

Kraków 04.09.2022

Ocena rozprawy doktorskiej
„Analiza proteomiczna i metabolomiczna procesów indukcji
pluripotencji w mioblastach oraz różnicowania indukowanych
komórek macierzystych w kierunku komórek kardialnych”

autorstwa mgr Marty Nolka-Szaszner

z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

przygotowanej pod opieką

promotorów:

prof. dr hab. Macieja Kurpisa

i dr hab. Magdaleny Łuczak, prof. ICHB PAN



Uniwersytet Jagielloński

Magiczne słowo *omika* pojawiło się w latach 80. jako wytwór wyobraźni i niezwykłej kreatywności trzech naukowców z dziedziny genetyki: dr Thomasa H. Rodericka, dr Franka Ruddle i dr Victora McKusick w 1986 roku. Podczas międzynarodowego spotkania w Bethesda (1986) na temat wykonalności mapowania całego ludzkiego genomu, „założyli” nowe czasopismo pod nazwą *Genomics* poświęcone badaniom genomu. Wynalezienie nowego słowa przez T.H. Roderick był początkiem tej (słowo)twórczo-naukowej działalności, która niczym strumień życiodajnej wody rozlała się na wszystkie specjalności biologii molekularnej, dając plony w postaci wszelkiego rodzaju *omicznych* owoców. W ślad za genomiką słowo *proteomika* zostało po raz pierwszy zaproponowane znacznie później przez Marca Wilkinsa w 1995 roku, aby opisać różnorodność białek tworzących cały organizm. Słowo *metabolomika* to także typowy przykład neologizmu odwołującego się do trendu w badaniach molekularnych.

Rozwój technik biologii molekularnej, także tych wywodzących się z chemii i fizyki, takich jak spektrometria mas, sekwencjonowanie molekularne i techniki chromatograficzne, przyczynił się do powstania wielu zbiorów (bibliotek) danych zawierających cechy ilościowe i jakościowe, jako wyniki eksperymentów prowadzonych na dużą skalę, w tym *genomiki*, *proteomiki* i *metabolomiki*. Taka wielomodalna analiza molekularna komórek i systemów komórkowych stwarza konieczność wprowadzenia systemowego podejścia do porównania wyników eksperymentów za pomocą nadzorowanych lub nienadzorowanych algorytmów eksploracji danych. Takie podejście pozwala na wyodrębnienie danych

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

Kraków 04.09.2022

i efektywną analizę wieloparametrowych zbiorów danych w celu uzyskania maksymalnej informacji o molekularnych fenotypach komórek.

Badanie fenotypu (*proteomu* i *metabolomu*) indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych to nie lada wyzwanie, nie tylko z powodu skomplikowanej metodologii, ale przede wszystkim wynikające z potrzeby poznania tego skomplikowanego systemu dla rozwoju medycyny regeneracyjnej. Badania kliniczne z wykorzystaniem progenitorowych (w tym indukowanych) komórek serca wykazały ich wykonalność i bezpieczeństwo, ale nie wykazały wyraźnych korzyści funkcjonalnych. W związku z tym konieczne jest głębsze zrozumienie biologii i metabolizmu iPS, aby opracować strategie zwiększenia ich potencjału terapeutycznego.

Praca doktorska wykonana przez panią mgr Martę Nolka-Szaszner pod kierunkiem promotorów prof. Macieja Kurpisa i Magdaleny Łuczak, prof. ICHB PAN zatytułowana „*Analiza proteomiczna i metabolomiczna procesów indukcji pluripotencji w mioblastach oraz różnicowania indukowanych komórek macierzystych w kierunku komórek kardialnych*” wpisuje się tematycznie i metodologicznie w te współczesne trendy molekularnej biologii, medycyny regeneracyjnej a także bioinformatyki.

Przedstawiona mi do recenzji praca opisuje badania na poziomie proteomicznym i metabolomicznym zmian zachodzących w trakcie indukcji pluripotencji w mioblastach ludzkich, jak również w trakcie późniejszego różnicowania uzyskanych komórek iPS w kierunku komórek o charakterze kardialnym. W pracy Doktorantka oceniła również zmiany zachodzące w proteomie i metabolomie serca po podaniu tak uzyskanych komórek kardialnych do myszy, u których wcześniej wywołano zawał przez podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej.

Uzyskane z wykorzystaniem metod spektrometrii mas wyniki przeanalizowano przy użyciu bioinformatycznych analiz funkcjonalnych w celu wskazania procesów metabolicznych i szlaków/ścieżek sygnałowych zmieniających się podczas kolejnych procesów odróżnicowywania i różnicowania. Badania zostały uzupełnione poprzez analizy kariotypu, barwienia



Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

Kraków 04.09.2022

immunofluorescencyjne, western blot, analizy RT-PCR genów oraz ocenę morfologiczną komórek wykonaną przy użyciu mikroskopu świetlnego.

Rozprawa doktorska p. mgr Marty Nolka-Szaszner jest bardzo obszerna, zarówno pod względem objętości (139 stron bez literatury) jak i treści. Układ pracy jest wzorcowy, przejrzysty, logiczny i pełny. Obszerny wstęp, który składa się z 8 podrozdziałów, już sam w sobie jest dziełem spójnym i dobrze napisanym. Bardzo dobrze napisanym pod względem językowym, opartym o najnowsze informacje z literatury oraz, co sprawia, że rozprawa doktorska może być czytana przez specjalistów z dyscyplin innych niż nauki medyczne, podstawowe informacje na temat patofizjologii zawału, metod leczenia i monitorowania. Przez ten „wywód” Doktorantka płynnie dochodzi do miejsca, w którym wprowadza czytelnika do miejsca skąd zrodziła się idea zastosowania komórek macierzystych do leczenia wad i chorób serca, w tym niewydolności pozawałowej. W części tej Doktorantka poświęciła też wiele uwagi biologii i charakterystyce komórek macierzystych, metod ich pozyskiwania (iPS) oraz wykorzystaniu ich leczeniu. Druga część wstępu poświęcona jest opisowi metod spektralnych i technik chromatograficznych i ich wykorzystaniu w badaniach proteomicznych. Jest to obszerne kompendium metodologiczne napisane prostym językiem, co jest zdecydowanie zaletą pracy doktorskiej. Pod koniec wstępu Doktorantka zwięźle uzasadniła wykorzystanie metod analizy funkcjonalnych w proteomice i metabolomice do poszukiwania interesujących różnic między próbami eksperymentalnymi.

Cel pracy doktorskiej p. mgr Marty Nolka-Szaszner to charakterystyka proteomiczna i metabolomiczna zmian zachodzących w trakcie odróżnicowywania mioblastów do indukowanych komórek pluripotentnych oraz późniejszego ich różnicowania w kierunku komórek o charakterze kardialnym. Cel ten jest wyjątkowo ambitny i wymagający rozbudowanej metodyki badawczej, także pod względem zaplanowanego protokołu badawczego. Realizacja takiego celu wymagała zrealizowania pośrednich celów takich jak:

1. pobranie i odróżnicowanie mioblastów ludzkich, poprzez transfekcje dwoma różnymi wektorami na bazie wirusa Sendai (Cyto-Tune-iPS) i wektora lentiwirusowego (EF1a-STEMCCA);
2. różnicowanie uzyskanych komórek iPS do



Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

Kraków 04.09.2022

komórek sercowych; 3. podanie uzyskanych komórek do serca myszy z indukowanym zawałem przez podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej; 4. wykonanie analiz proteomicznych i metabolomicznych na każdym etapie eksperymentu.



Uniwersytet Jagielloński

Moje uznanie dla Doktorantki wzbudza rozbudowana i skomplikowana metodyka badawcza, poczynszy od optymalizacji protokołów hodowli komórkowych, po opracowanie metodologii różnicowania komórek iPS. Ponadto doświadczenia na zwierzętach wymagały opanowania techniki indukowania zawału, wszczepienia przygotowanych komórek, a same zwierzęta w liczbie 25 sztuk, były kontrolowane (4 razy wykonywano badanie ECHO) i utrzymywano je przez 102 do pobrania materiału. Po tak skomplikowanym protokole badawczym Doktorantka wykonywał izolację materiału do oznaczeń proteomicznych i metabolomicznych.

Omówienie wyników

Indukowane komórki macierzyste (iPS) w kierunku komórek serca oraz pluripotencjalne komórki mioblastyczne to temat bardzo interesujący i dający badaczowi wiele możliwości na przeprowadzenie oryginalnych badań i dokonanie ważnych odkryć. Niewątpliwie najważniejszym osiągnięciem w pracy doktorskiej p. mgr Marty Nolka-Szaszner jest pokazanie, na podstawie wyników analiz proteomicznych i metabolomicznych, że proces odróżnicowania mioblastów w kierunku komórek pluripotencjalnych jest co najmniej dwuetapowy. W pierwszym tygodniu po transfekcji, bez względu jaki system zastosowano, obserwowane były zmiany w profilu białek powiązanych z zaburzeniami mitochondrialnymi i nasileniem fosforylacji oksydacyjnej. Doktorantka zaobserwowała różnice w obecności 31 białek różnicujących komórki reprogramowane obiema metodami, w tym istotne różnice dotyczące aktywacji białek związanych z infekcją wirusową oraz replikacją wirusa w komórkach reprogramowanych za pomocą metody *STEMCCA*. To zadecydowało o wyborze modelu badawczego. Ostatecznie do wyprowadzenia stabilnej linii komórek iPS Doktorantka użyła komórek odróżnicowanych wektorem *SEND1*. Po 7. dniu od odróżnicowywania komórek w kierunku iPS, Doktorantka zaobserwowała zmiany dotycząc głównie białek zaangażowanych w sygnalizację

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

Kraków 04.09.2022

eukariotycznego czynnika inicjującego *EIF2*, ścieżkę *mTOR*, a także tych uczestniczących w *splicingu* (str.87, 91). Bardzo intrygujące dla mnie, jako recenzenta, jest uzyskanie wyników wskazujących na złożony profil białkowy komórek iPS i wykazanie podobieństwa proteomicznego tych komórek do proteomu charakterystycznego dla różnych rodzajów miopatii i zaburzeń nerwowomięśniowych (str. 72-73). Obserwacja zmian metabolomu w pierwszych 7. dniach reprogramowania pokazała bardzo ważne zjawisko: poziom akumulacji kwasu glutaminowego w odróżnicowanych mioblastach spadał w stosunku do pierwotnych, który wyrównywał się w komórkach iPS (str. 94). Również interesującym wynikiem umieszczony w pracy jest wykazanie zmian ilościowych (spadek akumulacji i ekspresji) białka (*HMOX1*) *oksygenazy hemowej 1*, w trakcie procesu odróżnicowania mioblastów do komórek iPS oraz w czasie różnicowania iPS w kierunku komórek o charakterze kardialnym, co pokazano także za pomocą techniki western blot (str. 117-118).

Kolejnym niewątpliwie istotnym wkładem w rozwój wiedzy na temat różnicowania iPS w kierunku komórek serca jest szczegółowy opis zmian metabolomicznych, na różnych etapach różnicowania oraz w procesach naprawczych *in vivo* (model myszy SCID z indukowanym zawałem). Doktorantka w swych badaniach pokazała zmiany w akumulacji białek zaangażowanych w procesy degradacji i naprawy białek (białka związane z *ubikwitynacją*, białko *BAG*), sygnalizacją szlaku sygnałowego *sirtuiny*, oraz zmiany poziomu białek związanych z pracą i budową serca: sygnalizacją wapniową, sygnalizacją połączeń przylegających czy przebudową połączeń przylegających, oddziaływania z białkami macierzy ECM (sygnalizacja *integrzyn* i kinaz sprzężonych z integrzynami), sygnalizacja *paksyliny* i związana z cytoszkieletem aktynowym (str. 120-121). Wykonana przez doktorantkę porównawcza analiza metabolomiczna tkanki serca umożliwiła identyfikację 3 związków różnicujących: podwyższony poziom *kwasu deoksycholowego* i obniżony poziom akumulacji *glicerolu* i *kwasu mlekowego*, co wskazuje aktywację szlaków usprawniających prawidłowy metabolizm serca (str. 124).

Doktorantka udowodniła w swej pracy, że biegle posługuje się technikami zarówno inżynierii genetycznej jak i spektrometrii mas, co nie jest oczywiste, i



Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40

tel. bezp. 12 664 47 62

ul. Łojasiewicza 11

30-348 Kraków

świadczy o wysokiej interdyscyplinarności jej badań zaprezentowanych w pracy doktorskiej.



Uniwersytet Jagielloński

Swoje wyniki Doktorantka dyskutuje, wskazując na swych obserwacji z obserwacji z założoną hipotezą badawczą. Swoje wartościowe spostrzeżenia i komentarze zawarła na ponad 10 stronach w dyskusji. Znajduje się w niej wiele uwag uzasadniających metodykę pracy, jak wybór pożywek do hodowli, wektorów do odróżnicowania mioblastów, ocena charakterystyki biologicznej komórek. Jest to rzetelnie i krytycznie napisana część dyskusji. Dalej następuje to co najciekawsze, czyli dyskusja otrzymanych wyników zmian w proteomie i metabolomie. Tutaj doktorantka wykazała się umiejętnością wnioskowania i rozeznaniem w literaturze dotyczącej podobnej tematyki. Ponieważ podjęte przez Doktorantkę badania są pionierskie a literatura dotycząca zmian w metabolomie komórek kardialnych stosowanych w terapii jest uboga, Doktorantka niejednokrotnie musiała wykazać się samodzielnością w ocenie swych badań.

Moje uwagi szczegółowe dotyczą wyjaśnień prezentowanych wyników:

1. Rys. 9. pokazuje graficznie poziom „akumulacji znormalizowanej” białka *desminy* w mioblastach i komórkach iPS. Z przedstawionej metodyki nie jest jasne na czym polega normalizacja, co stanowi poziom podstawowy akumulacji i w jaki sposób została wyrażona niepewność statystyczna. Podobny sposób prezentacji wyników zastosowano na innych wykresach, w których przedstawiono wartości „akumulacji względnej” (Rys. 19, 35, 49). Doktorantka nie wyjaśniła w swej pracy czym różni się „akumulacja znormalizowana” (Rys. 9, 30, 33, 39, 42, 48) od względnej.
2. Wyjaśnienia wymaga co reprezentują punkty na składowych głównych poszczególnych wykresów (Rys. 12, 27, 41 i kolejne).

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
M. M. Smoluchowskiego

Zakład Fizyki Medycznej

W dyskusji brakuje mi:

3. Interpretacji zmian w ekspresji białka HMOX1, pokazanej w procesie odróżnicowywania.

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

Kraków 04.09.2022

4. Głębszej interpretacji zmian metabolizmu *glutationu* i inozytolu w procesach różnicowania i regeneracji komórek kardialnych.
5. Uwagi językowe. Doktorantka nie uniknęła stosowania makaronizmów, np. *wialka* (str. 47), *eluowano* (str. 49, 61) i zdarzyły się błędy fleksyjne. *komponent* (r.m.) zamiast komponenta (r. ż.)



Uniwersytet Jagielloński

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska p. mgr Marty Nolka-Szaszner jest naukowym dziełem o wybitnej wartości naukowej i walorach poznawczych dla badań nad mechanizmami różnicowania i odróżnicowania komórek kardialnych. Praca ta nie tylko rozszerza i ugruntowuje stan wiedzy na temat biologii mioblastów i komórek iPS w sercu, ale także stanowi przykład rzetelnego badania naukowego, dotyczącego pionierskiej tematyki zmian metabolicznych zachodzących w procesach odróżnicowywania i różnicowania komórek w sercu. Ponadto Doktorantka stawia w swej pracy odważne hipotezy, które dyskutuje w oparciu o doskonale dobrane piśmiennictwo.

Wniosuję zatem do Rady Naukowej IChB PAN o nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie nauki biologicznej dla p. mgr Marty Nolka-Szaszner, zgodnie z obowiązującymi przepisami ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” oraz rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Prof. n. med.

Ewa Łucja Stępień

Kierownik Zakładu

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

Wniosuję również do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej p. mgr Marty Nolka-Szaszner, zgodnie z Regulaminem działania Komisji ds. przewodów doktorskich Rady Naukowej IChB PAN, co uzasadniam walorami wybitnymi naukowymi pracy: badania wykonano na unikalnym modelu badawczym, którego samo opracowanie stanowi ważny wkład do dyscypliny, pionierska tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę, uzyskanie opracowanie wyników, które stanowią materiał do kontynuacji tematyki badawczej, wyróżniający sposób ujęcia wyników w dysertacji.

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