



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

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



Warszawa, 17 marca 2021

Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej: „Rola oksygenazy hemowej-1 w kardiomiocytach otrzymanych z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych” autorstwa Pana mgr. Mateusza Jeża.

Praca doktorska Pana mgr. Mateusza Jeża powstała w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jej promotorem jest prof. Józef Dulak a promotorem pomocniczym dr Jacek Stępniewski.

Celem pracy była analiza roli oksygenazy hemowej 1 (HO-1) w niezróżnicowanych i różnicujących w kardiomiocytach ludzkich komórkach iPS. Wcześniejsze prace prof. Dulaka i jego współpracowników dokumentowały taką rolę w różnicujących mysich komórkach macierzystych. Jak powszechnie wiadomo znaczenie tego enzymu zostało udowodnione także w procesach takich jak regeneracja mięśni szkieletowych czy gojenie uszkodzonych tkanek. Wiele tych prac powstało właśnie w Zakładzie Biotechnologii Medycznej. Z tego względu było to idealne miejsce do badań nad HO-1 w kardiomiocytach oraz zmaganiach z komórkami iPS. Celowo użyłam określenia "zmagania". Świetnie charakteryzuje ono niemal wszystkie projekty, w których naukowcy mają do czynienia z komórkami takimi jak ES czy iPS. Zmienność "osobnicza" tych komórek często jest powodem do ogromnych frustracji. Doktorat stanowił więc rozwinięcie podjętych już projektów, dotyczących HO-1. Jego celem było stworzenie modelu umożliwiającego badanie ludzkich kardiomiocytów uzyskanych z iPS oraz określenie roli HO-1 w różnicowaniu hiPS. Taki model byłby niezwykle istotny dla dalszych badań mających na celu wykorzystanie takich komórek dla poprawy zdolności naprawczych mięśnia sercowego. W szczególności, Doktorant postawił przed sobą następujące zadania: 1) opracowanie skutecznej metody uzyskiwania kardiomiocytów z hiPS; 2) określenie roli HO-1 w różnicowaniu hiPS; 3) określenie roli HO-1 w metabolizmie i elektrofizjologii kardiomiocytów uzyskanych z hiPS.

Wstęp do rozprawy doktorskiej obejmuje bardzo rozległą tematykę, począwszy od opisu pluripotencjalnych komórek macierzystych, ich uzyskiwania i różnicowania, przez charakterystykę kardiomiocytów uzyskiwanych z takich komórek, aż po przedstawienie HO-1 i jej roli w rozwoju zarodkowym, powstawaniu i funkcjonowaniu linii kardio oraz także w innych procesach. **Wstęp** zawiera wszystkie informacje istotne dla zrozumienia pracy i świadczy o bardzo rozległej wiedzy Autora. Ta część pracy "czytała się" bardzo dobrze i nie budziła niedosytu. Po jej zakończeniu czułam ważkość decyzji o podjęciu przedstawionych badań i byłam przygotowana do lektury **Wyników**. Zanim jednak to nastąpiło przeczytałam rozdział poświęcony **Materiałom i Metodam**, który niestety nie był tak jakościowo równy jak **Wstęp**.

Cele doktoratu mgr Mateusz Jeż zrealizował przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń, podczas których wykorzystał liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej, czy biochemii. Do metod tych zaliczają się m.in.: hodowle komórkowe, różnicowanie ludzkich komórek iPS, chemiczna indukcja HO-1, różne metody wyciszania ekspresji HO-1 (shRNA, CRISPR/Cas9), testy metaboliczne, elektrofizjologiczne, qRT-PCR, analizy transkryptomu, FACS, immunodetekcja, czy Western blotting. Otrzymane dane poddane zostały analizom statystycznym. Zastosowanie różnorodnych metod pozwoliło Doktorantowi na doskonałe opanowanie warsztatu biologii komórki. **Materiały i Metody** prezentują wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki. W wielu miejscach Autor pominął jednak informacje o pochodzeniu odczynników. Niestety nie można założyć, że każdy biolog wie gdzie kupić np. geltrex (pisownia Geltrex™), CytoTune™-IPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, czy inne odczynniki. Fakt, można sprawdzić w internecie, no ale recenzent chciałby znaleźć tego rodzaju info w pracy. Ponadto, skrótowo a wręcz zdawkowo zostały opisane niektóre stosowane metody (przykładem może być rozdział na temat pomiaru aktywności błon mitochondrialnych).

Wyniki można podzielić na dwie części - pierwsza to opis zmagania z ludzkimi komórkami iPS, wyborem najlepszej linii komórek, metody różnicowania, selekcji kardiomiocytów, inaktywacji czy stymulacji HO-1. Nieustająca walka. Jestem pełna podziwu dla Doktoranta, za konsekwencję w drodze do wyboru najlepszej techniki. Tym bardziej, że walcząc uzyskiwał wyniki, które wskazywały, że HO-1 nie ogrywa podczas różnicowania ludzkich iPS w kardiomiocyty ważkiej roli. Dopiero po pieczołowitym dopracowaniu metod różnicowania i selekcji komórek, identyfikacji problemów związanych z odczynnikami stosowanymi do modulowania poziomu HO-1 udało się przeprowadzić analizy wykazujące rolę tego enzymu w kardiomiocytach. Temu jest poświęcona druga część **Wyników**. Obejmuje ona między

innymi analizy transkryptomu i elektrofizjologii kardiomiocytów kontrolnych i tych pozbawionych HO-1. Wracając do części pierwszej nadmienię jeszcze, że Doktorant wykazał, że HO-1 nie ma wpływu na różnicowanie hiPS w kardiomiocyty i w zasadzie także na ich metabolizm. Część druga pracy była już pokazała natomiast, że przy braku ekspresji HO-1 w iPS-CM, a więc w kardiomiocytach, dochodzi do zmian w poziomie transkrypcji wielu genów kodujących czynniki zaangażowane w regulację funkcji tych komórek czy mięśnia sercowego (przedstawionych na Ryc. 29 m.in. jako tajemnicze "procesy sercowe"), w tym także odpowiedzialnych za przeżywalność kardiomiocytów. Co istotne wykazano także różnice w ekspresji np. kanałów jonowych, co sugerowało wpływ HO-1 na elektrofizjologię serca. Efekt ten potwierdzony został pomiarami potencjału czynnościowego komórek - te pozbawione HO-1 miały znacząco skrócony czas repolaryzacji. Przy okazji tych badań Doktorant wykazał, że protoporfiryna IX kobaltu (CoPP) powszechnie używana do modulacji poziomu HO-1 miała wpływ także na komórki pozbawione tego enzymu. Odkrył więc, że CoPP może działać niezależnie od HO-1. Jaki mógłby być mechanizm takiego działania? Fragment **Dyskusji** dotyczący tego problemu pozostawił we mnie pewien niedosyt. Nie mniej jednak, wyniki licznych doświadczeń przeprowadzonych przez doktoranta świetnie scharakteryzowały elektrofizjologii hiPS-CM. Doktorant wykazał także, że podobnie jak w przypadku komórek mysich, także ludzkie komórki pozbawione HO-1 są większe i ekspresyjną wyższy poziom czynnika wzrostu IGF2.

Podsumowując uzyskane wyniki, należy stwierdzić, że wskazanie takich funkcji HO-1 jak te wspomniane powyżej jest znaczącym osiągnięciem pracy doktorskiej. Wnosi nowe informacje na temat funkcji enzymu w kardiomiocytach. Bardzo dużym osiągnięciem jest także opracowanie skutecznej metody różnicowania ludzkich iPSC, wzbogacania populacji w kardiomiocyty, a także wytypowanie skutecznych metod modulacji poziomu HO-1. Daje to wspaniałe podłoże dla dalszych badań. Co do innych aspektów tej części pracy to należy podkreślić, że rozdział ilustrowany jest dobrej jakości rycinami, być może ich opisy mogłyby być bardziej obfite, no ale zwięzłość opisu wyników to jedna z cech tego doktoratu. Brakowało mi chociażby krótkich wprowadzeń i bardziej klarownych podsumowań podrozdziałów a także wyjaśnienia, dlaczego wybierano te a nie inne markery do analiz różnicowania (np. Rycina 15). Nie jest to wiedza objawiona i warto czasem czytelnikowi wytłumaczyć.

W **Dyskusji** wyniki własne zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą problematyki badań. Doktorant sprawnie wskazuje na różne aspekty uzyskiwania komórek iPSC, stosowane wektory a także problemy związanymi z ich różnicowaniem tych komórek. Sprawnie i krytycznie odnosi to do wyników swoich doświadczeń związanych z poszukiwaniami optymalnych warunków uzyskiwania kardiomiocytów. Świetnie dyskutuje rolę HO-1. Jedyne co budziło mój lekki

niepokój to wzmianki o regeneracji mięśnia sercowego, pewnie lepiej byłoby konsekwentnie używać określenia gojenie. Zabrakło mi nieco informacji dotyczących zmienności linii komórek iPS a co za tym idzie dyskusji jakie może to mieć konsekwencje dla prowadzonych badań. Zarówno we **Wstępie** jak i w **Dyskusji** wykorzystana została bogata literatura dotycząca tematyki badań - zacytowano 197 prac. Świadczy to o rozległej znajomości tematu prowadzonych badań.

Praca doktorska napisana jest poprawnym językiem. Czyta się ją dobrze. Jak każda praca zawiera jednak usterki. To nieuniknione. Gdybym miała wybrać jedną to oczywiście byłby nią "ciałka zarodkowe". To i tak brzmi lepiej niż "ciała embrionalne" używane przez niektórych, czy "wewnętrzna masa komórek blastocysty" przez innych (zamiast węzeł zarodkowy). Takie tłumaczenia *de novo* nie są konieczne - *embryoid bodies* to kule zarodkowe a termin ten używany jest przez polskich embriologów od kilkadziesiąt lat. Chciałam też tradycyjnie wspomnieć, że komórek nie traktuje się stężeniami a np. inhibitorem o taki to takim stężeniu. Nie użyłabym także określenia "synteza mitochondriów". Problemy stylistyczne istnieją, ale pozwolę sobie pominąć je w tej recenzji. Było ich naprawdę niewiele.

Podsumowując, pan mgr Mateusz Jeż zrealizował wszystkie postawione cele. Jego tytaniczny wręcz wysiłek pozwolił na opracowanie skutecznych metod uzyskiwania kardiomiocytów, także tych pozbawionych ekspresji HO-1. W efekcie udało mu się uzyskać nowatorskie dane na temat roli HO-1 w funkcjonowaniu ludzkich kardiomiocytów uzyskanych z komórek iPS. Jest to niewątpliwie dużo wartość przedstawionej do oceny pracy. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.IJ.Nr 65 poz. 595; z p62n. zm.), zgodnie z art. 175.1. ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.