

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Rudnickiej pt.

*„Lifestyle-dependent epigenetic signature
and the impact of lifestyle on epigenetic age acceleration”*

Promotor: Prof. dr hab. Wojciech Branicki

Praca wykonana w ramach grantu NCBiR „EPIGENOM”

Recenzent: Prof. dr hab. Ewa Ziętkiewicz

1. Tematyka rozprawy:

Praca doktorska mgr Joanny Rudnickiej dotyczy coraz częściej badanych zagadnień związanych z wpływem stylu życia na biologię organizmu w zdrowiu i chorobie, wywieranego poprzez wpływ na epigenom. Identyfikacja epigenetycznych markerów czynników związanych ze stylem życia jest niezwykle istotna dla rozszerzenia wiedzy na temat szybkości epigenetycznego starzenia, a stworzenie wydajnych narzędzi predykcyjnych opartych o metylację DNA ma ogromne znaczenie w dyscyplinie nauki biologiczne, zarówno w kontekście wiedzy podstawowej jak i praktycznej. Potrzeba prowadzenia badań, mających na celu lepsze poznanie i zrozumienie złożonych związków epigenomu z czynnikami środowiskowymi z jednej strony, a fenotypem z drugiej, jest rzeczą oczywistą. Przedłożona do recenzji dysertacja doskonale wpisuje się w ten nurt badań. Przedstawione przez Doktorantkę badania oparte są o analizę asocjacji odwracalnych i nieodwracalnych zmian metylacji w całym epigenomie (analiza EWAS – *epigenome-wide association studies*) z wybranymi czynnikami behawioralnymi, w poszukiwaniu sygnatur epigenetycznych związanych z tymi czynnikami i określenia ich implikacji funkcjonalnych na poziomie organizmu oraz wpływu na starzenie epigenetyczne. Dodatkowo, dysertacja zawiera ważny element praktyczny, w którym Autorka skupia się na porównaniu przydatności wybranych wysokoprzepustowych technologii w zastosowaniu do celowanej analizy metylacji DNA. Jako główny **cel pracy** Autorka przedstawiła identyfikację różnicowo metylowanych pozycji skorelowanych z różnymi czynnikami behawioralnymi, w kohorcie osób z Polski. Jako cele pośrednie wymieniła: analizę EWAS połączoną z interpretacją funkcjonalną; opracowanie nowego modelu predykcyjnego w oparciu o epigenetyczne markery palenia tytoniu; analizę stylu życia w odniesieniu do starzenia epigenetycznego; selekcję najlepszej technologii celowanego NGS przydatnej w analizie metylacji DNA.

2/3. Wiedza i samodzielność kandydatki:

Rozprawa doktorska bardzo dobrze dokumentuje rozległą wiedzę teoretyczną Doktorantki. Imponująca liczba 427 **referencji** obejmuje istotne dla tematu pracy piśmiennictwo z ostatnich kilkunastu lat. **Wstęp** stanowi rzetelne i klarowne omówienie stanu wiedzy w zakresie

dotyczącej związku stylu życia ze zmianami profilu epigenetycznego (w szczególności profilu metylacji DNA) oraz wpływu tych zmian na szybkość starzenia epigenetycznego (modele zegarów epigenetycznych odzwierciedlające różne aspekty procesu starzenia), druga odnosi się do technologii badań wysokoprzepustowych. W tekście można znaleźć przesłanki wskazujące na zasadność podjęcia kolejnych badań, zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Opis metodologii i wyników, a także przeprowadzona obszerna dyskusja pokazują świetne opanowanie tematu przez Doktorantkę i są świadectwem Jej samodzielności naukowej. **Metodyka** obejmuje panel nowoczesnych metod analitycznych właściwych dla wysokoprzepustowych badań asocjacji. Badane kohorty oraz metody ich badania dobrane są w sposób właściwy i klarownie przedstawione. To samo dotyczy metod i algorytmów użytych w analizie EWAS, strategii badania asocjacji pomiędzy wybranymi czynnikami a przyspieszeniem epigenetycznego starzenia, zastosowania dwóch modeli (dostosowanego do płci i wieku, oraz uwzględniającego zidentyfikowane wcześniej zmienne zakłócające), a także poszukiwania wzbogacenia wykrytych markerów w biologiczne funkcje czy też testowania przydatności różnych technologii stosowanych w analizach metylacji DNA. Właściwie dobrana została metodyka opracowania i ewaluacji modelu pozwalającego na określenie statusu palacza na podstawie analizy danych uzyskanych w analizie EWAS. Dokumentację **wyników** stanowią 24 ryciny i 18 tabel; częścią pracy jest obszerny suplement (16 tabeli i 10 rycin). **Dyskusja** jest niezwykle wnikliwa i porusza różne aspekty przeprowadzonych badań w odniesieniu do szerokiej literatury dotyczącej omawianych badań. Omawiając ograniczenia przedstawionych wyników i proponując dalsze kierunki badań Doktorantka zademonstrowała zdolność krytycznego a zarazem perspektywicznego spojrzenia na własną pracę badawczą.

Część przedstawionych wyników została opublikowana w wieloautorskiej pracy w czasopiśmie *Clinical Epigenetics* (2023), w której Doktorantka zajmuje trzecią pozycję na liście autorów; część wyników była przedstawiana na polskich i międzynarodowych konferencjach naukowych w postaci posterów i prezentacji ustnych, gdzie Doktorantka była pierwszym autorem. Omówienie teoretycznych podstaw badań, fachowy opis stosowanej metodologii i przyjętej strategii badań, klarowne przedstawienie wyników oraz dyskusja poruszająca różne aspekty uzyskanych wyników, wskazują na to, że Doktorantka jest wysokiej klasy ekspertem w tematyce stanowiącej podstawę dysertacji.

4. Oryginalność rozprawy:

Opis podzielony został na dwie części: pierwsza poświęcona jest analizom dotyczącym wpływu różnych czynników związanych ze stylem życia na epigenom, druga dotyczy porównania efektywności stosowanych technologii badania metylacji. Przyjęty w pierwszej

części schemat: asocjacja badanego czynnika z innymi; analiza EWAS; analiza funkcjonalna (dla palenia i alkoholu), powtórzony dla kolejnych badanych czynników, skutkuje wprowadzić pewną redundancją, ale jest przejrzysty i pozwala porównywać wyniki dla analizowanych czynników behawioralnych. W analizie EWAS dotyczącej palenia, w modelu skorygowanym na płeć i wiek, zidentyfikowano 51 pozycji o istotnie zmienionym poziomie metylacji (DMPs; większość o obniżonej metylacji), mapujących się do 23 genów. W modelu skorygowanym na liczne zmienne towarzyszące, Doktorantka identyfikowała 34 DMP, wszystkie o obniżonej metylacji. Pięć najistotniej zmienionych DMP w obu modelach mapowało się do genów *AHRR*, *F2RL3* i *RARA*. Podobne szczegółowe analizy przeprowadzono w odniesieniu do wyników dotyczący związku metylacji z innymi czynnikami związanymi ze stylem życia. Wykryte markery były wzbogacone w biologiczne ścieżki związane z metabolizmem lipidów, regulacją odporności, procesami zapalnymi i komórkową odpowiedzią na stres.

Osobne rozdziały poświęcone są opracowaniu modelu predykcyjnego dla palenia, oraz analizie asocjacji starzenia epigenetycznego z czynnikami behawioralnymi. Doktorantka opracowała predykcyjny model pozwalający na określenie statusu palacza z dokładnością AUC 0.788, czułością 60.7% i specyficznością 82.8%; wskazała przy tym na zależność czułości modelu od częstości/ilości palenia. Na podkreślenie zasługuje fakt, że model oparty jest na trzech markerach, a zatem jest tani w zastosowaniu. W analizie wieku epigenetycznego Doktorantka wykazała, że niezależnie od stosowanych zegarów biologicznych najsilniejszy wpływ na przyspieszone starzenie komórkowe wywiera palenie tytoniu i nadmierne spożycie alkoholu. Z przyspieszeniem starzenia zasocjowany jest też zbyt krótki czas snu, podczas gdy umiarkowane spożycie kawy wiąże się z obniżeniem szybkości starzenia.

W ostatniej części pracy Doktorantka potwierdziła eksperymentalnie, że spośród badanych przez nią technologii analizy metylacji całogenomowej, Ion AmpliSeq cechuje się najwyższą dokładnością i powtarzalnością przy minimalnej ilości użytego do badań DNA.

Praca kończy się krótkim podsumowaniem wykonanych badań; przedstawione punkty stanowią użyteczną rekapitulację uzyskanych wyników.

5. Uwagi krytyczne:

Szkoda, że Wstęp nie kończy się podsumowaniem wskazującym braki w istniejącym stanie wiedzy, które pozwoliłoby odnieść się wprost do proponowanego przez Doktorantkę zakresu badań. Podobnie w podsumowaniu wyników zabrakło podkreślenia przez Doktorantkę, które z dokonanych przez Nią odkryć są nowością w stosunku do istniejącego stanu wiedzy (np. analiza polskiej populacji; 3-markerowy model predykcyjny pozwalający na opłacalne zastosowanie w praktyce); informację na ten temat można wprawdzie odszukać w dysertacji, jednak ze względu na obszerność tekstu jest to dla czytelnika dość pracochłonne.

6. Inne spostrzeżenia:

Z przyjemnością zaznaczam, że praca wyróżnia się dużą starannością opracowania stylistycznego i przygotowania redakcyjnego.

7. Ocena końcowa

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Joanny Rudnickiej spełnia całkowicie warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2024r. 1571 z późn. zmianami).

W związku z powyższym wnoszę o zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie pani mgr Joanny Rudnickiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Pragnę podkreślić, że przedstawione w niniejszej recenzji nieliczne uwagi krytyczne nie umniejszają wysokiej wartości ocenianej dysertacji. Opisane badania zostały bardzo dokładnie zaplanowane i udokumentowane, przeprowadzone z zastosowaniem najnowszej technologii eksperymentalnej i analitycznej, a wyniki wnoszą ważne informacje na temat wpływu stylu życia na zmiany w metylomie i na proces starzenia epigenetycznego. Wiedza ta ma istotne znaczenie dla badań podstawowych, a także potencjał zastosowań w medycynie i kryminalistyce.

Ze względu na wysoki poziom przedstawionych badań, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Joanny Rudnickiej.



Prof. dr hab. Ewa Ziętkiewicz
Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Poznań, 5 sierpnia 2025.r.