

Prof. dr hab. Jacek Jaworski
Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Cambridge, 26 luty 2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Jacka Stępniewskiego, pt. „Nowe mechanizmy otrzymywania oraz różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych: wpływ ścieżki Nrf2/HO-1 oraz cukrzycy”

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana magistra Jacka Stępniewskiego opisuje wyniki badań mających na celu określenie wpływu ścieżki Nrf2/HO-1 (hemoksygenaza 1), będącej główną składową odpowiedzi komórki na stres, na zdolność indukowanego przeprogramowania komórek somatycznych do komórek pluripotencjalnych. Dodatkowymi celami rozprawy były (i) sprawdzenie czy HO-1 i Nrf2 są konieczne dla różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych do wybranych typów komórek oraz (ii) uzyskanie komórek pluripotencjalnych, które umożliwiłyby modelowanie różnych typów cukrzycy. W konsekwencji, przeprowadzone przez Doktoranta badania wykazały potencjalną rolę badanych białek, szczególnie Nrf2, w procesie reprogramowania oraz określić mechanizmy regulujące komórkowy poziom/dystrybucję tych białek w trakcie tego procesu. Ponadto, Doktorant udowodnił, iż hemoksygenaza 1 jest konieczna dla prawidłowego różnicowania uzyskanych pluripotencjalnych komórek macierzystych do kardiomiocytów i mioblastów. W końcu pan mgr Stępniewski otrzymał pluripotencjalne komórki macierzyste, które w przyszłości umożliwią modelowanie różnych typów cukrzycy. Przedstawione wyniki w mojej ocenie mają duże znaczenie poznawcze i prawdopodobnie również praktyczne, ponieważ wpisują się w nurt bardzo aktualnych badań mających na celu poszukiwanie ścieżek sygnałowych, których modulacja przy użyciu związków drobnocząsteczkowych może przyczynić się do zwiększenia wydajności procesu przeprogramowania komórek. Opracowanie tego typu związków jest absolutnie kluczowe dla dalszego postępu w standaryzacji produkcji komórek iPS na potrzeby biotechnologii medycznej. Ponadto, przedstawione badania wpisują się w drugi bardzo ważny nurt badań z wykorzystaniem komórek iPS, czyli opracowanie nowych modeli chorób dotyczących narządy trudno dostępne w oparciu o łatwo dostępne komórki pacjentów.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 145 stron maszynopisu ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawę rozpoczynają wykaz skrótów oraz wyczerpujące streszczenia w językach polskim i angielskim. Po nich następuje obszerny, liczący 35 strony Wstęp teoretyczny, zawierający 3 główne podrozdziały, które w sposób dogłębny wprowadzają czytelnika w zakres badań

opisanych w rozprawie. Po Wstępie, Doktorant zamieścił jasno sformułowane cele rozprawy a następnie opis materiałów i metod, podzielony na 29 podrozdziałów (25 stron). Wyniki, liczące 33 strony podzielone zostały na 3 główne części tematyczne dotyczące: optymalizacji metod wykorzystywanych w reprogramowaniu komórek somatycznych (część I), reprogramowania mysich fibroblastów i roli białek HO-1 i Nrf2 w tym procesie (część II) oraz modelowaniu cukrzycy przy użyciu komórek iPSC (część III). Następująca po tym rozdziale osiemnastostronicowa Dyskusja omawia wybrane najważniejsze problemy naukowe rozprawy. Praca doktorska pana mgr Stępniewskiego kończy się syntetycznymi wnioskami i bibliografią.

Ocena merytoryczna

Wstęp ocenianej rozprawy jest bardzo obszerny. Omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia zarówno celów rozprawy jak i logiki wykonywanych doświadczeń. Pierwszy podrozdział Wstępu dotyczy metod wykorzystywanych do przeprogramowywania komórek somatycznych ze szczególnym uwzględnieniem zdefiniowanych czynników transkrypcyjnych w tym procesie. Druga część Wstępu koncentruje się roli HO-1 i Nrf2, będących przedmiotem rozprawy, w odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny. W końcu ostatnia 3 część wraca do tematyki komórek iPSC i opisuje wykorzystanie tych komórek do modelowania chorób i poszukiwania nowych leków. Dodatkowo w tym podrozdziale Doktorant odniósł się do wykorzystania komórek iPSC w badaniach nad embriogenezą i w medycynie regeneracyjnej. Lektura Wstępu nie pozostawia wątpliwości co do rozległej wiedzy Doktoranta. Natomiast mam uwagi krytyczne co do organizacji samego tekstu i zawartości podrozdziału 1.1.1 w kontekście jego tytułu. Jeśli chodzi o pierwszą kwestię to pomimo tego, że sam tekst jest bardzo dobrze napisany i zawarte są w nim właściwe i potrzebne informacje to bardzo przeszkadzał mi brak podziału bardzo dużych rozdziałów na mniejsze podrozdziały. Uniemożliwiło to szybkie odnalezienie treści potrzebnych do zrozumienia dalszych części doktoratu lub krytycznej lektury dyskusji. Dodatkowo w przypadku pierwszego podrozdziału zatytułowanego "Reprogramowanie komórek somatycznych za pomocą zdefiniowanych czynników transkrypcyjnych", spowodowało to, iż jego zawartość tylko częściowo koresponduje z tytułem. Przykładowo, w podrozdziale tym oprócz opisu użycia zdefiniowanych czynników transkrypcyjnych w procesie reprogramowania jest jeszcze mowa o: zjawisku interferencji RNA ogólnie, mikroRNA, substancjach drobnocząsteczkowych wspomagających przeprogramowanie i umożliwiających zastąpienie zdefiniowanych czynników transkrypcyjnych. Moim zdaniem przemyślany podział na podrozdziały znacząco poprawiłby przystępność tej części rozprawy doktorskiej pana mgr Stępniewskiego.

Cele rozprawy. Doktorant sformułował 2 główne cele rozprawy. Pierwszym było zbadanie roli HO-1 i Nrf2 w procesie otrzymywania i różnicowania iPSC. Drugim celem z kolei było wykorzystanie komórek iPSC do modelowania chorób, w których obserwowane były zaburzenia ekspresji lub funkcjonowania HO-1. W celu osiągnięcia celów głównych doktorant zaproponował 5 celów szczegółowych. W tym scharakteryzowanie komórek wyjściowych pozbawionych HO-1 i Nrf2, i ocenienie ich zdolności do reprogramowania jak również analizę otrzymanych komórek pluripotencjalnych i ich potencjału do różnicowania. Dodatkowym celem było określenie wpływu związków drobnocząsteczkowych na poziom ekspresji hemoksygenazy 1. Dwa ostatnie zadania szczegółowe skupiały się na otrzymaniu i charakterystyce komórek iPSC związanych z cukrzycą. W mojej opinii cele rozprawy zostały sformułowane prawidłowo, logicznie i adekwatnie do zawartości rozprawy.

Materiały i Metody. Wszystkie metody niezbędne do realizacji założonych celów zostały w mojej ocenie prawidłowo dobrane i opisane w sposób wystarczający do powtórzenia wykonanych procedur przez osoby dysponujące odpowiednim doświadczeniem i umiejętnościami. Na szczególne podkreślenie oraz pochwałę zasługuje zakres metod wypracowanych przez doktoranta w celu reprogramowania komórek somatycznych do iPSC, różnicowania iPSC oraz przeprowadzenie pełnej charakterystyki uzyskanych komórek. W tym kontekście zaimponowały mi metody niestandardowe opisane w niniejszej rozprawie, m.in. różnicowanie komórek iPSC do śródbłonka. Inną unikatową cechą warsztatu wykorzystanego w przedstawionych mi do oceny badaniach był szeroki wachlarz zwierząt modyfikowanych genetycznie, co bardzo wyróżnia pracę doktorską pana mgr Stępniewskiego na tle prac wykonywanych w naszym kraju. Moje jedyne zastrzeżenie w przypadku Materiałów i Metod budzi nadmiernie rozbudowana tabela, w której zebrano wszystkie odczynniki wykorzystane w rozprawie. Po pierwsze tabela ta jest zbyt skomplikowana i dość ciężko się jest w niej zorientować. Zwłaszcza, że czasem czytelnik, o ile nie jest dobrze wprowadzony w tematykę, może nie wiedzieć z czym ma do czynienia. Dobrym przykładem jest wymienienie w tej tabeli tylko nazw plazmidów, bez dodatkowego opisu, pośród innych materiałów i odczynników wykorzystanych w bardzo obszernej kategorii "Transfekcja, Testy aktywności, Izolacja i pomiar białka". Co ciekawe, na stronie 78 umieszczono je jeszcze raz w osobnej tabeli, tym razem już z odpowiednim opisem. Podobnie, plazmidy wykorzystywane do produkcji wektorów wirusowych umieszczono zarówno w tabeli głównej jak i w osobnej Tabeli (str. 61). Moim zdaniem wprowadza to nie potrzebne zamieszanie. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę Doktoranta, że naczynia hodowlane, filtry, szczepy myszy oraz linie komórkowe ciężko w moim przekonaniu zaliczyć do odczynników a pomimo to znalazły się w omawianej tabeli.

Wyniki. Pierwsza, bardzo krótka część wyników dotyczy bardzo ograniczonej optymalizacji metod używanych przez Doktoranta w dalszej pracy do uzyskania komórek iPSC. W efekcie opracowano metody izolacji i hodowli fibroblastów mysich zarówno w celu uzyskania warstwy komórek odżywczych jak i materiału do procedury reprogramowania. Ponadto, doktorant wykazał, iż jest w sposób efektywny produkować wektory lentiwirusowe i transdukować nimi komórki docelowe. W tej części nie do końca było dla mnie zrozumiałe w jakim celu zamieszczono wyniki eksperymentów polegających na transdukcji komórek MSC oraz komórek szpiku kostnego wektorem kodującym GFP. W moim przekonaniu nie były to doświadczenia konieczne do osiągnięcia wyznaczonych celów a Doktorant nie podał żadnego uzasadnienia. Część druga Wyników jest poświęcona badaniu roli HO-1 i Nrf2 w procesie przeprogramowania fibroblastów do komórek iPSC i ich dalszego różnicowania do wybranych typów komórek (kardiomiocytów i mioblastów). W pierwszej kolejności Doktorant scharakteryzował wyjściową populację fibroblastów pochodzącą z myszy pozbawionych HO-1 (*Hmox*^{-/-}) i ocenił ich zdolność do przejścia w stan pluripotencji pod wpływem czynników OKSM. W efekcie pan mgr Stępniewski wykazał, iż istnieją istotne różnice w poziomie miRNA-34a oraz białka 14-3-3σ myszy kontrolnych i *Hmox*^{-/-}. Ponadto, na podstawie wyniku przedstawionego na ryc. 7-4D, Autor stwierdził, że w komórkach pozbawionych białka HO-1 zaobserwował wyższy poziom p53. O ile dwa pierwsze wyniki nie budzą specjalnych wątpliwości o tyle to ostatnie stwierdzenie w moim przekonaniu jest nieuprawnione, ponieważ jakoś przedstawionych blotów jest fatalna i moim zdaniem wyklucza wszelkie analizy. Najciekawszym i moim zdaniem najważniejszym wynikiem

części poświęconej roli hemoksygenazy1 w przeprogramowywaniu komórek jest obserwacja, iż podanie związku CoPP, potencjalnie zwiększającego aktywność HO-1, znacząco podnosi wydajność procesu reprogramowania fibroblastów do komórek iPSC. Ta obserwacja w moim przekonaniu może mieć ważne implikacje praktyczne jako, że wciąż poszukiwane są związki drobnocząsteczkowe wspomagające proces przeprogramowania. Natomiast nie wydaje mi się aby Doktorant bezspornie wykazał, iż HO-1 jest konieczne dla procesu przeprogramowania lub że CoPP działa za pośrednictwem HO-1. Pomimo, iż Doktorant stwierdza na stronie 85, że przeprowadzone analizy pozwoliły zaobserwować zmniejszoną wydajność reprogramowania w przypadku fibroblastów *Hmox*^{-/-} to dane przedstawione na rycinie 7-6A nie do końca wspierają to stwierdzenie, gdyż liczba kolonii iPSC chociaż rzeczywiście jest nieco niższa to różnica ta nie jest istotna statystycznie. Dodatkowo zabrakło mi eksperymentu, w którym CoPP dodano by do fibroblastów *Hmox*^{-/-} w trakcie przeprogramowania. Tylko w przypadku gdyby nie zaobserwowano pozytywnego efektu CoPP można by twierdzić, iż związek ten działał poprzez HO-1. Sama obserwacja, że zwiększa on w fibroblastach ekspresję HO-1 jest tylko poszlaką a nie dowodem na udział HO-1 w procesie przeprogramowania fibroblastów. W dalszej części Wyników poświęconych potencjalnej roli HO-1 w reprogramowaniu fibroblastów Doktorant skoncentrował się na wpływie innych, znanych związków drobnocząsteczkowych, wspomagających reprogramowanie, na poziom ekspresji HO-1. Spośród nich największym zaskoczeniem okazał się kwas walproinowy. Pomimo, iż wiele grup wskazuje na to, iż związek ten wspomaga reprogramowanie, obniżał on poziom HO-1 w fibroblastach. Co więcej, w przypadku doświadczeń przeprowadzonych przez Doktoranta kwas walproinowy wpływał negatywnie na liczbę koloni iPSC. Jednak podobnie jak w przypadku badań nad CoPP Doktorant nie przeprowadził eksperymentów z użyciem kwasu walproinowego w trakcie przeprogramowania komórek pozbawionych HO-1. W związku z tym, w moim przekonaniu w niniejszej rozprawie, ostatecznie nie wykazano w sposób funkcjonalny związku pomiędzy efektem kwasu walproinowego na wydajność przeprogramowania komórek i jego efektem na poziom białka HO-1 w komórkach. W omawianej części rozprawy doktorskiej sporo eksperymentów poświęcono również próbie określenia jak kwas walproinowy może wpływać na poziom białka HO-1 w komórce, w tym na potencjalną regulację transkrypcyjną kodującego go genu (ryc. 7-9, 7-10). Zastanawia mnie jaka była przesłanka stojąca za tą analizą skoro na rycinie 7-8E Doktorant nie wykazał wpływu kwasu walproinowego na poziom mRNA HO-1 w fibroblastach. Wydaje mi się, że dużo ciekawsze w tym kontekście są wyniki, które przedstawiono na ryc. 7-11 dotyczące potencjalnej regulacji potranskrypcyjnej poziomu HO-1. Szkoda, iż doktorant nie przeprowadził tej analizy dogłębniej w celu wykazania związku przyczynowo skutkowego pomiędzy podwyższoną ekspresją wybranych mirRNA w efekcie działania kwasu walproinowego na poziom HO-1. Podsumowując tę część Wyników stwierdzam, iż Doktorant wykonał ogromną pracę i liczbę eksperymentów lecz duża część z nich była bardzo wstępna i w moim przekonaniu nie wyjaśniła do końca badanego zjawiska, co nieco rozczarowuje.

Jednak lektura dalszych części ocenianej pracy doktorskiej była dla mnie bardziej satysfakcjonująca. Dotyczyły one charakterystyki i przeprogramowania fibroblastów

pozbawionych genu *Nfe2l2*, charakterystyki iPSC *Hmox1*^{-/-} i *Nfe2l2*^{-/-} a także zdolności różnicowania iPSC *Hmox1*^{-/-} do mioblastów i kardiomiocytów. W ostatniej części przedstawione są dane z pracy Doktoranta opublikowanej w *Science Reports* dotyczącej generacji iPSC z fibroblastów myszy db/db oraz zakończone sukcesem próby uzyskania iPSC od pacjentów z cukrzycą HNF1A-MODY, ich charakterystyki i różnicowania do komórek śródbłonna (db/db) i trzustki (HNF1A-MODY). Do tych wszystkich części nie mam zasadniczych zastrzeżeń i jestem pod dużym wrażeniem ilości jak i jakości uzyskanych wyników. Nie będę wymieniał tutaj ich wszystkich i ograniczę się do tych, które zwróciły moją szczególną uwagę. Z tych istotniejszych moim zdaniem warto wymienić:

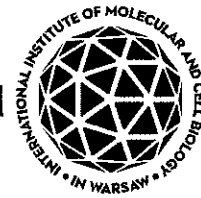
1. udowodnienie negatywnego wpływu braku Nrf 2 na proces przeprogramowania oraz pozytywny efekt kolejnego nowego testowanego związku - sulforanu.
2. wykazanie wpływu braku HO-1 na zdolność różnicowania iPSC do kardiomiocytów
3. wykazanie braku zdolności iPSC HO-1 KO do tworzenia potworniaków.
4. wykazanie negatywnego wpływu braku funkcjonalnego receptora leptyny na zdolność komórek iPSC do różnicowania w komórki nabłonka.

Podsumowując przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera wiele istotnych i cennych wyników, zarówno o znaczeniu czysto poznawczym jak i aplikacyjnym. W moim odczuciu jednak część badań dotyczących mechanizmu wpływu kwasu walproinowego na poziom HO-1 w komórce przedstawionych pierwszej części była nieco zbyt powierzchowna aby wyciągnąć jednoznaczne wnioski i być może przedwczesne było wyłączenie ich do niniejszej rozprawy.

Dyskusja. Dyskusja przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej pana mgr Sępniewskiego podobnie jak Wstęp jest napisana bardzo sprawnie i pozwala się ponownie przekonać o dużej wiedzy Doktoranta jak również o jego zdolności do trafnego wyciągania wniosków, interpretowania własnych wyników i ich konfrontacji z rezultatami innych badaczy. Moją uwagę szczególnie zwróciły obszernie fragmenty dyskusji dotyczące mechanizmów molekularnych łączących HO-1 i proces przeprogramowywania oraz obserwacji odwrotnego do spodziewanego działania kwasu walproinowego na ten proces. Z uwag krytycznych to, podobnie jak we Wstępie, zabrakło mi podziału Dyskusji na podrozdziały, które mogłyby w tym przypadku podkreślać, które z zagadnień zdaniem doktoranta są najistotniejsze w jego dyskusji.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest przygotowana bardzo starannie. Została napisana poprawnym językiem i w bardzo przejrzysty sposób. Jak w przypadku większości tak długich tekstów, które do tej pory miałem szanse oceniać, nie udało się uniknąć kilku drobnych błędów edytorskich, które jednak nie przeszkadzają w zrozumieniu tekstu i których nie warto przytaczać. Wspomnę tylko o jednej, kwestii, na którą warto byłoby uważać w przyszłości, tak w tekstach naukowych jak i w nauczaniu kolejnych pokoleń młodych naukowców. Choć sam osobiście bardzo tego żałuję, to w poprawnej polszczyźnie naukowej, tylko geny mogą ulegać ekspresji lub nadekspresji. Białka są natomiast produkowane,



nadprodukowane lub zmienia się ich poziom w komórce. Na koniec, warto podkreślić, iż wyniki zamieszone w rozprawie zostały zilustrowane licznymi przejrzystymi rycinami i jedyne zastrzeżenia jakie mam do nich to brak skali w przypadku wszystkich zdjęć mikroskopowych.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pana mgr Jacka Stępniewskiego spełnia wymagania określone odpowiednimi przepisami. Wyniki zostały uzyskane za pomocą adekwatnych metod i przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy na temat roli białek HO-1 i Nrf2 w procesie indukowanego przeprogramowania komórek somatycznych do komórek pluripotencjalnych. Ponadto, dzięki przeprowadzonym badaniom uzyskano nowe, potencjalnie bardzo użyteczne modele komórkowe do badania molekularnych mechanizmów różnych typów cukrzycy. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pana mgr Jacka Stępniewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jacek Jaworski