

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Kraszewskiej pt. „Characterization of cellular barriers for successful AAV transduction in the heart using human iPSC-derived cardiomyocytes and cardiac fibroblasts as a model”**

Na przestrzeni ostatnich lat stopniowo kolejne terapie wykorzystujące metody medycyny molekularnej, a w szczególności terapii genowej są wprowadzane do praktyki klinicznej, często przynosząc przełom nie tylko w leczeniu schorzeń o podłożu typowo genetycznym ale także w niektórych schorzeniach o podłożu wieloczynnikowym. Jednak postęp w zakresie terapii genowej wydaje się znacznie wolniejszy niż przypuszczaliśmy 20 lub 10 lat temu. Mimo znaczącego postępu wiedzy dotyczącego rozwoju wektorów zarówno wirusowych jak i nie wirusowych oraz wprowadzania innowacyjnych metod transferu wektorów nadal jedną z głównych barier w uzyskaniu efektu terapeutycznego jest często niski poziom efektywnie transdukowanych komórek. Zwykle transdukcja w warunkach *in vivo* jest znacznie niższa od tej uzyskiwanej w warunkach laboratoryjnych *in vitro* oraz efektywność transdukcji u człowieka i dużych zwierząt laboratoryjnych jest niższa niż uzyskiwana w przypadku eksperymentów prowadzonych na małych zwierzętach np. myszach lub szczurach. Mimo to nadal istnieją obszary patologii człowieka, które stanowią potencjalnie bardzo atrakcyjny cel dla terapii genowej. W przypadku chorób układu krążenia są to w szczególności: niewydolność serca, kardiomopatie, nawrót zwięzienia po zabiegach na tętnicach wieńcowych, genetycznie uwarunkowane zaburzenia rytmu serca, degeneracja pomostów żylnych po rewaskularyzacji chirurgicznej, angiogeneza w chorobie niedokrwiennej serca. Jednym z podstawowych problemów do rozwiązania pozostaje szczególnie niska efektywność transdukcji komórek serca człowieka uzyskiwana w warunkach *in vivo*. Ten problem dotyczy także szeroko dzisiaj stosowanych wektorów opartych na wirusach związanych z adenowirusami (AAV), których sukces wynika przede wszystkim z wysokiej efektywności i trwałości transdukcji przy niskiej indukcji odczynu zapalnego. Stąd za bardzo cenne uważam podjęcie przez mgr Izabelę Kraszewską badań dotyczących właśnie tej problematyki, których wyniki zawarto w rozprawie doktorskiej pt. „Characterization of cellular barriers for successful AAV transduction in the heart using human iPSC-derived cardiomyocytes and cardiac fibroblasts as a model” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Jaźwy-Kusior w wiodącym ośrodku badań

eksperymentalnych w obszarze terapii genowej w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie, kierowanym przez wybitnego specjalistę w tym obszarze Prof. Józefa Dulaka.

Praca jest obszerna obejmuje 169 stron wydruku zawierającego wiele tabel oraz rycin i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich; składa się ze wstępu wprowadzającego w problematykę pracy, sformułowania celu pracy, opisu stosowanych metod, przedstawienia wyników, dyskusji, wniosków, wykazu piśmiennictwa oraz syntetycznego streszczenia w języku polskim i angielskim. Na końcu rozprawy umieszczono wykaz w pełni wykorzystanego i właściwie przytoczonego piśmiennictwa. Znaczna część z 333 cytowanych prac została opublikowana w ostatnim pięcioleciu.

We „Wstępie” poprzedzonym wykazem skrótów używanych w tekście, który znacznie ułatwia lekturę rozprawy, Doktorantka kompetentnie i rzeczowo przedstawia koncepcję transferu genów dla celów terapii genowej, biologię wirusów AAV, strukturę i sposób działania wektorów opartych na wirusach AAV ze szczególnym uwzględnieniem odpowiedzi immunologicznej na transdukcję przy pomocy tych wektorów. W kolejnej części wstępu Doktorantka podsumowuje aktualny stan wiedzy dotyczący zastosowania wektorów AAV w badaniach przed- i klinicznych w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego. Szczególnie ciekawa i bardzo wartościowa dla czytelnika jest część poświęcona trudnościom i ograniczeniom w translacji efektów uzyskiwanych w badaniach na zwierzętach do badań klinicznych na ludziach. Końcowa część wstępu jest poświęcona omówieniu metod badania mechanizmów transdukcji *in vitro* ze szczególnym uwzględnieniem komórek uzyskiwanych z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), wykorzystanych w badaniach wykonanych przez Doktorantkę. Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w problematykę przeprowadzonych badań oraz uzasadnia sformułowany w kolejnym rozdziale cel główny rozprawy doktorskiej jakim była identyfikacja głównych barier dla wydajnej transdukcji tkanek ludzkiego serca wektorami AAV. Realizacji celu głównego służyło rozwiązanie problemów badawczych zaadresowanych w celach szczegółowych odnoszących się do potencjalnych mechanizmów barier ograniczających efektywność transdukcji wektorów AAV w zastosowanym modelu hodowli kardiomocytów (iPSC-CMs) i fibroblastów sercowych (iPSC-CFs) takich jak: 1) oddziaływania międzykomórkowe w hodowlach w warunkach 3D, 2) transport wewnątrzkomórkowy i obróbka kapsydu wektora w cytoplazmie, 3) oddziaływanie białek odpowiedzi na uszkodzone DNA z genomem wektora oraz 4) długoterminowe konsekwencje ekspresji transgenu takie jak obecność dwunucowego RNA w kardiomocytach.



W rozdziale „Metody” Autorka starannie i bardzo szczegółowo opisuje metodę uzyskania oraz prowadzenia hodowli kardiomocytów oraz fibroblastów sercowych uzyskiwanych z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) wykorzystanych w przeprowadzonych eksperymentach. Doktorantka opisuje metodologię produkcji wykorzystanych do badań wektorów AAV w małej i dużej skali, metody transdukcji hodowli kardiomocytów (iPSC-CMs) i fibroblastów sercowych (iPSC-CFs) oraz wykorzystane sposoby oceny jej efektywności. Bardzo dokładnie Doktorantka opisała wszystkie wykorzystane metody biologii molekularnej wykorzystane w przeprowadzonych eksperymentach. Podano także metodykę badań, którym poddano tkankę uzyskaną z wyszczepionych serc od pacjentów poddanych przeszczepieniu serca. W sposób w pełni wyczerpujący przedstawiono metody analizy statystycznej. Należy podkreślić, że zastosowane w pracy metody eksperymentalne i statystyczne są bardzo nowoczesne i adekwatne dla rozwiązania będących przedmiotem niniejszej rozprawy problemów badawczych.

W kolejnej części pracy mgr Izabela Kraszewska prezentuje uzyskane wyniki w sposób uporządkowany i adekwatny do sformułowanych celów ilustrując je właściwie dobranymi tabelami i rycinami. Należy podkreślić wysoką staranność i przejrzystość rycin, w szczególności zdjęć histopatologicznych prowadzonych hodowli komórkowych, które bardzo ułatwiają zapoznanie się czytającego rozprawę z najważniejszymi wynikami. Dyskusja jest bardzo rzeczowa, wnikliwa i krytyczna. Jej kolejne części koncentrują się na kolejnych poddawanych analizie wynikach i logicznie prowadzą przez kolejne wynikające z siebie etapy prowadzonego eksperymentu. W pierwszym etapie prowadzonych badań Doktorantka wykazała, że AAV6 był bardziej wydajny w warunkach hodowli 2D a serotyp AAV9 bardziej wydajny w warunkach 3D. Doktorantka wykazała, iż może za to odpowiadać aktywność endogennych sialidaz, które wpływają na poziom ekspozycji galaktozy – receptora dla AAV9 i kwasu sialowego – receptora dla AAV6. Za ten efekt może odpowiadać aktywność sialidazy NEU3, na co wskazują obserwacje Doktorantki pochodzące z eksperymentów z komórkami knock-out NEU3 oraz wykazanie dużej zmienności poziomu NEU3 w tkance serca pacjentów poddawanych transplantacji tego narządu. W kolejnych eksperymentach Doktorantka poddała badaniu znaczenie przetwarzania kapsydu i genomu wektora wewnątrz transdukowanych komórek. Wykazano, że hamowanie aktywności kinazy białkowej CK2 prowadzi do wzrostu efektywności transdukcji we wszystkich typach badanych komórek. Doktorantka wykazała, że inhibicja aktywności CK2 prowadzi do wyciszenia kaweoliny-1 oraz aktywacją odpowiedzi na niesfałdowane białka, które to procesy zwiększają efektywność transdukcji wektorów AAV.

Dodatkowo mgr Izabela Kraszewska zaobserwowała, że obecność białka opiekuńczego BIP jest niezbędna do efektywnej transdukcji komórek iPSC-CFs. Dodatkowo wykazano, że hamowanie aktywności CK2 prowadzi do przejściowej aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzone DNA (DDR) we wszystkich typach komórek poprzez destabilizację białka Mre11. Białko Mre11 poprzez hamowanie syntezy drugiej nici DNA wektora hamuje ekspresję transgenu w transdukowanych komórkach. Bardzo ciekawym elementem badań Doktorantki i niezwykle wartościowym w moim przekonaniu jest wykazanie wpływu AAV na mechanizmy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej komórek iPSC-CMs i iPMCCFs. W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że ekspozycja na AAV obniża ekspresję receptorów Toll-podobnych (TLR) i innych prozapalnych genów przy jednoczesnym wzroście miRNA-146a oraz miRNA-199 w transdukowanych komórkach. Wykazano także obecność dsRNA oraz, że odpowiedź na dsRNA w obecności interferonu prowadzi do obniżenia poziomu transkryptów białka wskaźnikowego GFP. W dyskusji własne wyniki Doktorantka umiejętnie konfrontuje z wynikami nielicznych opublikowanych badań dotyczących mechanizmów ograniczających efektywność transdukcji komórek układu sercowo-naczyniowego człowieka przy pomocy wektorów opartych na wirusach AAV. Ta część rozprawy w pełni ukazuje dobre zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze dotyczącej zagadnienia będącego przedmiotem rozprawy. Należy zwrócić uwagę na krytycyzm Autorki wobec uzyskanych wyników i świadomość potencjalnych ograniczeń wynikających z zastosowanych metod badawczych co świadczy o właściwym przygotowaniu merytorycznym i dojrzałości naukowej.

Kolejny rozdział obejmuje trzy główne wnioski dotyczące mechanizmów ograniczonej efektywności transdukcji komórek serca człowieka przez wektory AAV sformułowane w oparciu o wcześniej wnikliwie omówione wyniki. Wniosek pierwszy wskazuje na znaczenie międzykomórkowych interakcji i aktywności endogennych sialidaz. Wniosek drugi podkreśla znaczenie mechanizmów związanych z kinazą proteinową CK2. Natomiast we wniosku trzecim Doktorantka podkreśla znaczenie generowania dsRNA podczas długotrwałej ekspresji transgenu.

Podsumowując, w moim przekonaniu praca doktorska mgr Izabeli Kraszewskiej stanowi wysoce oryginalne opracowanie i wnosi niezwykle istotny wkład w rozwój wiedzy o mechanizmach ograniczonej transdukcji komórek serca człowieka przez wektory oparte na wirusach AAV. Uzyskane wyniki oraz zaproponowane przez Doktorantkę mechanizmy mogą mieć bardzo duże znaczenie podczas planowania kolejnych badań przed i klinicznych z wykorzystaniem metod transferu genów do serca człowieka. Jestem przekonany, że praca



doktorska mgr Izabeli Kraszewskiej będzie miała także duży wpływ na rozwój dalszych badań z wykorzystaniem wektorów AAV.

Przedstawiona do recenzji praca mgr Izabeli Kraszewskiej spełnia wszelkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn.zm). Wnoszę, zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Izabeli Kraszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na bardzo wysoką wartość uzyskanych wyników, ich oryginalność oraz bardzo istotny wpływ na rozwój dalszych badań nad wykorzystaniem wektorów opartych na wirusach AAV w terapii genowej wnoszę o wyróżnienie rozprawy.



prof. dr hab. med. Marcin Gruchała