

Zakład Neurobiologii Molekularnej
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

rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Jeża pt.:

Rola oksygenazy hemowej-1 w kardiomiocytach otrzymanych z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych

Rozprawa doktorska w formie manuskryptu została wykonana w Zakładzie Biotechnologii Medycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca została napisana w typowym układzie zgodnym ze standardami pracy naukowej zawierającej najważniejsze sekcje takie jak wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusję.

Wprowadzenie pracy obejmuje 20 stron i zawiera w pierwszej części przegląd wiedzy na temat komórek macierzystych, a w następnej sekcji dokładne omówienie szczególnego typu tych komórek otrzymanych w laboratorium, indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC). Rozdział ten zawiera również omówienie otrzymania kardiomiocytów uzyskiwanych z komórek iPSC oraz procesów fizjologicznych i metabolicznych zachodzących w tych komórkach. Druga część wprowadzenia zawiera informacje na temat oksygenazy hemowej-1, jej wpływu na komórki macierzyste oraz prekursory kardiomiocytów, a także opis wpływu na różnicowanie do mysich kardiomiocytów. Wprowadzenie zostało przygotowane bardzo dobrze i jeżeli doszukiwać się braku omówienia którejs z dziedzin przydatnej wiedzy to będzie to pogłębienie informacji o roli HO-1 w dorosłych kardiomiocytach i jej roli w powstawaniu chorób serca. Natomiast szerzej jest to również omówione w dyskusji. Wprowadzenie zawiera jedną rycinę przedstawiającą przemiany biochemiczne z udziałem HO-1, jednak praca mogłaby zawierać więcej atrakcyjnych grafik pomagających zrozumieć omówioną wiedzę, a także ubarwiających manuskrypt.

Następną częścią rozprawy jest omówienie celu pracy, który został przedstawiony dość skrótowo. Praca zawierała 3 cele dotyczące zbadania wpływu HO-1 na różnicowanie hiPSC do kardiomiocytów, procesy metaboliczne w tych komórkach, a także na elektrofizjologię kardiomiocytów. O ile z rozdziału "Cel pracy" dowiadujemy się o głównych celach pracy, to jednak nie dowiadujemy się niczego o celach szczegółowych pracy.

Materiały i metody zostały w większości poprawnie i wyczerpująco opisane. Liczba metod użytych w pracy jest imponująca i godna najlepszych prac doktorskich. Zwraca uwagę zastosowanie przez Doktoranta bardzo nowoczesnych metod badawczych w biologii komórkowej, takich jak reprogramowanie z użyciem zestawu Sendai, kultury iPSC, ich testowanie, różnicowanie do kardiomiocytów kilkoma metodami i zastosowanie cystometrii przepływowej. Zastosowano także analizę wysokoprzepustową transkryptomu (RNAseq) w celu wytypowania różnic pomiędzy liniami z wyciszoną ekspresją HO-1 i liniami WT. Do wyciszenia zastosowano metodę z shRNA z transferem lentiwirusowym oraz metodę CRISPR/Cas9. Następnie zwraca uwagę paleta testów funkcjonalnych takich jak pomiar metabolizmu komórkowego z udziałem testów Seahorse, a także analizy cało-komórkowego patch clamp. Jest to bardzo wymagająca i trudna metoda do wdrożenia i uzyskania wyników. W metodach zwraca uwagę rozdział analiza statystyczna, do której mam pytania odnoszące się do zastosowanych testów i prezentacji wyników. Generalna uwaga to zastosowanie SD jako słupka błędów, natomiast powszechnie obowiązujące jest zastosowanie błędu standardowego średniej (SEM), ponieważ bierze on pod uwagę zarówno odchylenie standardowe, jak i wielkość grupy badanej. Sekcja omawiająca statystykę nie ujawnia tego, co Doktorant uznaje za powtórzenie biologiczne, a co za powtórzenie techniczne. Powtórzeniami biologicznymi mogą być klony tych samych komórek otrzymane z użyciem jednego shRNA lub klony z kilkoma shRNA, lub osobne kultury jednej linii wskazane prawdopodobnie jako $N = 3$, jednakże nie jest to dokładnie opisane. Natomiast powtórzenia techniczne to prawdopodobnie wspomniane „pomiary” i „kropki” na przykład w opisie rysunku 15? Proszę o wyjaśnienie, co Doktorant rozumie jako „kropki” i „pomiary” czy są to powtórzenia kultur, czy są to wyłącznie powtórzenia techniczne qPCR. Co do porównania dwóch linii sh HO-1 B i sh HO-1 D w porównaniu do „scr ctr” (prawdopodobnie kontrola shScrambled – skrót nie jest wyjaśniony w podpisie, co mogłoby być pomocne) to zastosowanie testu porównywania wielu średnich – (analiza wariancji ANOVA) jest prawidłowe, natomiast nie wiadomo, czym są

gwiazdki nad niektórymi belkami, bo sekcja metod nie wymienia testu posthoc. Proszę o wyjaśnienie podczas obrony, jakim testem posthoc wykryto, że dana średnia, nad którą umieszczono gwiazdki, jest źródłem zmiany (dotyczy wszystkich rycin z testem ANOVA). Testem ANOVA można wykryć tylko występowanie zmiany w układzie eksperymentalny – w tym wypadku 3 średnich. To samo dotyczy wielu rysunków w pracy.

Sekcję wynikową otwiera charakterystyka uzyskanych komórek iPSC w szczególności ich pluripotencjalności, która została dokonana z udziałem markerów komórek macierzystych OCT3/4, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 i NANOG. Wybór markerów do tego celu jest standardowy i prawidłowy natomiast nie pokazano negatywnych barwień na te antygeny, co nie jest bardzo istotnym uchybieniem, jednakże kontrola specyficzności przeciwciał nie została pokazana. Drugim z testów było spontaniczne różnicowanie z udziałem ciałek zarodkowych i barwienia na markery wszystkich 3 listków zarodkowych. Oba testy wykazały pluripotencjalność linii iPSC, które następnie użyto do testowania produkcji kardiomiocytów dwoma metodami, które w istocie oferowały podobną wydajność otrzymania tych komórek. Jednakże ze względu na stwierdzone później wyciszenie kasety lentiwirusowej z shRNA w metodzie różnicowania PSC, w eksperymentach z shRNA zastosowano metodę z inhibicją Wnt i Gsk3b (GiWi). Uwaga do ryciny 14 to pytanie, dlaczego zastosowano słupki błędów, jeżeli $n = 1$ i co było słupkami błędów? Po tych działaniach przeprowadzono eksperyment, w którym farmakologicznie hamowano bądź aktywowano oksygenazę hemową-1 nie wykazując różnic w wydajności różnicowania. Był to drugi zestaw eksperymentów, który nie wykazał roli tego enzymu w różnicowaniu do kardiomiocytów.

Ponieważ podejście farmakologiczne i shRNA nie wyciszały aktywności lub ekspresji oksygenazy całkowicie, dlatego Doktorant postanowił unieczynnić ekspresję oksygenazy hemowej w komórkach iPSC i kardiomiocytach z pomocą edycji genów CRISPR/Cas9. Sekcja opisująca wyniki produkcji KO HO-1 pokazuje duży nakład pracy, który został włożony w wyprodukowanie tych linii komórkowych, ponieważ konieczne było uzyskanie wyłączenia obydwóch alleli genu dla skutecznego KO. Brak oksygenazy hemowej nie doprowadził do zmiany w pluripotencjalności zmodyfikowanych komórek iPSC.

Następnie przystąpiono do testowania wpływu KO HO-1 na wydajność różnicowania do kardiomiocytów metodą GiWi i uzyskano zmienne wyniki. Sekcja 7.2.1 i sekcja 7.2.2, a także późniejsza sekcja 7.9.2 pokazuje wydajność różnicowania do kardiomiocytów na poziomie ok

60% (metoda GiWi i PSC). Natomiast sekcja 7.7. pokazuje wydajność różnicowania niezmodyfikowanych komórek WT w doświadczeniu 1 na poziomie harmonizującym z sekcją 7.2.1, 7.2.2 i 7.9.2 natomiast w doświadczeniu 2 różnicowanie jest na poziomie 5%. Nie znajduję wytłumaczenia, dlaczego zaprezentowano doświadczenie nr 2 i co ma ono pokazywać w porównaniu do doświadczenia 1? Doktorant wykazał także brak wpływu KO HO-1 na spontaniczne różnicowanie do markerów mezodermy, chociaż różne klonety wykazały zmienną ekspresję markerów (rycina nr 25; ANOVA; brak informacji o teście posthoc). Czy przyczyną tych rozbieżnych wyników mogły być niespecyficzne wyłączenia edycji genomu (ang.: Off-targets) w różnych klonach komórek? Czy w późniejszych eksperymentach RNAseq sprawdzono zmiany w genach pod kątem zmian mogących powstać w czasie edycji genomu? Cała zmienność różnicowania skłoniła Doktoranta do dalszej optymalizacji otrzymania Kardiomiocytów z użyciem sortowania magnetycznego lub selekcji metabolicznej. Ostatecznie otrzymano prawie czystą populację kardiomiocytów metodą PSC w obecności selekcji metabolicznej z użyciem 6 mM mleczanu.

Zoptymalizowane kultury komórek kardiomiocytów wykorzystano następnie do analizy transkryptomu, gdzie wykryto zmiany w mRNA 1026 różnych genów (449 i 577 odpowiednio podwyższonych i obniżonych). Czy przeprowadzono analizę zmian wynikłych z niespecyficzności CRIPR/Cas9? Analiza GO terms wykazała obecność procesów związanych z elektrofizjologią i z regeneracją serca. Nie wskazano, z jakiego programu komputerowego korzystano i które GO term zastosowano i który poziom. Doktorant wykonał analizę ekspresji kanałów jonowych metodą qPCR, która potwierdziła podwyższony poziom kanału potasowego KCNQ1 w hiPSC-CM KO HO-1. Zwraca uwagę gen SNC5a. Ponieważ dość często w pracy rozkład pomiarów nie jest normalny (rysunek 15, 16, 21, 25, 31), dlatego w stwierdzeniu statystycznie znaczących różnic mógłby pomóc test nieparametryczny, co z kolei mogło np. pokazać zamianę w SNC5a. Zmiany w ekspresji kanałów w HO-1 KO hiPSC-CM znalazły swoje odzwierciedlenie w funkcjonalnych analizach patch clamp. Kardiomiocyty charakteryzowały się skróconym czasem repolaryzacji błony komórkowej. Czym są słupki błędów w analizach patch clamp (SD czy SEM), ponieważ zdają się bardzo małe (co wskazuje na SEM), podpis do rycin nie precyzuje tego, natomiast rozdział 6.18 mówi o SD. W analizach znowu zastosowano test ANOVA, ale nie wymieniono testu posthoc. Analiza pomiaru konsumpcji tlenu oraz aktywności błon mitochondrialnych nie wykazały zmian w metabolizmie hiPSC-CM.

Na koniec proszę o komentarze odnośnie do ważnych punktów dotyczących wykonanych badań. Pierwsze pytanie dotyczy tego, czy i jak opisane badania wpłyną w przyszłości na rozwój metod i strategii terapeutycznych związanych z oksygenazą hemową w chorobach serca. Czy potencjalne terapie komórkowe (wstrzykiwane do serca kardiomiocyty) powinny brać pod uwagę poziom oksygenazy hemowej lub też powinny posiadać konkretny poziomem ekspresji tego enzymu na różnym etapie kolonizacji mięśnia sercowego przez kardiomiocyty dostarczone egzogenne (w dyskusji wspomniano o dwojakim wpływie HO-1 na mięsień sercowy). Drugie pytanie dotyczy szczegółowego wpływu oksygenazy hemowej na różnicowanie do kardiomiocytów. Wiadomo, że komórki w czasie różnicowania przechodzą przez różne stadia progenitorów. Czy planuje się zbadać te populacje komórkowe? Jakie metody można zastosować do definiowania tych stadiów z większą dokładnością? Czy na różnicowanie mogą mieć wpływ komórki towarzyszące kardiomiocytom takie jak komórki endotelialne?

Podsumowując pracę, należy zauważyć jej istotny wpływ na gromadzenie wiedzy na temat różnicowania do kardiomiocytów. Bardzo dogłębnie opracowano metody pozyskania kardiomiocytów, dochodząc do wydajności prawie 100%, co niewątpliwie jest bardzo przydatne w badaniach zespołu. Nie potwierdzono wpływu braku oksygenazy hemowej na różnicowanie do kardiomiocytów, jednakże zauważono jej wpływ na transkryptom i fizjologię kardiomiocytów co przedstawiono w dyskusji do pracy. Jest to duży wkład w rozwój tej dziedziny wiedzy.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pana mgr. Mateusza Jeża spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455) oraz 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). Praca została wykonana z podjęciem ważnego problemu badawczego, jakim jest uzyskanie postępu wiedzy na temat regeneracji mięśnia sercowego i wpływu oksygenazy hemowej HO-1 na różnicowanie i biologię kardiomiocytów. Wykonanie pracy jest oryginalne, wykorzystuje ogromny zasób innowacyjnych metod badawczych w biologii komórek macierzystych i wykonano ją wysokim nakładem pracy. Moje uwagi do pracy mają charakter

pytań do dyskusji podczas obrony. W związku z moją pozytywną oceną pracy składam formalny wniosek do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie, Pana mgr. Mateusza Jeża do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



Maciej Figiel