

Kraków, 7. września -
9. października 2024



Uniwersytet Jagielloński

Ocena rozprawy doktorskiej napisanej przez
Mgr Martę Budzińską
zat. „*Autologiczne komórki pochodzenia miogennego od pacjentów
dystroficznych poddane modyfikacji genetycznej jako nowa strategię
poprawy struktury i funkcji mięśni szkieletowych w chorobie Duchenne’a*”
przygotowanej pod kierunkiem i opieką naukową promotora
prof. Macieja Kurpisza
w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych
Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Znalezienie i opracowanie metody leczenia genetycznie uwarunkowanej choroby zanikowej mięśni jaką jest choroba Duchenne’a (DMD), lub jej łagodniejszej formy dystrofia Beckera (BMD), to bardzo ambitne wyzwanie z którym zmagają się najwybitniejsze zespoły badawcze genetyków i biologów na świecie, w tym grupa kierowana przez promotora tej pracy **prof. Macieja Kurpisza**. Piszę tę recenzję w nieprzypadkowym dniu, a mianowicie 7. września, w którym przypada Światowy Dzień Świadomości Dystrofii Mięśniowej Duchenne’a. Data ta została tak wybrana, ponieważ gen DMD, kodujący białko *dystrofiny*, jest najdłuższym znanym ludzkim genem i składa się on właśnie z 79 *egzonów*.

Podłoże genetyczne tej choroby to mutacje w genie białka *dystrofiny*. Są to różnego rodzaju delecje, duplikacje, powodujące przesunięcie ramki odczytu ORF, ale także spoza ORF, także mutacje związane z prawidłowym składaniem mRNA. Rodzaj mutacji w obrębie tego genu, w różnej lokalizacji *egzonów* kodujących odpowiednie domeny funkcjonalne białka, wpływa na końcową budowę *izoformy* dystrofiny, a w szczególności na budowę kluczowych domen tego białka wiążących białka cytoszkieletu (*aktynę*) i białka błonowe (*dystroglikan*). Destabilizacja wiązania tego kompleksu spowodowane zanikiem niektórych domen w białku *dystrofiny*, powoduje destabilizację wiązania cytoszkielet-powierzchnia komórki, a tym samym prowadzi do uszkodzenia błony komórkowej podczas skurczu komórki mięśniowej. Stopień destabilizacji tego kompleksu ma implikacje kliniczne, wpływ na fenotyp i objawy DMD lub BMD.

Molekularne podstawy DMD, jej patomechanizmy związane z fizjologicznym przebiegiem szlaków metabolicznych w komórce mięśnia szkieletowego pacjenta z DMD, zostały wyczerpująco i klarownie przedstawione we wstępie rozprawy doktorskiej. Ta część pracy (wstęp) liczy 13 stron, co przy cało-witej długości pracy doktorskiej (67 stron) stanowi wręcz idealną proporcję. W tejże części p. **mgr Marta Budzińska** opisała także mechanizm przewle-łego stanu zapalnego jaki zachodzi w mięśniach u chorych na DMD. Opisy patomechanizmu na poziomie

Prof. n. med.

Ewa Łucja Stępień

Kierownik Zakładu

e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki

im. M. Smoluchowskiego



Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40

tel. bezp. 12 664 47 62

ul. Łojasiewicza 11

30-348 Kraków

komórkowym zostały wzbogacone samo-dzielnie wykonanymi schematami i ilustracjami (ryc. 1-5). Duży nacisk kładę tutaj na słowo **samodzielnie**, bo wykonanie choćby najprostszej ryciny, bez korzystania z dostępnych teraz baz obrazów, wymaga przemyślenia i za-planowania każdego schematu. Zwróć tutaj uwagę, aby w schemacie obrazującym powstawanie reaktywnych form tlenu w układach biolo-gicznych (ryc. 4), strzałkę dla szlaku *katalazy* lepiej byłoby poprowadzić od cząsteczki H_2O_2 , która jest rozkładana w tym procesie.



Uniwersytet Jagielloński

Rola wolnych rodników tlenowych w patomechanizmie DMD oraz ich związek z przewlekłym stanem zapalnym stanowią podrozdziały wstępu pracy. Wyjaśnienie tych zjawisk było niezbędne, ponieważ w swej metodologii badawczej Doktorantka dokonała charakterystyki ekspresji genów prozapalnych (*NF-kB*, *TNF- α*), proliferacyjnych (*STARS*, *SRF*, *MRFTA2*, *RHO*) i aktywności szlaków *redox* (*TAC*, *SOC*, *katalaza*). We wstępie znalazły też miejsce opisy obowiązującego schematu leczenia DMD i nowych strategii terapeutycznych wdrażanych na świecie, które zapewne były inspiracją dla tej pracy Doktorskiej (tabela 1). Doktorantka tutaj też opisała dlaczego w swej pracy posłużyła się strategią opartą o wykorzystanie autologicznych komórek *iPS* różnicowanych do komórek *mezoangioblastów* (*HIDEM*). Są to pionierskie badania grupy **prof. Macieja Kurpisa**, a protokół wykorzystany w pracy doktorskiej został oparty o unikalne doświadczenia.

Uwagi krytyczne recenzenta dotyczące tej część pracy: Czego mi brakuje w tym opisie to informacji dlaczego w swojej strategii Doktorantka wykorzystwała gen *mikrodystrofiny* (μ DYS), i czymże ten skonstruowany gen jest?

Wstęp, jak i cała praca, napisane są bardzo ładną polszczyzną, Doktorantka pokazała, że nie tylko biegle posługuje się polską terminologią naukową, ale także rozumie to co pisze i pisze logiczne i lekko. Pojawiły się małe niedociągnięcia językowe.

Kolejną częścią pracy doktorskiej są założenia i cel pracy, gdzie Doktorantka przedstawia swoją motywację podjęcia się badań nad wyprowadzeniem transdukowanej genem μ DYS linii komórek *mezoangioblastów* wyprowadzonych z odróżnicowanych do *iPS* komórek mięśniowych pobranych od pacjentów chorych na DMD. Celem pracy było uzyskanie takiej linii komórek *HIDEM* aby były zdolne do poprawy funkcji mięśni szkieletowych. Ich funkcjonalność miała być zbadana na mysim modelu dystrofii mięśniowej *mdx*. Cele pracy udało się doktorantce w całości zrealizować.

Poniżej omówię strategię realizacji wyznaczonych celów badawczych w oparciu o przedstawioną w dysertacji metodologię.

Cześć poświęcona opisowi materiałów i metodyce badawczej jest wystarczająco obszerna i szczegółowa. Stanowi ona 13 stron tekstu uzupełnionego o tabele zawierające spisy odczynników, aparatury badawczej, sekwencji *primerów* do badań ekspresji wybranych genów, listy

Prof. n. med.

Ewa Łucja Stępień

Kierownik Zakładu

e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki

im. M. Smoluchowskiego



Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40

tel. bezp. 12 664 47 62

ul. Łojasiewicza 11

30-348 Kraków



Uniwersytet Jagielloński

przeciwciał oraz opisy ich znakowania. Zawiera też schematy budowy plazmidów wykorzystanych wytworzenia wektorów *lentiwirusowych*, genu μ DYS i genu reporterowego *GFP*. Znajduje się też tam opis modelu mysiego, sposób uzyskania i podawania domięśniowo komórek *HIDEM*. Warto też podkreślić, że na samym początku tej części pracy Doktorantka przedstawiła charakterystykę chorych na DMD od których pobrano komórki do eksperymentów. Chorych tych cechowało różne podłoże genetyczne DMD oraz bardzo zróżnicowany fenotyp. W tym miejscu należy nadmienić, że wykorzystana w pracy doktorskiej przez p. **mgr Martę Budzińską** strategia uzyskania linii komórek *mezoengiogialnych* jest bardzo przemyślana, nie ma w niej przypadku, a opracowanie metodologii było możliwe dzięki doświadczeniu i wiedzy nabytych pod kierunkiem promotora **prof. Macieja Kurpisa**. Komórki *iPS* zostały pozyskane jako wynik badań finansowanych z grantu OPUS 2017/25/B/NZ/01131, metodą różnicowania do *HIDEM* opracowano na podstawie protokołu Malffioletti (2015) i jest to jak napisała Doktorantka jedyny eksperyment, który wykorzystał ten protokół to badań z sukcesem, przedstawionym w dysertacji. Wykonane przez Doktorantkę testy funkcjonalne na zwierzętach, wykorzystujące bieżnię, też były jedynym możliwym wyborem. Nieliczna, jak sama doktorantka zwróciła uwagę w części dyskusji, grupa zwierząt testowych była zapewne kompromisem dla oszczędzenia zwierząt laboratoryjnych oraz ograniczona była dostępnością materiału komórkowego (nie wszystkie linie komórkowe wyprowadzone od pacjentów wykazywały jednakowy potencjał proliferacyjny).

Uwagi krytyczne recenzenta dotyczące tej części pracy: Brakuje mi informacji w jakiej gęstości wysiewano komórki *HIDEM* (liczba komórek na cm^2) przy kolejnych pasażach? Jaką komórki uzyskiwały gęstość przy konfluencji 80-90%? Jaka była ich dynamika wzrostu (czas podwojenia)? W opisie wirowania komórek pojawia się zapis którego osobiście staram się unikać, szybkość wirowania wyrażona w obrotach na minutę i stosuję bardziej uniwersalny zapis w postaci względnej siły odśrodkowej (rcf).

Prof. n. med.

Ewa Łucja Stępień

Kierownik Zakładu

e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki

Wyniki to równie fascynująca część pracy. Udało się otrzymać linii komórek *HIDEM*, które wykorzystywała w dalszej kolejności do transdukcji genem μ DYS. Już na tym etapie Doktorantka dokonała interesującego odkrycia, co w dalszej części pracy pokazało, że zróżnicowane podłoże genetyczne dystrofii mięśniowej rzutuje na tylko na przebieg choroby (czego dowiedzieliśmy się z opisu pacjentów), ale także wpływa na oczekiwane efekty terapeutyczne. Otóż okazało się, przeprowadzonej przez Doktorantkę charakterystyce komórek *HIDEM*, że linie te wykazywały dużą zmienność pod względem ekspresji markerów odróżnicowania (CD13, CD44, CD49b, CD73 i CD148).



Zakład Fizyki Medycznej

im. M. Smoluchowskiego

Co ciekawe linia wyprowadzona od pacjenta 40, która charakteryzowała się największą ekspresją wymienionych markerów, słabo się dzieliła, stąd nie mogła być już wykorzystana do dalszych eksperymentów. Dla mnie jako recenzenta taki „negatywny” wynik jest szczególnie ciekawy, bo w pewnym sensie podważa hipotezę badawczą i prowokuje do dalszych poszukiwań.

tel. sekr. 12 664 46 40

tel. bezp. 12 664 47 62

ul. Łojasiewicza 11

30-348 Kraków

Fenotyp komórek pozyskanych od tego pacjenta był odmienny, a podłoże genetyczne mutacji w genie DMD złożone (dwie delecje egzonów 2-17 i 30-44). Prosiłabym o rozwinięcie tego wątku przy obronie.



Uniwersytet Jagielloński

Do tej części wyników pragnę też wyrazić swoje zadowolenie, że pomiary cytometryczne zostały zilustrowane panelami wykresów z fluorescencji, co nie pozostawia wątpliwości dla recenzenta, jak wyniki były analizowane. Trochę gorzej wypadły zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego dla markerów *iPS* (Ryc 12 A,B,C,D) i odróżnicowania (Ryc. 15 A,B,C,D), wydruki takich obrazów są zawsze mniej czytelne.

Kolejna bardzo ciekawa część wyników to skuteczna transdukcja genem μ DYS za pomocą wektora konstrukcji *lentwirusowej* i charakterystyka uzyskanych komórek pod kątem ich funkcjonalności. Do oceny funkcjonalności wybrano testy aktywności enzymatycznej SOD, katalazy i ocenę całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w lizatach komórkowych oraz ocenę poziomu ekspresję genów ścieżki sygnałowej STARS. Wybór tych wskaźników był świetnie dobrany i właśnie w tym miejscu pokazał skuteczność strategii zaplanowanej w badaniu i sprawdzeniu hipotezy badawczej, że **utworzenie linii indukowanych komórek mezenchymalnych modyfikowanych mikrodstrofiną przyczyni się po poprawy funkcji mięśni szkieletowych.**

Brak dystrofiny wiąże się z destabilizacją środowiska redox w miocytach, zatem po skutecznej transdukcji spodziewalibyśmy się poprawy tych parametrów co wykazano na liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów 34 i 38.

Eksperymentów na zwierzętach – model dystrofii (myszy mdx) okazały się najtrudniejsze. Dwie rzeczy złożyły się na to ograniczenie: mała liczba zwierząt (n=4) oraz protokół badania. Z takiej liczby trudno było wybrać odpowiednie dane do analizy, a na podstawie tabeli 7 i 8 widać, że były duże różnice między skrajnymi. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano w teście wstrząsów elektrycznych. Moja uwaga, zapis wyników eksperymentów z Ryc. 21 odbiega od wykresu porównującego średnie liczby porażenia prądem (Ryc. 22). Na podstawie opisu i wykresu zapisu w czasie wnioskuję, że myszy mdx po terapii komórkami transdukowanymi μ DYS przyjmowały mniej porażenia prądem aby rozpocząć aktywność ruchową. Ten wynik jest kluczowy dla eksperymentów przedstawionych w dysertacji.

Dyskusja pracy doktorskiej p. **mgr Marty Budzińskiej** jest wyczerpująca i odnosząca się w pełni do uzyskanych wyników. Jeszcze raz Doktorantka nawiązuje w niej do stosowanych wcześniej strategii leczenia dystrofii mięśniowej DMD, których efekt był ograniczony, kiedy stosowano same MSC, nawet jeśli były różnicowane (systemowa transplantacja *mezoangioblastów*). Doktorantka przedstawiła w dyskusji różne strategie podejmowane przez poprzednich badaczy, i uzasadniła dlaczego dokonała właśnie takiego, a nie innego wyboru protokołu łączącego terapia

Prof. n. med.

Ewa Łucja Stępień

Kierownik Zakładu

e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki

im. M. Smoluchowskiego



Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40

tel. bezp. 12 664 47 62

ul. Łojasiewicza 11

30-348 Kraków

komórkowa z terapią genomową. Odniosła się też do wyboru metody transdukcji, krytycznie odnosząc się do zastosowanych przez siebie wektorów i uzasadniają swój wybór bezpieczeństwem pacjentów. Być może protokół oparty o wykorzystanie konstrukcji AAV byłby skuteczniejszy do badania klinicznego, sprawdzenie tej strategii wymagałoby by dalszych badań.



Uniwersytet Jagielloński

Badania z wykorzystaniem reprogramowanych *iPS* mają swoje ograniczenia technologiczne oraz jak wykazała Doktorantka w swojej pracy nie bez znaczenia jest genotyp pacjenta. Największe problemy z procesie różnicowania wykazywały komórki od pacjentów 39 i 40, czyli od tych z najbardziej upośledzonym fenotypem i najbardziej skomplikowanej mutacji. Ta obserwacja jest ważna dla podejmowania decyzji terapii komórkowej (nie można zwlekać) oraz podejmowania dalszych prac nad protokołami klinicznymi.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską p. **mgr Marty Budzińskiej** oceniam pozytywnie, jest ona dziełem o wybitnej wartości naukowej i walorach poznawczych dla badań nad mechanizmami leżącymi u podstaw terapii genowej w chorobie DMD. Praca ta rozszerza i ugruntowuje stan wiedzy na temat udziału μ DYS w patofizjologii komórki mięśniowej, a także stanowi przykład rzetelnego badania naukowego. Doktorantka podjęła się odważnego zadania, które zrealizowała i przedstawiła w formie znakomicie zestawionych wyników.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej IGC PAN w Poznaniu o nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie dla p. **Marty Budzińskiej**, zgodnie z obowiązującymi przepisami ustawy: „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”.

Prof. n. med.

Ewa Łucja Stępień

Kierownik Zakładu

e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Ze względu na wybitną wartość naukową i oryginalne odkrycia naukowe oraz wysoką jakość eksperymentów wnioskuje również do Wysockiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej p. **Marty Budzińskiej**.

Instytut Fizyki

im. M. Smoluchowskiego



Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40

tel. bezp. 12 664 47 62

ul. Łojasiewicza 11

30-348 Kraków