



Wrocław, 22.08.2022

Ocena pracy doktorskiej mgr Kaliny Andrysiak

pt. „Application of human induced pluripotent stem cells and CRISPR/Cas9 gene editing technology for investigation of molecular background of Duchenne muscular dystrophy-related cardiomyopathy”

Pracę wykonano w Zakładzie Biotechnologii Medycznej pod opieką profesora Józefa Dulaka oraz dr Jacka Stępniewskiego i przygotowano w języku angielskim.

Wstęp

Choroby genetyczne człowieka, zarówno w aspekcie wiedzy o procesach z nimi związanych, jak i w aspekcie terapii stanowią wciąż nierozwiązany problem stojący przed nauką i medycyną chorób rzadkich. Jeśli nawet skupimy się wyłącznie na relatywnie dobrze poznanych, oraz intensywnie badanych przez ostatnie dziesięciolecia, chorobach rzadkich jakimi są dystrofie mięśniowe, jak np. w przypadku tej rozprawy doktorskiej dystrofia mięśniowa typu Duchenne’a, czy bliższe moim zainteresowaniom EDMD, to nasuwa się konkluzja, że pomimo dotychczas zgromadzonego olbrzymiego zasobu wiedzy na ich temat, wciąż wiele aspektów tych chorób, szczególnie na poziomie molekularnym, pozostaje niezbadanych. Jednym z kluczowych problemów, zarówno w przypadku DMD/BMD jak i EDMD jest fakt, że najpopularniejszy genetyczny model zwierzęcy – myszy mdx (DMD) czy *EMDnull* (EDMD1) odbiegają fenotypem i jego nasileniem od fenotypu pacjentów w bardzo wielu aspektach. Zastępowanie myszy modelowych większymi zwierzętami to zwielokrotnione koszty i problemy techniczne a w związku z tym ograniczona skala badań w zasadzie wyłącznie do zaawansowanych prób terapeutycznych. Jako uzupełnienie i/lub alternatywę stosuje się wyprowadzone hiPSCs z komórek pobranych od zdrowych dawców i



pacjentów oraz wytworzone izogeniczne linie komórkowe. Tak uzyskane modele komórkowe poddaje się różnicowaniu *in vitro* do docelowego materiału w wariantach 2D lub 3D, np. mioblasty i miotuby czy kardiomiocyty. Tak uzyskane komórki docelowe poddawane są analizom. Niestety ta metodologia ma także swoje swoiste problemy i pułapki. Pomijając fakt braku wielu skomplikowanych i oczywistych interakcji *in vitro* różnicowanych komórek w porównaniu do różnicowania *in vivo*, istotnym problemem jest standaryzacja procesu różnicowania, konieczność każdorazowego kontrolowania markerów etapów dojrzewania oraz co najistotniejsze, precyzyjnej oceny jaki etap różnicowania dana porcja komórek rzeczywiście osiąga. Jest to szczególnie istotne dla kluczowej dla nauki analizy porównawczej danych z różnych laboratoriów. Dodatkowym utrudnieniem w pracy z różnicowanymi *in vitro* liniami komórkowymi jest ich duża heterogenność, także w obrębie klonów z tej samej linii hPSCs, o heterogenności osobniczej nawet nie wspominając.

Praca z takimi modelami badawczymi wymaga wysoko ukształtowanego intelektu, wysokiej sprawności manualnej, wiedzy, doświadczenia, perfekcyjnego opanowania technik hodowli i badawczych oraz wykonania wielu skomplikowanych procedur kontrolnych na różnych etapach hodowli komórek, różnicowania czy samych eksperymentów.

Takiego właśnie skomplikowanego projektu badawczego podjęła się doktorantka a prace zostały ujęte w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej. Jako naukowiec zajmujący się badaniem molekularnego mechanizmu rozwoju fenotypu chorobowego w pokrewnej grupie chorób nerwowo-mięśniowych (laminopatie) z podobnym fenotypem sercowo-mięśniowym jestem pod wrażeniem zarówno zakresu przeprowadzonych badań jak i istotnym znaczeniem naukowym przedstawionych wyników.

Pracę wykonano w Zespole, który od wielu lat z dużymi sukcesami zajmuje się analizą wpływu molekularnych mechanizmów rozwoju fenotypu chorobowego w DMD w aspekcie mięśni szkieletowych i serca oraz rolę białek związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny w DMD. Pragnę wspomnieć, że do rozprawy



dołączono Suplement w którym umieszczono listę 11 publikacji w których Pani mgr Kalina Andrysiak jest dwukrotnie pierwszym autorem, raz drugim oraz trzykrotnie trzecim autorem wieloautorowych prac.

Formalna ocena pracy

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została napisana w języku angielskim, składa się ze 150-u numerowanych stron, 10-ciu rozdziałów, zawiera 34 ryciny (plus 6 rycin dodatkowych w suplemencie), oraz cytuje 450 prac źródłowych. Na stronie 3-ciej zamieszczono informację o finansowaniu pracy w ramach projektów: Maestro 3 (NCN 2012/06/A/NZ1/00004), Preludium, , CISTEM, oraz PROM program.

Układ rozprawy, proporcje pomiędzy rozdziałami oraz ich kolejność są typowe i odpowiednie dla tego typu prac doktorskich. Praca jest napisana przejrzysto i w sposób przyjazny dla odbiorcy, Autorka posługuje się swobodnie i bardzo precyzyjnie językiem i terminologią naukową. Wstęp pracy jest napisany bardzo umiejętnie, przy szerokim zakresie tematycznym i poruszeniu wszystkich istotnych zagadnień oraz pozwala na dogłębne zapoznanie się ze stanem wiedzy i problemami czekającymi wciąż na rozwiązanie. Autorka szczególnie umiejętnie porusza się w gąszczu problematyki dotyczącej istniejących strategii terapii dystrofii mięśniowej DMD i prac nad nowymi strategiami terapeutycznymi, szczególnie w aspekcie rozwoju terapii genowej. Przedstawione ilustracje i dokumentacja są czytelne, wszystkie w podobnym stylu i układzie. Opisy do ilustracji i dokumentacji są zrozumiałe, lecz niestety bardzo lakoniczne co zmusza czytelnika do poszukiwań istotnych informacji w tekście lub/i Materiałach i Metodach. Rozdział Materiały i Metody zawiera większość niezbędnych informacji, jakkolwiek ułatwieniem dla czytelnika byłoby zebranie razem listy i nazw linii hiPSC, uzyskanych nowych linii modyfikowanych genetycznie oraz linii zróżnicowanych kardiomiocytów. Cel pracy jest jasno określony i zdefiniowany. Merytoryczna zawartość rozdziałów Wyniki oraz Dyskusja jest bardzo dobrze rozdzielona. Dyskusja jest napisana przejrzysto a hipotezy dobrze i ciekawie



uzasadnione. Bibliografia jest wyjątkowo rozbudowana. Pozycje literaturowe są bardzo dobrze dobrane i odpowiednio cytowane. Dodatkowy Suplement zawiera dodatkową dokumentację która przynajmniej w części powinna się raczej znaleźć w rozdziale Wyniki jako integralna część pracy a wyniki przedyskutowane.

Szczegółowa ocena pracy

Autorka w celu realizacji projektu zdecydowała się zastosować model komórkowy DMD oparty o wyprowadzone linie hiPSCs (pacjenta z DMD oraz 2 zdrowych), izogeniczne kontrole oraz *in vitro* różnicowane linie kardiomiocytów oparte o wyprowadzone hiPSCs.

Cele projektu, które sformułowała Autorka były następujące: 1/-wyprowadzenie niezbędnych linii komórkowych oraz uzyskanie zróżnicowanych *in vitro* kardiomiocytów; 2/-ocena globalnych zmian w poziomie transkrypcji, analizowanych metodą RNAseq, pomiędzy liniami komórkowymi kontrolnymi i liniami DMD oraz analiza porównawcza proteomu w tych liniach; 3/-weryfikacja wybranych mechanizmów molekularnych i szlaków sygnalizacyjnych wytypowanych z globalnych analiz proteomu i transkryptomu w wybranych liniach komórkowych; 4/-ocena porównawcza parametrów elektrofizjologicznych i mechanicznych wybranej linii kardiomiocytów; 5/-ocena potencjalnej roli utrofiny w kardiomiocytach DMD jako potencjalnego czynnika terapeutycznego w oparciu o nadekspresję i usunięcie genu utrofiny i pomiary własności elektrofizjologicznych.

W trakcie realizacji pracy Autorka, w oparciu o wytworzony model linii komórkowych i różnicowanie *in vitro* do kardiomiocytów, wykazała, że w zależności od zastosowanych metod obróbki wstępnej statystycznej (m.in tzw „batch effect removal” oraz PCA-Principal Component Analysis-analiza głównych składowych) uzyskanych danych z analizy RNAseq, istotnej statystycznie zmianie ulega 9 lub 80 genów pomiędzy kardiomiocytami kontrolnymi (CTRL-zdrowi dawcy) a komórkami CTRL z usuniętym genem dystrofiny. W kontekście tego eksperymentu nasuwa się pytanie do Autorki dlaczego nie przeanalizowano linii



komórkowych uzyskanych od pacjenta z DMD uzyskanych z linii DMB03 w tym i kolejnych eksperymentach?

W kolejnej serii eksperymentów Autorka przeprowadziła analizę porównawczą proteomu kardiomiocytów pomiędzy dwoma klonami każdej z kontroli (DMB01-CM1/2, DMB02-CM1/2) a klonami z usuniętym genem dystrofiny. W analizie porównawczej proteomu kontrolnych hPSCs oraz odpowiednich linii kardiomiocytów (Fig 17b) zastanawia mnie nieobecność, na wysokim poziomie, na wykresie podstawowych markerów różnicowania (z wyjątkiem MYH7) poczynając od komórek progenitorowych (np. któregoś z: GATA4, TBX5, ISL, MEF2C, NKX2.5) przez niedojrzałe kardiomiocyty (np. CTNT podczas gdy MYH7 jest wykrywany) a skończywszy na dojrzałych kardiomiocytach (np.:CTNT, MLC2a/v, SCN5A, CACNA, IRX4). Czy reprezentanci tych markerów występują w proteomie w liniach CM? A jeśli tak to w jakiej relacji do kontroli hPSCs? Porównanie proteomu kardiomiocytów kontrolnych oraz DMD wykazało, że 45 białek ma istotnie statystycznie zmieniony poziom. W kolejnej analizie Autorka dokonuje oceny porównawczej danych transkryptomicznych z danymi proteomicznymi (Ryc 18) podając wartości 2044 oraz 1840 jako zmienione w tym samym lub przeciwnym kierunku. W związku z tym mam pytanie do Autorki jak uzyskano te dane (jaki sposób liczenia i parametry zmiany założono w kalkulacji) jeśli istotnie statystycznie zmiany w transkryptomie zdefiniowano jako 50 genów i 30 genów (w górę i w dół odpowiednio), a w analizie proteomu zmiany istotne statystycznie dotyczyły 45 białek?

Na podstawie analiz bioinformatycznych danych z transkryptomu i proteomu Autorka umiejętnie typuje potencjalne szlaki metaboliczne i molekularne oraz kluczowe białka odpowiedzialne za potencjalne zmiany fenotypowe takie jak metabolizm wapnia, stres oksydacyjny czy dysfunkcje fizjologiczne serca. Autorka demonstruje podwyższony poziom białka mitoNEET w mitochondriach i cytoplazmie linii kardiomiocytów DMD. (Ryc.19). Autorka w sposób przemyślany formułuje i udowadnia hipotezę o indukcji stresu oksydacyjnego związanego z metabolizmem żelaza na podstawie danych o podwyższonym poziomie ferrytyny



oraz obniżonym poziomie ferroportyny co z kolei prowadzi Autorkę do hipotezy o podwyższonym poziomie ROS zweryfikowanej pozytywnie. Następnie udowadnia powiązanie wysokiego poziomu ROS z podwyższonym poziomem Nrf-2 i oksydoreduktazy NAD(P)H chinonowej¹. Uzyskane dane wskazują na podobne szlaki molekularne pomiędzy kardiomiocytami DMD oraz mioblastami DMD, wcześniej wykazane już w zespole prof. Dulaka dla miotubul.

Do oceny zaburzeń metabolizmu wapnia Autorka stosuje pomiary oscylacji wapniowych, stwierdzając ich zaburzenie oraz techniki patch-clamp które wykazały podwyższoną hiperpolaryzację następczą oraz obniżony czas trwania potencjału czynnościowego (Ryc. 23-25). W związku z tymi eksperymentami mam kolejne pytanie do Autorki o przyczyny wybrania wyłącznie linii DMB01 do analiz przedstawionych w Ryc. 24a-d skoro z danych przedstawionych w Ryc.20a wynika, że w tej linii zmianie ulega jedynie transkrypt dla genu FTH1?

Bardzo ciekawe i istotne naukowo dane Autorka przedstawiła w eksperymencie nad rolą utrofiny w polepszeniu funkcji fizjologicznych kardiomiocytów DMD, wskazując na polepszenie wartości hiperpolaryzacji następczej po nadekspresji utrofiny.

W mojej ocenie największym osiągnięciem Autorki w ramach projektu doktorskiego jest przeprowadzenie całej grupy eksperymentów dotyczących wyprowadzenia 3 linii hiPSCs, uzyskanie izogenicznych linii kontrolnych oraz analiza porównawcza linii pod względem proteomu i transkryptomu. Drugie w kolejności osiągnięcie pod względem wartości naukowej to umiejętne wyciągnięcie z danych transkryptomicznych i proteomicznych kluczowych informacji które pozwoliły na identyfikację metabolizmu żelaza jako kluczowego dla rozwoju fenotypu DMD w kierunku podwyższonego poziomu ROS, powiązania ze stresem oksydacyjnym (link do podobnego mechanizmu w mioblastach DMD) i dysfunkcji mitochondriów. Ciekawym wynikiem jest też wykazanie wzrostu sztywności błony plazmatycznej kardiomiocytów DMD.

Chciałbym podkreślić, że wszystkie wykonane eksperymenty zostały bardzo starannie zaplanowane, zastosowano bardzo wiele zaawansowanych



technik eksperymentalnych i analiz, a uzyskane wyniki poddano skrupulatnej i rzeczowej analizie. Moje szczególne uznanie budzą umiejętności Autorki i swoboda zastosowania technik związanych z hiPSCs i różnicowaniem *in vitro* które wymagają szczególnej ostrożności i uwagi oraz perfekcyjnego opanowania technik komórkowych. Nie wspominając o konieczności wykonywania bardzo wielu analiz kontrolnych i żmudnych procedur. Wysoko również oceniam wysoką sprawność manualną, dużą wiedzę i doświadczenie w pozostałych zastosowanych technikach laboratoryjnych.

Wysoko oceniam intelekt, wiedzę i umiejętność krytycznej analizy danych oraz dyskusji uzyskanych wyników jakie Autorka zaprezentowała w Dyskusji. Z obowiązku Recenzenta mam jedynie w tej części uwagę, że nie do końca zgadzam się z Autorką co do hipotezy dotyczącej zmienności/odchyleń danych z różnych linii/klonów kardiomiocytów (str 106 góra), zdefiniowania heterogenności danych z analiz globalnych jako tzw. „batch effect” czyli przypisanie tej zmienności wyłącznie czynnikom nie biologicznym (technicznym) oraz podanej interpretacji uzasadnienia eliminacji niektórych wyników za pomocą metody PCA. Byłbym wdzięczny za polemikę w tych zagadnieniach.

Wypełniając swoją rolę jako „advocatus diaboli” i polemizując z niektórymi założeniami i tezami, chciałbym zwrócić uwagę na pewne elementy pracy, procedur eksperymentalnych oraz interpretacji danych które wymagają wyjaśnienia lub doprecyzowania ze strony Autorki. Zaczniemy od końca czyli uzasadnienia usunięcia niektórych próbek z analiz (np. RNAseq oraz proteom) na podstawie ‘batch effect’ (Wyniki i Dyskusja). Czy nie daleko naturalniejsza jest hipoteza o dużej zmienności różnych klonów hiPSC od tego samego dawcy? Podobnie jak duża zmienność poszczególnych klonów zróżnicowanych kardiomiocytów wynikająca choćby z różnego tempa i efektywności różnicowania kardiomiocytów w każdym z klonów i każdym różnicowaniu? Taką hipotezę potwierdza nawet wynik eksperymentu z Supp.Fig.2 (*nota bene*: dlaczego brakuje linii DMB01-CTRL?) w którym ewidentnie linie różnią się poziomem GATA4 i SMA między sobą mimo identycznych warunków hodowli. Stąd moje pytanie czy



analizowała Pani typowe markery różnicowania kardiomiocytów w zróżnicowanych komórkach a jeśli tak to jakie i czy porównywała Pani stopień zróżnicowania komórek między sobą po zakończeniu każdego kolejnego procesu różnicowania? W kwestii różnicowania hIPSC do mioblastów i miotubul generalnie panuje przekonanie, udokumentowane eksperymentalnie, (także w naszym i zaprzyjaźnionych laboratoriach) o dużej heterogenności/zmienności pomiędzy klonami z tej samej linii hIPSC czy różnicowaniu miotubul. Jak to jest w przypadku kardiomiocytów?

Nie jestem ekspertem od bioinformatyki, prosiłbym więc o szersze wytłumaczenie z zastosowania PCA do eliminacji próbek z analiz globalnych (Ryc 13-17). Z mojej ograniczonej wiedzy wynika, że tą metodę stosuje się zwykle do obniżenia komplikacji wielowymiarowych, licznych, wieloparametrowych, wielowymiarowych danych w celu dwuwymiarowej prezentacji danych. Tutaj nie do końca rozumiem wielo-parametrowość czy dużą liczbę danych. Ponadto nie udało mi się znaleźć jakie parametry lub dane stoją za pojęciami Parametr 1, Parametr 2, Pc1, Pc2 lub % na osiach wykresu PCA do uzasadnienia eliminacji 1 lub 2 próbek z dostępnych 8 próbek. Jak i dlaczego w związku z tym można interpretować PCA jako wskazanie do zdefiniowania heterogenności jako „batch efekt”? Kolejna niejasność/brak informacji w M&M dotyczy parametrów oceny statystycznej wyników RNAseq oraz analizy proteomu. Jaką konkretnie wartość zmiany przyjęto jako próg istotności statystycznej w obu analizach? W ocenie danych proteomu jaką definicję obecności białka w danej grupie komórek założono oraz jakie przyjęto parametry? Obecność peptydów we wszystkich próbkach? W większości próbek, czy wystarcza tylko obecność w jednej próbce. Jaki procent pokrycia białka wykrytymi peptydami założono jako potwierdzoną obecność danego białka? Prosiłbym o wyjaśnienie tych kwestii ponieważ nie udało mi się odszukać tych danych w M&M lub podpisach do Rycin. Prosiłbym także o



wyjaśnienie sposobu obliczenia danych liczbowych o korelacji transkryptomiki z proteomiką z Ryc.18 (2044 oraz 1840).

Wnioski końcowe

Powyższe uwagi, sugestie i tematy do dyskusji na publicznej obronie rozprawy doktorskiej, w żadnym stopniu nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy, którą cechuje logiczny ciąg przyczynowo skutkowy zaplanowanych doświadczeń, naukowa dojrzałość, imponujący warsztat badawczy oraz duża swoboda w poruszaniu się w tematyce dystrofii typu DMD oraz w hiPSC jako modelu badawczym DMD w szczególności.

W moim przekonaniu niewątpliwą zaletą przedstawionej mi rozprawy doktorskiej jest bardzo dobry, oparty na najnowocześniejszych metodach warsztat badawczy, obejmujący zaawansowane modele i techniki badawcze typowe dla współczesnych, zaawansowanych technologicznie laboratoriów biotechnologii medycznej i biologii molekularnej. Czytając rozprawę odniosłem wrażenie, że Autorka bardzo swobodnie i z dużą wiedzą oraz umiejętnościami, także manualnymi i warsztatowymi, porusza się w tematyce badawczej swojej pracy. Natomiast przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi bardzo dobry punkt wyjścia do dalszych badań na mechanizmami molekularnymi i rolą procesów molekularnych w różnicowaniu kardiomiocytów i rozwoju fenotypu chorobowego sercowego w dystrofii typu Duchenne'a.

Dlatego uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Kaliny Andrysiak 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 z późn. zm.)

Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Kaliny Andrysiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. W związku z moją wysoką oceną rozprawy doktorskiej Autorki wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne UJ, zgodnie z wymaganiami art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o



szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Kaliny Andrysiak stosowną nagrodą.

Pracownia Białek Jądrowych
KIEROWNIK
Ryszard Rzepecki
prof. dr hab. Ryszard Rzepecki

Ryszard Rzepecki

Ryszard Rzepecki, Ph.D. D.Sc.,
Professor
Laboratory of Nuclear Proteins
Faculty of Biotechnology, University of Wrocław
Street Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
www.nuclearproteins.com
ryszard.rzepecki@uwr.edu.pl
Animal Facility:
Przybyszewskiego Street 63/77
51-137 Wrocław, Poland