Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Al. Kościuszki 4, 90-419 Łódź

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Zakład Biologii Nowotworów
ul. Żeligowskiego 7/9
90-752 Łódź

Łódź 18.05.2021

Recenzja pracy doktorskiej
Pani magister Katarzyny Kmiotek Wasylewskiej
pt.: *„Prokardiomiogenne i proangiogenne właściwości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych wykazujących nadekspresje wybranych mikroRNA"*

przygotowanej pod kierunkiem profesor Ewy Zuby-Surmy
w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Recenzja w przewodzie dotyczącym nadania stopnia w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Pani Katarzyna Kmiotek Wasylewska analizowała wpływ pęcherzyków uwalnianych przez komórki iPS na kilka procesów związanych z biologią komórek macierzystych i progenitorowych. W swoich badaniach doktorantka wykorzystała pęcherzyki wydzielane przez komórki iPS niemodyfikowane genetycznie jak również pęcherzyki wydzielane przez komórki iPS, które wykazywały zdolność do wzmożonej syntezy różnych cząsteczek miRNA.

Praca jest bardzo ważna z kilku powodów. Po pierwsze ze względów poznawczych. Wyniki badań pęcherzyków wydzielanych przez różne komórki należą obecnie do jednych z najbardziej intrygujących. Podobnie, prowadzi się bardzo intensywne badania miRNA. Ponadto, zastosowanie iPSc w medycynie regeneracyjnej napotyka na duże trudności ze względu na zdolność tych komórek, do formowania teratom.

W tej sytuacji różne produkty komórek iPS rozpatrywane są jako posiadające potencjał terapeutyczny.

Tematyka badań jest więc bardzo istotna. Łączy się tu trzy ważne dla rozwoju biologii zagadnienia: iPSc, miRNA i pęcherzyki wydzielnicze. Przeprowadzenie skrupulatnych badań takiej kombinacji zjawisk, pod opieką doświadczonej promotor, w renomowanym ośrodku naukowym, przez ambitną doktorantkę dawało duże szanse na otrzymanie wartościowych wyników i przygotowanie dysertacji na bardzo wysokim poziomie.

Cała koncepcja została wzmocniona przez bardzo staranny dobór molekuł miRNA, biorąc pod uwagę ich udokumentowaną rolę w różnych procesach fizjologicznych.

Badania przeprowadzono w sposób bardzo staranny. Po pierwsze wykonano bardzo pracochłonne analizy pozwalające ustalić, czy faktycznie udało się pozyskać pęcherzyki wydzielnicze (EVs). W tym celu zastosowano nowoczesną metodologię. Po drugie wpływ pęcherzyków badano po zastosowaniu bardzo adekwatnych modeli.

Doktorantka postawiła sobie kilka ambitnych celów.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, na proces kardiomiogenezy, oraz angiogenezy . Dodatkowym celem było także zbadanie potencjału pro-regeneracyjnego EVs pozyskanych z natywnych i modyfikowanych genetycznie komórek iPS (iPS-EVs), w mysim modelu niedokrwiennego uszkodzenia tkanek. Próba osiągnięcia tak postawionych celów zależała od zastosowania kilku modeli badawczych i szerokiego repertuaru technik.

Pęcherzyki pochodziły z ludzkich komórek iPS, które nie były modyfikowane metodami inżynierii genetycznej i komórek iPS modyfikowanych genetycznie. tak aby doszło w nich do nadekspresji wybranych miRNA – tj. miR-1, miR-199a oraz miR-126. Dodatkowo, kontrolnie posłużono się iPSc zmodyfikowanymi genetycznie, tak aby wykazywały nadekspresję copGFP.

Scharakteryzowano frakcje EVs. Badano stężenie i rozkład wielkości pęcherzyków metodą NTA. Dokonano ich analizy za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Dokonano analizy profilu antygenowego EVs stosując wysokorozdzielczą cytometrię przepływową i cytometrię obrazową. Wykonano badania metodą Western-Blot oraz RT- PCR w czasie rzeczywistym. Dokonano oceny profilu antygenowego komórek iPS natywnych i modyfikowanych genetycznie z zastosowaniem cytomertii przepływowej.

Przeprowadzono badania *in vitro* następujących rodzajów komórek poza iPSc: prawidłowych ludzkich komórek śródbłonka naczyń wieńcowych (HCAEC), ludzkich fibroblastów izolowanych z komory serca (NHCF-V), , a także ludzkich skórnych fibroblastow (NHDF-Ad) Dodatkow badano ludzkie indukowane kardiomiocyty (iCM), ludzkie indukowane fibroblasty serca (iCF).

Prowadzono również kilka rodzajów różnicowań. Różnicowanie komórek iPS w kierunku kardiomiocytów i komórek endotelium. W kierunku kardiomiocytow różnicowano również komórki fibroblastów izolowanych z komory serca (NHCF-V).

Po otrzymaniu EVs z różnych komórek iPS testowano wpływ iPS-EVs na wybrane funkcje komórek serca. Analizowano proliferację, przeżywalność, zdolność do migracji i metaboliz komórek poddanych wpływom EVs.

Przeżywalności komórek poddanych wpływom EVs badano w warunkach podstawowych i cytotoksycznych.

Wpływ EVs badano w bardzo róznych warunkach np. w zakresie kardiomiogenezy w obecności cytokin i pod nieobecność cytokin, a także w obecności i bez inhibitorów miRNA.

Prowadzone analizy umożliwiły dokonanie licznych obserwacji, a następnie wyciągnięcie wniosków.

Po pierwsze stwierdzono, że nadekspresją wybranych cząsteczek miRNA nie znosi pluripotencji, co jest ważną i ciekawą obserwacją samą w sobie, jako że miRNA próbuje sie wykorzystać zarówno do otrzymywania iPSc jak i indukcji ich róznicowania. Gdyby wybrane czasteczki wpływały negatywnie na pluripotencję np. indukując różnicowanie utrudniałoby to oczywiście wykorzystanie komórek iPSc, jako swoistych bioreaktorów do produkcji pęcherzyków wydzielnicznych zawierających wybrane molekuły miRNA.

Zaobserwowano, że nadekspresja cząsteczek miR-1, miR-199a lub miR-126 w komórkach iPS, czyni je bardziej podatnymi na różnicowanie w kierunku kardiomiocytów (w przypadku miR-1 i miR-199a) i komórek śródbłonka (miR-126).

Stwierdzono, że komórki iPS produkują pęcherzyki wydzielnicze zawierające różne molekuły biologicznie czynne, w tym cząsteczki miRNA których nadekspresję wywołana została metodami inżynierii genetycznej.

Stwierdzono, że iPS-EVs wykazujące nadekspresję miR-1 miR-199a wpływają proregeneracyjnie na komórki serca. Efekt taki wykryto zarówno w warunkach podstawowych jak i w środowisku o wyższej cytotoksyczności. Wzmiankowany efekt proregeneracyjny zależał od stymulacji ich aktywność migracyjnej i zwiększanie aktywności metabolicznej. W warunkach *in vitro* zaobserwowano, że zdefiniowane pęcherzyki promują, także różnicowanie wybranych fibroblastów serca w kierunku kardiomiocytów przejawiające się wzrostem ekspresji genów związanych z kardiomiogenezą.

Wykryto że iPS-EVs z nadekspresją miR-126 odgrywają rolę proangiogenną. Efekt ten opiera się o stymulację ich aktywności metabolicznej i migracyjnej, promowanie przeżywalności w

warunkach cytotoksycznych, a także istotną stymulację zdolności tych komórek do formowania kapilar endotelialnych *in vitro*.
Ostatnie badania dotyczyły analiz *in vivo*. Wykryto że iPS-EVs z nadekspresją miR-126 zwiększają perfuzję tkanek, co przekłada się na zmniejszenie nekrozy i ogólną poprawę stanu zwierząt po transplantacji preparatów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Badania podsumowano w następujący sposób. EVs z komórek iPS wykazujących nadekspresję miR-1, miR-199a, oraz miR-126 mogą być wykorzystane do promowania procesów kardiomiogenezy, oraz angiogenezy w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.
Modyfikowane genetycznie komórki iPS, oraz izolowane z nich preparaty pęcherzyków zewnątrzkomórkowych mogą w przyszłości stać się lekiem stosowanym w terapii chorób którym towarzyszy uszkodzeń niedokrwiennych tkanek.

Wnioski te uważam za uzasadnione.

Praca jest przygotowana bardzo dobrze.

Mam tylko kilka wątpliwości co do sposobu prezentacji niektórych wyników.

Pierwsza. Uważam, że nie jest optymalne pokazywania obok siebie prążków WB ujmując to kolokwialnie wyciętych z różnych żeli.

Po drugie dla niektórych czytelników mylące może być pokazywania słupków powstałych po analizie RT-PCR wykonanych różnymi zestawami starterów obok siebie, ponieważ różne startery mają różna wydajność reakcji. Wynik sugeruje, że można porównywać bezpośrednio ekspresję różnych genów między sobą. Jest to dość często spotykana praktyka. Jednak formalnie nie jest ona poprawna chyba, że wszystkie startery mają wystandaryzowaną wydajność reakcji.

Co do ogólnej strategii doboru metod to trochę zabrakło mi badań prowadzących do powstania funkcjonalnych kardiomiocytów.

Jako biotechnologowi nasuwają mi się pytania z pogranicza badań podstawowych i stosowanych.
Czy można otrzymywać pęcherzyki w innych ludzkich komórkach niż iPSc przydatne w medycyenie regeneracyjnej czy ogólnie innych rodzajach medycyny? Czy pozyskiwanie pęcherzyków posługując się liniami nieśmiertelnymi? Kolejne pytanie związane z poprzednim. Czy zdaniem doktorantki iPSc mają jakąś przewagę w stosunku do nieśmiertelnych nienowotworowych komórek ludzkich w tym zakresie?

*Czy pęcherzyki można wykorzystać aby przygotować np szczepionki? Czyli np czy można zamiast zapakowania w nie **mi**RNA doprowadzić do zapakowania w nie mRNA kodującego białko jakiegoś patogenu?*
Czy może to być formulacja lepsza czy gorsza od liposomalnej?

Podsumowując chciałbym podkreślić, że dysertacja przedstawiona do recenzji jest niezwykle interesująca i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Została przygotowana w sposób staranny i właściwy, Praca wnosi nowe, ważne informacje do dotychczasowego stanu wiedzy, otwiera nowe możliwości badawcze i wskazuje na ich wykorzystanie w praktyce klinicznej.

Niektóre wyniki związane z pracą doktorską zostały opublikowane. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Sekula M, Kedracka-Krok S, Kamycka E, Adamiak M, Jankowska U, Madetko-Talowska A, Sarna M, Bik-Multanowski M, Kolcz J, Boruczkowski D, Madeja Z, Dawn B, Zuba-Surma EK; *„Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microvesicles Transmit RNAs and Proteins to Recipient Mature Heart Cells Modulating Cell Fate and Behavior"*; 2015; Stem Cells. 33(9):2748-61

Autorka jest również współautorką publikacji niewchodzących w zakres pracy doktorskiej. Bobis-Wozowicz S*, Kmiotek K*, Kania K, Karnas E, Labedz-Maslowska A, Sekula M, Kedracka-Krok S, Kolcz J, Boruczkowski D, Madeja Z, Zuba-Surma EK; *„Diverse impact of xeno-free conditions on biological and regenerative properties of hUC-MSCs and their extracellular vesicles"*; 2017; J Mol Med (Berl). 95(2):205-220;

Ponadto doktorantka jest autorką dodatkowych publikacji związanych z tematyką medycyny regeneracyjnej.

Paw M, Borek I, Wnuk D, Ryszawy D, Piwowarczyk K, Kmiotek K, Wójcik-Pszczoła KA, Pierzchalska M, Madeja Z, Sanak M, Błyszczuk P, Michalik M, Czyż J; *„Connexin43 Controls the Myofibroblastic Differentiation of Bronchial Fibroblasts from Asthmatic Patients"*; 2017; Am J Respir Cell Mol Biol.

Rzezniczek S, Obuchowicz M, Datka W, Siwek M, Dudek D, Kmiotek K, Oved K, Shomron N, Gurwitz D, Pilc A; *"Decreased sensitivity to paroxetine-induced inhibition of peripheral blood mononuclear cell growth in depressed and antidepressant treatment-resistant patients"*; 2016; Transl Psychiatry. 6(5):e827

Zwracam się w związtu z tym z wnioskiem do **Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu** Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny

Kmiotek Wasylewskiej - i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie zważywszy na duże walory poznawcze i aplikacyjne przedstawionej pracy wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
Zakład Biologii Nowotworów
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Prof. dr hab. n. med. Piotr Rieske