

Prof. dr hab. n. med. Aleksandra Szczepankiewicz
Kierownik Pracowni Badań Komórkowych i Molekularnych
Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Poznań, dnia 19 grudnia 2022r.

OCENA

osiągnięcia naukowego, dorobku naukowego oraz działalności dydaktycznej i
organizacyjnej dr n. biol. Zuzanny Bukowy-Bieryłło
w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauki medyczne i nauki o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

Doktor nauk biologicznych Zuzanna Bukowy-Bieryłło ukończyła studia magisterskie na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach na kierunku biotechnologia w 2003 roku. Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii uzyskała w 2009 roku na podstawie rozprawy doktorskiej „Czynniki regulujące aktywności białka WRN”. Pracę doktorską przygotowała w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, a promotorami rozprawy byli prof. dr hab. Barbara Tudek (IBB PAN) oraz prof. Tinna Stevnsner (Uniwersytet w Aarhus, Dania). Badania były realizowane w ramach grantu promotorskiego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W latach 2009-2012 była zatrudniona na stanowisku badacza w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej, a od 2012 jest zatrudniona w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk.

Ocena osiągnięcia naukowego „Pierwotna dyskineza rzęsek (wrodzona dysfunkcja rzęsek ruchomych) – podstawy genetyczne, biologiczne oraz możliwości terapii”

Osiągnięcie naukowe stanowi spójny tematycznie cykl pięciu prac złożony z 4 prac oryginalnych oraz jednego rozdziału w książce opublikowanych w latach 2013-2022 i dotyczących badań podłoża genetycznego i biologicznego oraz możliwości terapii pierwotnej dyskinezy rzęsek. Łączny wskaźnik Impact Factor cyklu jest równy 15,632, a sumaryczna punktacja prac według list MNiSW/MEiN wynosi 305.

W skład ww. cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe wchodzi następujące prace:

1. Bukowy-Bieryłło Z, Ziętkiewicz E, Loges NT, Wittmer M, Geremek M, Olbrich H, Fliegauf M, Voelkel K, Rutkiewicz E, Rutland J, Morgan L, Pogorzelski A, Martin J, Haan E, Berger W, Omran H*, Witt M*. RPGR mutations might cause reduced orientation of respiratory cilia. *Pediatr Pulmonol.* 2013; 48(4):352-63. DOI: 10.1002/ppul.22632.

2. Bukowy-Bieryłło Z, Rabiasz A, Dabrowski M, Pogorzelski A, Wojda A, Dmenska H, Grzela K, Sroczynski J, Witt M, Zietkiewicz E. Truncating mutations in exons 20 and 21 of *OFD1* can cause primary ciliary dyskinesia without associated syndromic symptoms. *J Med Genet.* 2019; 56(11):769-777. DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105918
3. Witt M, Bukowy-Bieryłło Z. Primary Ciliary Dyskinesia (Kartagener Syndrome). Rozdział w: 'Epstein Inborn Errors of Development. The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis' 3rd Edition, Oxford, UK. Oxford University Press 2016, pp.221-227
4. Bukowy-Bieryłło Z, Dąca-Roszak P, Jurczak J, Przysiałowska- Macioła H, Jaksik R, Witt M, Zietkiewicz E. *In vitro* differentiation of ciliated cells in ALI-cultured human airway epithelium – The framework for functional studies on airway differentiation in ciliopathies. *Eur J Cell Biol*, 2022, 101 (1): 151189, 13, doi: /10.1016/j.ejcb.2021.151189M
5. Bukowy-Bieryłło Z*, Dabrowski M*, Witt M, Zietkiewicz E. Aminoglycoside-stimulated readthrough of premature termination codons in selected genes involved in primary ciliary dyskinesia. *RNA Biol.* 2016; 2;13(10):1041-1050. DOI: 10.1080/15476286.2016.1219832, * wspólne pierwsze autorstwo

Wszystkie prace wchodzące w skład cyklu są współautorskie, a dr Zuzanna Bukowy-Bieryłło w przedstawionych 3 pracach cyklu jest pierwszym autorem, w 1 pracy jest równorzędnym pierwszym autorem, a w rozdziale do książki jest drugim autorem. Wskazuje to na istotny wkład pracy badawczej Habilitantki oraz kluczową rolę w opracowaniu koncepcji badań w większości prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Pierwotna dyskineza rzęsek jest chorobą uwarunkowaną wielogenowo o dużej heterogenności objawów klinicznych, co utrudnia wczesne rozpoznanie choroby i wskazuje na potrzebę badań prowadzenia genetycznych i biologicznych, które umożliwią lepsze poznanie patogenetyki PCD oraz opracowanie skutecznych metod diagnostycznych. Badania dr Bukowy-Bieryłło doskonale wpisują się w ten nurt zarówno w aspekcie identyfikacji genetycznego podłoża pierwotnej dyskinezy rzęsek, z uwzględnieniem syndromicznych form PCD w populacji słowiańskiej jak i analizy biologicznych podstaw PCD, w tym ekspresji genów związanych z różnicowaniem nabłonka dróg oddechowych oraz możliwości terapii poprzez stymulację translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP.

W pierwszych dwóch pracach cyklu wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, Habilitantka badała wątek podłoża genetycznego syndromicznych form PCD, w których poza występowaniem objawów związanych z upośledzeniem funkcji rzęsek ruchomych, występują także objawy upośledzenia funkcji rzęsek pierwotnych. W pierwszej pracy analizowany był gen *RPGR*, zlokalizowany na chromosomie X i kodujący białko obecne w strefie przejściowej aksonemy. Gen ten warunkuje prawidłowe funkcjonowanie siatkówki oka, a mutacje *RPGR* odpowiadają za 70% przypadków retinopatii barwnikowej siatkówki sprzężonej z chromosomem X. W pracy Habilitantka po raz pierwszy wykazała, że mutacje *RPGR* nie muszą być związane z upośledzeniem słuchu, czy zmianami w strukturze aksonemy, a wyniki badań potwierdziły, że mutacje *RPGR* są związane z występowaniem retinopatii. Natomiast w kontekście PCD zasugerowano związek mutacji *RPGR* z nieskoordynowanym ruchem rzęsek, co może prowadzić do upośledzenia oczyszczania rzęskowo-słuzowego. Należy podkreślić, że wyniki tego badania były pionierskie, a praca ta, cytowana ponad 50 razy, powstała dzięki współpracy z ośrodkami zagranicznymi w Niemczech i Australii, co umożliwiło dostęp do nowatorskich technik ciliogenezy *in vitro* oraz materiału klinicznego.

Badanie podłoża genetycznego syndromicznych form PCD. Habilitantka kontynuowała w kolejnej pracy, badając mutacje w genie *OFD1*, również zlokalizowanym w chromosomie X, który koduje białko będące składnikiem centrioli oraz ciałek podstawnych rzęsek i jest niezbędne do tworzenia rzęsek pierwotnych. Dzięki analizie sekwencjonowania całego eksomu (WES), w pracy zidentyfikowano i scharakteryzowano nowe mutacje skracające białko *OFD1*, które mogą powodować PCD bez objawów syndromicznych poza układem oddechowym. Ponadto, praca była pierwszą, która wskazała, że mutacje w genie *OFD1* mają wpływ na długość rzęsek pacjentów, co potwierdziło wyniki uzyskane w modelach komórkowych i zwierzęcych. W związku z obecnością objawów oddechowych i brakiem silnych objawów związanych z rzęskami pierwotnymi u badanych pacjentów, w pracy zasugerowano włączenie eksonów 20-21 genu *OFD1* do badań genetycznych do poszukiwania przyczyn i diagnozy PCD.

Uzupełnieniem cyklu prac dotyczących podłoża genetycznego PCD jest trzecia praca z cyklu, która jest pracą poglądową podsumowującą stan wiedzy dotyczący podstaw klinicznych i genetycznych PCD, z uwzględnieniem zaleceń ekspertów dotyczących rozpoznawania i leczenia PCD. Praca została opublikowana jako rozdział w trzecim wydaniu książki pt. „Epstein Inborn Errors of Development. The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis”, otwierając dział poświęcony ciliopatiom.

Czwarta praca z cyklu dotyczyła nurtu związanego z biologicznymi podstawami PCD w hodowli *in vitro* komórek nabłonka dróg oddechowych i miała na celu scharakteryzowanie czasowego profilu ekspresji 14 genów związanych z różnicowaniem nabłonka, ze szczególnym uwzględnieniem genów związanych z różnicowaniem komórek rzęskowych. Uzyskane profile ekspresji transkryptów badanych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym (TLDA) oraz sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq) wykazały dobrą korelację i pozwoliły na identyfikację najlepszych punktów czasowych dla przyszłych analiz ekspresji genów z użyciem hodowli nabłonka dróg oddechowych. Wyniki te mogą znaleźć zastosowanie w badaniach funkcjonalnych takich jak potwierdzenie funkcji nowych genów lub do analizy wpływu wariantów sekwencji DNA na ekspresję białka w trakcie różnicowania komórek nabłonka i to nie tylko w PCD, ale również w innych chorobach układu oddechowego np. mukowiscydozie czy przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc.

Ostatnia praca z cyklu jest efektem wyników uzyskanych w toku realizacji rozprawy doktorskiej, w której Habilitantka była promotorem pomocniczym. Praca ta dotyczyła oceny możliwości terapii PCD poprzez stymulację translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP. W badaniach analizowano 16 przedwczesnych kodonów STOP (PTC) w 5 genach związanych z dysfunkcją rzęsek i zidentyfikowanych w populacji polskich pacjentów chorych na PCD. Charakterystyka wpływu antybiotyków aminoglikozydowych na stymulację translacyjnego odczytu PTC w odniesieniu do mutacji związanych z PCD wykazała, że model *in vitro* jest wystarczający do zbadania wrażliwości PTC na stymulację, jednak w modelu *ex vivo* wykazano dużo niższy poziom stymulacji mimo zastosowania kilkukrotnie wyższych stężeń antybiotyków. Praca ta stanowi pierwsze opublikowane badanie dotyczące możliwości zastosowania stymulacji translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP w terapii PCD jak również wskazuje potrzebę badania i wykorzystania związków innych niż antybiotyki aminoglikozydowe w terapii PCD.

Podsumowując, dr Bukowy-Bieryłło przedstawiła cykl prac, które dokumentują nowatorskie badania w zakresie lepszego poznania podłoża genetycznego i biologicznego pierwotnej dyskinezy rzęsek jak również wskazania nowych możliwości terapeutycznych choroby.

Ocena pozostałego dorobku naukowego/istotnej aktywności naukowej

Poza pracami stanowiącymi osiągnięcie naukowe, dr Zuzanna Bukowy-Bierytło jest współautorką 17 prac naukowych (w 4 z nich jest pierwszym autorem), w których skład wchodzi 12 prac oryginalnych (wszystkie opublikowane w czasopismach indeksowanych z listy filadelfijskiej), 5 prac poglądowych (w tym 4 prace z Impact Factor), jak również 26 doniesień zjazdowych zaprezentowanych na zjazdach krajowych i zagranicznych. Sumaryczny wskaźnik Impact Factor poza osiągnięciem habilitacyjnym wynosi 84,746, o łącznej punktacji MNiSW/MEiN równej 919. Zdecydowana większość tych prac powstała po uzyskaniu stopnia doktora.

Główne obszary zainteresowań badawczych Habilitantki poza osiągnięciem naukowym obejmowały poszukiwanie markerów genetycznych związanych z ryzykiem występowania nowotworów (w ramach badań do pracy magisterskiej prowadzonych na Uniwersytecie Aarhus w Danii); badanie wpływu stresu oksydacyjnego na aktywności enzymatyczne białka WRN (badania realizowane w pracy doktorskiej w ramach grantu promotorskiego); a w kolejnych latach analizę patogenezę PCD, które ukierunkowały Habilitantkę w pracach dotyczących badania podłoża genetycznego PCD. Badania te umożliwiły m.in. identyfikację mutacji w genie *DNAI1* w populacji słowiańskiej, co pozwoliło na opracowanie szybszej metody diagnostyki mutacji *DNAI1* i jest wykorzystywane podczas diagnostyki PCD u pacjentów polskich. W dalszych badaniach genetycznego podłoża PCD Habilitantka skupiła się na analizie częstości mutacji genów *RSPH4A* i *RSPH9* u pacjentów PCD w populacji słowiańskiej oraz porównanie defektów ultrastrukturalnych rzęsek oddechowych występujących u polskich pacjentów, do pacjentów z Europy Zachodniej i USA. Uzyskane dane wskazały, że mutacje w genie *RSPH4A* mogą stanowić dość częstą przyczynę PCD w populacji wschodnioeuropejskiej w grupie pacjentów, a wszystkie zidentyfikowane mutacje skupiały się w okolicy eksonów 1 i 3 *RSPH4A*, co miało duże znaczenie w przyspieszeniu identyfikacji mutacji tego genu u pacjentów diagnozowanych w kierunku PCD. Dalsze badania z udziałem Habilitantki koncentrowały się na identyfikacji mutacji w genie *CFAP300*, które korelowały z brakiem lub niewłaściwą lokalizacją białek markerowych obydwu ramion dyneinowych u pacjentów z PCD w badaniu ultrastrukturalnym (TEM) oraz immunohistochemicznym, co jest typowym defektem struktury rzęsek wynikającym z niewłaściwego funkcjonowania genów transportujących kompleksy ramion dyneinowych takich jak *CFAP300*. Natomiast w modelu zwierzęcym płazińca *Schmidtea mediterranea* wykazano, że obecność *CFAP300* jest niezbędna dla właściwego funkcjonowania rzęsek ruchomych, służących do poruszania się po podłożu, co pośrednio potwierdziło, że mutacje nonsensowne czy wprowadzające przedwczesną terminację translacji *CFAP300* obecne u pacjentów, mogą być przyczyną PCD.

Kolejnym nurtem badawczym Habilitantki były prace związane z biologią komórek nabłonka, które stanowiły podstawę do opracowania warsztatu badawczego modeli komórkowych stosowanych do badań funkcjonalnych nabłonka dróg oddechowych. Pomocny był w tym udział w stażu zagranicznym u prof. Omrana, i realizacja projektu, który umożliwił wprowadzenie metody hodowli na styku faz ciecz-powietrze (ALI) do repertuaru technik obu zespołów badawczych, polskiego i niemieckiego. Uzyskane kompetencje i doświadczenie badawcze zaowocowało uzyskaniem przez Habilitantkę grantu naukowego Narodowego Centrum Nauki, co pozwoliło na kontynuację badań dotyczących metod ciliogenezy *in vitro* w pierwotnej dyskinezie rzęsek.

Habilitantka była również aktywnie zaangażowana w prace międzynarodowego projektu COST BEAT-PCD, którego celem było m.in. doskonalenie standardów diagnostyki i leczenia tej choroby oraz wymiana informacji na ten temat. Dr Bukowy-Bieryłło brała również udział w przygotowaniu opracowania wspólnego stanowiska ekspertów na temat sposobu raportowania wyników diagnostyki PCD za pomocą mikroskopii elektronowej (TEM) dla 18 ośrodków z 14 krajów prowadzących diagnostykę PCD. W badaniach zdefiniowano także kryteria jakości próbki nabłonka do analizy TEM oraz schemat raportu, aby był pomocny w rozpoznaniu PCD za pomocą innych metod diagnostycznych.

W dalszych etapach prace badawcze Habilitantki skupiały się również na badaniach molekularnych związanych z translacyjnym odczytem przedwczesnych kodonów STOP oraz zastosowaniem algorytmów komputerowych do opracowania efektywnych algorytmów wyszukiwania w bazach danych publikacji podobnych tematycznie pod kątem PCD.

Efektom ww. badań, realizowanych w większości w toku realizacji grantów naukowych krajowych i europejskich, było kilkanaście publikacji, w większości we współpracy z badaczami z ośrodków krajowych i zagranicznych, co wskazuje na umiejętności Habilitantki w nawiązywaniu kontaktów naukowych i podejmowanie współpracy poza jednostką macierzystą. Wyniki tych badań zaowocowały również opatentowaniem testu diagnostycznego pozwalającego na określenie poziomu ryzyka zapadalności na raka piersi.

Podsumowując ocenę dorobku naukowego, stwierdzam, że Habilitantka samodzielnie poszukuje nowych tematów badawczych i możliwości ich realizacji we współpracy z ośrodkami krajowym i zagranicznymi, w ramach grantów naukowych pozyskiwanych w podmiotach finansujących naukę w kraju i za granicą i z sukcesem publikuje wyniki tych badań.

Ocena osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzujących naukę

Osiągnięcia związane z działalnością dydaktyczną dr Zuzanny Bukowy-Bieryłło obejmowały opiekę nad studentami w toku realizacji prac dyplomowych (była promotorem jednej pracy magisterskiej i jednej pracy licencjackiej). Była także promotorem pomocniczym dwóch prac doktorskich (jednej zakończonej uzyskaniem stopnia doktora z wyróżnieniem w 2018r., jedna jest w trakcie realizacji). Ponadto, sprawowała również opiekę nad stażystami w trakcie praktyk studenckich. W ramach działalności szkoleniowej prowadziła wykłady dla uczestników studium doktoranckiego przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (2018, 2019). Od 2016r. w ramach współpracy z Uniwersytetem SWPS, prowadziła zajęcia dydaktyczne w ramach interdyscyplinarnego przedmiotu „Biologiczne źródła zachowania” dla studentów dziennych i zaocznych na kierunku psychologia.

Wśród osiągnięć organizacyjnych Habilitantki na uwagę zasługuje współorganizowanie trzech międzynarodowych konferencji naukowych poświęconych pierwotnej dyskinezie rzęsek (w 2011 roku w ramach HEALT-PROT, w 2014 roku w ramach projektu BESTCILIA, oraz w 2019 roku w ramach projektu BEAT-PCD), a także pierwszej w Polsce konferencji dla pacjentów z PCD. Habilitantka włączała się również aktywnie w działania popularyzujące wiedzę o PCD - zarówno wśród specjalistów personelu medycznego (lekarzy, pielęgniarek, fizjoterapeutów), jak również wśród pacjentów chorych na PCD. Ponadto, w ramach projektu BESTCILIA, koordynowała także przygotowanie materiałów informacyjnych dla pacjentów na temat PCD, a broszura została przetłumaczona na 6 języków i zaadaptowana do realiów 9 różnych krajów

europejskich. Ponadto, uczestniczyła w przygotowaniu kilkudziesięciu doniesień na temat osiągnięć projektu BESTCILIA, m.in. warsztatów, konferencji i publikacji dotyczących PCD publikowanych na stronie projektu. Współorganizowała również zajęcia dla szerokiej publiczności organizowanych przez Stowarzyszenie Popularyzacji Nauki Gen-i-już przy Instytucie Genetyki Człowieka PAN m.in. zajęcia w ramach Nocy Biologów, Poznańskiego Festiwalu Nauki i Sztuki czy Nocy Naukowców.

Podsumowanie

Na podstawie przedstawionej dokumentacji, obejmującej opis osiągnięcia naukowego, dorobku naukowego oraz działalności dydaktycznej i organizacyjnej, stwierdzam, że dr n. biol. Zuzanna Bukowy-Bieryłło spełnia ustawowe wymogi o nadanie stopnia doktora habilitowanego określone w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Stwierdzam, że Habilitantka jest samodzielnym naukowcem o znaczącym dorobku naukowym, organizacyjnym i dydaktycznym, a osiągnięcie naukowe pt. „Pierwotna dyskineza rzęsek (wrodzona dysfunkcja rzęsek ruchomych) – podstawy genetyczne, biologiczne oraz możliwości terapii” stanowi oryginalny i istotny wkład w rozwój nauk medycznych.

W związku z powyższym popieram wniosek dr Zuzanny Bukowy-Bieryłło o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne i wnoszę o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Aleksandra Szczepankiewicz
Prof. dr hab. Aleksandra Szczepankiewicz