

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Alicji Martyniak
pt. „Nowe mechanizmy rozwoju kardiomiopatii w dystrofii
mięśniowej Duchenne'a - rola mikroRNA-378a”

Choroby dziedziczne spowodowane defektami w obrębie pojedynczych genów wydają się najprostszymi przykładami schorzeń o podłożu genetycznym. Mutacje w obrębie jednego genu powinny teoretycznie skutkować defektami konkretnego produktu tego genu, wskazując jednoznacznie na specyficzny mechanizm takiej choroby. Liczbę znanych genetycznych chorób jednogenowych szacuje się na ponad 7 tysięcy, ale przyjmując powyższe założenia, powinno być teoretycznie łatwo poznać mechanizmy ich wszystkich. Niemniej badania ostatnich lat drastycznie i negatywnie zweryfikowały taką możliwość. Okazuje się bowiem, że defekty w pojedynczych genach mogą spowodować takie zmiany w sieci powiązań procesów biochemicznych i komórkowych, że znaczenie dla patogenezy okazują się mieć dodatkowe czynniki, zdawałoby się że bezpośrednio nie związane ze specyficznym genem czy jego produktem. Takie skomplikowane patomechanizmy skutkują też koniecznością złożonego podejścia terapeutycznego, w którym być może skorygowanie pierwotnych wad genetycznych czy biochemicznych nie zapewnia efektywności leczenia choroby.



Jednym ze schorzeń należących do omawianej grupy chorób jest dystrofia mięśniowa Duchenne'a. Pierwotną jej przyczyną jest mutacja w genie *DMD* kodującym dystrofinę. Jak wspomniałem wcześniej, w przypadku chorób jednogenowych okazuje się, że inne czynniki mogą mieć także ważne znaczenie w rozwoju schorzenia. Pani mgr Alicja Martyniak podjęła się zadania określenia roli jednego z rodzajów mikroRNA, konkretnie microRNA-378a (w skrócie: miR-378a), w kardiomiopatii występującej w dystrofii mięśniowej Duchenne'a. Zadanie takie należy uznać za ambitne i adekwatne do przedstawienia rozwiązania powyższego problemu naukowego jako podstawy rozprawy doktorskiej. Badania zostały wykonane na Uniwersytecie Jagiellońskim, pod opieką promotora – Pana prof. dr hab. Józefa Dulaka oraz promotora pomocniczego – Pana dr Jacka Stępniewskiego. Zarówno miejsce wykonywania badań (znakomita uczelnia) jak i osoba promotora (jeden z czołowych polskich biologów molekularnych, o niewątpliwej międzynarodowej renomie) gwarantowały znakomite warunki do wykonania zaplanowanych badań. Po lekturze ocenianej pracy przyznaję, że Doktorantka znakomicie wykorzystała te niezwykle sprzyjające okoliczności i wykonała bardzo ciekawe i ważne badania.

Wykorzystując całą gamę różnych metod z zakresu genetyki, biochemii i biologii molekularnej wykonała liczne doświadczenia, które wskazały na istotną rolę miR-378a w patomechanizmie dystrofii mięśniowej Duchenne'a. Co prawda Doktorantka wykazała, że miR-378a nie wpływa na elektrofizjologię komórek hiPSC-CM, niemniej udowodniła ona, że odgrywa on rolę w regulacji wzrostu hipertroficznego oraz oscylacji fal wapniowych. Ponadto, Pani mgr Alicja Martyniak stwierdziła, że badany mikroRNA jest istotny dla regulacji metabolizmu glukozy w kardiomiocytach, w szczególności przez regulację poziomu transportera glukozy GLUT1. W kolejnych doświadczeniach Doktorantka pokazała, że w warunkach braku miR-378a występuje obniżony poziom podjednostek budujących mitochondrialny łańcuch oddechowy, zmniejsza się stosunek mtDNA/nDNA oraz zmniejsza się poziom TFAM. Dodatkowo, zaobserwowane zostały zmiany w procesach autofagii (w tym

także w mitofagii) w kardiomiocytach pozbawionych miR-378a. Doktorantka zasugerowała na podstawie tych badań, że miR-378a może być potencjalnym celem terapeutycznym w dystrofii mięśniowej Duchenne'a. Hipotezę tę poparła przeprowadzeniem badań mogących wskazywać, że dalsze prace nad taką ścieżką poszukiwania leku na tę chorobę są uzasadnione. Otrzymane przez Panią mgr Alicję Martyniak rezultaty badań sugerują bowiem, że obniżenie poziomu miR-378a w kardiomiocytach pozbawionych dystrofiny może przywracać równowagę pomiędzy procesami biogenezy mitochondriów a mitofagią.

Uzyskane i opisane w rozprawie doktorskiej Pani mgr Alicji Martyniak wyniki uważam za bardzo cenne i ważne. Pozwalają one na lepsze zrozumienie patomechanizmu dystrofii mięśniowej Duchenne'a oraz na zaproponowanie celu terapeutycznego. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka udowodniła iż potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe, jak również rozwiązała oryginalny problem naukowy. Lektura wstępnej części pracy wskazuje także, że posiada dogłębną wiedzę teoretyczną w zakresie tematyki prowadzonych badań.

Lektura rozprawy doktorskiej Pani mgr Alicji Martyniak wzbudziła moje duże zainteresowanie, co wiąże się także z pojawieniem się pytań dotyczących przeprowadzonych badań. W szczególności chciałbym przedyskutować z Doktorantką podczas obrony rozprawy doktorskiej dwie kwestie. Po pierwsze, badając zjawisko autofagii należy pamiętać o złożoności samego procesu jak też w szczególności jego regulacji. W związku z tym, nawet określenie efektywności zachodzenia autofagii nie jest ani łatwe ani oczywiste. Co prawda istnieją powszechnie akceptowane markery autofagii, takie jak poziom białek LC3-II czy p62, niemniej podkreśla się w literaturze konieczność daleko idącej ostrożności w interpretacji rezultatów doświadczeń, w szczególności tych opartych o analizę jednego albo nielicznych parametrów. Mam zatem pytanie do Doktorantki, na ile Jej zdaniem zaprezentowane w pracy wyniki doświadczeń mogą świadczyć o modulacji autofagii przez miR-378a, a w jakim mogą to jedynie sugerować. Dla przykładu, na Ryc. 23 przedstawione są poziomy białka

LC3-II w komórkach w różnych warunkach (w obecności i przy braku badanego mikroRNA oraz w standardowych warunkach hodowli komórek i podczas głodzenia). Analiza przykładowego wyniku doświadczenia Western-blotting wskazuje, że poziom LC3-II był podobny we wszystkich wariantach doświadczalnych. Co prawda w komórkach pozbawionych miR-378a poziom innej formy omawianego białka, LC3-I, był drastycznie obniżony, jednak wskaźnikiem stymulacji autofagii jest forma LC3-II. Oczywiście bardzo ważny jest stosunek obu form białka, niemniej brak zmian poziomu LC3-II przy jednoczesnym drastycznym obniżeniu poziomu LC3-I w komórkach nie produkujących miR-378a jest zastanawiający. Czy Doktorantka rozważała zbadanie poziomów różnych innych markerów autofagii aby dokładniej określić mechanizm regulacji tego procesu przez miR-378a?

Moje drugie pytanie merytoryczne dotyczy mechanizmów działania miR-378a. Pani mgr Alicja Martyniak wykazała wieloraki wpływ tego mikroRNA na procesy zachodzące w komórkach będących modelami dystrofii mięśniowej Duchenne'a. Panuje ogólne przekonanie, że mikroRNA kontrolują ekspresję różnych genów poprzez bezpośrednie oddziaływania z odpowiednimi mRNA, co prowadzi do negatywnej regulacji ich aktywności. Niemniej rezultaty badań Doktorantki wskazują na tak wielostronne efekty miR-378a w dystrofii mięśniowej Duchenne'a, że wydaje się mało prawdopodobne aby przedstawiony mechanizm działania był jedynym występującym w tym przypadku. Czy Doktorantka może przedstawić hipotezę dotyczącą molekularnych mechanizmów działania miR-378a w badanym schorzeniu? Czy istnieją wyniki doświadczeń wskazujących, że miR-378a może mieć dodatkowy (poza klasycznym dla mikroRNA) mechanizm działania w komórkach?

Obok powyższych, wynikających z przedstawienia niezwykle ciekawych badań, pytań merytorycznych, mam też pewne uwagi redakcyjne do tej ogólnie poprawnie napisanej rozprawy. Przedstawię je poniżej w punktach – niektóre z nich mają charakter dyskusyjny, zatem również jestem ciekaw odpowiedzi Doktorantki w tym zakresie.



1. W tytule rozprawy (a potem także w jej treści) czytamy o „nowych mechanizmach rozwoju kardiomiopatii...”. Moim zdaniem nie jest to prawidłowe określenie. Badane przez Doktorantkę mechanizmy istnieją bowiem odkąd w naturze pojawiły się mutacje w genie *DMD*, czyli prawdopodobnie od milionów lat, nie są zatem „nowe”. Nowe są niewątpliwie na przykład konstrukty genetyczne uzyskane w trakcie wykonywania pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Martyniak, gdyż nie istniały one wcześniej. Natomiast badane mechanizmy są „nowo odkryte”, ale nie „nowe”, gdyż istniały dużo wcześniej, a tylko nikt o nich nie wiedział. Być może wydaje się, że jest to niewielka różnica nomenklaturowa, jednak moim zdaniem w języku naukowym powinniśmy zwracać uwagę aby posługiwać się bardzo jednoznacznymi określeniami, w celu uniknięcia nieporozumień i błędnych interpretacji.
2. W wielu miejscach pracy Autorka używa określenia „biosynteza mitochondriów”. Moim zdaniem trafniejszym określeniem jest „biogeneza mitochondriów”. Termin biosynteza używany jest bowiem dla określenia biologicznej produkcji jednego (albo grupy) związków chemicznych, jest jednak mylący w przypadku tworzenia całych organelli komórkowych.
3. Określenia typu „autofagia jest obniżona” (np. na str. 24) brzmią jak żargon. Chodzi oczywiście o obniżenie efektywności danego procesu, a w innych przypadkach o obniżenie poziomu jakiegoś czynnika, ale powinno to być wyraźnie zaakcentowane w tekście.
4. Nie jest dla mnie jasne w jakim stopniu analizy transkryptomyczne były weryfikowane niezależną metodą, np. RT-qPCR. Ponadto uważam, że wyniki uzyskane z badań transkryptomicznych mogłyby być szerzej zaprezentowane, np. w postaci wykresów typu „*volcano plot*”.



5. W pracy można spotkać niekonsekwentne używanie nazwy „ekspresja” w stosunku do procesów genetycznych. Należy pamiętać, że zgodnie z definicją, ekspresji ulegają geny, natomiast białka – jako produkty ekspresji genów – mogą być produkowane czy syntezowane, ale nie eksprymowane.
6. Do jednoznacznej interpretacji wyników zaprezentowanych na Ryc. 34 bardzo pomocne byłyby analizy ilościowe określające średnią liczbę mitochondriów w komórce. Uzyskane obrazy mikroskopowe powinny pozwolić na takie analizy. Dlaczego nie zostały one przeprowadzone? Czy Doktorantka planuje takie analizy wykonać?
7. Na stronie 107 czytamy: „wartość ta była podniesiona do poziomu kardiomiocytów kontrolnych, niemniej różnice te nie osiągnęły istotności statystycznej”. Nie zgadzam się z taką interpretacją wyników. Celem analizy statystycznej jest stwierdzenie czy obserwowane w wynikach doświadczeń różnice pomiędzy porównywanymi grupami można uznać za znaczące, czy też stanowią one jedynie efekt przypadkowych fluktuacji czy to w badanej populacji obiektów doświadczalnych czy też wynikających z niedokładności metod pomiarowych. W związku z tym, brak istotności statystycznej pomiędzy porównywalnymi wartościami pomiarowymi należy interpretować jako nie występowanie faktycznych różnic między nimi. W takich przypadkach nie powinno się wskazywać na podniesienie czy obniżenie jakiejś wartości w stosunku do innej grupy, gdyż rzeczywistych różnic nie udało się zaobserwować.
8. Dlaczego Autorka zdecydowała się zamieścić niektóre wyniki w postaci „suplementów” zamiast przedstawić je w głównej części pracy? Nie są to przecież ani bardzo rozbudowane bazy danych czy surowe wyniki, ani rezultaty mające tylko marginalne znaczenie dla całej pracy.

W podsumowaniu uważam, że Pani mgr Alicja Martyniak przedstawiła bardzo ciekawą pracę naukową. Wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych badań oraz umiejętnościami prowadzenia prac naukowych i rozwiązywania problemów naukowych. Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Na podstawie powyższego, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Alicji Martyniak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Mając na uwadze istotność przeprowadzonych badań, uzyskanie szczególnie interesujących i ważnych wyników, umożliwiających lepsze poznanie molekularnych mechanizmów dystrofii mięśniowej Duchenne’a, a także zaproponowanie potencjalnego celu terapeutycznego, co wskazuje także na aspekt aplikacyjny badań, zwracam się z wnioskiem o stosowne wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.



prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn