



POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland

Phone: (48-22) 589 22 09; Fax: (48-22) 822 53 42; <http://www.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek
Pracownia Neurobiologii Molekularnej
Centrum Neurobiologii
Tel. +48 22 5892209
Email: b.kaminska@nencki.edu.pl

Warszawa, 08.01.2021

Ocena osiągnięcia naukowego, osiągnięć naukowo-badawczych i aktywności naukowej oraz dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego doktor Anny Grochot-Przęczek
pt. "Nowe nietypowe funkcje białek regulujących odpowiedź komórek śródblonka na stres oksydacyjny i ich znaczenie w patofizjologii komórek śródblonka"
w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ocena formalna

Jako osiągnięcie naukowe zgłoszono cykl 6 zbliżonych tematycznie publikacji, które składają się na dokonanie naukowe pt. „**Nowe nietypowe funkcje białek regulujących odpowiedź komórek śródblonka na stres oksydacyjny i ich znaczenie w patofizjologii komórek śródblonka**”. Otrzymane materiały w języku polskim i angielskim zawierają 1) autoreferat; 2) informację o przebiegu kariery, dorobku naukowym, dydaktycznym, wdrożeniowym i popularyzatorskim; 3) wykaz opublikowanych przez dr Annę Grochot-Przęczek prac wraz z kopiami najważniejszych publikacji opisujących jej osiągnięcia naukowe oraz oświadczenia współautorów wyrażających zgodę na wykorzystanie wieloautorskich publikacji w postępowaniu o nadanie dr. Anny Grochot-Przęczek stopnia doktora habilitowanego. Przedstawione materiały są kompletne i spełniają wymogi formalne określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych. Załączone oświadczenia współautorów definiują jednoznacznie jej istotny udział w stworzeniu koncepcji prac, pozyskaniu finansowania i przeprowadzenia doświadczeń. W pracach zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe dr Anny Grochot-Przęczek jest ostatnim i korespondencyjnym autorem. Dwie z tych prac, opublikowane w *Vasc Pharmacol 2019* i *Free Radic. Biol. Med. 2020*, są pracami przeglądowymi dotyczącymi białek będących przedmiotem prac doświadczalnych i podsumowują stan wiedzy na ich temat. Zgłoszone do osiągnięcia prace zostały opublikowane w międzynarodowych czasopiśmie specjalistycznych o dużej renomie i znaczącym współczynniku oddziaływania.

Ocena kariery zawodowej

Kariera zawodowa dr Grochot-Przęczek jest typowa dla naukowców polskich, gdyż związana jest z głównie jedną instytucją - Wydziałem Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz jednym opiekunem naukowym tzn. prof. dr hab. Alicją Józkowicz. Na szczęście zarówno w trakcie studiów doktorskich w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, jak po uzyskaniu doktoratu, miała okazję poznać różne środowiska naukowe, czerpać szeroką wiedzę i poznawać różne podejścia i metody naukowe.

Dr Grochot-Przęczek ukończyła studia magisterskie z biotechnologii wykonując pracę magisterską pod kierunkiem prof. dr hab. Alicją Józkowicz na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu

Jagiellońskiego (WBBB-UJ) w 2006 roku. W latach 2006-2009 była doktorantką Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i wykonywała pracę doktorską w Zakładzie Biotechnologii Medycznej WBBB-UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Alicją Józkowicz. Zarówno praca magisterska jak i doktorska dotyczyły roli oksydazy hemowej 1 (HO-1), pierwsza w leczeniu gojenia ran u myszy cukrzycowych, druga roli HO-1 w terapeutycznym zastosowaniu proangiogennych komórek pochodzenia szpikowego w angiogenezie. Pracę doktorską pt. „Zastosowanie proangiogennych komórek pochodzenia szpikowego w terapeutycznej angiogenezie – rola oksygenazy hemowej-1” wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Alicji Józkowicz obroniła w 2012 r. na WBBB-UJ.

W latach 2006-2012 pracowała w Zakładzie Biotechnologii Medycznej WBBB-UJ, a w latach 2012-2014 była asystentem w Pracowni Farmakologii Molekularnej Śródbłonna Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków UJ. Od 2014 r. jest adiunktem na Zakładzie Biotechnologii Medycznej WBBB-UJ.

W trakcie swojej pracy naukowej dr Grochot-Przęczek odbyła dwa krótkie staże naukowe w kontynuując swoje wcześniejsze zainteresowania nad mechanizmami angiogenezy. Pierwszy, 3 tygodniowy staż naukowy odbyła w trakcie studiów doktorskich w laboratorium Dr. Anupama Agarwala na Uniwersytecie Alabama w Birmingham, USA. Kolejny 12 miesięczny staż odbyła jako wizytujący badacz w na Uniwersytecie Medycznym w Wiedniu, gdzie współpracowała z prof. Christophem Neumayerem i prof. Ihorem Hukiem z Oddziału Chirurgii Naczyń Krwionośnych. W karierze dr Grochot-Przęczek brakuje niestety regularnego postdoka, wyjścia poza strefę komfortu, możliwości zapoznania się z technikami i tematami nieco bardziej odległymi od jej pierwotnych zainteresowań. Jest to pewne ograniczenie, które odbija się trochę na jakości jej publikacji, w których stosuje dobrze sobie znane techniki i ogranicza się do podobnej problematyki.

Dr Grochot-Przęczek jest współautorem 23 prac badawczych i 8 przeglądowych, z czego 14 prac badawczych i 5 przeglądowych opublikowała po uzyskaniu stopnia doktora. Są to w większości prace opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych, o znaczącym *impact factor* (IF). Ich tematyka związana jest z analizą molekularnych mechanizmów angiogenezy i różnicowania komórek mezenchymalnych i śródbłonna, regulacją transkrypcji, roli HO-1 i miRNAs w tych procesach, farmakologicznej modulacji tych procesów. Widać w tego, że dr Grochot-Przęczek aktywnie uczestniczyła w licznych projektach realizowanych w zakładzie kierowanym przez prof. Józefa Dulaka i prof. Alicję Józkowicz. Jej dorobek naukowy można uznać za bardzo dobry, wyniki oceny naukometrycznej pokazują, że jej prace wzbudziły znaczne zainteresowanie środowiska naukowego i były cytowane 1224, a indeks Hirscha wynosi 16. Jest to znacząca liczba cytowań wskazująca na zainteresowanie jej pracami. Wyniki swoich prac prezentowała na licznych konferencjach zagranicznych, bardzo często w postaci referatów zaproszenie lub wybranych ze streszczeń.

Za swoją działalność naukową dr Grochot-Przęczek uzyskała liczne nagrody-stypendia, w tym dwukrotnie stypendium START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, stypendium Fundacji L'Oreal dla Kobiet i Nauki oraz Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (dla wybitnych naukowców).

W trakcie swojej działalności uczestniczyła jako wykonawca w 9 projektach badawczych, a w ostatnich latach była i jest kierownikiem 3 projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Projekty te dotyczą zagadnień związanych z rolą czynnika NRF2 w angiogenezie indukowanej przez GDF-15 i SDF-1 oraz roli miRNA 34a w komórkach śródbłonna.

Ocena osiągnięcia naukowego stanowiącego jednotematyczny cykl publikacji

Rozprawę habilitacyjną stanowi monotematyczny cykl prac pt. ” **Nowe nietypowe funkcje białek regulujących odpowiedź komórek śródbłonna na stres oksydacyjny i ich znaczenie w patofizjologii komórek śródbłonna**”, który składa się z 6 prac (4 doświadczalne i 2 przeglądowe) opublikowanych w

dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej o znaczącym IF. Mimo iż prace są wieloautorskie dr Grochot-Przęczek jest wiodącym i korespondencyjnym autorem we wszystkich zgłoszonych jako osiągnięcia pracach. Autoreferat dr Grochot-Przęczek stanowi bardzo dobre, skrótowe omówienie prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego.

W pracy Kloska i wsp. (*Antioxid Redox Signal. 2019*) podjęto zagadnienie roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 na powstawanie naczyń krwionośnych. Jako model doświadczalny wykorzystano hodowle pierwotne ludzkich komórek śródbłonna aorty, które były stymulowane czynnikami proangiogennymi SDF-1 and GDF-15 oraz myszy pozbawione Nrf2. Doświadczenia z wyciszeniem Nrf2 za pomocą siRNA wykazały ważną rolę białka Nrf2, ale w sposób niezależny od jego aktywności transkrypcyjnej. Angiogeneza była zaburzona w komórkach śródbłonna z obniżoną ekspresją Nrf2, ale nie w komórkach z ekspresją dominującej negatywnej formy Nrf2 lub fragmentu Nrf2 wiążącego Keap1. Wykazano, że Nrf2 służy jako hamujące białko Keap1 (białko 1 związane z ECH podobne do Kelcha), znany represor transkrypcji. Wzrost poziomu białka Nrf2 dostępnego dla Keap1 prowadził do wzrostu RhoGAP1 (białko aktywujące Rho GTPazę 1) i Cdc42 (regulator podziału komórkowego). Stwierdzono, że utrudnia to także agregację podosomów i zakłóca reorganizację aktyny, zapobiegając w ten sposób angiogenezie. Skutki niedoboru Nrf2 były odwrócone przez jednoczesne wyciszenie RhoGAP1 lub Keap1. W mysim modelu stwierdzono, że rozwój siatkówki oka przebiegał podobnie u myszy z prawidłowym genotypem i Nrf2KO. Mysi model braku Nrf2 okazał się nieadekwatny, gdyż zachowany był N-końcowy fragment Nrf2 zawierający domenę wiążącą Keap1. Mógł więc służyć do badania Nrf2 jako czynnika transkrypcji, ale nie jako białka sekwestrującego Keap1. Wyniki tych badań ujawniły nową funkcję czynnika Nrf2 niezwiązaną bezpośrednio z regulacją transkrypcji, co pozwoliło odmiennie interpretować wcześniejsze dane dotyczące systemu Nrf2-Keap1.

W kolejnej pracy Kopacz i wsp. (*Redox Biol 2020*) analizowano funkcje Nrf2 w odpowiedzi na stres komórkowy. Pokazano, że zarówno pierwotne hodowle ludzkich komórek śródbłonna, jak i komórki mysiej aorty pozbawione Nrf2 starzeją się w hodowli, ale nie towarzyszy temu stres oksydacyjny (wykazano brak zmian markerów stresu), pojawia się natomiast zwiększona S-nitrozylacja białek. Funkcjonalna rola S-nitrozylacji obejmuje przeciwdziałanie uszkodzeniom oksydacyjnym i indukcji starzenia komórek, w których pośredniczy NOX4. Stwierdzono, że S-nitrozylacja i starzenie są regulowane przez Keap1, partnera Nrf2, który kolokalizuje z syntazą tlenu azotu (NOS) i nitrozylowanym białkiem GAPDH w komórkach śródbłonna pozbawionych Nrf2. Zahamowanie aktywności transkrypcyjnej Nrf2 wraz z poddaniem się warunkom naprężenia (shear stress) indukowało starzenie w ludzkich komórkach śródbłonna (co prawda wykorzystano tylko jeden marker starzenia - barwienie aktywności β -galaktozydazy). Zaproponowano hipotezę, że nadmiar „niezwiązanego” Keap1 determinuje los tych komórek poprzez regulację S-nitrozylacji, między innymi białek takich jak NOX4. W pracy zastosowano imponujący i obszerny zestaw metod (w tym spektrometrię mas do identyfikacji różnicowo nitrozylowanych białek), dlatego wyniki są bardzo przekonujące.

Praca Loska i wsp. (*Vascul Pharmacol 2019*) podsumowuje uzyskane wyniki i przedstawia je w szerokim kontekście starzenia komórek nabłonka naczyń, w czym upatrywano patomechanizmów dysfunkcji tych komórek śródbłonna i podłoża chorób (przy okazji zwracam uwagę, że nie ma słowa senescencja w języku polskim, więc należy go unikać). Podkreślono znaczenie nowego mechanizmu interakcji Nrf2 i Keap1. Ponieważ Nrf2 jest znany jako regulator stresu oksydacyjnego, odkrycie jego innych funkcji i brak wpływu na stres oksydacyjny w badanych modelach komórkowych było zaskakujące.

W kolejnej pracy Kopacz i wsp. (*Redox Biol 2020*) podjęte dalsze badania nad rolą Keap1 w regulacji proteostazy białek i ich roli w starzeniu komórek śródbłonna. Nieprawidłowo sfałdowane białka mogą indukować stres komórkowy, który prowadzi do zmian patologicznych. Zbadano, czy starzenie komórek

śródbłonka zależne od Nfr2 związane jest z zaburzeniem mechanizmów proteostazy białek wykorzystując komórki ludzkiego śródbłonka od dawców młodych i starszych (>60 lat) oraz komórki śródbłonka myszy WT i Nfr2 KO. Wykazano, że zarówno fizjologiczne jak i przedwczesne starzenie powoduje tworzenie się agregatów białkowych w komórkach śródbłonka, co skutkuje zahamowaniem proliferacji i prawidłowej angiogenezy. Za pomocą mikroskopii sił atomowych pokazano sztywne struktury cytoplazmatyczne zawierające agregaty białek w komórkach Nfr2 KO. Było to powiązane z upośledzeniem autofagii, obecnością nitrozylowanych białek i kolokalizacją z Keap1. Przy użyciu spektrometrii mas stwierdzono obecność w tych agregatach białek zaangażowanych w proces translacji, zwijania białek, tworzenie kompleksów rybosomalnych. Większość z nich zawierała motyw podobny do ETGE lub zwiększoną ilość aminokwasów promujących struktury nieuporządkowane. Wyciszenie ekspresji Keap1 odwracało ten fenotyp w komórkach Nfr2 KO, wskazując na udział interakcji KEAP1-Nrf2 w tych procesach. Wyniki tych badań oraz przegląd danych na temat roli Keap1 w różnych procesach podsumowano w pracy przeglądowej Kopacz i wsp. (*Free Radic Biol Med.* 2020). W pracy podkreślono znaczenie równowagi między Keap1 i Nrf2 dla zachowania homeostazy komórek śródbłonka i zapobiegania przedwczesnego starzeniu komórek. Wyniki tych pracy są bardzo oryginalne, zwracają uwagę na nieznane wcześniej aspekty fizjologii komórek śródbłonka. Zwraca uwagę konsekwencja w odkrywaniu kolejnych mechanizmów i logiczny ciąg doświadczeń prowadzących do końcowych wniosków.

Praca Kloska i wsp. (*Arch Biochem Biophys.* 2019) dotycząca roli reduktazy biliwerdyny (BVR) w komórkach ludzkiego śródbłonka i jego funkcje, odbiega trochę tematycznie, gdyż w centrum uwagi jest BVR. Pokazano w tej pracy, że wyciszenie ekspresji BVR w komórkach ludzkiego śródbłonka zmienia morfologie komórek, prowadzi do utraty markerowych białek oraz potencjału angiogenego z jednoczesnym wzrostem ekspresji białek mezenchymalnych. Zmiany te wskazywały na indukcję procesu tzw. przejścia śródbłonkowo-mezenchymalnego – EndMT (odpowiednika EMT, epithelial-mesenchymal transition). Komórki BVR KO wykazywały zmienioną ekspresję genów związanych z syntezą/transportem hemu, podwyższony poziom Nrf2 i HO-1, akumulację wolnego żelaza, ROS i uszkodzenia oksydacyjne. Podanie bilirubiny nie przywracało stanu prawidłowego, a także indukowało EndMT w komórkach kontrolnych. Sformułowano hipotezę, że indukcja EndMT w komórkach BVR KO związana jest z nadmierną produkcją żelaza i wynikająca ze zwiększenia aktywności HO-1 i degradacji hemu. Usunięcie HO-1 w komórkach BVRKO odwracało wspomniane procesy i przywracało równowagę i fenotyp śródbłonka. Wykazano rolę hemu w ekspresji niektórych genów kluczowych dla metabolizmu żelaza i hemu oraz postulowano, że mechanizmem indukcji EndMT przez brak BVR, jest regulacja transportu hemu do jądra komórkowego przez BVR, co byłoby nietypowa, nieenzymatyczną aktywnością tego białka. Po raz kolejny zwraca uwagę fakt stawiania hipotezy i konsekwentnego jej weryfikowania poprzez badanie mechanizmów za pomocą różnych narzędzi badawczych.

Przedstawiony cykl publikacji wskazuje, że dr Grochot-Przeczek realizuje ważne poznawczo i ciekawe projekty, weryfikuje nowatorskie hipotezy, wykorzystując nowoczesne metody badawcze z zakresu biologii molekularnej i komórkowej, uzyskuje wartościowe wyniki naukowe, które są publikowane w bardzo dobrych czasopismach specjalistycznych. Dr Anna Grochot-Przeczek jest bardzo aktywnym badaczem w dziedzinie, którą można określić jako mechanizmy molekularne regulujące funkcje komórek śródbłonka naczyń i ekspresję genów w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. Jej prace pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy różnych procesów patologicznych śródbłonka i związanych z tym chorób. Choć tematyka prac jest powiązana i wynika z zainteresowań opiekunki Kandydatki, prof. Alicji Józkowicz, wyraźnie widać, że dr Grochot-Przeczek znalazła sobie własną niszę i realizuje własne projekty badawcze dotyczące nowych zagadnień w zespole.

Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Dr Grochot-Przęczek jest aktywnie zaangażowana w opiekę nad studentami i młodymi kadrami naukowymi. Z dostarczonych materiałów wynika, że jest promotorem pomocniczym w 2 przewodach doktorskich, była promotorem 8 prac magisterskich i 4 prac licencjackich. Prowadziła przez 2 lata wykład dla „Biochemia stresu oksydacyjnego”, jest koordynatorem kursu praktycznego z produkcji i zastosowania wektorów wirusowych oraz prowadzi różne seminaria.

Dr Grochot-Przęczek uczestniczyła w organizacji sesji naukowej i działalności komitetów naukowych i organizacyjnych zjazdów krajowych i zagranicznych (np. Kongres BIO2016 w Warszawie, Vascular Biology Symposium 2019 w Wiedniu, International Conference on Heme Oxygenase and Related Enzymes in Los Angeles, 2021). Współpracowała z firmą farmaceutyczną Adamed nad rozwojem związków o działaniu przeciwnowotorowym. Recenzowała manuskrypty dla wielu czasopism i projekty naukowe dla organizacji polskich i zagranicznych. Uczestniczyła w panelu Narodowego Centrum Nauki. Świadczy to o jej rozpoznaniu w środowisku naukowym i docenieniu kompetencji naukowych. **Ogólnie oceniam bardzo pozytywnie jej aktywność dydaktyczną i organizacyjną na tym etapie rozwoju zawodowego.**

Podsumowanie i wniosek końcowy

Na podstawie oceny dokumentacji szczególnego osiągnięcia naukowego (w znaczeniu Art. 219 ust.1 pkt. 2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. poz. 1668)), osiągnięć naukowo-badawczych, dorobku dydaktycznego oraz współpracy międzynarodowej, stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego, **bardzo wysoko oceniam całokształt dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Anny Grochot-Przęczek.** Cykl publikacji dotyczący roli białek Nrf2, Keap1 i HO-1 w regulacji ekspresji genów, nieprawidłowym fałdowaniu, agregacji i nitrozylacji białek, mechanizmach różnicowania i starzenia komórek śródbłonna stanowi oryginalny, nowatorski i bardzo ważny z klinicznego punktu widzenia wkład do naszej wiedzy. Na duże uznanie zasługuje skuteczność w zdobywaniu funduszy na badania. Całościowy dorobek oraz przedstawione osiągnięcie **dr Anny Grochot-Przęczek** stanowi znaczący wkład do rozwoju nauki, w pełni odpowiadający kryteriom stawianym przy ubieganiu się o stopień doktora habilitowanego, zgodnie z wymaganiami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. "Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce". **Z wyżej wymienionych powodów rekomenduję Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wsparcie wniosku o nadanie dr Anny Grochot-Przęczek stopnia doktora habilitowanego.** Uważam, że osiągnięcie naukowe Kandydatki zasługuje na wyróżnienie, gdyż przedstawiono cykl wybitnych prac, opublikowanych w bardzo dobrych specjalistycznych czasopismach. Na podkreślenie zasługuje użycie przez nią szerokiego wachlarza nowoczesnych metod, podjęcie ciekawego problem, zbadanie go wszechstronnie i kompleksowe.

Z poważaniem


Prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek