



UNIwersytet
Warszawski

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



Warszawa, 13 lipca 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Alicji Martyniak:
Nowe mechanizmy rozwoju kardiomiopatii w dystrofii mięśniowej Duchenne'a
- rola mikroRNA-378a**

Praca doktorska Pani mgr Alicji Martyniak powstała w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorem był prof. Józef Dulak a promotorem pomocniczym dr Jacek Stępniewski.

Celem pracy było określenie roli mikroRNA-378a w kardiomiocytach uzyskanych z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego dystrofinę. Doktorantka badała także podłoże powstawania kardiomiopatii u chorych na dystrofię mięśniową Duchenne'e (DMD). Już we wcześniejszych projektach prof. Dulak, dr Stępniewski i ich współpracownicy wykorzystywali iPSC do badań nad różnicowaniem kardiomiocytów, w tym także tych pozbawionych dystrofiny. Wykazali, że komórki te stanowią bardzo dobre narzędzie w analizach fenotypu związanego z rozwojem choroby, w tym także badaniach dysfunkcji kardiomiocytów. Wskazywali także na rolę prowadzonych prac dla opracowania potencjalnych terapii badanego schorzenia. Wyniki wcześniejszych projektów realizowanych przez zespół oraz dane literaturowe wykazały, że miR-378a jest cząsteczką charakterystyczną dla mięśnia sercowego, bierze ona udział w regulacji metabolizmu komórek, a także reguluje powstawanie i funkcjonowanie mitochondriów. Jego powiązanie z kardiomiopatią występującą u myszy mdx, stanowiących model DMD, również zostało udokumentowane. Mechanizm działania tego miRNA pozostawał jednak nie w pełni wyjaśniony.

Mgr Alicja Martyniak postawiła sobie za cel weryfikację trzech hipotez badawczych: 1) mir-378a odpowiada za równowagę pomiędzy poborem glukozy a jej wykorzystaniem przez kardiomiocyty; 2) rozwój kardiomiopatii u pacjentów z DMD jest związany z zaburzonym procesem mitofagii; 3) delecja miR-378a w kardiomiocytach DMD odwraca fenotyp choroby. Hipotezy brzmią zwięźle i w sumie dosyć niewinnie - ale ich weryfikacja obejmowała imponujący zakres badań kardiomiocytów, w których doprowadzano do zaburzeń

ekspresji badanego miRNA, zarówno tych ekspresujących jak i pozbawionych dystrofiny, analiz ekspresji genów, proteomu, fizjologii komórek, czy analiz materiału uzyskanego od pacjentów chorujących na DMD. Te rozległe badania były bardzo spójne i doprowadziły do uzyskania świetnych wyników znacząco poszerzających naszą wiedzę na temat "kardiologicznego fenotypu" wywołanego przez brak dystrofiny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku polskim licząca 147 stron, z czego *Wstęp* stanowi 22 strony, *Materiały i metody* 19 stron, *Wyniki* 47 stron, a *Dyskusja wyników* 18 stron. Ponadto, praca zawiera *Spis treści*, *Wykaz skrótów*, *Wykaz linii komórkowych*, wymagane *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, *Cele pracy i hipotezy badawcze*, *Wnioski*, *Bibliografię* (163 pozycje) i *Suplement*. Doktorantka, umieściła w niej także wykaz swoich publikacji (7), z których przynajmniej dwie zawierają wyniki związane z doktoratem, oraz spis projektów, w których uczestniczyła (2) lub którymi kierowała (1).

W pierwszej części *Wstępu* do rozprawy doktorskiej mgr Martyniak przedstawia podłoże dystrofii mięśniowej Duchenne'a, rozwój choroby oraz kardiomiopatię jej towarzyszącą. Zwraca szczególną uwagę na zaburzenia autofagii i mitofagii towarzyszące kardiomiopatii oraz zaburzenia metaboliczne związane z DMD. Następnie omawia mikro RNA skupiając się na miR-378a jako czynnika regulującym angiogenezę, miogenezę i zaangażowanym w utrzymanie homeostazy energetycznej organizmu. Podkreśla szczególną rolę tego mikro RNA w funkcjonowaniu serca wskazując na jego zaangażowanie w protekcję mięśnia sercowego przed hipertrofią i zwłóknieniem, a także ograniczanie apoptozy kardiomiocytów. Doktorantka podkreśliła także, że poziom miR-378a jest niższy w mięśniach chorych na DMD, co może zaburzać przebieg autofagii i nasilać apoptozę oraz, że cząsteczka ta ma znaczący wpływ na metabolizm węglowodanów oraz lipidów. Ostatnia część *Wstępu* przedstawia modele badawcze wykorzystywane w analizach fenotypu związanego z brakiem funkcjonalnej dystrofiny, skupiając się na modelach in vitro, które wykorzystywała w swoich badaniach. Kluczowe oczywiście były ludzkie iPSC, uzyskane zarówno z komórek zdrowych dawców jak i tych chorych na DMD, oraz możliwość precyzyjnych modyfikacji genetycznych tych komórek. *Wstęp* w sposób przystępny nakreśla tło dla prowadzonych badań i uwypukla konieczność wnikliwej analizy roli miR-378a w ludzkich kardiomiocytach, rzecz jasna z myślą o opracowaniu terapii ograniczającej rozwój kardiomiopatii u pacjentów chorych na DMD. Ta część pracy napisana jest w sposób przystępny, ilustrowana bardzo dobrymi schematami, zawiera wszystkie informacje istotne dla zrozumienia podłoża realizowanego projektu i świadczy o rozległej wiedzy Autorki.

Materiały i metody zostały przygotowane w sposób precyzyjny i nie budziły moich wątpliwości. Cele doktoratu mgr Alicja Martyniak zrealizowała przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń, podczas których wykorzystywała liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej, biochemii, fizjologii komórki (np. analizy metaboliczne). Do metod tych zaliczają się m.in.: hodowle komórkowe, reprogramowanie ludzkich komórek somatycznych (jednojądrzaste komórki krwi), różnicowanie uzyskanych iPSC, wykorzystanie technik CRISPR/Cas9, testy metaboliczne,

elektrofizjologiczne, badanie funkcji mitochondriów, qRT-PCR, analizy transkryptomu, proteomika, mikroskopia konfokalna i TEM, 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 doskonałe opanowanie warsztatu naukowca. Pewien niepokój podczas lektury pracy budził we mnie opis "antyludzkich" przeciwciał. Sugerowałabym jednak bardziej opisową formę "skierowane przeciwko.....", te mysie czy kozie antyludzkie nie brzmią dobrze.

Wyniki rozpoczyna opis analizy wpływu delecji miR-378a na fenotyp ludzkich kardiomiocytów uzyskanych z iPSC. Zakładam, że kariotyp badanych komórek był analizowany (podczas pracy magisterskiej?), chociaż nie znalazłam na ten temat informacji w doktoracie. Już te pierwsze analizy potwierdziły wpływ miR-378a na rozmiary komórek. Doktorantka przeprowadziła analizy transkryptomiczne i proteomiczne wskazujące na zmiany w ekspresji białek zaangażowanych w regulację metabolizmu czy pobudliwości komórek. Dalsze badania wykazały, że delecja miR-378a nie wpływa jednak znacząco na aktywność elektrofizjologiczną badanych kardiomiocytów. Zaobserwowano jednak wzrost ekspresji receptora rianodynowego CACNA2D1. Tutaj bodajże po raz pierwszy Doktorantka zwraca uwagę na różnice między badanymi klonami iPSC. Ta heterogenność może stanowić spory problem dla badaczy komórek pluripotencjalnych. Jednak pomimo braku spójności niektórych wyników obserwowane tendencje były oczywiste i nie utrudniały wnioskowania na podstawie uzyskanych danych.

Oprócz analiz elektrofizjologicznych dużą część pracy stanowią te dotyczące metabolizmu komórki i funkcjonowania mitochondriów. Analizowano komórki pozbawione miR-378a ale także takie, w których przywrócono ekspresję tego czynnika. Miało to wpływ na odwrócenie niektórych zmian fenotypowych badanych komórek. Przeprowadzone doświadczenia wskazały także na zaangażowanie miR-378a w regulację metabolizmu glukozy oraz biosyntezę mitochondriów, łącząc te wątki z elektrofizjologią komórki. Brak miR-378a prowadzi do obniżenia metabolizmu kardiomiocytów, mitofagii i autofagii.

Kluczowe dla pracy były analizy iPSC uzyskanych z komórek pacjentów DMD. Uzyskane linie różniły się od siebie mutacjami w genie kodującym dystrofinę. Fenotyp tych linii był jednak w zasadzie spójny, chociaż oczywiście pod wieloma względami były różne. Co istotne podczas różnicowania iPSC w kierunku mezodermy i kardiomiocytów poziom miR-378a wzrastał. Ponadto, badano podwójne KO czyli iPSC pozbawione miR-378a, w których z sekwencji kodującej dystrofinę eksperymentalnie usunięto ekson 50. Tu znowu pojawia się pytanie czy zweryfikowano kariotyp uzyskanych komórek? W kardiomiocytach pozbawionych DMD doprowadzano również do nadekspresji badanego miRNA. Te podejścia badawcze pozwoliły wykazać zmiany elektrofizjologiczne w DKO w porównaniu z kontrolami, miały one jednak w zasadzie łagodny charakter. Jednak, co niezwykle istotne, analizy metaboliczne wykazały, że delecja miR-378a w komórkach DMD KO prowadziła to zniwelowania ich dystroficznego fenotypu. Także analizy

mitochondriów przyniosły bardzo ciekawe wyniki - delecja miRNA także niwelowała fenotyp DMD. Istotnym uzupełnieniem pracy są wyniki analiz surowicy pacjentów cierpiących na DMD.

Podsumowując, Doktorantce udało się uzyskać kilka świetnych modeli komórkowych pozwalających na ocenę wpływu miR-378a na funkcjonowanie kardiomiocytów pozbawionych dystrofiny. W swojej pracy badaniach wykorzystwała bardzo liczne podejścia badawcze, w efekcie czego otrzymała spójny obraz roli badanego mikro RNA. Wykazała, że odgrywa on rolę w metabolizmie węglowodanów, akumulacji glukozy w komórkach, wpływa na aktywność mitochondriów na także na ich biosyntezę i usuwanie. Co istotne, delecja badanego miRNA odwraca fenotyp DMD. Ogrom wyników został przedstawione w sposób logiczny i w zasadzie klarowny. Być może w niektórych miejscach mogłyby pojawić się cząstkowe podsumowania.

W *Dyskusji* uzyskane dane zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań. Mgr Alicja Martyniak krytycznie podeszła do efektów swojej pracy i obficie się do nich odwołując ulokowała je na tle prac innych badaczy. Niektóre konkluzje i opisy mogłyby trafić do sekcji *Wyniki*, no ale każdy ma swój styl dyskusowania. Lekturę świetnie wspierały schematy podsumowujące uzyskane dane, z rozbiciem na poszczególne aspekty fenotypu badanych komórek. *Wnioski* świetnie streściły meritum pracy.

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem. Błędy językowe są nieliczne. Czytało się ją dobrze, może z wyjątkiem tych "antyludzkich" przeciwciał czy wykonywania pomiarów "w kolejnym kroku". Ilustracje, schematy, wykresy zostały starannie przygotowane, jedynie w niektórych rycinach opisy były zbyt małe i przez to nieczytelne. To czego można było uniknąć to "rozbijania" zdań przez ryciny.

Podsumowując, pani mgr Alicja Martyniak zrealizowała wszystkie postawione cele. Jej ogromny wysiłek doprowadził do zweryfikowania hipotez badawczych i uzyskania nowych, cennych wyników dotyczących roli miR-378a w funkcjonowaniu kardiomiocytów oraz powstawaniu kardiomiopatii u chorych na DMD. Uzyskane modele komórkowe mogą być wykorzystywane w dalszych badaniach. Tak więc, 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.