

RECENZJA

wniosku w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu w dyscyplinie Nauki Medyczne dr n. med. Agnieszka Anna Rawłuszko-Wieczorek na podstawie cyklu publikacji pt.: „Znaczenie wewnątrztkankowych przemian estrogenów w prognozowaniu przeżycia pacjentów oraz ścieżki sygnałowej zależnej od receptora estrogenowego typu β w odpowiedzi na hipoksję w raku jelita grubego”.

Recenzję przygotowano w oparciu o otrzymaną dokumentację:

1. Wniosek przewodni
2. Dane wnioskodawcy
3. Poświadczenie uzyskania stopnia doktora – kopia dyplomu
4. Autoreferat
5. Wykaz osiągnięć naukowych
6. Bibliometria
7. Oświadczenia współautorów
8. Wykaz publikacji, w tym kopii prac stanowiących osiągnięcie naukowe
9. Zaświadczeń o odbytych zagranicznych stażach naukowych
10. Zaświadczeń o kierowaniu grantami

Sylwetka Kandydatki

Dr Agnieszka Anna Rawłuszko-Wieczorek ukończyła Wydział Biologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, na kierunku biotechnologia, otrzymując stopień magistra biotechnologii w lipcu 2008 r.

Następnie podjęła pracę na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, gdzie uzyskała w dniu 12 marca 2014 r. stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Tytuł rozprawy: „Regulacja epigenetyczna wybranych genów zaangażowanych w odpowiedź na hipoksję w raku jelita grubego.” Promotorem rozprawy był

prof. dr hab. Paweł P. Jagodziński, zaś samą pracę wyróżniono Nagrodą Rektora dla Nauczycieli Akademickich UMP.

Od 2009 roku związana jest z Uniwersytetem Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, początkowo na stanowisku asystenta i później adiunkta w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej, a od roku 2018 w Instytucie Biostrukturalnych Podstaw Nauk Medycznych, Zakład Histologii i Embriologii UMP, obecnie na stanowisku adiunkta. Wcześniej odbyła długoterminowy zagraniczny staż naukowy na Uniwersytecie Floryda, Gainesville, Stany Zjednoczone (2008 r) oraz w latach 2015-2017 na Uniwersytecie w Stuttgarcie, Niemcy.

Kandydatka nie ubiegała się dotąd o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Dorobek naukowy kandydatki

W trakcie dotychczasowej kariery zawodowej dr Agnieszka Anna Rawłuszko-Wieczorek koncentrowała zainteresowania naukowe wokół tematyki związanej z podłożem epigenetycznym oraz etiologią raka jelita grubego. W związku ze złożonym podłożem genetycznym i epigenetycznym leżącymi u podstaw rozwoju raka jelita grubego Kandydatka podjęła się zgłębienia tematu znaczenia wewnątrztkankowych przemian estrogenów oraz ścieżki sygnałowej aktywowanej przez receptor estrogenowy typu β , odpowiadając tym samym na rosnące ostatnio zainteresowanie środowiska naukowego tym receptorem steroidowym w kontekście wykorzystania go jako biomarkera, min. w terapii spersonalizowanej. Dzięki współpracy z zespołem klinicystów Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu udało się dr Rawłuszko-Wieczorek zrealizować szereg badań ujętych we wniosku habilitacyjnym, które były, co godne jest podkreślenia, finansowane zarówno ze środków statutowych i grantów wewnętrzuczelnianych, jak również ze środków pozyskanych w ramach konkursów Narodowego Centrum Nauki, tzn. PRELUDIUM 3 oraz HARMONIA10, których była lub jest kierownikiem.

Wcześniej w okresie przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora pani Rawłuszko-Wieczorek prowadziła badania min. nad wpływem ligandów receptora AhR na ekspresję polimerazy k i RNA II na modelu wątroby szczura. Wykazała w nich, że zmiany obu polimeraz są powiązane ze zmianami ekspresji genów kontrolnych: Cyp1a1 oraz Cyp1b1 zaangażowanych w detoksykację ksenobiotyków w wątrobie.

Kandydatka prowadziła także badania nad zmianami ekspresji enzymów zaangażowanych w syntezę estrogenu w raku jelita grubego. Pierwsze prace związane z tym tematem dotyczyły obserwacji zmian ekspresji genu HSD17 β 1, którego produkt odpowiada za konwersję E1 do E2 oraz wykazania po raz pierwszy powiązaniego z tym mechanizmu kontroli jego ekspresji poprzez metylację DNA regionu promotorowego HSD17 β 1. Ponadto Kandydatka wykazała wpływ maślanu sodu na obniżenie ekspresji aromatazy cytochromu P450 w liniach komórkowych CRC, co skutkowało zmniejszoną konwersją androstendionu (A) do E1.

W innych badaniach Kandydatka oceniała wpływ metylacji DNA na ekspresję genów zaangażowanych w kontrolę odpowiedzi na hipoksję w raku jelita grubego. W pracy tej, bezpośrednio związanej z rozprawą doktorską, wykazała odwrotną korelację pomiędzy ilością transkryptów analizowanych genów i stopniem metylacji DNA w obrębie wysp CpG u pacjentów z rakiem jelita grubego dla genu PHD3 i HIF2A. Wyniki te zostały uzupełnione eksperymentami *in vitro* na ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego z zastosowaniem związków chemicznych wpływających na przywrócenie ekspresji tych genów.

Podczas pracy w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej dr Rawłuszko-Wieczorek podjęła badania nad stresem oksydacyjnym u osób z cukrzycą typu 1. W trakcie tych badań wykonała oznaczenia poziomu ekspresji genu dla dysmutazy ponadtlenkowej 2, co pozwoliło na zaobserwowanie, że mimo wyższej ekspresji SOD2 u pacjentów z cukrzycą typu 1, ilość białka SOD2 była niższa u pacjentów z powikłaniami mikronaczyniowymi, co może wskazywać na potencjalnie zaburzoną odpowiedź na stres oksydacyjny.

Po uzyskaniu stopnia doktora Kandydatka skoncentrowała badania nad regulacją epigenetyczną ekspresji TET w raku jelita grubego i w endometriozie. Autorka wykazała korelację ekspresji genu TET2 ze współczynnikiem 5-letniego przeżycia pacjentów oraz metylację DNA regionu promotorowego TET1 w podgrupie pacjentów z rakiem jelita grubego, co wskazywało na nowy mechanizm kontroli jego ekspresji.

Dr Rawłuszko-Wieczorek w trakcie stażu podoktorskiego w Stuttgarcie zajmowała się poszukiwaniem nowych białek zaangażowanych w odczytywanie potranslacyjnych modyfikacji histonów. Brała udział w opracowaniu nowej metody wykrywania 'readers' (tj. miejsc dokujących dla białek rozpoznających modyfikacje) opartej o drożdżowy test trójhybrydowy. Z powodzeniem przeprowadziła eksperyment potwierdzający specyficzność nowo

opracowanej metody. W trakcie pobytu w Niemczech prowadziła również badania nad poznaniem specyficzności wiązania domen rozpoznających modyfikacje chromatyny w obrębie białek KMT2A. W 2019 r. rozpoczęła badania nad modyfikacją epigenetyczną, N6-metyloadenozyny w RNA. Badania przeprowadzane w ramach pracy doktorskiej, w której pełni rolę promotora pomocniczego, dotyczą badania zmian poziomu metylacji adenozyny w pozycji 6 RNA oraz enzymów odpowiadających za jej wprowadzenie, rozpoznanie oraz usunięcie z łańcucha RNA u pacjentów z nowotworami głowy i szyi. Ponadto, prowadzone badania in vitro mają na celu sprawdzenie w jaki sposób wyciszenie poszczególnych genów związanych bezpośrednio z m6A ma wpływ na przeżycie komórek nowotworowych, odpowiedź na chemio- lub radioterapię, także w warunkach hipoksji.

Warto zaznaczyć, że cykl prac ujęty we wniosku habilitacyjnym skłonił habilitantkę do dalszych badań i prób wykazania, że w obecności kompleksu ER β -E2 zmienia się dostępność chromatyny oraz, że to czynniki epigenetyczne odgrywają znaczącą rolę w dostosowaniu odpowiedzi transkrypcyjnej kierowanej przez ER β w komórkach raka jelita grubego. Całościowy opis możliwości, w jaki sposób receptor estrogenowy wraz z różnymi modyfikacjami epigenetycznymi może kształtować transkryptom danej komórki, opisała w pracy poglądowej. Obecnie prowadzi badania, finansowane w ramach grantu SONATA, które mają na celu zidentyfikowanie mechanizmów epigenetycznych zaangażowanych w regulację odpowiedzi komórkowej zależnej od ER β . Z kolei projekt HARMONIA ma na celu kompleksowe zidentyfikowanie kluczowych czynników epigenetycznych biorących udział w odpowiedzi na hipoksję. Przedstawiona w cyklu habilitacyjnym praca oznaczona jako P4 została częściowo zrealizowana dzięki środkom pochodzącym z tego grantu i wskazuje, jak czynnik transkrypcyjny (ER β) wraz z epigenetycznymi koregulatorami moduluje ekspresję HIF1A oraz genów docelowych zaangażowanych w odpowiedź na hipoksję.

Ponadto dr Rawłuszko-Wieczorek w ramach współpracy międzynarodowej prowadzi badania we wspólnym granicie (CZS Meet & Work finansowanym przez Carl-Zeiss-Stiftung) nad hipoksją w oparciu o model 3D do obserwacji zmian migracji komórek w zależności od wprowadzonych modyfikacji epigenetycznych.

**Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora
habilitowanego pt.**

„Znaczenie wewnątrztkankowych przemian estrogenów w prognozowaniu przeżycia pacjentów oraz ścieżki sygnałowej zależnej od receptora estrogenowego typu β w odpowiedzi na hipoksję w raku jelita grubego”.

Celem cyklu czterech prac naukowych było wykazanie roli wewnątrztkankowej puli estrogenów w raku jelita grubego oraz znaczenia ER β w warunkach hipoksji, czyli obniżonego stężenia parcjalnego tlenu w obrębie guza.

Kandydatka opublikowała 4 prace dotyczące tego zagadnienia. Najważniejszym efektem pierwszej z tych prac („Reduced expression of steroid sulfatase in primary colorectal cancer.” 2013, Biomed Pharmacother. 67(7):577-82. doi: 10.1016/j.biopha.2013.04.007) było wykazanie istotnie niższej ekspresji sulfatazy steroidowej (STS) na poziomie transkryptu u 90 pacjentów z rakiem jelita grubego w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienną w szczególności w grupie pacjentów powyżej 60 roku życia, w stadium G2 nowotworu oraz w guzie zlokalizowanym w części proksymalnej jelita grubego. Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę o ochronnym działaniu E2 w CRC i w związku z tym potencjalnym obniżeniem ekspresji genów zaangażowanych w jego endogenną syntezę. W dalszej części tych badań Kandydatka wykazała, że inkubacja linii komórkowych CRC, HCT116 i DLD-1, z niewielką dawką maślanu sodu istotnie zwiększa ilość transkryptu genu STS a przeprowadzone obserwacje potwierdzają hipotezę o potencjalnym ochronnym znaczeniu estrogenu w CRC i jednocześnie także antynowotworowe właściwości maślanu sodu.

W drugiej publikacji, „Effect of DNA methylation profile on OATP3A1 and OATP4A1 transcript levels in colorectal cancer.” w Biomed Pharmacother. 74: 233-42. doi: 10.1016/j.biopha.2015.08.026 w roku 2015, wykazała istotny statystycznie wyższy poziom transkryptu genu OATP4A1 oraz niższy poziom transkryptu genu OATP3A1 w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką histopatologicznie niezmienną pobraną od tego samego pacjenta (n=103), jednak analiza 5-letniego przeżycia pacjentów nie wykazała tych zmian jako potencjalnych niezależnych czynników prognostycznych. Zróznicowanie ekspresji tych dwóch genów w obrębie tej samej tkanki może wskazywać na ich odmienną rolę w

kontekście transportowanych substratów w raku jelita grubego. Wyniki tych prac sugerują mechanizm odpowiadający za wyciszenie ekspresji OATP3A1 poprzez metylację DNA.

W kolejnej pracy, „Significance of intratissue estrogen concentration coupled with estrogen receptors levels in colorectal cancer prognosis.” w *Oncotarget* (2017, 14;8(70):115546-115560. doi:10.18632/oncotarget.23309), habilitantka przedstawiła wyniki opracowania ultraczułej metody pomiaru endogennego stężenia E1 i E2 (z czułością do 10 fg/ml) za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas i jonizacją elektrosprej. Dr Rawłuszko-Wieczorek wykazała w tej pracy dłuższy wskaźnik 5-letniego przeżycia bez wznowy u pacjentów z rakiem jelita grubego z wysoką ekspresją ESR1 powiązaną z wysokim stężeniem E1. Można przyjąć, że dopiero obserwacje Kandydatki zawarte w trzeciej publikacji po raz pierwszy wskazują na powiązanie endogennych poziomów E1 i E2 z receptorami estrogenowymi w próbach pochodzących od tych samych pacjentów i potwierdzają na materiale tkankowym wcześniejsze doniesienia oparte na modelu *mysim*.

W ostatniej publikacji, „Estrogen receptor β affects hypoxia response in colorectal cancer cells.” w *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Basis of Disease*; doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166894 w roku 2023, po raz pierwszy Kandydatka opisała hamujący wpływ obecności ER β na skuteczną odpowiedź na hipoksję komórek nowotworowych oraz zasugerowała możliwe elementy złożonego mechanizmu jego działania. Warto dodać, że z punktu widzenia profilaktyki nowotworowej wyniki tych prac stanowią istotny punkt wyjścia do dalszych badań nad poszukiwaniem specyficznych biomarkerów raka jelita grubego.

Podsumowując wyniki badań przeprowadzonych przez dr Rawłuszko-Wieczorek w ramach cyklu składającego się na osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, należy podkreślić, że we wszystkich czterech publikacjach kandydatka jest pierwszym ich autorem, zaś jej rola we wszystkich tych badaniach była wiodąca. Badania i uzyskane wyniki mają charakter w znacznej mierze pionierski.

Wskazane przez kandydatkę najważniejsze osiągnięcia naukowe będące rezultatem przeprowadzonych przez nią badań stanowią w opinii recenzenta bardzo istotny wkład w rozwój reprezentowanej przez dr Rawłuszko-Wieczorek dyscypliny naukowej. W szczególności

zaś wkład w badania nad rozwojem raka jelita grubego. Kandydatka w sposób zwięzły przedstawiła te osiągnięcia w swoim autoreferacie w ośmiu punktach.

Dr Agnieszka Anna Rawłuszko-Wieczorek spełnia kryteria dotyczące wykazania się istotną aktywnością naukową.

Analiza danych naukometrycznych kandydatki

Dr Rawłuszko-Wieczorek posiada bogaty dorobek naukowy. Poza cyklem stanowiącym osiągnięcie naukowe składa się nań łącznie 15 publikacji, z których 12 stanowią oryginalne prace naukowe, zaś trzy prace poglądowe. W 9 pracach była pierwszym autorem (IF tylko tych 9 prac = 34,715). Ponadto kandydatka może pochwalić się 9 komunikatami zjazdowymi, w tym 2 zagranicznymi.

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi 4 publikacje w recenzowanych czasopismach posiadających łączny IF = 10,634, przy punktacji MNiSW = 225 oraz cytowanych ogółem 28 razy. Kandydatka jest w tych publikacjach każdorazowo pierwszym autorem.

Sumaryczna punktacja Impact Factor wszystkich jej prac wynosi 67,031, w tym dla prac poza cyklem: 56,397. Liczba cytowań według Web of Science: 252, bez autocytowań: 215. Indeks Hirscha (według Web of Science) wynosi 9.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW wynosi 885.000, przy czym dla prac poza cyklem: 660.000.

Należy zaznaczyć, że kandydatka publikowała w dobrych czasopismach znajdujących się na tzw. liście filadelfijskiej min. w Biomedicine and Pharmacotherapy, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Molecular Cancer Research lub Biochimica et Biophysica Acta.

Inne obszary aktywności zawodowej

1. Dydaktyka.

Dr Rawłuszko-Wieczorek prowadzi od wielu lat zajęcia (seminaria i ćwiczenia) dla studentów I lub II roku kierunku lekarskiego oraz lekarsko-stomatologicznego z biochemii, biologii molekularnej, również dla studentów anglojęzycznych. Ponadto,



od roku 2018 prowadzi wykłady, seminaria oraz ćwiczenia z histologii dla studentów I roku kierunku lekarskiego i lekarsko-dentystycznego, również dla obcokrajowców. Od ponad 10 lat realizuje również inne zadania z zakresu dydaktyki, min. była opiekunem Koła Naukowego Biochemii i Biologii Molekularnej, promotorem pracy inżynierskiej i prac magisterskich, a także ich opiekunem. Jest promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich.

2. Osiągnięcia organizacyjne.

Dr Rawłuszko-Wieczorek kierowała bądź dalej kieruje wieloma grantami finansowanymi min. przez NCN:

PRELUDIUM 3 (2012/05/N/NZ5/00844). Czas realizacji: 29/01/2013-28/01/2016,

HARMONIA 10 (2018/30/M/NZ5/00831). Czas realizacji: 12/04/2019-11/04/2024,

SONATA 17, NCN (2021/43/D/NZ5/02295). Czas realizacji: 24/06/2022-23/06/2025.

Pełniła rolę głównego wykonawcy we wspomnianym grantie CZS Meet & Work (P2022-11-001) finansowanym przez Carl-Zeiss-Stiftung, Niemcy. Kierowała 3 grantami przyznanymi przez Uniwersytet Medyczny w Poznaniu w ramach konkursu „Młodzi Naukowcy” oraz była opiekunem naukowym 2 grantów studenckich.

Kandydatka wielokrotnie podejmowała działania popularyzujące naukę, w tym brała udział w szkoleniach z pisania wniosków o granty indywidualne Marii Skłodowskiej-Curie organizowanych przez Regionalny Punkt Kontaktowy Programów Ramowych Unii Europejskiej. Została wybrana jako Ambasador Nauki w projekcie realizowanym przez Euraxess wspólnie z Ministerstwem Nauki i Szkolnictwa Wyższego, którego celem było promowanie mobilności naukowców. Zostało to udokumentowane w formie filmu internetowego.

Działania popularyzujące naukę objęły również inne wystąpienia konferencyjne a także webinaria organizowane przez Akademię Młodych Uczonych, PAN. W roku 2017 współorganizowała konferencję „Nauka- to takie proste!”.

W swojej karierze zawodowej kandydatka otrzymała wiele nagród i wyróżnień, min. Nagrody Naukowe Rektora Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu,

stypendium indywidualne M. Skłodowskiej-Curie (program Horyzont) oraz granty podróżne.

Należy podkreślić, że bogaty dorobek dr Rawłuszko-Wieczorek został zgromadzony pomimo kilku przerw w pracy naukowej spowodowanych urlopami macierzyńskimi oraz rodzicielskimi.

Od 2010 roku jest członkinią Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Była recenzentem 14 publikacji w polskich i zagranicznych czasopismach.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dokumentacja, w tym publikacje składające się na osiągnięcie naukowe, autoreferat, wykaz osiągnięć naukowych, dane bibliometryczne, zaświadczenia o odbytych zagranicznych stażach naukowych oraz zaświadczenia o kierowaniu grantami naukowymi, a także działalność dydaktyczna i organizacyjna pani dr Agnieszki Anny Rawłuszko-Wieczorek odpowiadają wymaganiom określonym w art. 219 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. z 2020, poz. 85 z późniejszymi zmianami) i pozwalają jej przystąpić do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Wrocław, 07.03.2024


prof. dr hab. Piotr Ziółkowski

