

Prof. dr hab. n. med. Marek Sanak
Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej
II Katedra Chorób Wewnętrznych im. prof. Andrzeja Szczeklika
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Kraków, 8.02.2021 r.

Recenzja osiągnięcia naukowego oraz aktywności naukowej w postępowaniu habilitacyjnym dr n. med. Michała Korostyńskiego, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Na podstawie powołania z dn. 24.11.2020 przez Radę Naukową Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk na recenzenta w postępowaniu habilitacyjnym Pana dr Michała Korostyńskiego przedstawiam opinię dotyczącą osiągnięcia naukowego zatytułowanego „Rozkład wzorców ekspresji genomu na funkcjonalne składowe oraz ich interpretacja w kontekście wybranych schorzeń wielogenowych”.

Pan dr n. med. Michał Korostyński studiował Biologię w latach 1998- 2002 na Uniwersytecie Śląskim, Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska. Tytuł magistra uzyskał w zakresie biotechnologii roślin i mikroorganizmów. W roku 2003 kontynuował naukę w zakresie biologii molekularnej na studiach podyplomowych Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydziału Biologii. W latach 2003-2007 był doktorantem Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Na podstawie rozprawy doktorskiej „Genomowe determinanty ośrodkowego działania opioidów” uzyskał w 2008 r. stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Promotorem w przewodzie doktorskim był Pan prof. dr hab. Ryszard Przewłocki. W 2015 r. Habilitant ukończył studia podyplomowe MBA. Pan dr Michał Korostyński jest zatrudniony od 2008 r. w Instytucie Farmakologii PAN na stanowisku adiunkta. Od 2018 r. kieruje Działem Transferu Technologii Instytutu Farmakologii PAN.

Pani dr Michał Korostyński przedstawił osiągnięcie naukowe zatytułowane „Rozkład wzorców ekspresji genomu na funkcjonalne składowe oraz ich interpretacja w kontekście wybranych schorzeń wielogenowych”. Jest to cykl 7 prac oryginalnych opublikowanych w języku angielskim w czasopiśmie międzynarodowym z Listy Filadelfijskiej, które metodologicznie łączy wspólna platforma wysokoprzepustowych badań ekspresji RNA oraz wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych do analizy czynnościowej ekspresji genów.

1.) W publikacji „Novel drug-regulated transcriptional networks in brain reveal pharmacological properties of psychotropic drugs”, która się ukazała w BMC Genomics w 2013 roku Habilitant jest pierwszym autorem i współautorem do korespondencji. Publikacja dotyczy zmian ekspresji genów w prążkowiu u myszy. Zwierzętom podano jednorazowe dawki 18 leków psychotropowych reprezentujących działanie przeciwdepresyjne, antypsychotyczne, anksjolityczne, psychostymulujące i opioidowe. Materiał do badania techniką mikromacierzy ekspresji całego genomu był pobierany w ustalonych odstępach czasowych, między 1 a 8 godziną od podania substancji. Podstawową hipotezą badawczą było stwierdzenie swoistego dla leku oraz dla ich farmakologicznych klas profilu ekspresji genów. Kolejnym etapem badania były analizy wzorców zmiany ekspresji po uwzględnieniu odstępów czasowych. Pozwoliło to na zaproponowanie molekularnej klasyfikacji leków psychotropowych, opartej na statystycznej analizie składowych głównych różnicowo modulowanych mRNA. Na podstawie uzyskanych wyników, Habilitant zaproponował trzy klasy zmian aktywności transkrypcyjnej genów, odpowiadające modulacji transkrypcji w neuronach, w komórkach glejowych oraz reorganizacji wypustek nerwowych. Szczególną uwagę Habilitant poświęcił tianeptynie, leкови przeciwdepresyjnemu o nieustalonym mechanizmie działania. Sprawdzenie wartości predykcyjnej dla molekularnego mechanizmu działania tianeptyny zostało przeprowadzone na podstawie hybrydyzacji in situ ujawniającej podobieństwo do trancylprominy w aktywacji monoaminergicznego wzmocnienia i było potwierdzone testem uwarunkowanej preferencji miejsca. Trwałą wartością omawianej publikacji jest uruchomienie nadal działającej bazy danych (www.genes2mind.org), która zawiera moduły przeszukiwania i porównywania profili ekspresji genów mysich ustalonych w omawianej pracy.

2.) W 2015 roku ukazała się w czasopiśmie Neuropharmacology publikacja „Regulation of alternative gene transcription in the striatum in response to antidepressant drugs”, której autorem korespondencyjnym jest Pan dr Michał Korotyński. Tematem pracy było porównanie efektów jednorazowego podania mianseryny albo trancylprominy na transkryptom prążkowie myszy, przy czym analiza bioinformatyczna była oparta na wynikach sekwencjonowania nowej generacji. Badanie ex vivo zostało uzupełnione eksperymentem na wyprowadzonych pierwotnych hodowlach mysich neuronów płodowych oraz astrocytów. W przypadku hodowli in vitro stymulantami były kwas kainowy dla neuronów i deksametazon dla komórek glejowych. Tym samym nawiązano bezpośrednio do obserwacji poczynionych w pracy Nr 1, w której klaster modulacji ekspresji genetycznej neuronów obejmował geny wczesnej odpowiedzi aktywacyjnej, natomiast klaster glejowy dotyczył ścieżek metabolicznych. Habilitant postawił interesującą hipotezę o możliwości pojawienia się zmienionych czynnościowo pod wpływem testowanych leków białek, powstających wskutek alternatywnej transkrypcji lub składowania eksonów. Dzięki odpowiedniej głębokości sekwencjonowania transkryptów wykazana została bardzo dobra korelacja ekspresji z analizami przeprowadzonymi przy wykorzystaniu techniki mikromacierzy hybrydyzacyjnych w pracy Nr 1. Analiza ekspresji, podobnie jak w pracy poprzedniej obejmowała wskazanie wspólnie regulowanych grup genów oraz poszukiwanie

czynników transkrypcyjnych identyfikowanych na podstawie stwierdzenia motywów wiążących w sąsiedztwie modulowanych transkryptów. Interesującym odkryciem było stwierdzenie występowania po podaniu leków antydepresyjnych wariantów kodujących, w tym podjednostkę gamma-3 receptora GABA-A z dodatkową domeną kanału jonowego. W podsumowaniu, opisane w pracy Nr 2 eksperymenty potwierdzały zaproponowany przez Habilitanta mechanizm działania leków psychotropowych, polegający na czasowym wzroście ekspresji transkrypcji genetycznej, przy czym większość regulowanych transkryptów zawierała sekwencje kodujące białka.

3.) Trzecia publikacja włączona w cykl osiągnięcia naukowego Pana dr Michała Korostyńskiego również dotyczy neuropsychofarmakologii. Praca „Molecular profile of dissociative drug ketamine in relations to its rapid depressant action” została opublikowana w czasopiśmie BMC Genomics w 2016 r. Habilitant jest autorem do korespondencji w tej publikacji. Kliniczne obserwacje u człowieka wskazują na przeciwdepresyjne efekty podania ketaminy, jednakże silne działania dysocjacyjne, amnestyczne i halucynogenne tej substancji stoją na przeszkodzie w jej stosowaniu klinicznym. Hipoteza zaproponowana w pracy zakładała występowanie profilu molekularnego ketaminy, który ją różni od innych antagonistów NMDA pozbawionych działania przeciwdepresyjnego. Wykorzystany został podobny plan badania jak w dwóch poprzednich publikacjach z cyklu habilitacyjnego. Wpływ jednorazowego podania ketaminy u myszy został porównany z fencyklidyną i memantyną. Zmiany transkryptomowe były analizowane w tkankach prążkowiec i hipokampa przy użyciu mikromacierzy ekspresji, w punktach czasowych od 1 do 8 godzin po podaniu leków. Następnie, w tym samym materiale wybrane transkrypty o największych różnicach w ekspresji zostały zanalizowane na podstawie sekwencjonowania RNA. Obserwowane najbardziej istotne różnice w ekspresji genów po podaniu ketaminy zostały potwierdzone techniką ilościowego PCR. Głównym wnioskiem z omawianej pracy jest wykazanie wpływu ketaminy na szlaki metaboliczne tkanki mózgowej w związku z aktywacją perylipiny-4 i proteazy serynowo-treoninowej regulowanej przez glukokortykoidy. Zaproponowany został również wpływ ketaminy na szlak mTOR, związany z plastycznością neuronów.

4.) Kolejna publikacja włączona w cykl naukowego osiągnięcia, w której Pan dr Michał Korostyński jest pierwszym autorem dotyczy zupełnie innego zagadnienia, mianowicie modelu choroby zwyrodnieniowej stawów. W pracy opublikowanej w International Journal of Genomics w 2017 r. przedstawiono badanie transkryptomu krwi pełnej szczura z indukowanym zapaleniem kostno-stawowym wskutek podania dostawowego jodooctanu sodu. Jest to toksyczny związek chemiczny, o działaniu alkilującym i silnie hamującym proteazy serynowe, który wywołuje zmiany w obrębie struktur stawu odpowiadające degeneracji chrząstki stawowej u człowieka. Profil transkryptomu krwi obwodowej u szczura został zbadany z wykorzystaniem mikromacierzy hybrydacyjnych w kilku punktach czasowych naśladujących różny stopień zaawansowania choroby stawu. Analiza danych

opisujących ekspresję mRNA we krwi zwierzęcia była wykonana w klasyczny sposób, z wykorzystaniem kontrastu dla 4 punktów czasowych między 2 a 28 dniem od podania jodooctanu. Grupy wspólnie regulowanych genów zostały porównane z danymi dotyczącymi ekspresji we krwi chorych na zapalenie kostno-stawowe, udostępnionymi przez badaczy z Lejdy. Podstawowa hipoteza badawcza, zakładająca obecność biomarkerów wczesnej fazy zapalenia kostno-stawowego nie znalazła potwierdzenia, niemniej obserwowano niewielki wspólny podzbiór 3 genów, których transkrypcja była modulowana zarówno w modelu zwierzęcym, jak i w badaniu klinicznym.

5.) Następną publikacją w tej samej tematyce modelu chemicznego zapalenia kostno-stawowego u szczura ukazała się w 2018 r. w czasopiśmie *Functional and Intergrative Genomics*. Pan dr Michał Korotyński jest pierwszym autorem tej publikacji. W pracy tej materiałem do analiz transkryptomu była tkanka stawu kolanowego zmieniona pod wpływem wstrzyknięcia jodooctanu sodu. Analiza transkryptów, których ekspresja była istotnie modulowana przez zapalenie chemiczne ujawniła 5 grup odpowiadających sygnalizacji receptora PPAR gamma, szlakowi WNT, osteogenezie, aktywności metaloproteaz oraz nieswoistej odpowiedzi zapalnej mediowanej przez receptory Toll-like i interleukinę-1. W poszukiwaniu wspólnej regulacji obserwowanych grup genów *in silico* dokonano analizy czynników transkrypcyjnych. Jednym z ważniejszych wniosków z tej pracy jest istotna rola sygnalizacji receptora PPAR-gamma, skłaniająca do testowania opcji terapeutycznych ze względu na kliniczne rejestracje tiazolidynodionów, syntetycznych agonistów tego receptora. Inną interesującą obserwacją jest przejściowe hamowanie szlaku sygnalizacji WNT w pierwszych etapach chemicznego zapalenia stawu.

6.) Dwie kolejne publikacje włączone w cykl osiągnięcia naukowego Habilitanta dotyczą jeszcze innego zagadnienia, ściśle związanego z kliniką neurochirurgii. W publikacji, która się ukazała w *Journal of Translational Medicine* w 2019 r. Pan dr Michał Korostyński jest pierwszym autorem. Przeprowadził badanie na chorych z ostrym krwotokiem podpajęczynówkowym spowodowanym pęknięciem tętniaka śródczaszkowego, których porównał z chorymi po 3 do 15 miesięcy od epizodu krwawienia oraz z osobami, u których wykluczono krwawienie podpajęczynówkowe. W pracy tej przedstawiono wyniki badania techniką sekwencjonowania RNA transkryptomu krwi pełnej. Grupę wybranych transkryptów o największych różnicach ekspresji zweryfikowano techniką ilościowego PCR. Ze względu na zależność między składem komórkowym krwinek białych a transkryptomem, badanie uwzględniało wskaźnik limfocytów do granulocytów/monocytów, wyliczany na podstawie obecności swoistych dla tych linii komórkowych transkryptów. Najogólniej, krwawienie podpajęczynówkowe wykazało korelację z grupą transkryptów o zmniejszonej ekspresji, do których należały geny aktywacji leukocytów oraz różnicowania limfocytów T. Stwierdzono zgodność predykcji molekularnej wzoru odsetkowego leukocytów z oznaczeniem ich subpopulacji na podstawie cytometrii przepływowej. Pęknięciu tętniaka śródczaszkowego towarzyszyła indukcja transkryptów

charakterystycznych dla aktywacji monocytów, przy czym obserwowany klinicznie wzrost ich odsetka korelował ze zwiększeniem ekspresji genetycznej ich markerów w materiale z krwi pełnej.

7.) By precyzyjnie opisać na poziomie transkryptomu zmiany ekspresji genetycznej w komórkach krwi, ta sama grupa chorych z ostrym krwotokiem podpajęczynówkowym, oraz po przebytych epizodzie krwawienia, a także grupa kontrolna zostały scharakteryzowane pod względem profilu mikroRNA krwi obwodowej. Ta ostatnia publikacja cyklu osiągnięcia naukowego ukazała się w czasopiśmie *Molecular Neurobiology* w 2020 r. Pan dr Michał Korostyński jest jej pierwszym autorem. Analiza transkryptomu została ukierunkowana na małe cząsteczki RNA o właściwościach modulujących dostępność translacyjną mRNA. Zostały one zbadane we krwi techniką sekwencjonowania RNA. Klasyczna analiza wyników objęła wskazanie cząsteczek mikroRNA o największych różnicach ekspresji w porównaniach międzygrupowych, poszukiwanie docelowych transkryptów hamowanych przez mikroRNA, oraz porównawczą analizę ekspresji regulowanych transkryptów. Wśród tych ostatnich, w ostrej fazie krwotoku śródczaszkowego potwierdziły się spadki ekspresji mRNA dla podjednostki beta inhibiny, chemokiny CXCL5, czynnika stymulującego kolonie makrofagów i amfoteryny (HMGB1). To ostatnie białko w pomiarze immunoreaktywności w surowicy krwi okazało się jednak podwyższone. Takie zaskakujące rozbieżności się zdarzają i podkreślają konieczność badania ekspresji również na poziomie białek.

W podsumowaniu, Pan dr Michał Korostyński przedstawił jako swoje osiągnięcie naukowe cykl 7 prac oryginalnych, które łączy wykorzystanie wysokoprzepustowych technik transkryptomicznych w postaci mikromacierzy ekspresji całogenomowej oraz sekwencjonowania równoległego nowej generacji. Publikacje dotyczą trzech grup tematycznych: neuropsychofarmakologii, laboratoryjnego modelu zapalenia kostno-stawowego oraz klinicznego zagadnienia ostrego krwotoku podpajęczynówkowego spowodowanego pęknięciem tętniaka śródczaszkowego. Za najbardziej zaawansowane eksperymentalnie należy uznać pierwsze 3 publikacje dotyczące swoistych zmian transkrypcji w wybranych strukturach mózgu u myszy pod wpływem jednorazowych podań leków o spektrum psychotropowym, w szczególności leków antydepresyjnych. Dwie kolejne publikacje dotyczą modelu zapalenia stawu u szczura spowodowanego miejscowym podaniem substancji chemicznej. Są one interesujące ze względu na szeroki zakres analiz, jednakże mają wartość opisową i nie podjęto próby potwierdzenia biologicznej istotności obserwowanych zmian ekspresji przez eksperymentalną interwencję. Dwie kolejne publikacje dotyczą relatywnie rzadkiego stanu chorobowego u człowieka, krwotoku podpajęczynówkowego, który ze względu na konieczność interwencji neurochirurgicznej i odległe powikłania kognitywne jest istotnym problemem medycznym. W przypadku tych prac, analiza transkryptomu uzupełniła znane uprzednio obserwacje dotyczące zmian w składzie odsetkowym leukocytów krwi obwodowej oraz scharakteryzowała relacje między obecnością cząsteczek mikroRNA i zmianami ekspresji mRNA. Zwornikiem dla cyklu

osiągnięcia naukowego Habilitanta jest bardzo solidna analiza bioinformatyczna, obejmująca poszukiwania wariantów składania transkryptów, próby wyjaśnienia wspólnej regulacji ekspresji przez poszukiwanie czynników transkrypcyjnych, a także integracja wyników przez wskazanie ścieżek sygnalizacji i składowych komórkowych tkanki, które uległy zmianie. Jak już wspomniano, Pan dr Michał Korostyński był pierwszym autorem lub autorem do korespondencji w każdej z tych prac. Ukazały się w czasopismach funkcjonujących w międzynarodowym obiegu naukowym, łączny wskaźnik oddziaływania tych czasopism wyniósł 26,03.

Pozostały dorobek naukowy Habilitanta po doktoracie obejmuje 54 publikacje z jego autorstwem lub współautorstwem, o łącznym wskaźniku oddziaływania czasopism, w których się te prace ukazały wynoszącym 245,05. Przy liczbie cytowań 1423, odsetek autocytacji jest poniżej 10%, natomiast indeks Hirscha dorobku naukowego Pana dr Korostyńskiego jest wysoki i wynosi 22 (wg Web of Science). W kontekście dorobku naukowego Habilitanta jest godne podkreślenia, że w 2011 r. był współautorem publikacji dotyczącej neurobiologii, która się ukazała w Nature. Pan dr Michał Korostyński jest również autorem lub współautorem trzech monografii, w tym dwóch z zakresu neurofarmakologii i jednej z metodologii badań ekspresji genów.

Habilitant współpracuje z wieloma ośrodkami naukowymi w kraju. Są to Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Medycyny Doświadczalnej im. M. Mossakowskiego, Zakład Biochemii Komórki Uniwersytetu Jagiellońskiego, Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Klinika Psychiatrii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego i Klinika Neurologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, nie wspominając o Zakładach jego macierzystego Instytutu Farmakologii PAN. Z ośrodków poza granicami kraju wspomnieć należy o Uniwersytecie w Leicester oraz Europejskiej sieci genetycznej badań chorób wieloczynnikowych. Odbył kilka staży naukowych w renomowanych ośrodkach zagranicznych, takich jak DeCODE w Reykjaviku i Instytucie Psychiatrii Maxa Plancka w Monachium.

Pan dr Michał Korostyński zdobył doświadczenie dydaktyczne prowadząc autorskie kursy biomatematyki oraz genomiki obliczeniowej i analizy biomedycznej dla studentów Wydziału Matematyki i Informatyki Uniwersytetu Jagiellońskiego.


W zakresie kształcenia młodej kadry naukowej był promotorem pomocniczym trzech prac doktorskich oraz opiekunem praktyk studenckich.

Wśród nagród, których jest laureatem warto wspomnieć o Nagrodzie imienia Jakuba Karola Parnasa przyznawanej przez Polskiego Towarzystwo Biochemiczne i nagrodzie imienia Jerzego Konorskiego przyznawanej przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu.

Elementem dorobku, którego próżno szukać w autoreferacie Habilitanta jest pozyskiwanie środków na badania naukowe i samodzielne kierowanie przez Niego projektami finansowanymi przez instytucje zewnętrzne. Informacje te są jednak zawarte wykazie osiągnięć i obejmują granty Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego IUVENTUS Plus, NCN i Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, w których był kierownikiem.

W podsumowaniu, Pan dr Michał Korostyński spełnia w całości kryteria stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego, ponieważ jej dorobek stanowi znaczący wkład do rozwoju nauki na poziomie międzynarodowym i znajduje odzwierciedlenie we wskaźnikach bibliograficznych stosowanych w naukometrii.

Przedkładając pozytywną recenzję w postępowaniu habilitacyjnym Pana dr Michała Korostyńskiego uprzejmie proszę Pana Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN im. J. Maja o jej uwzględnienie.


Prof. dr hab. n. med. Marek Śanak