

**OCENA ŚRÓDOKRESOWA
–ZA OKRES OD 01.10.2022 DO 30.09.2024
MID-TERM ASSESSMENT FOR PERIOD 01.10.2022 – 30.09.2024**

KATARZYNA WASIAK

.....
(imię / imiona i nazwisko doktoranta / name/s and surname of PhD student)

1. Tytuł rozprawy doktorskiej (w języku dysertacji) / Original title of doctoral dissertation

Opracowanie produktów terapii zaawansowanej (ATMPs) ze szczególnym uwzględnieniem uniwersalnych (dla każdego biorcy) CAR-T (limfocytów T z chimerycznym receptorem antygenowym) oraz CAR-M (makrofagów z chimerycznym receptorem antygenowym).

Therapy products (ATMPs) with particular reference to universal (for each recipient) CAR-T (T lymphocytes with a chimeric antigen receptor) and CAR-M (macrophages with chimeric antigen receptor).

2. Komisja Ewaluacyjna ds. Oceny Śródkresowej Doktoranta Międzynarodowej Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (UM) w dyscyplinie: nauki medyczne w składzie: / Evaluation Commission for Mid-term Assessment the PhD student at UM International Doctoral School in the discipline: medical sciences consists of:

No.	Tytuł / stopień naukowy, imię, nazwisko / Scientific title / degree, name, surname	Rola / Role
1.	dr hab. n. med. Tomasz Boczek	Przewodniczący Komisji / Head of the Committee
	Uniwersytet, wydział, instytut / University, faculty, institute: Uniwersytet Medyczny w Łodzi	
2.	dr hab. n. med. Mariusz Hartman	Członek Komisji z UM / Member from the MUL
	Uniwersytet, wydział, instytut / University, faculty, institute: Uniwersytet Medyczny w Łodzi	
3.	Prof. dr hab. n. med. Magdalena Zielińska	Członek Komisji spoza UM / Member from outside the MUL
	Uniwersytet, wydział, instytut / University, faculty, institute: PAN w Warszawie	
4.	lek. wet. Piotr Kamola	Obserwator – doktorant / Observer – Doctoral student
	Uniwersytet Medyczny w Łodzi/ Medical University of Lodz:	

Ocena końcowa doktoranta KATARZYNA WASIAK / Final assessment of PhD student

POZYTYWNA / POSITIVE*

Uzasadnienie końcowej oceny Komisji / Justification of Commission's final assessment result

Na podstawie przedłożonej do oceny dokumentacji dotyczącej działalności kształcenia w Międzynarodowej Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi komisja pozytywnie ocenia doktorantkę. Zgodnie z harmonogramem, w czasie pierwszych dwóch lat kształcenia w Międzynarodowej Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (rok akademiki 2022/2023 i 2023/2024), p. mgr. Wasiak zaplanowała realizację 3 zadań badawczych, obejmujących różnicowanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) do indukowanych neuralnych komórek macierzystych (iNSC); dostosowanie metody CRISPR opartej na lentivirusowym systemie ekspresyjnym w celu wykonania usunięcia (knock-out) genu kodującego β -2 mikroglobulinę (B2M) oraz genu kodującego łańcuch α receptora limfocytu T (TRAC; ang. *T cell receptor alpha chain*), tj. zaprojektowanie odpowiednich sekwencji sgRNA, uzyskanie plazmidowego DNA, itp.; modyfikację genetyczną komórek iNSC z wykorzystaniem konstruktorów i weryfikację usunięcia genu B2M i TRAC; przeprowadzenie reprogramowania komórek iNSC do iPSC ko B2M, iPSC B2M/TRAC^{-/-};
Na podstawie dostarczonych materiałów można stwierdzić, że Doktorantka udokumentowała:

1. uzyskanie komórek iNSC w wyniku zróżnicowania komórek iPSC; fenotyp komórek potwierdza obecność markerów SOX2 i nestyny (barwienie immunocytochemiczne, Ryc.2);
2. zaprojektowanie i przygotowanie na potrzeby zastosowania techniki CRISPR/Cas9, opartej na wektorach lentiwirusowych drugiej generacji, odpowiednich sekwencji (sgRNA, Cas); otrzymanie plazmidowego DNA (materiał poddany analizie jakościowej i ilościowej), który wykorzystwała do otrzymania odpowiednich wektorów lentiwirusowych;
3. uzyskanie komórek iNSC z inaktywowanym genem (B2M i TRAC), następcza weryfikacja na poziomie mRNA i białka, jak również barwieniem immunocytochemicznym (Real-time PCR, Western Blot, ICC; Ryc. 4, Ryc.5);
4. uzyskanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych z wyciszonym B2M (iPSC ko B2M) z komórek iNSC ko B2M (Ryc. 6; dokumentacja barwienia immunocytochemicznego B2M i TRA-1-60 jako marker pluripotencji);
5. zaprojektowanie nowych sekwencji sgRNA dla genu TRAC o przewidywanej zwiększonej specyficzności, które w analogiczny sposób zostały wklonowane do wektorów plazmidowych, w celu otrzymania wektorów lentiwirusowych;
6. otrzymanie konstruktorów ekspresyjnych kodujących cząsteczki CAR anty-CD19 i oraz anty-CD22 (zadanie badawcze zaplanowane do realizacji na III roku kształcenia w roku akademickim 2024/25);

Potwierdzając osiągnięcia naukowe wynikające z innych aktywności bezpośrednio związanych z realizacją rozprawy doktorskiej poza wypełnieniem punktów harmonogramu IPB, p. mgr. Katarzyna Wasiak wykazała współautorstwo publikacji naukowej (praca oryginalna: doi: <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02886-0>); czynny udział jako autor prezentujący w dwóch konferencjach naukowych oraz uczestnictwo w badaniach prowadzonych przez jednostkę macierzystą (projekt ABM2020/ABM/04/00002).

On the basis of the documentation submitted for evaluation regarding the activity of education at the International Doctoral School of the Medical University of Lodz, the committee assess the doctoral student positively. According to the information presented within the IRP form, during two years of education in an International Doctoral School of Medical

University Łódź (the academic year 2022/2023 and 2023/2024), three interrelated tasks have been planned, encompassing i.e., the iPSC cells differentiation into induced neural stem cells (iNSCs); design of gRNA sequences for the CRISPR method based on the lentivirus expression system, along with the preparation of lentiviral vectors encoding elements necessary for the inactivation of chosen genes (*B2M*, *TRAC*); genetic modification of iNSCs with inactivated *B2M* (iNSC ko *B2M*), and subsequent verification of *B2M* gene inactivation; iNSC reprogramming into iPSC ko *B2M* and iPSC *B2M/TRAC*^{-/-};

The following research goals were achieved:

1. the correct iPSC differentiation into iNSC (ICC for specific markers SOX2 and Nestin; Fig. 2);
2. design specific tools and conduct genetic modification of iNSCs using tools designed to inactivate genes (*B2M* and *TRAC*) via CRISPR/Cas9 technology based on second-generation lentiviral vectors;
3. iNSC transduction with vectors to *B2M/TRAC* gene knockout; results verification at both the mRNA and protein levels, and by ICC (Western blot analysis and RT-PCR; Fig. 4, ICC for *B2M*; Fig. 5);
4. reprogramming of NSCko*B2M* cells into iPSC with verification (ICC for TRA-1-60, *B2M*; Fig.6);
5. design of new double-stranded sgRNA sequences for the *TRAC* gene with predicted increased specificity and subsequent use for lentivirus preparation;
6. design and generation of lentiviral vectors encoding CAR molecules targeting CD19 and CD22 antigens (research task originally planned to be conducted in the academic year 2024/25);

Doctoral student Katarzyna Wasiak confirmed scientific achievements and other activities directly related to the implementation of the doctoral dissertation, apart from fulfilling the points of the IPB schedule. She is a co-author of the original publication (<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02886-0>); she was a presenting author in two scientific conferences and conducted research within the unit project (2020/ABM/04/00002).

Opinia dotycząca jakości opieki naukowej i wsparcia w prowadzeniu działalności naukowej
/ Opinion concerning scientific guidance and support in conducting scientific activities

Promotor / Supervisor PROF. DR HAB. N. MED. PIOTR RIESKE
BARDZO DOBRA / VERY GOOD

Ocena prezentacji osiągnięć doktoranta i dyskusja naukowa / Assessment of Presentation of Achievements and scientific discussion

KATARZYNA WASIAK Prezentacja osiągnięć i dyskusja naukowa / Presentation of Achievements and scientific discussion	Ocena / Assesment
Prezentacja osiągnięć doktoranta / PhD student's Presentation of Achievements	BARDZO DOBRA / VERY GOOD

Dyskusja naukowa / Scientific discussion

BARDZO DOBRA / VERY GOOD