



UNIwersytet
Warszawski

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



Warszawa, 4 października 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej "Rola genu *AMOTL2* w pluripotencji i różnicowaniu ludzkich komórek macierzystych" autorstwa mgr Anny Jędrzejak.

Praca doktorska Pani mgr Anny Jędrzejak powstała w Zakładzie Ekspresji Genów, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorką pracy jest dr hab. Małgorzata Borowiak, prof. UAM.

Celem pracy było określenie roli *AMOTL2* w rozwoju trzustki. Zadania szczegółowe doktoratu dotyczyły: określenia wzoru ekspresji *AMOTL2* podczas rozwoju trzustki u ludzi i podczas różnicowania linii ludzkich komórek ES (hESC) a także charakterystyki komórek, w których doprowadzono do obniżenia ekspresji *AMOTL2*. Tak jak inne badania prowadzone w grupie prof. Borowiak, także i te świetnie wpisują się w tematykę badań, których wyniki mogą przyspieszyć praktyczne wykorzystanie pluripotencjalnych komórek macierzystych w medycynie. Mają także istotne znaczenie dla lepszej charakterystyki i zrozumienia podłoża różnicowania tych komórek.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna w języku angielskim licząca 126 stron. Jej podział jest klasyczny. Składa się z wykazu stosowanych skrótów, nazw genów, streszczeń w języku angielskim i polskim, wstępu, celu pracy, wyników, dyskusji i perspektyw na przyszłe badania, materiałów i metod, listy ilustracji oraz spisu literatury (oszacowałam go na około 220 pozycji). Praca zawiera także spis publikacji, autorstwa Doktorantki (2, niezwiązane z tematyką doktoratu), doniesień konferencyjnych (5), projektów, które uzyskała Doktorantka (3, w tym Preludium NCN) oraz tych, w których uczestniczyła jako wykonawca (2).

Wstęp do rozprawy został bardzo dobrze przygotowany. W sposób szczegółowy i przystępny charakteryzuje on komórki macierzyste, mechanizmy regulujące ich pluripotencję, opisuje szlaki przekazywania sygnału zaangażowane w jej utrzymanie oraz w inicjację różnicowania. Bardzo dobrze scharakteryzowano oddziaływania między opisanymi szlakami, które są podstawą utrzymania pluripotencji ludzkich PSC. Następnie, scharakteryzowane zostały kluczowe markery pluripotencji, w końcu różnicowanie komórek pluripotencjalnych *in vivo*, a więc w rozwijającym się zarodku. Bardzo dobrze przedstawiony został

rozwój i funkcjonowanie trzustki oraz, kluczowe dla zrozumienia prowadzonych badań, etapy różnicowania PSC w kierunku komórek budujących trzustkę (Fig. 4). Krytycznie przedstawione zostały problemy związane z wykorzystaniem dostępnych protokołów różnicowania. Końcowy fragment *Wstępu* przedstawia AMOTL2, wskazując że ekspresja tego genu wykrywana jest już w komórkach węzła zarodkowego, zarówno w zarodkach myszy jak i ludzki, a także w tzw. naiwnych PSC. Doktorantka, przywołuje wyniki badań zespołu prof. Borowiak, a także tych włączonych do swojej pracy magisterskiej, charakteryzujące komórki *Ngn3(+)* podczas rozwoju trzustki u myszy. Do genów, które zostały zidentyfikowane jako charakterystyczne dla komórek EP *Ngn3(+)* zaliczony został także *Amotl2*, cel opisanych w doktoracie badań.

Wstęp ilustrowany jest bardzo dobrymi i klarownymi schematami (no może z wyjątkiem nieco labiryntowej Fig. 7). Całość jest świetnym podsumowaniem istniejącego stanu wiedzy i doskonale wprowadza w temat badań. Mankamenty tej części pracy są małe. Zarówno we *Wstępie* jak i w spisie skrótów SMAD opisano jako „Mothers Against Decapentaplegic Homolog”, zabrakło „Suppressor of”. Ponadto, Fig. 2 opisuje układ moczowo-płciowy jako powstały z endodermy, podczas gdy jego źródłem jest mezoderma pośrednia. Warto też zaznaczyć, że początkowe i końcowe odcinki układu pokarmowego, oddechowego, rozrodczego i wydalniczego są pochodzenia ektodermalnego.

Pierwsza część *Wyników* dotyczy analizy ekspresji AMOTL2 podczas rozwoju ludzkiej trzustki oraz różnicowania in vitro hESC. Wyniki umieszczone w bazach danych (*Materiały i metody*, Tabela 6) zostały wnikliwie przeanalizowane przez Doktorantkę. Dzięki temu, w pierwszej kolejności, wykazane zostało, na jakim etapie rozwoju obecne są komórki *NG3+/AMOTL2+*. Immunodetekcja AMOTL2 oraz markerów komórek α i β wykazała, że AMOTL2 jest obecny głównie w komórkach α . Kolejne meta-analizy dostępnych danych scRNA-seq (także tych pochodzących z laboratorium prof. Borowiak) pozwoliły prześledzić obecność komórek ekspresyjujących *NG3* i/lub *AMOTL2*, a także porównać komórki *NEG3+* ekspresyjujące i nieekspresyjujące *AMOTL2*. Ta ostatnia analiza pokazała, że komórki *AMOTL2+* charakteryzuje zwiększona ekspresja genów kodujących białka zaangażowane regulację migracji i adhezji komórek. Dane pozyskane w wyniku analizy dojrzałych trzustek nie wykazały ekspresji *AMOTL2* w komórkach endokrynnych. Analiza baz danych pochodzących z scRNA-seq ludzkich zarodków przedimplantacyjnych i linii hESC wykazały, że *AMOTL2* ekspresjonowany jest w komórkach moruli, węzła zarodkowego blastocyst oraz hESC. Immunodetekcja wykazała, że hESC syntetyzowały jednocześnie SOX2 i AMOTL2. Co kryje się za określeniem „vast majority”? Czy były to podobne proporcje jak te, które przedstawia Fig. 14? Te wstępne analizy stanowią doskonałe tło do doświadczeń opisanych w dalszej części pracy – a więc do charakterystyki fenotypu hESC, w których doprowadzono do obniżenia ekspresji *AMOTL2*.

Opis uzyskiwania komórek AMOTL2 KO został bardzo dobrze przygotowany. Schematy są klarowne, pozwalają prześledzić wybrane strategie. Jak zwykle w przypadkach doświadczeń wykorzystujących metodę CRISPR-Cas9 uzyskane zostały różniące się od siebie klony. Do dalszych badań Doktorantka wybrała trzy z nich. Zakładam, że wprowadzone delecje uniemożliwiały powstanie funkcjonalnego białka i dlatego

nie potwierdzano jego nieobecności. Dlaczego do badań wybrano tylko jedną linię hESC? Zdaję sobie sprawę, że była to genetycznie zmodyfikowana linia zawierająca *CAS9* indukowany DOX. Ale czy jest ona najlepsza do prowadzonych analiz? Czy różnicuje ona wydajniej w kierunku komórek trzustki, w porównaniu do innych dostępnych hESC? Różnice między liniami komórek pluripotencjalnych (ESC, iPSC) były wielokrotnie opisywane i mogą być bardzo duże, wpływając znacząco zarówno na ich pluripotencję jak i zdolność do różnicowania. Także uzyskiwane z nich klony nie są niestety identyczne. Co zresztą Doktorantka przedstawia w *Dyskusji* (str. 91) i co widać na mapach ciepła przedstawionych w pracy (np. Fig. 22).

W kolejnych etapach Doktorantka porównywała kontrolne hESC z dwoma liniami określanymi jako AMOTL2_KO_1 i AMOTL2_KO_2. Rozdział 3.3. powinien zaczynać się od informacji, które to były linie z trzech uzyskanych. Czy Fig. 23 i kolejne pokazują różnice wspólne dla dwóch linii komórek AMOTL2_KO i dwóch linii komórek WT? Czy też są to dane dla jednej linii? Której? Pomijając te techniczne uwagi należy podkreślić, że uzyskane dane wyraźnie wskazują, że brak *AMOTL2* znacząco dereguluje ekspresję genów związanych z organizacją cytoszkieletu komórki, adhezją, migracją, czy składników macierzy pozakomórkowej. Ma także wpływ na metabolizm czy różnicowanie komórek, szlaki przekazywania sygnału. Co istotne brak *AMOTL2* nie wpływa na ekspresję *AMOTL1* czy *AMOT*. Możemy więc przyjąć, że nie dochodzi to kompensacji niedostatku tego czynnika.

Bazując na danych wskazujących na wpływ AMOTL2 na ekspresję białek cytoszkieletu czy adhezyjnych Doktorantka przeprowadziła analizy morfologii hESC. Analizy te wykazały zwiększoną konfluencję oraz większą liczbę komórek w hodowlach wszystkich badanych linii AMOTL2_KO. Potwierdzono to stosując immunodetekcję ufosforylowanego histony H3. Stwierdzono także, że w tych hodowlach mniej komórek przechodzi apoptozę.

Najważniejsze, w moim odczuciu, doświadczenia dotyczyły określenia w jaki sposób AMOTL2 wpływa na różnicowanie komórek pluripotencjalnych. Analizy mRNA kodujących markery listków zarodkowych uwidoczniły, że przy braku tego białka spada poziom ekspresji białek endodermy i mezodermy, a wzrasta markerów endodermy. Obserwuje się także zmiany w ekspresji mRNA kodujących białka cytoszkieletu. Wykorzystując inhibitor ROCK wykazano jednak, że zmiany te nie mają wpływu na losy różnicujących komórek. Dalsze, obszernie porównania, udokumentowały, że zastosowania ROCKi miało wpływ na wielkość kul zarodkowych, w których różnicowały hESC, zarówno AMOTL2_KO jak i WT, co nie było dla mnie zbyt zaskakujące. Nie mniej jednak podobnie jak w przypadku hodowli hESC w postaci kolonii tak jak i te różnicujące w EB proliferowały „wydajniej”. Kolejny etap doświadczeń dotyczył analizy zależności między AMOTL2 a ścieżką przekazywania sygnału HIPPO, a co za tym idzie YAP. W tych doświadczeniach zastosowano inhibitor YAP – werteporfinę. Pozwoliło to wykazać, że zablokowanie YAP nie ma wpływu na różnicowanie komórek AMOTL2_KO. Ostatnia część wyników dotyczy obniżenia poziomu kanału wapniowego PIEZO1 w komórkach KO. Ten wątek nie był jednak rozwijany i w zasadzie można było nie włączać go do rozprawy.

Podsumowując, przeprowadzone badania doprowadził do uzyskania nowatorskich i bardzo istotnych dla zrozumienia rozwoju trzustki wyników. Rola AMOTL2 była po raz pierwszy tak wnikliwie analizowana w ludzkich komórkach różnicujących zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Niezwykle istotne było wykazanie zaangażowania tego białka w regulację proliferacji komórek, ich apoptozę oraz co kluczowe w determinację wyboru ścieżki różnicowania. AMOTL2 jest istotny dla powstawania endodermy. Wyniki zostały przedstawione w sposób logiczny, a to przy ich ogromie niekoniecznie było łatwym zadaniem.

W *Dyskusji* uzyskane dane zostały bardzo dobrze podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą. Doktorantka świetnie podkreśliła mocne i słabe strony prowadzonych doświadczeń i krytycznie odniosła się do swoich wyników. Zwróciła np. uwagę na trudności w pracy z komórkami pluripotencjalnymi, o czym wspomniałam na początku mojej recenzji. Doktorantka bardzo dobrze nakreśliła plany dalszych badań, podkreśliła rolę AMOTL2 w determinacji losów komórek powstającej trzustki. *Dyskusja* jest ilustrowana bardzo dobrymi schematami.

Materiały i metody. Mgr Anna Jędrzejak przeprowadziła szereg bardzo dobrze zaplanowanych analiz i doświadczeń, podczas których wykorzystwała liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej, analizy bioinformatyczne. Wszystkie są bardzo dobrze opisane w tej części doktoratu. Towarzyszą im odpowiednie tabele i zestawienia prezentujące wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki.

Rozprawa doktorska napisana jest po angielsku. Tylko więc w ograniczonym stopniu czuję się przygotowana do oceny stylu czy gramatyki. Czytało się ja bardzo dobrze. Figury były starannie przygotowane. Ich opisy były klarowne.

Podsumowując, mgr Anna Andrzejak zrealizowała wszystkie postawione cele. Wykonana przez nią praca jest obszerna, wskazuje na ogromną pracowitość i skrupulatność Doktorantki. W jej wyniku przedstawiła nowatorską rozprawę dokumentującą rolę AMOTL2 zarówno w pluripotencji jak i podczas różnicowania komórek ES i rozwoju trzustki *in vivo*. Uzyskane dane mogą stanowić i zapewne stanowią podłoże dla dalszych badań. Wyniki doktoratu były już prezentowane na licznych konferencjach naukowych. Co istotne mgr Andrzejak uczestniczyła także w innych projektach badawczych, których wynikiem są już opublikowane prace.

Stwierdzam, więc 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 Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Anny Andrzejak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość naukową przedstawionej rozprawy, jej nowatorski charakter, i stworzenie podłoża do dalszych badań o dużym znaczeniu także aplikacyjnym, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.