

Kraków, 19.12.2022



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Marii Ziojły pt. *Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynnej trzustki***

Właściwości ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych stwarzają szansę na ich wykorzystanie w medycynie regeneracyjnej, w szczególności w terapii chorób tych narządów, w których nie występują tkankowe komórki macierzyste. Należy do nich trzustka, a możliwości regeneracji komórek produkujących insulinę są przedmiotem intensywnych badań z wykorzystaniem zarodkowych komórek macierzystych oraz indukowanych pluriptencjalnych macierzystych, jedynych znanych obecnie komórek zdolnych do efektywnego różnicowania do komórek wysepek trzustkowych. Mimo niewątpliwego, olbrzymiego postępu w badaniach i zgromadzonej wiedzy, opracowane metody różnicowania komórek pluripotencjalnych do komórek beta trzustki są czaso- i kosztochłonne i dalece mało efektywne w stosunku do oczekiwań. Dalsze poznawanie procesów, których wykorzystanie może ulepszyć stosowane metody jest więc niewątpliwie uzasadnione.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Natalii Marii Ziojły, zatytułowana „*Rola czynnika transkrypcyjnego ETV1 w adhezji ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych i rozwoju in vitro ludzkiej endokrynnej trzustki*” wpisuje się w tę tematykę. Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Ekspresji Genów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem pani dr hab. Małgorzaty Borowiak, prof. UAM, której dotychczasowe osiągnięcia w zakresie badań nad mechanizmami różnicowania komórek pluripotencjalnych są szeroko znane i cytowane.. Badania przedstawione w rozprawie były zatem, jak można się było spodziewać, bardzo dobrze zaplanowane pod względem metodycznym. Ogrom pracy, jaki wykonała Doktorantka budzi uznanie, przytłacza zaś rozmiar rozprawy, liczącej 252 strony. To oczywiście humorystyczny „zarzut”, ale wart podniesienia, chociaż właściwie obecnie można się podobnej wielkości rozpraw spodziewać, w sytuacji, gdy pojedyncze publikacje liczą nieraz sto lub nawet więcej stron.

Rozprawa ma układ klasyczny, chociaż od niego nieco odbiega umieszczenie materiałów i metod na końcu rozprawy, jest to jednak oczywiście także przyjęty i stosowany sposób. W obszernym wstępie Doktorantka dyskutuje szeroko zagadnienie pluripotencji komórek macierzystych oraz badania nad różnicowaniem komórek pluripotencjalnych do komórek trzustki. Cele pracy są bardzo dobrze sformułowane, następuje po nich obszerny rozdział Wyniki, które zostały krótko przedyskutowane w rozdziale „*Dyskusja i perspektywy na przyszłe badania*”. Dyskusja jest być może trochę zbyt zwięzła jak na rozmiar pracy, można jednak uznać, że odnosi do wszystkich najważniejszych wyników i rozważa tematy do dalszych badań.

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Kierownik zakładu

Prof. dr hab. Józef Dulak

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. + 48 12 664 6375

tel. + 48 506 006 083

fax. + 48 12 664 6918

jozef.dulak@uj.edu.pl

<http://www.zbm.wbbib.uj.edu.pl>

Po „Dyskusji” wyniki zostały raz jeszcze omówione w Podsumowaniu (rozdział 5), a na końcu opisane zostały Materiały i Metody zastosowane w pracy. Rozprawę kończy obszerny spis ponad 200 pozycji literatury.

### *Analiza uzyskanych wyników*

Jak wynika z tytułu, celem badań opisanych w rozprawie było określenie roli czynnika transkrypcyjnego ETV1 w ludzkich komórkach pluripotencjalnych, w tym określenie udziału tego czynnika w procesach różnicowania komórek pluripotencjalnych, ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania do komórek trzustki.

Na wyniki składają się obszerne analizy bioinformatyczne wykonane najpierw na podstawie danych dostępnych w bazach zawierających wyniki sekwencjonowań. Na podstawie danych z sekwencjonowania pojedynczych płodowych trzustek mysich został wytypowany czynnik transkrypcyjny ETV1 i Doktorantka poddała go badaniu w dobrze zaplanowanych doświadczeniach z wykorzystaniem linii ludzkich zarodkowych komórek macierzystych, w których sekwencja kodująca *ETV1* była poddana edycji z zastosowaniem metody CRISPR/Cas9. Do tego celu Autorka wykorzystwała uzyskaną przez innych badaczy linię ESC ze stabilną, indukowaną ekspresją Cas9, natomiast sama projektowała sekwencje sgRNA. W takich komórkach zostały wykonane analizy dotyczące wpływu wyłączenia ETV1 na właściwości komórek (prolifrację, migrację oraz adhezję), ze zbadaniem potencjalnych, zaangażowanych w te procesy szlaków molekularnych. Następnie te komórki posłużyły do badania ekspresji genów odpowiedzialnych za pluripotencję, różnicowania tych komórek do trzech listków zarodkowych oraz do komórek trzustki. W tej trzeciej części wyników znowu dominują analizy bioinformatyczne, w tym przeprowadzonych sekwencjonowań RNA z pojedynczych komórek

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że ETV1 ulega bardzo wysokiej ekspresji w badanej linii komórek pluripotencjalnych. Wyłączenie ETV1 prowadzi do zwiększania liczby komórek przylegających do podłoża, co jak pokazały dalsze analizy, jest wynikiem zwiększonej adhezji komórek. Analizując wyniki RNAseq porównujące ekspresję genów w komórkach typu dzikiego oraz komórkach z wyłączoną ekspresją ETV1 Autorka wskazuje kilka potencjalnych genów, których zmiana ekspresji może być jej zdaniem odpowiedzialna za zwiększoną adhezję. Poszukując mechanizmów molekularnych wskazuje na fosforylację kinazy Akt, zwiększoną w komórkach pozbawionych ETV1. Dalsze badania pokazały, że zahamowanie aktywności Akt w komórkach z wyłączonym ETV przywraca adhezję komórek do poziomu obserwowanego w komórkach dzikich. Kolejne analizy wykazały, że między komórkami pozbawionymi ETV1 a komórkami typu dzikiego nie ma różnic w ekspresji genów związanych z pluripotencją. Niemniej rola czynnika ETV1 ujawnia się w trakcie różnicowania, bowiem komórki pozbawione ETV1 różnicują preferencyjnie do mezodermy i endodermy, wykazując upośledzone różnicowanie do ektodermy, co przekłada się na upośledzone tworzenie komórek produkujących insulinę.

Badania te wskazują na znaczenie czynnika ETV1 dla prawidłowego rozwoju ludzkich komórek pluripotencjalnych. Co więcej, sugerują, że nie tylko obecność, ale i prawidłowy poziom tego czynnika w komórkach pluriptencjalnych jest kluczowy, bowiem wydaje się, że zwiększenie jego ekspresji ponad poziom fizjologiczny jest dla komórek bardzo niekorzystne, prowadząc do utraty przez nie zdolności adhezji i w konsekwencji śmierć.

### **Zalety doktoratu**

Oceniana rozprawa prezentuje nowoczesne podejście w poszukiwaniu nowych szlaków molekularnych, których regulacja ma znaczenie w funkcjonowaniu i różnicowaniu pluripotencjalnych komórek macierzystych. Doktorantka wykazała się umiejętnością globalnej analizy ekspresji genów i wykorzystania tej wiedzy do analizy funkcji wybranego genu – ETV1. Praca pokazuje umiejętności Doktorantki w zakresie hodowli i analizy funkcji komórek pluriptencjalnych, znajomości i wykorzystania technik edycji genów CRISPR/Cas9. Otrzymane wyniki mogą się przyczynić do opracowania skuteczniejszych metod uzyskiwania komórek trzustki zdolnych do produkcji insuliny.

Rozprawa prezentuje dużą wiedzę teoretyczną Doktorantki a także liczne umiejętności praktyczne, obejmujące analizy bioinformatyczne z wykorzystaniem wyników sekwencjonowania nowej generacji, hodowli komórek, zastosowania licznych metod biologii molekularnej i biologii komórki.

### **Uwagi krytyczne i pytania**

*Uwagi dotyczące planowania i przeprowadzenia doświadczeń o raz interpretacji wyników*

1. W badaniach wykorzystano technikę CRISPR/Cas9, której zastosowanie związane jest z występowaniem tzw. off-target effects, czyli niepożądanego edycji odcinków DNA wykazujących pewną homologię do sekwencji mających być specyficznie rozpoznawanych przez sgRNA. Jest to wskazane, tym bardziej, że Doktorantka stosowała kilka sekwencji sgRNA. Czy przeprowadzone zostały analizy nad występowaniem takich potencjalnych miejsc i co taka weryfikacja pokazała? W związku z doświadczeniami nad edycją genu nie jest jasne, co Doktorantka rozumie pod stwierdzeniem specyficzności delekcji i wskazaniem na rycinie 26 “smugi widoczne po reakcji PCR”...?
2. Doktorantka informuje, że w przypadku obu wyprowadzonych klonów H3 i D1 doszło to takiej samej, homozygotycznej mutacji wprowadzającej przedwczesny kodon stop. Niemniej analiza qPCR wykryła, co prawda obniżoną, ale jednak ekspresję mRNA ETV1, i co zastanawiające, badanie Western blot wykryło w komórkach białko ETV1, w tym spadek ilości białka w klonie D1 tylko o 59.5%. Jak Doktorantka wytłumaczy uzyskane wyniki?

3. Na stronie 199 Doktorantka napisała: "*Równy i okrągły kształt kolonii wskazywał, że wyrosła ona z pojedynczej komórki (...)*". Czy nie jest to zbyt daleko idąca interpretacja? Czy kształt kolonii powstałych z dwóch lub trzech komórek położonych obok siebie także nie mógłby być tak regularny?
4. Na podstawie analizy stopnia konfluencji hodowli komórek typu dzikiego i pozbawionych *ETV1* (wyniki przedstawione na ryc. 33 i 34) Doktorantka stwierdza że nie występują różnice w proliferacji między badanymi komórkami. Czy wyniki pokazane na ryc. 34, sugerujące pewne różnice w tempie przyrostu konfluencji nie skłaniają jednak do weryfikacji poprzez zastosowanie innych metod badania proliferacji komórek?
5. Wyniki pomiaru ekspresji białek związanych z adhezją komórkową zostały wykonane na podstawie analizy intensywności fluorescencji (s. 120 oraz wyniki pokazane na ryc. 46). Immunofluorescencyjna detekcja białek jest oczywiście uzasadniona i ma wartość informacyjną, a zdjęcia pokazane na ryc. 46 istotnie zdają się przynajmniej częściowo popierać konkluzje Doktorantki. Należy jednak pamiętać, że analiza immunofluorescencji nie jest metodą ilościową i do przeprowadzonych ocen czy też „pomiarów intensywności fluorescencji” należy podchodzić z ostrożnością. Czy Doktorantka planuje lub może już wykonała sprawdzenie ekspresji wybranych białek/genów za pomocą metody Western blot lub ewentualnie dodatkowo ilościowym RT-PCR? Jest to wskazane, zwłaszcza, że w przypadku innych białek (*Akt*) analiza Western blot została wykonana.
6. Przeprowadzone analizy genów i pośrednio białek związanych z adhezją wskazują na potencjalnych kandydatów odpowiedzialnych za obserwowaną zwiększoną adhezję komórek PC pozbawionych *ETV1*. Czy Doktorantka może już sprawdzała, lub planuje zbadanie, które z białek adhezyjne (*integryna 5a*, *e-kadheryna*, *winkulina* oraz *paksylina*) może odgrywać istotną/najważniejszą rolę, zwłaszcza, że jak widać z ryciny 36, adhezja może być zmieniona w przypadku określonych rodzajów podłoża.
7. Doświadczenia z nadekspresją *ETV1* pokazały, że komórki transfekowane plazmidem z *ETV1* odczepiały się od podłoża (s. 123). Czy Doktorantka podjęła próbę zastosowania mniejszej ilości plazmidu, bądź sprawdzenia efektu nadekspresji *ETV1* w komórkach jeszcze przed oderwaniem się od podłoża? Możliwa jest także zmiana promotora na indukowany bądź zastosowanie słabszego (np. jakiego?), co Autorka rozważa w dyskusji.
8. Zwiększona adhezja w przypadku wyłączenia *ETV1*, a przede wszystkim bardzo szybkie odczepianie się komórek od podłoża w przypadku nadekspresji *ETV1* może

być także związane z wpływem ETV1 na przeżywalność komórek, co Doktorantka także sugeruje. Czy w związku z tym zostały wykonane odpowiednie testy na żywotność komórek? Wykorzystanie, jak Doktorantka napisała, ekspresji GFP do monitorowania żywotności komórek z nadekspresją *ETV1* (s. 207) nie jest wystarczające i nie jest to test na obumieranie i przeżywanie.

9. W poszukiwaniu mechanizmu odpowiedzialnego za rolę ETV1 w adhezji komórek Doktorantka podjęła się dokładniejszego zbadania ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/Akt, która była zmieniona w analizie RNA seq i potwierdzona za pomocą analizy Western. Wyniki te są interesujące i wskazują na zmianę w ilości ufosforylowanej postaci Akt, jednak ze względu na to, iż analizy zostały wykonane tylko jeden raz (jak wynika z ryciny 48), wymagają one powtórzenia i potwierdzenia. Bardziej miarodajne są inne wyniki pokazane na ryc 49, wskazujące, że zahamowanie aktywności Akt w komórkach z wyłączonym ETV1 przywraca adhezję komórek do poziomu obserwowanego w komórkach dzikich. Badania te mają dużą wartość, ponieważ zostały wykonane z użyciem różnych dawek inhibitora. Analogicznie, aktywacja szlaku PI3/Akt przez insulinę w komórkach dzikich prowadzi do zwiększenia adhezji do poziomu obserwowanego w komórkach z wyłączoną ekspresją ETV1. W tym kontekście warto byłoby przeprowadzić takie badania (hamowanie/wyciszenie ekspresji) innych genów związanych z adhezją, przy których Doktorantka ograniczyła się do pomiaru immunofluorescencji, co wskazałem wcześniej.
10. Autorka w swoich badaniach skoncentrowała się na jednej linii komórkowej. Pojawia się zatem pytanie, na ile te wyniki będą potwierdzone w innych liniach komórek pluripotencjalnych, w tym także w komórkach iPSC? Czy Doktorantka ma może już w tym zakresie jakieś wyniki, które nie zostały przedstawione w rozprawie?

#### *Uwagi o charakterze technicznym*

1. Jakie jest pochodzenie linii Hues8-iCas9? – w M&M na stronie 195 brak informacji. Na stronie 80 jest wzmianka o oryginalnym wyprowadzeniu linii, ale nie wiadomo czy pochodzi ona z tego wskazanego laboratorium i została przekazana w ramach wymiany naukowej, czy też została zakupiona?
2. Str. 207 – jak należy rozumieć zdanie: *Komórki inkubowano przez 96 godzin z interwałem 2-godzinnym w 37oC w atmosferze zawierającej 5% CO2* (domyślam się, że chodzi o analizę proliferacji co dwie godziny, tak jak to autorka opisuje na stronie 92)?

3. Brakuje informacji o zgodzie komisji etycznej na wykonanie badań na zwierzętach (str. 211).
4. W M&M brak rozdziału o analizie statystycznej (choć pewne informacje są pod wykresami). Do analiz wielu grup (Rycina 49) należało jednak zastosować analizę Anova z testem post-hoc, a nie test t-Studenta.
5. Nie jest jasne, czemu służy tak bardzo precyzyjne (do trzeciego miejsca po przecinku) podawanie wartości różnic w ekspresji genów, jak na stronie 142, (np. 262, 375 razy różnica w ekspresji SOX17 między komórkami ETV1-KO a komórkami typu dzikiego)?
6. Autorka zastosowała szereg metod i analiz, chociaż nie wszystkie doświadczenia przyniosły dające się interpretować wyniki i można się zastanawiać, czy były to powody obiektywne czy przyczyny techniczne, jak np. w przypadku analizy Chip-seq oraz CUT&RUN (s. 137-138). Nie jest do końca jasne, dlaczego Doktorantka zdecydowała się zamieścić w doktoracie takie analizy, bowiem w mojej ocenie nie wnoszą one istotnej wartości do (bardzo dobrej) jakości pracy, a nie są to tzw. wyniki negatywne z rodzaju niepotwierdzających hipotezy, czyli wyniki, które warto i trzeba pokazywać.

#### *Uwagi redakcyjne.*

1. Zauważyłem drobne nieścisłości w numeracji rycin – zdjęcia na stronie 148 i wykresy pokazujące ekspresję SOX1 i FOXA2 opisane są jako rycina 57, a wcześniej ten sam numer nosi rycina pokazując kształt sfer.
2. Do pracy wkradły się pojedyncze błędy literowe, jak np. „Woda wonna od nukleaz” (str 202), a na stronie 147 „plenipotencja” zastąpiła „pluripotencję”. Stosujemy sekwencjonowanie Sangera, a nie Snagera (s. 88). Glukagon jest raz określany w skrócie jako GCG, innym razem Gcg.
3. Wielkość skali nie jest podana przy wszystkich zdjęciach (np., brakuje na Rycinie 20 oraz 33).
4. Nazwy genów powinny być pisane kursywą, a nie zawsze tak jest (np. w pierwszym zdaniu na stronie 88).
5. Nie rozumiem, dlaczego sgRNA nakierowane na ekson 9 ETV1 otrzymane z firmy SYNTHEGO zostały nazwane syntetycznymi, a sgRNA zaprojektowane przez

Doktorantkę takiego miana nie otrzymały? Na czym polega „syntetyczność” pierwszych a brak (?) syntetyczności drugich?

## **Uwagi końcowe i wnioski**

Przedstawione uwagi i pytania merytoryczne oraz wskazane drobne zastrzeżenia techniczne i formalne nie wpływają oczywiście na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy. Ogrom pracy Doktorantki, wielość zastosowanych technik i analiz budzą uznanie i wskazują z jednej strony na znaczącą pracę eksperymentalną, jaką wykonała Doktorantka, a z drugiej strony na jej bardzo dobre umiejętności analityczne. Sposób przygotowania rozprawy dowodzi także zdolności do krytycznej analizy wyników, zarówno tych opublikowanych jak i własnych. Przedstawiona do oceny rozprawa wnosi istotne informacje do wiedzy na temat mechanizmów różnicowania komórek pluripotencjalnych i wskazuje na dodatkowe szlaki, które mogą być brane pod uwagę przy ulepszaniu metod różnicowania komórek pluripotencjalnych do komórek trzustki.

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Marii Ziojły spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) (zgodnie z art. 175.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.2018, poz. 1669). Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Natalii Marii Ziojły do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zarazem, ze względu na wysoką wartość naukową rozprawy i potwierdzenie przez Doktorantkę szerokich umiejętności praktycznych i teoretycznych, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.