

prof. dr hab. Maciej Figiel

Poznań, 25.10.24

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

Autorka rozprawy doktorskiej: *mgr Anna Paulina Jędrzejak*

Tytuł rozprawy.: *Rola genu AMOTL1 w pluripotencji i różnicowaniu ludzkich komórek macierzystych*

Promotorka pracy: *dr. hab. Małgorzata Borowiak prof. UAM*

1. Ocena formalna

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, w Laboratorium Komórek Macierzystych. Rozprawa została napisana języku angielskim w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej wymagane rozdziały w kolejności: „Abstract”, „Introduction”, „Aims of the thesis”, „Results”, „Discussion”, „Material and methods”, „Figure lists” i „Literature”. Praca zawiera dużą liczbę dobrze skomponowanych i atrakcyjnych rycin „Fig.” i tabele. Tekst rozprawy zawiera odnośniki do literatury naukowej, które są jednolicie sformatowane i prawidłowo przytaczane. W rozprawie jest lista publikacji naukowych oraz raportów konferencyjnych, które zostały wymienione na początkowych stronach manuskryptu. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Anny Pauliny Jędrzejak wypełnia wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim.

2. Ocena merytoryczna

Pierwszy rozdział pracy to wstęp, który nie jest długi i obejmuje 17 stron, ale informacje w nim zawarte są merytoryczne i wystarczające do wprowadzenia czytelnika w tematykę i zrozumienia części eksperymentalnej oraz dyskusji. Wstęp omawia temat pluripotencjalnych komórek macierzystych. Wśród informacji znaleźć można szczegółowe omówienie regulacji stanu pluripotencjalności, np. dokładne omówienie różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału przez ścieżki PI3K/AKT, MAPK, WNT i Hippo. Następnie omówione jest współdziałanie i wzajemne oddziaływania wszystkich ścieżek w

regulacji stanu pluripotencjalności. Te sekcje opatrzone są rysunkiem schematu ścieżek i ich wzajemnych oddziaływań. Po tym następuje krótka sekcja dotycząca rozwoju wczesnych faz zarodka, rodzajów komórek listków zarodkowych, jakie tkanki z nich powstają i że z endodermy powstaje trzustka. Następny rozdział traktuje właśnie o trzustce jej rozwoju w fazie embrionalnej oraz modelach in vitro, czyli przepis jak zrobić trzustkę i jakie komórki po kolei powstają in vitro. W tej pracy autorkę szczególnie interesują progenitory endokrynne pozytywne na NGN3, ich subtypy, a także obecność w tych subtypach ekspresji genu *AMOTL2*, który jest głównym bohaterem rozprawy.

Autorka dokładnie przestudiowała literaturę i zidentyfikowała braki w istniejącej wiedzy. Ponieważ, różnicowanie do komórek beta jest mniej efektywne z każdym następnym stadium tego różnicowania, stwierdziła, że zbyt szybkie pojawianie się ekspresji NGN3 towarzyszy powstaniu komórek beta o upośledzonej produkcji i wydzielaniu insuliny. Autorka stwierdza, że nie poznano do końca mechanizmów związanych z morfologicznymi zmianami w komórkach, które towarzyszą różnicowaniu, przez co nie można w sposób wydajny generować komórek beta in vitro. Zainteresowała się subtypem 2 progenitorów endokrynych, które w E16.5 produkują komórki beta ze względu na ich markery (EMT i mezenchymalne). Autorka szukała genów, które są unikalne dla tego subtypu i znalazła *Amotl1*. Gen ten jest regulowany przez ścieżkę Hippo, która może być aktywowana przez odpowiedź na stymulację mechanosensoryczną, co może regulować architekturę tkanek poprzez formowanie cytoszkieletu jego depolimeryzacje czy też polimeryzacje. Takie procesy intensywnie zachodzą w komórkach hPSC, które wkraczą na ścieżkę różnicowania, a nawet w czasie przechodzenia między stanami pluripotencjalności. Autorka podkreśla plejotropową rolę genu *AMOTL2* w sprzęganiu (ang.: crosstalk) różnych ścieżek regulacji pluripotencjalności demonstrując na rysunku miejsca fosforylacji-aktywacji tego białka. Autorka stwierdziła, że rola *AMOTL2* w stanie pluripotencjalności typu „primed” powinna zostać zbadana, co pomoże rozszyfrować rolę tego genu również w czasie rozwoju, „EM transition”, komórkach EP i generowaniu komórek beta i w konsekwencji rozwoju trzustki.

W rozdziale „Cel pracy”, pomiędzy 6 celami uwydatniają się 2 części, a mianowicie 1). Część, która zawiera charakterystykę transkrypcyjną, badanie profilów ekspresji *AMOTL2* w rozwijającej się trzustce (in vivo) i komórkach pluripotencjalnych i istnienia progenitorów *AMOTL2(+)/NGN2(+)*, a także badania różnic transkrypcyjnych pomiędzy ludzkimi komórkami pluripotencjalnymi *AMOTL2(+)* vs *AMOTL(-)*. 2). Poznanie roli *AMOTL2* w komórkach pluripotencjalnych, wygenerowanie modelu KO, w którym wyłączono gen *AMOTL2* w komórkach hPSC z pomocą CRIPR/CAS. Następnie zbadano funkcjonalne konsekwencje braku ekspresji *AMOTL2* na pluripotencjalność i wpływ tego braku na dalszy los komórki, czyli

ukierunkowanie jej proliferacji i różnicowania. Oceniam postawione cele rozprawy jako bardzo ambitne, a poznanie odpowiedzi na postawione pytania za ważne dla zrozumienia biologii komórki.

Rezultaty i Analiza danych

Sekcja wyników liczy sobie ponad 44 stron, a zawartość potwierdza, że w eksperymenty laboratoryjne i analizę danych przeprowadzono dużym nakładem twórczej pracy.

Po pierwsze Autorka przeanalizowała ekspresję mRNA AMOTL2 w różnych populacjach komórek z pomocą wielu wolno-dostępnych danych z scRNAseq, a także z macierzystego laboratorium. W tym podrozdziale wyników analizowano populacyjny rozkład ekspresji AMOTL2 w stadiach rozwojowych takich jak hPSC i ich różnicowania do komórek trzustki oraz w ludzkiej embrionalnej trzustce. Okazało się, że ekspresja tego genu jest obecna bardzo wcześnie w rozwoju, zarówno in vitro, jak i in vivo. W różnicowaniu in vitro szczyt tej ekspresji/populacji AMOTL2 przypada na fazę S3-S6 i autorka przypisuje te komórki do trajektorii/linii komórek mezenchymalnych. W trzustkach z ludzkich embrionów ekspresja AMOTL2 jest wykrywana w populacjach NGN3+ na wczesnych etapach rozwoju trzustki 10-14 wpc, czyli we wczesnej organogenezie embrionalnej. Populacja AMOTL2(+)/NGN3(+) okazała się b. rzadka – tylko 47 komórek ze wszystkich NGN3(+) 500 progenitorów endokrynnych i ze wszystkich 53 tys. zsekwencjonowanych komórek z faz embriogenezy ludzkiej trzustki. Trzeba przyznać, że rzeczywiście populacja komórek jest niezwykle rzadka, jednak jak wskazuje autorka, jest to 20 % wszystkich progenitorów NGN3(+) ze stadium 12-13 wpc (lub 16% z 12-13-14 wpc). Ponadto w dalszych analizach mgr Jędrzejak doszła do wniosku, że AMOTL2(+)/NGN3(+) jest populacją rozwojowo młodszą niż AMOTL2(-)/NGN3(+) co jest trochę zaskakujące. Co ważne po analizie genów ko-ekspymowanych w tych populacjach wniosowała, że funkcje tych populacji muszą być szczególnie silnie związane z adhezją, migracją i polimeryzacją białek cytoszkieletowych oraz adhezją do błony podstawnej. Wobec tak obiecującej roli AMOTL2 w populacjach Autorka postanowiła wyprodukować knock-out AMOTL2 w komórkach Pluripotencjalnych.

Komórki KO AMOTL2 powstały z pomocą technologii CRIPR-Cas9. W poszukiwaniu funkcji genu wykonano RNAseq, poszukując różnic między komórkami KO AMOTL2 vs WT. Okazało się, że zidentyfikowano obniżoną i podwyższoną ekspresje odpowiednio 237 i 491 genów co moim zdaniem jest ogromną liczbą. Przekonuje to, że brak AMOTL2 zaburza wiele procesów komórkowych. Wydaje mi się jednak, że tak ogromne różnice w ekspresji mogą oznaczać jakąś destabilizację tej linii hPSC, co może oznaczać pewne niekontrolowane przychodzenie pomiędzy stadiami komórek. Jest oczywiście pewna różnica między długością eksonu 2 pomiędzy allelami genu, więc można domniemywać wpływ

szczątkowego peptydu, który nadal ulega ekspresji (jeżeli dobrze rozumiem strategię). W takim razie miejsce wiązania fosfatazy PPP2R2A i domena wiążąca lub będąca celem tankyrazy nie zostały usunięte. Może to też oznaczać jakieś niekontrolowane wydążenia w na skutek przeprowadzenia KO drogą CRIPR-Cas9. Proszę o komentarz w tej sprawie. Wyniki, w których widzimy ogromny efekt na ekspresje mRNA, są oczywiście niezwykle obiecujące, jednak na pewno scRNAseq powiedziałyby tutaj więcej.

Rzeczywiście Autorka potwierdza, że KO AMOTL2 mocno wpływa na szybszy wzrost kolonii komórek pluripotencjalnych, ale także na ich morfologię, ponieważ daje się zauważyć bardzo nierówne brzegi kolonii. Autorka pokazuje, że brak ekspresji AMOTL2 powoduje zwiększoną proliferację i zmniejszoną apoptozę w hPSC. To działanie braku ekspresji AMOTL2 na komórki pluripotencjalne przypominało mi niejako działanie inhibitora ścieżki ROCK, który dodajemy do komórek PSC przy ich pasażowaniu. Co ciekawe brak AMOTL2 sprawia, że komórki różnicują do ektodermy kosztem mezodermy i endodermy. Jeżeli dobrze zrozumiałem, bez inhibitora ROCK, KO AMOTL2 tworzą nieregularne EB jakby o morfologii zawierającej rozety. Jednak później rosną szybciej i w dniu 9 EB KO AMOTL2 są większe, niż te z inhibitorem, natomiast EB WT z inhibitorem ROCK zaczynają być dość duże i nieregularne i zaczynają nieukierunkowane różnicowanie dopiero w dniu 9. Nakierowanie do różnicowania do ektodermy jest w zasadzie wczesne, ale w wypadku KO AMOTL2 może być jeszcze wcześniejszym zdążeniem w całym procesie różnicowania. Praca, którą znalazłem w referencjach do doktoratu, mówi o „dorsalizacji” w embrionach Danio po KO AMOTL2. Rozdział dyskusji 4.4 o wpływie AMOTL2 na „rodowód komórkowy” dostarczył ciekawej dyskusji, ale jednak proszę o szerszy komentarz lub spekulacje na temat wpływu genu AMOTL2 na różnicowanie innych listków zarodkowych. Jeżeli takie informacje są dostępne.

Materiały i metody w pracy charakteryzują się nowoczesnością i zróżnicowaniem. Obejmują analizy powszechnie dostępnych danych scRNAseq, podstawowe techniki biologii molekularnej, CRISPR/Cas9, cystometrię przepływową, analizy żywych komórek w czasie rzeczywistym, techniki różnicowania komórek macierzystych. Metody są udokumentowane bardzo starannie łącznie z tabelą aplikacji, które zostały użyte w analizach bioinformatycznych RNAseq, scRNAseq i obrazowania. Wszystkie metody pozwalają na dobre zreprodukcowanie eksperymentów.

Właściwie jedyna poważniejsza uwaga do pracy jest związana z komórkami AMOTL2-KO . Może to rodzić pewne pytania, czy obserwowane efekty całkowicie wynikają z KO genu AMOTL2, czy też może jakaś część fenotypu wynika z mutacji typu off-target lub pozostałych po operacji KO miejsc wiązania czynników do szczątkowego peptydu AMOTL2. Poza tym w polskim tytule powinno być „pluripotencjalności”.

3. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Pauliny Jędrzejak została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego i jej wykonanie jest oryginalne. Ambitne cele pracy doktorskiej Pani mgr Anny Pauliny Jędrzejak zostały osiągnięte. Wyniki zawarte w pracy mają dużą wartość naukową dla zrozumienia czynników, które sterują rozwojem trzustki, od samego początku już w komórkach pluripotencjalnych. Rozprawa doktorska Pani mgr. Anny Pauliny Jędrzejak spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668). Moje uwagi do pracy mają jedynie charakter dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy uważam, że Pani mgr Anna Paulina Jędrzejak powinna być dopuszczona do końcowych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Maciej Figiel