



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko



Warszawa, 26 sierpnia 2022

**Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej: „Application of human induced pluripotent stem cells and CRISPR/Cas9 gene editing technology for investigation of molecular background of Duchenne muscular dystrophy-related cardiomyopathy”
autorstwa Pani mgr Kaliny Andrysiak.**

Praca doktorska Pani mgr Kaliny Andrysiak powstała w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jej promotorem jest prof. Józef Dulak a promotorem pomocniczym dr Jacek Stępniewski.

Celem pracy było opracowanie modelu badawczego i wykorzystanie go do oceny wpływu braku dystrofiny na funkcjonowanie kardiomiocytów uzyskanych z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC). We wcześniejszych projektach prof. Dulak i jego współpracownicy wykorzystywali iPSC do określania funkcji takich czynników, jak np. hemoksygenaza hemowa -1 czy wybrane miRNA. Zespół ma więc znaczące doświadczenie w pracach z tego rodzaju komórkami i doskonale zdaje sobie sprawę nie tylko z ich zalet ale także z zagrożeń płynących z ich zmienności "osobniczej". iPSC to niewątpliwie najlepsze obecnie narzędzie pozwalające na analizy fenotypu związanego z rozwojem choroby a także na opracowywanie potencjalnych terapii badanych schorzeń. Model komórkowy, którego uzyskania podjęła się Doktorantka miał pozwolić na określenie w jaki sposób mutacja w genie kodującym dystrofinę wpływa na funkcjonowanie kardiomiocytów. Swoimi badaniami Doktorantka objęła także komórki pozbawione dystrofiny i utrofiny. Uzyskanie i analiza iPSC mogły wskazać, i faktycznie wskazały, na podłoże kardiomiopatii związanych z rozwojem dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD).

Projekt, który realizowała Doktorantka, a jego wyniki opisała w rozprawie doktorskiej, skupiał się na następujących celach: 1) uzyskaniu izogenicznych linii ludzkich iPSC oraz uzyskanie z nich kardiomiocytów pozwalających na badanie podłoża kardiomiopatii towarzyszącej rozwojowi DMD; 2) identyfikacji zmian w ekspresji genów i poziomie białek związanych z mutacją w genie kodującym dystrofinę; 3) wytypowaniu i analizie najbardziej zmienionych funkcji kardiomiocytów uzyskanych

z pozbawianych dystrofiny iPSC; 4) uzyskaniu i wstępnej analizie iPSC pozbawionych zarówno funkcjonalnej dystrofiny jak i utrofiny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku angielskim licząca 150 stron, z czego **Wstęp** stanowi 28 stron, **Materiały i metody** 24 strony, **Wyniki** 36 stron, a **Dyskusja** 15 stron. Ponadto, praca zawiera **Spis treści**, **Spis skrótów**, wymagane **Streszczenia** w języku polskim i angielskim, **Cele pracy**, **Wnioski**, **Piśmiennictwo** (350 pozycji!!) i **Figury dodatkowe**.

Wstęp do rozprawy doktorskiej w sposób klarowny i wyczerpujący przedstawia podłoże dystrofii mięśniowej Duchenne'a, rozwój choroby oraz kardiomiopatię jej towarzyszącą. Świetnie charakteryzuje różne mutacje, które mogą doprowadzić do rozwoju DMD i ich konsekwencje. Zwraca uwagę, które mutacje związane są z częstszym powstawaniem kardiomiopatii. Omawia modele zwierzęce wykorzystywane w badaniach podłoża i rozwoju DMD. Ta część pracy obejmuje też bardzo dobrą charakterystykę narzędzi badawczych, jakimi są indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste oraz technika CRSIPR/Cas9. **Wstęp** przedstawia także obecny stan badań nad opracowaniem terapii dystrofii, w tym także związanych z nią kardiomiopatii, włączając w to te, które już trafiły do kliniki. W końcowej części tego rozdziału Doktorantka skupia się na przybliżeniu metabolizmu żelaza w mięśniu sercowym, który, jak się okazało w wyniku prowadzonych przez nią badań, ulega zaburzeniom w kardiomiocytach pozbawionych dystrofiny. **Wstęp** zawiera wszystkie informacje istotne dla zrozumienia pracy i świadczy o bardzo rozległej wiedzy Autorki. Ta część pracy "czytała się" bardzo dobrze. Po jej zakończeniu czułam się gotowa do lektury **Wyników**.

Materiały i metody także nie budziły moich wątpliwości. Cele doktoratu mgr Kalina Andrysiak zrealizowała przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń, podczas których wykorzystwała liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej, czy biochemii. Do metod tych zaliczają się m.in.: hodowle komórkowe, reprogramowanie ludzkich komórek somatycznych (jednojądrzaste komórki krwi), różnicowanie ludzkich iPSC, wykorzystanie technik CRISPR/Cas9, testy metaboliczne, elektrofizjologiczne, qRT-PCR, analizy transkryptomu, proteomika, immunodetekcja, Western blotting i inne. Otrzymane dane poddane zostały analizom bioinformatycznym i statystycznym. Schematy i tabele ułatwiły zrozumienie przeprowadzonych doświadczeń i analiz. Zastosowanie różnorodnych metod pozwoliło Doktorantce na doskonale opanowanie warsztatu naukowca. **Materiały i Metody** prezentują wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki. Do tej części pracy mam jedynie pytanie o wybór metody reprogramowania. Dlaczego zdecydowano się na wykorzystanie zestawu zawierającego c-Myc? Czy rzeczywiście wydajność metody, w której stosuje się onkogen przeważała?

Wyniki rozpoczyna szczegółowy opis uzyskiwania ludzkich iPSC - pochodzących od dwóch osób zdrowych i od jednego chorego na DMD, manipulacji genetycznych, które doprowadziły do uzyskania 3 par iPSC wykorzystywanych w szczegółowych analizach fenotypu, a także metod różnicowania iPSC prowadzących do uzyskania kardiomiocytów - iPSC-CM. W efekcie uzyskano trzy linie wyjściowe, określane

jako DMB01-CTRL, DMB02-CTRL i DMB03-DMD. Wykorzystując technikę CRISPR/Cas9 w komórkach linii 01 i 02 doprowadzono do delecji egzonu 50 w genie kodującym DMD - tym samym doprowadzający do powstania linii DMB01-DMD oraz DMB02-DMD. W linii 03 doprowadzono do korekcji mutacji uzyskując odpowiednik linii kontrolnej. Taki zabieg umożliwił porównanie komórek o takim samym "pochodzeniu" a tym samym badanie efektów mutacji lub jej braku, w komórkach o tym samym podłożu genetycznym. Wszystkie iPSC zostały przeanalizowane pod względem ekspresji genów pluripotencji, zdolności do różnicowania w pochodne ekto-, endo- i mezodermy. Określono także ich kariotyp. Mam dwa pytania dotyczące tych analiz - jaki był odsetek komórek o prawidłowym genotypie w przypadku każdej linii iPSC? Mam też uwagę dotyczącą analizy kul zarodkowych. Po trzech tygodniach hodowli to już nie są kule, ale rozrosty kul zarodkowych. Fig. 12c przedstawiająca immunodekację dystrofiny jest dla mnie nieczytelna. Kolor zielony i żółty są tak do siebie podobne, że trudno rozróżnić sygnał pochodzący od dystrofiny i od aktywny.

Dostęp do narzędzi, jakimi były trzy pary linii iPSC pozwolił na uzyskanie kardiomiocytów a następnie analizę transkryptomoczną i proteomiczną komórek kontrolnych i pozbawionych dystrofiny. Analizy te przeprowadzone zostały w sposób bardzo precyzyjny, włączając wszelkie odpowiednie korekty. Wyniki tych analiz przedstawiono w sposób bardzo klarowny, wskazując na procesy które ulegają zmianie przy braku dystrofiny. Połączenia transkryptomiki i proteomiki pozwoliło na identyfikację 18 transkryptów i białek, których poziom zmieniał się podobnie oraz 13, w przypadku których poziom transkryptu i białka nie zmieniał się tak samo. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na wytypowanie kilku białek do dalszych analiz. Było to, m.in. białko mitoNEET, o którym wiadomo że jest zaangażowane w kontrolę homeostazy żelaza w komórkach. Poziom tego białka był niższy w iPSC-CM wszystkich trzech linii DMD. Co ciekawe wiązało się to z podwyższonym poziomem jonów żelaza zarówno w mitochondriach jak i cytoplazmie. Kolejnym etapem badań była analiza ekspresji genów i kodowanych przez nie białek związanych z metabolizmem żelaza w komórkach oraz stresem oksydacyjnym. W efekcie, Doktorantka wykazała, że iPSC-CM pozbawione dystrofiny były bardziej wrażliwe na stymulację żelazem. Obserwowała też wzrost poziomu wolnych rodników. Efekt ten można było odwrócić stosując chelator żelaza. Pokłosiem tych badań była analiza ultrastruktury mitochondriów komórek linii DMB01-CTRL i DMD. Załączone w doktoracie zdjęcia niestety nie są najbardziej czytelne. Dają jednak przesłanki do stwierdzenia, że być może dochodzi do uszkodzeń mitochondriów w iPSC-CM pozbawionych dystrofiny.

Kolejnym etapem badań była analiza zmian w poziomie jonów wapnia. W przypadku kardiomiocytów DMD zaobserwowano różnice zarówno w liczbie jak i czasie trwania oscylacji wapniowych. Doktorantka wykryła także zmiany w ekspresji genów kodujących czynniki zaangażowane w regulację poziomu jonów wapnia w komórce. Udokumentowała także zmiany w parametrach elektrofizjologicznych a także związanych z "sztywnością" błony komórkowej badanych komórek. Last but not least, Doktorantka wykazała, że

wprowadzenie mutacji w genie kodującym utrofinę nasila fenotyp komórek DMD. Przywrócenie funkcji genu kodującego utrofinę znosi te efekty.

Podsumowując uzyskane wyniki stwierdzam, że Doktorantce udało się opracować doskonały model badawczy umożliwiający analizę fenotypu kardiomiocytów pozbawionych dystrofiny. W swoich badaniach wykorzystwała 3 pary linii komórkowych, co ograniczyło wpływ podłoża genetycznego badanych komórek. Przeprowadzając analizę transkryptomyczną i proteomiczną zidentyfikowała zaburzenia w ekspresji genów związanych z metabolizmem żelaza i wapnia, wpływające na poziom stresu oksydacyjnego oraz mogące mieć wpływ na funkcjonowanie kardiomiocytów, co może prowadzić do rozwoju kardiomiopatii. Wyniki zostały przedstawione w sposób logiczny i klarowny, a to przy ich ogromie niekoniecznie było łatwym zadaniem.

W *Dyskusji* wyniki zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań. Szczególnie podobał mi się fragment dotyczący powiązań kardiomiopatii z metabolizmem żelaza. Co istotne, Doktorantka zwróciła uwagę na problemy, jakie mogą być związane ze stosowanymi metodami badawczymi i analitycznymi. W tym fragmencie pracy zabrakło mi jedynie "zbiorczego" nakreślenia dalszych perspektyw badań dotyczących podłoża kardiomiopatii w DMD, ze wskazaniem najlepszego zdaniem Doktorantki modelu in vivo.

Rozprawa doktorska napisana jest po angielsku. Trudno mi ocenić czy jej język jest super poprawny. Na pewno jest bardzo zrozumiały. Czytało się ją dobrze. Zwróciłabym pewnie większą uwagę na interpunkcję, bo nawet jako nie-anglistka zauważałam pewne usterki. Ilustracje, schematy, wykresy są bardzo starannie przygotowane.

Podsumowując, pani mgr Kalina Andrysiak zrealizowała wszystkie postawione cele. Jej tytaniczny wręcz wysiłek pozwolił na opracowanie modeli badawczych umożliwiających analizę fenotypu kardiomiocytów uzyskanych z iPSC. Dostęp do takich kardiomiocytów umożliwił określenie roli dystrofiny w ich funkcji - analizę transkryptomyczną, proteomiczną, funkcjonalną oraz wytypowanie procesów komórkowych zmienionych w wyniku mutacji. Jest to niewątpliwie duża wartość przedstawionej do oceny pracy. Ponadto, podczas realizacji doktoratu pani mgr Andrysiak uczestniczyła w innych projektach badawczych - jest współautorką licznych publikacji.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość naukową przedstawionej rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.