



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Katarzyny Kmiotek-Wasylewskiej z tytułem
„Prokardiomiogenne i proangiogenne właściwości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych wykazujących nadekspresję wybranych mikroRNA”,
która została wykonana w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod opieką promotora prof. dr hab. Ewy Zuby-Surmy

Tematyka przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej dotyczy analizy wpływu pęcherzyków komórkowych (EVs) pochodzących z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS), modyfikowanych genetycznie w celu osiągnięcia nadekspresji wybranych cząsteczek mikroRNA (miRNA) - w warunkach 1) *in vitro* na wybrane funkcje komórek serca, a także 2) *in vivo* na procesy regeneracyjne w mysim modelu niedokrwiennego uszkodzenia kończyny. Dodatkowo, w swoich badaniach mgr Katarzyna Kmiotek-Wasylewska podjęła próbę charakterystyki składu molekularnego EVs wydzielanych przez różne typy komórek: *i*) natywne iPS, *ii*) ukierunkowane tkankowo komórki progenitorowe serca (iCPC) oraz *iii*) kardiomiocyty (iCM) i *iv*) fibroblasty (iCF) wyróżnione z komórek iPS. Badania podjęte przez mgr Kmiotek-Wasylewską są niewątpliwie nowatorskie i istotne w kontekście jednego z ważniejszych wyzwań współczesnej medycyny, tj. leczenia skutków choroby niedokrwiennej serca. Wyniki badań prezentowane w rozprawie stanowią podwaliny dla przyszłych spersonalizowanych terapii uszkodzeń tkanek z zastosowaniem EVs wzbogaconych o porządne czynniki bioaktywne.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kmiotek-Wasylewskiej z tytułem „Prokardiomiogenne i proangiogenne właściwości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych wykazujących nadekspresję wybranych mikroRNA” liczy 168 stron i została przygotowana w sposób typowy dla rozpraw doktorskich. Obejmuje spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp teoretyczny (27 stron), po którym wyraźnie określono cel główny i cele szczegółowe pracy, materiały i metody (23 strony), wyniki (53 strony), dyskusja (22 strony), podsumowanie i wnioski końcowe, a po nich bibliografia, na którą składa się 364 pozycji, z czego zdecydowana większość to publikacje anglojęzyczne opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Tekst rozprawy wspomagany jest rycinami (44 ryciny) oraz tabelami (7 tabel niezależnych od rycin). Warto dodać, że tradycyjne rozdziały rozprawy doktorskiej zostały poprzedzone informacją o finansowaniu badań (4 granty, w tym 2 przyznane Doktorantce) oraz najważniejszych osiągnięciach mgr Kmiotek-Wasylewskiej. Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymogi formalne stawiane tego typu dziełom.

Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że co kilka sekundy ktoś w wieku pomiędzy 30. a 70. rokiem życia umiera przedwcześnie z powodu choroby niezakaźnej. Choroby układu sercowo-naczyniowego są jednymi z najczęściej występujących chorób niezakaźnych, odpowiedzialnymi za zdecydowaną większość zgonów na świecie. Wraz z rozwojem cywilizacji i zmianą naszych nawyków żywieniowych, spadkiem aktywności fizycznej oraz wzrastającym spożyciem alkoholu i paleniem papierosów z roku na rok wzrasta też liczba przypadków śmiertelnych powodowanych chorobami układu sercowo-naczyniowego, w tym chorobą niedokrwienną serca. W chwili obecnej oprócz szeroko pojętej profilaktyki i interwencji farmakologicznych mających zapobiec ostrym postaciom choroby niedokrwiennej, nie ma skutecznych terapii umożliwiających przywrócenie pełnej sprawności serca u pacjentów po zawale mięśnia sercowego. Duże nadzieje upatruje się w zastosowaniu komórek macierzystych, w tym iPS w leczeniu uszkodzeń organów o mniejszej lub znikomej zdolności do regeneracji, takich jak serce. Ostatnie badania sugerują, że czynniki uwalniane przez iPS mogą wspomagać funkcje komórek budujących serce. Wśród nich wymienia się czynniki niesione przez EVs, które jak wykazały badania zespołu prof. Ewy Zuby-Surmy i innych badaczy, mogą wspomagać w warunkach *in vitro* i *in vivo* regenerację komórek. Nie było jednak wiadomo, czy proregeneracyjne właściwości EVs wydzielanych przez iPS można wzmocnić poprzez sterowaną indukcję pakowania do wnętrza pęcherzyków czynników o właściwościach prokardiogennych i proangiogennych. Tego zadania podejmuje się w swoich badaniach Doktorantka, przeprowadzając szereg dobrze zaplanowanych doświadczeń *in vitro* i *in vivo*, stosując szeroki wachlarz technik hodowli komórkowych, biologii komórki, mikroskopii, cytometrii i biologii molekularnej. Cel główny został jasno określony (choć pojawia się pewna niespójność, o której wspominam później), a realizacja sześciu wyodrębnionych celów szczegółowych doprowadziła do powstania obszernej, nowatorskiej pracy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kmiotek-Wasylewskiej poprzedzona jest szczegółowym *Wstępem teoretycznym*, w którym Doktorantka wprowadza nas w zagadnienia dotyczące choroby niedokrwiennej serca; komórek macierzystych, w tym iPS; klasyfikacji i biogenezy EVs oraz komunikacji międzykomórkowej odbywającej się z ich udziałem, a także dotychczasowego zastosowania EVs w regeneracji tkanek. Ostatni podrozdział dotyczy miRNA. Tu dowiadujemy się o biogenezie i funkcji tych małych niekodujących cząsteczek RNA oraz ich potencjalnym zastosowaniu w leczeniu chorób niedokrwienych. Doktorantka sprawnie wprowadza nas w zakres tematyczny rozprawy, poruszając w wyczerpujący sposób praktycznie wszystkie aspekty swojej pracy badawczej.

W części *Materiały i Metody* starannie i z dużą precyzją opisane zostały wszystkie etapy pracy eksperymentalnej, począwszy od hodowli komórkowej i uzyskania poszczególnych modeli badawczych, przez preparatykę i charakterystykę EVs, kończąc na metodach zastosowanych w ocenie wpływu EVs na funkcje komórek, przeprowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Wyniki stanowią najobszerniejszy rozdział rozprawy, zawierający uporządkowany opis uzyskanych wyników, zaprezentowanych w przejrzysty sposób na 29 rycinach. Można wyróżnić w nim trzy główne części. W pierwszej z nich mgr Kmiotek-Wasylewska opisuje wyniki dotyczące skutków transdukcji komórek iPS, mierzonych różnymi metodami i na różnych poziomach (ekspresja markerów białkowych, genów, miRNA, potencjału różnicowania). Wykazuje, że nadekspresja wybranych miRNA w komórkach iPS wpływa na ich transkryptom, a także potencjał różnicowania w kierunku kardiomiocytów i komórek śródbłonna naczyń.

W kolejnej części Doktorantka skupia się na przedstawieniu wyników dotyczących charakterystyki EVs uzyskanych z natywnych i modyfikowanych komórek iPS wykazujących nadekspresję miR-1, miR-199a-3p/miR-199a-5p lub miR-126-3p/miR-126-5p. Należy szczególnie docenić, że w tym celu stosuje szereg metod wykazanych jako niezbędne w tego typu badaniach przez Międzynarodowe Towarzystwo Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych (ang. *The International Society for Extracellular Vesicles*) w raporcie MISEV 2018. Jest to niestety wciąż rzadkość w badaniach dotyczących EVs. Dodatkowo Doktorantka oceniła obecność w EVs prokardiomiogennych i proangiogennych transkryptów oraz cząsteczek miRNA. Wyniki badań przedstawionych w tej części pracy wskazują, iż iPS z nadekspresją wybranych miRNA wydziela heterogenną populację EVs o charakterystycznym cargo molekularnym,

mogącym mieć bardziej pożądaną, terapeutyczną aktywność względem komórek mięśnia sercowego niż natywne iPS.

Ostatni etap pracy dotyczył oceny wpływu EVs na priokardiomiocytowe i proangiogenne funkcje komórek (prolifrację, migrację, żywotność, aktywność metaboliczną). W tym celu Doktorantka zastosowała ludzkie fibroblasty serca (linia NHCF-V) oraz śródbłonek naczyń wieńcowych (linia HCAEC). Dodatkowo zbadała zdolność różnicowania ludzkich fibroblastów serca w kierunku kardiomiocytów oraz potencjał do tworzenia struktur kapilarnych przez ludzkie komórki śródbłonek naczyń. Badania te wskazują, że EVs pochodzące z linii iPS-miR-1, iPS-miR-199a-3p/-5p i iPS-miR-126-3p/-5p wpływają na funkcje komórek badanych linii oraz ich potencjał do różnicowania do kardiomiocytów (linia NHCF-V, iPS-miR-1, iPS-miR-199a-3p/-5p) i tworzenia struktur kapilarnych (linia HCAEC, iPS-miR-126-3p/-5p). Potencjał regeneracyjny EVs pochodzących z natywnych iPS oraz linii iPS-miR-126-3p/-5p został także zbadany w warunkach *in vivo*, z zastosowaniem mysiego modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny dolnej. W porównaniu użyto również EVs pochodzące z dojrzałych fibroblastów skóry, wykazując całkiem odmienny do iPS sposób działania na poziomie transkryptomu w badanym modelu *in vivo*. Drobne różnice w perfuzji krwi oraz ekspresji genów uczestniczących w procesie angiogenezy wskazują, że jednak transdukcja komórek iPS prowadząca do nadekspresji miR-126-3p/miR-126-5p może przyczynić się do zwiększenia potencjału proangiogenego EVs wydzielanych przez te komórki.

Bardzo cenny, końcowy fragment *Wyników* przedstawia perspektywę dalszych badań nad EVs pochodzącymi z różnych typów komórek (iPS, iCPC, iCM, iCF). W oparciu o wyniki uzyskane podczas stażu w *University of Wisconsin-Madison School of Medicine and Public Health* (w ramach grantu NCN Etiuda) Doktorantka próbuje wskazać jakie nowe obszary tematyczne chce poruszyć w przyszłych badaniach.

W obszernej *Dyskusji* mgr Kmiotek-Wasylewska szczegółowo przedstawia zakres wykonanych prac, a rezultaty konfrontuje z opublikowanymi już wynikami badań, umiejętnie podejmując próbę ich interpretacji. Uzyskane wyniki są logicznie powiązane z cytowanym piśmiennictwem dotyczącym tematyki rozprawy doktorskiej, doprowadzając do wysunięcia trzech wniosków końcowych. Doktorantka umieszcza również cenne i przejrzyste graficzne podsumowanie uzyskanych wyników w postaci ryciny zamykającej część merytoryczną rozprawy doktorskiej.

PYTANIA I UWAGI KRYTYCZNE

1. Podczas omawiania biogenezy i mechanizmu powstawania EVs z udziałem endosomalnego kompleksu sortującego ESCRT (ang. *endosomal sorting complex required for transport*) Doktorantka wskazuje, że ESCRT to czterobiałkowy kompleks. Każdy z kompleksów ESCRT 0-III zbudowany jest z kilku białek, a łącznie buduje je około 30 białek. Biogenezę EVs w szlaku zależnym od ESCRT dopełnia aktywność bardzo ważnych białek pomocniczych takich jak Alix, które uczestniczą w pakowaniu zawartości EVs.

2. Niefortunny skrót myślowy zawarto na stronie 31 rozprawy, w podrozdziale 4.3.3. Nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniem, że stabilność pęcherzyków w różnych płynach ustrojowych, wynikająca z ochronnej roli jaką pełni podwójna błona białkowo-lipidowa, umożliwiła przenoszenie informacji niesionej przez EVs z jednej komórki do drugiej. Jest to proces zdecydowanie bardziej złożony, o czym zresztą Doktorantka pisze w dalszej części rozprawy.

3. Nie jest też prawdą, że „Skład białkowy EVs jest różny w zależności od mechanizmu ich powstawania” (strona 31). Maszyna zaangażowana w pakowanie EVs może być podobna w różnych szlakach biogenezy EVs. Dobrym przykładem jest tutaj białko Alix, zaangażowane w formowanie składu pęcherzyków powstających z udziałem kompleksu ESCRT, jak i bez jego udziału, np. w szlaku zależnym od syntenin i syndekanów.

4. Nomenklatura dotycząca miRNA wyraźnie wskazuje, że miRNA stanowią klasę a nie rodzinę niekodujących RNA. Natomiast określenie „rodzina miRNA” zostało zarezerwowane dla określenia grupy cząsteczek miRNA sklasyfikowanych wspólnie w oparciu o sekwencję dojrzałego miRNA oraz sekwencję i/lub strukturę pre-miRNA. I tak większość miRNA zgromadzonych w miRBase jest przypisana do ponad 1,5 tysiąca rodzin.

5. Podczas omawiania procesu biogenezy miRNA wkradło się kilka błędów rzeczowych:

- fragmenty rozpoznawane przez miRNA (ang. *miRNA response elements*) znajdują się nie tylko w obszarze 3'UTR mRNA docelowego.
- parowanie rzeczywiście odbywa się w obrębie sekwencji 'seed' obejmującej nukleotydy od 2 do 8 końca 5' miRNA, jednak nie można tej sekwencji nazwać sekwencją docelową. Sekwencja docelowa, rozpoznawana przez miRNA znajduje się w obrębie mRNA (ang. *miRNA response element*).
- na stronie 38 i 39 zaprezentowano bardzo uproszczony, wręcz błędny sposób biogenezy miRNA, w szczególności dotyczący ostatnich etapów powstawania cząsteczek miRNA oraz wywoływanych przez nie efektów regulatorowych. Wybór nici dupleksu miRNA, która wiąże się z białkiem Argonaut nie ogranicza się jedynie do nici 5'-3'. Natomiast, po rozpoznaniu transkryptu dochodzi do inicjacji jednej z wielu ścieżek wyciszania, np. usuwanie czapeczki i deadenylacja transkryptu prowadzącą do jego degradacji, współzawodnictwo o czapeczkę, przedwczesne zahamowanie procesu wydłużania lub degradacja białka podczas translacji. Są to procesy w dużej mierze niezależne od siebie, niewystępujące w następstwie opisanym przez Doktorantkę. Błędna sekwencja zdarzeń towarzyszących biogenezie i wyciszaniu ekspresji genów z udziałem miRNA ma również swoje odzwierciedlenie w Rycinie 8.
- nie jest prawdą, że miRNA z jednego klastra mają różne sekwencje docelowe. Dobrym przykładem jest tutaj klastery miR-17-92, złożony z 6 prekursorów miRNA (mir-17, 18a, 19a, 20a, 19b-1 i 92a-1) kodujących 4 różne sekwencje 'seed'.

6. Nie jest dla mnie jasna niespójność celów rozprawy zaprezentowanych tuż za *Wstępem teoretycznym* na stronie 45 oraz w rozdziale *Podsumowanie i wnioski końcowe* na stronie 145.

7. W doświadczeniach *in vitro* użyto EVs, które były izolowane z pożywki kondycjonowanej po mrożeniu i przechowaniu w -80 °C. Czy sprawdzano jaki wpływ ma mrożenie na zmianę składu „preparatów” pęcherzykowych użytych w kolejnych procedurach? Czy samo mrożenie mogło mieć wpływu na uwolnienie zawartości komórek obecnych w pożywce, a tym samym czynników, które miały wpływ na kolejne obserwacje?

8. Jak sprawdziło się zastosowanie oceny koncentracji białka metodą Bradforda w ocenie koncentracji pęcherzyków? Czy jest to metoda satysfakcjonująca, oddająca rzeczywistą liczbę pęcherzyków izolowanych z pożywki? Dlaczego nie wykorzystano pomiarów uzyskanych podczas oceny ruchów Browna?

9. W opisie metody obliczeń ($\Delta\Delta Ct$) zastosowanej dla danych uzyskanych w analizie real-time PCR (strona 58) zabrakło cytowania pracy źródłowej. Nie jest też jasne na jakiej podstawie wybrano $\beta 2$ mikroglobulinę, jako gen referencyjny. Czy był on stabilny w analizowanym układzie eksperymentalnym?

10. Aby możliwe było odtworzenie reakcji real-time PCR z zastosowaniem sond TaqMan, konieczne jest podanie ID zestawu sondy i starterów, a nie numeru katalogowego przypisanego wszystkim zestawom o określonej pojemności w firmie *Thermo Fisher Scientific*.

11. Wnioskowanie, że nieznacznie wyższe poziomy markerów c-kit, CXCR-4 i KDR w liniach z nadekspresją badanych miRNA w porównaniu do komórek natywnych iPS-WT mogą wskazywać na ich prokardiomiogenne i proangiogenne właściwości nie jest zasadne przy braku istotności statystycznej.

12. Na niektórych rycinach zabrakło odpowiednio dobranej skali, co uniemożliwia ocenę poziomu ekspresji badanych transkryptów; np. ryciny 24 i 25.

13. Stwierdzenie ze strony 88 o „braku selektywnego pakowania badanych transkryptów miRNA z komórek iPS do iPS-EVs” jest zbyt daleko posunięte. Doktorantka nie badała liczby kopii badanych miRNA w poszczególnych frakcjach EVs, różniących się chociażby wielkością, czy markerami powierzchniowymi. A przecież sama stwierdza, że otrzymane populacje pęcherzyków były heterogenne. Zatem pewne jest, że uzyskane wyniki są sumą informacji z poszczególnych frakcji pęcherzyków.

14. Na rycinach prezentujących wyniki żywotności ludzkich fibroblastów (linia HCAEC) i śródbłonna naczyń wieńcowych (linia NHCF-V) zabrakło prezentacji danych dla kontroli.

15. Nie mogę zgodzić się punktem 3 podsumowującym uzyskane w rozprawie wyniki. O ile prawdą jest, że natywne i modyfikowane komórki iPS uwalniają frakcje EVs wywołujące określone, opisane przez Doktorantkę efekty biologiczne, nie badano efektywności, wydajności, etc. przenoszenia informacji

(mRNA, mRNA, miRNA) upakowanej w EVs do komórek docelowych w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

16. Podobny komentarz należy się również pierwszemu z wniosków końcowych rozprawy. Nie badano efektywności pakowania miRNA, a ich poziom w EVs był porównywalny do komórek, z których zostały uwolnione.

17. Wniosek trzeci wymaga modyfikacji, gdyż zawiera on raczej generalne stwierdzenie skonstruowane w oparciu o opublikowane dane, a nie wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej. Tym bardziej, że nie przeprowadzono badań potwierdzających bezpieczeństwo stosowanych „preparatów”.

18. W rozprawie zauważyć można kilka błędów językowych, interpunkcyjnych i redakcyjnych, a także brak konsekwencji w zapisie (np. pro-regeneracyjny/proregeneracyjny) oraz nieprecyzyjne lub nawet błędne określenia, np. na stronach: 27, 28, 31 – dwuwarstw/a lipidowej/a; 38 – ulega dojrzewaniu; 39 – procesowane, post-transkrypcyjną; np. 39, 40, ...85, 100 – transkrypt(ów) mRNA; 43 – przeprowadzonych badaniach światowych; 54 – Ocena stężenia pęcherzyków metodą Bradforda, Ocena stężenia i rozkładu wielkości pęcherzyków metodą NTA; oraz rycinach, np. relatywna ekspresja.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu należy stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki wzbogacają naszą dotychczasową wiedzę o nowe informacje na temat możliwości wzmagania proregeneracyjnych właściwości EVs wydzielanych przez iPSC, aby w przyszłości możliwe było ich zastosowanie w terapiach prokardiogennych i proangiogennych. Pani mgr Katarzyna Kmiotek-Wasylewska wykazała się doskonałym opanowaniem wielu nowoczesnych technik badawczych z zakresu biologii komórki, cytometrii, mikroskopii i biologii molekularnej. Wszystkie wskazane na wstępie cele pracy zostały osiągnięte. Dużą wartość rozprawy wynika z kompleksowego podejścia do rozpatrywanego problemu oraz zastosowania odpowiednio dobranych, nowoczesnych metod. Przedłożona do recenzji rozprawa nie tylko dostarcza danych, które wzbogacają już istniejącą wiedzę w nowe, kluczowe informacje, ale również, prezentowane tu wyniki stanowią podstawę do dalszych badań, zmierzających do zastosowania spersonalizowanych terapii schorzeń niedokrwiennych serca. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy jak pracowitość i docieklivość. Jestem przekonana, wyniki uzyskane przez Doktorantkę zyskają uznanie specjalistów. Przedstawione zaś powyżej uwagi i pytania nie zmieniają wysokiej oceny pracy, wskazując jedynie na niedociągnięcia związane z trudnościami jakie napotyka badacz biologii EVs, które często wynikają z ograniczeń metodycznych, wymagających postępu technologicznego. Część niedociągnięć związanych jest również z procesem redagowania tej bardzo obszernej i drobiazgowej rozprawy.

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kmiotek-Wasylewskiej spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z obowiązującymi przepisami i mam zaszczyt wnieść do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kmiotek-Wasylewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość naukową rozprawy oraz znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Olsztyn, 28 maja 2021 r.