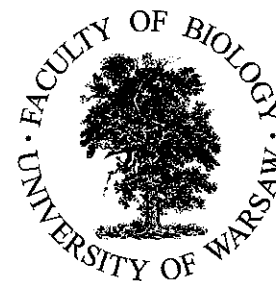




**UNIwersytet Warszawski  
WYDZIAŁ BIOLOGII  
Instytut Zoologii  
Zakład Cytologii**



*prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko  
Prodziekan ds. organizacji badań Wydziału Biologii  
Kierownik Zakładu Cytologii*

Warszawa, 29 lutego 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Nowe mechanizmy otrzymywania oraz różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych: wpływ ścieżki Nrf2/HO-1 oraz cukrzycy”  
autorstwa Pana mgr. Jacka Stępniewskiego

Praca doktorska autorstwa Pana mgr. Jacka Stępniewskiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Dulaka. Podczas jej realizacji doktorant skupiał się na zrozumieniu mechanizmów reprogramowania komórek somatycznych a następnie różnicowania uzyskanych indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS), analizując jaką rolę w obu procesach odgrywa szlak oksygenazy hemowej - 1 (HO-1). Fakt, że praca była realizowana w zespole prof. Józefa Dulaka, którego wkład w badania różnych aspektów funkcjonowania HO-1 i związanych z nią czynników jest ogromny, zapewnił możliwość wielowątkowej analizy roli tego enzymu i związanych z nim czynników w reprogramowaniu komórek somatycznych.

Pomimo że komórki iPS otrzymane zostały po raz pierwszy już 10 lat temu to wiedza na temat ich uzyskiwania i różnicowania wciąż nie jest kompletna (i zapewne długo jeszcze nie będzie). Stwierdzenie to nie będzie zaskakujące jeżeli przypomnimy sobie, że zarodkowe komórki macierzyste (ES) uzyskane aż 35 lat temu wciąż kryją wiele tajemnic, a każdy rok przynosi nowe informacje na ich temat. W przypadku iPS sytuacja jest dużo bardziej skomplikowana gdyż niewiadomym związanym z ich różnicowaniem towarzyszą niewiadome dotyczące ich uzyskiwania z komórek somatycznych. Z tego powodu liczne badania koncentrują się na opracowaniu i zrozumieniu mechanizmów wydajnych i „prawidłowych” metody reprogramowania (na marginesie należy zauważyć, że <sup>nie</sup> wiemy jeszcze co kryje się pod określeniem „prawidłowe”). Z tego powodu pytania o kolejne czynniki, które mogą wpływać i na otrzymywanie i na różnicowanie komórek iPS są kluczowe dla zrozumienia biologii tych komórek.

Badania podjęte przez mgr. Stępniewskiego były niewątpliwie nowatorskie, po raz pierwszy weryfikowały rolę HO-1 i Nrf2 w reprogramowaniu komórek. Dotyczyły także wykorzystania komórek iPS w modelowaniu chorób, w których czynniki te odgrywają istotną rolę. Wśród postawionych celów znalazło się określenie wydajności reprogramowania fibroblastów pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących HO-1 i Nrf2, zbadanie wpływu czynników drobnocząsteczkowych na reprogramowanie, analizę różnicowania uzyskanych komórek iPS, analizę różnicowania komórek iPS otrzymanych z fibroblastów myszy będących zwierzęcym modelem cukrzycy, a także myszy db/db. Realizacja postawionych celów doprowadziła do powstania pracy wielowątkowej i obszernej. Rozumiem jednak wolę Autora, który zdecydował się zaprezentować tak wiele wyników i nie mam zamiaru z tego powodu nadmiernie go krytykować.

Postawione cele mgr Stępniewski zrealizował przeprowadzając szereg bardzo dobrze zaplanowanych badań. Realizując swój projekt Doktorant wykorzystał szerokie spektrum technik. Wśród stosowanych metod znalazły się techniki hodowli fibroblastów, komórek iPS, ich różnicowania in vitro, produkcji wektorów plazmidowych i wirusowych, transfekcji komórek, barwień histologicznych, immunolokalizacji antygenów, poza tym techniki mikroskopii, Western blotting, techniki pozyskiwania i analiz RNA i wiele innych. Wykorzystał także zwierzęta transgeniczne, jako dawców fibroblastów, które poddawał reprogramowaniu. Dane uzyskane z wykorzystaniem tych różnorodnych metod badawczych poddane zostały niezbędnym analizom statystycznym. Tak szeroko zakrojone i wielowątkowe podejście metodyczne umożliwiło szeroką analizę uzyskanych komórek iPS.

Rozprawa doktorska pana mgr. Stępniewskiego poprzedzona jest bardzo obszernym Wstępem. Opisuje on zarówno historię reprogramowania, ewolucję technik uzyskiwania komórek iPS jak i wprowadza czytelnika w problematykę badań nad oksygenazą hemową – 1. Tematyka pracy doktorskiej została wyczerpująco i precyzyjnie przedstawiona. Schematy dobrze ilustrują Wstęp. Informacje zawarte w części pracy poświęconej *Materiałom i Metodom* również zostały zaprezentowane w jasny sposób. Wyniki zawierają uporządkowany opis przeprowadzonych badań oraz uzyskanych rezultatów. Mam wrażenie, że brzmie jak zacięta płyta, ale recenzując kolejny doktorat powstały w Zakładzie Biotechnologii Medycznej muszę podkreślić, że nie tylko badania zostały dobrze zaplanowane i wykonane ale także rozprawa jest świetnie napisana. A to niestety ogranicza moje recenzenckie zapędy. Mgr Stępniewski ogrom wykonanych przez siebie doświadczeń przedstawia bowiem w sposób bardzo przystępny. Jasno tłumaczy, dlaczego zaplanował te a nie inne eksperymenty. Rozpoczynając lekturę niektórych fragmentów pracy miałam wrażenie, że te akurat badania niezbyt dobrze wpisują się w całość rozprawy. Jednak kończąc czytanie danego fragmentu stwierdzałam, że jednak nie, nie miałam

racji. Muszę przyznać, że taki zabieg pisarski, zastosowany przez Doktoranta mniej lub bardziej świadomie, wywoływał pewne napięcie w czytelniku – i też muszę przyznać, że za każdym razem to napięcie było umiejętnie niwelowane. Z całym przekonaniem chciałam podkreślić, że ani przez chwilę nie czułam zapoznając się z wynikami pracy.

Realizując postawione cele Doktorant scharakteryzował fibroblasty o genotypie  $Hmox1^{-/-}$  wykazując, że charakteryzują je pewne zaburzenia regulacji cyklu komórkowego, mogące mieć negatywny wpływ na proliferację tych komórek. W efekcie wydajność uzyskiwania komórek iPS była niższa. Obniżenie poziomu HO-1 kwasem walproinowym miało podobny efekt a zwiększenie ekspresji tego enzymu prowadziło do wzrostu efektywności reprogramowania. Także fibroblasty pozbawione funkcjonalnego genu kodującego Nrf2, a co za tym idzie o niższej ekspresji HO-1 "gorzej" tworzyły komórki iPS. Autor wykazał więc, że manipulując poziomem HO-1 można wpływać na reprogramowanie komórek. Mysie fibroblasty  $Hmox1^{-/-}$  zostały także wykorzystane do analiz molekularnych, które udowodniły ciekawe zależności między HO-1 a deacetylazami Hdac5 i Hdac7. Komórki iPS o genotypach  $Hmox1^{-/-}$  oraz  $Nfe2l2^{-/-}$  były w stanie różnicować in vitro. Co ciekawe te o genotypie  $Nfe2l2^{-/-}$ , w odróżnieniu od komórek  $Hmox1^{-/-}$ , nie tworzyły potworniaków. W pracy zabrakło mi jednak przekonującego wytłumaczenia podłoża tych niezwykle interesujących różnic.

W drugiej części Wyników Doktorant opisał analizy komórek iPS uzyskanych z fibroblastów myszy db/db. Komórki te były zdolne do różnicowania w pochodne ekto-, endo- i mezodermy jednak gorzej tworzyły komórki śródbłonna. Podobną zdolność do "wielokierunkowego" różnicowania wykazywały ludzkie komórki iPS uzyskane z fibroblastów pochodzących od pacjentów cierpiących na cukrzycę HNF1A-MODY. Udało się z nich jednak uzyskać komórki syntetyzujące insulinę i glukagon. Wszystkie otrzymane komórki iPS poddano wnikliwym analizom molekularnym.

W zwięzłej i bardzo dobrze przygotowanej Dyskusji wyniki własne zostały przedstawione na tle badań zarówno „macierzystego” zespołu jak i innych grup zajmujących się podobną problematyką. Autor wykazał się wspaniałą znajomością tematu, dojrzałym i krytycznym podejściem zarówno do wyników własnych jak i tych prezentowanych przez inne zespoły. Z całą pewnością jest ekspertem w dziedzinie prowadzonych przez siebie badań.

Wyniki zawierają 28 rycin, kilka schematów zostało zawartych we Wstępie. Gdyby nie ryciny pracę mogłabym uznać za niemal idealną. Określenia "niemal" używam z powodu „komórek sercowych” (czyli de facto nie wiadomo jakich), „wyższych pasaży”, nadużywania określenia „w kontekście” i kilku innych drobiazgów językowych, czy błędnie podpisanej ryciny 7-4. No i z powodu „chmierycznych myszy”. Myszy bowiem są chimerowymi albo po prostu

chimerami – chimeryczność ciągle jeszcze oznacza niestabilność nastroju a nie fakt, że organizm zbudowany jest z komórek pochodzących od różnych osobników. Wracając do rycin chciałam podkreślić, że większość z nich jest bardzo dobrej jakości, są dobrze opisane, świetnie prezentują uzyskane wyniki. Niektóre z nich zawierają jednak zbyt ciemne, nieostre, a przez to nieczytelne fotografie. Co o tyle napawa mnie smutkiem, że wiem do jakiej klasy sprzętu mają dostęp pracownicy i studenci Wydziału BBB UJ. Do nieudanych należą przede wszystkim zdjęcia wchodzące w skład rycin 7-1C, 7-3 (bardzo ciemne zdjęcia o złym oświetleniu pola widzenia), 7-6B, 7-19 (dlaczego barwienie H&E ma kolor zielono-brązowy?), 7-21 czy 7-22. Tego mankamentu pracy oczywiście nie mogę pominąć milczeniem, ale nie ma on wpływu na moje wysokie zdanie o rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, pan mgr Jacek Stępniewski zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele. Otrzymane wyniki rzucają nowe światło na rolę oksygenazy hemowej-1, czynnika Nrf2 na uzyskiwanie i różnicowanie komórek iPS, wykazując że od poziomu tych białek zależy sukces reprogramowania. Zbadał także możliwości wykorzystania komórek iPS w modelowaniu chorób, w które w ten czy inny sposób uwikłana jest oksygenaza hemowa-1. Wnioski końcowe znajdują pełne poparcie w wynikach przedstawionych analiz i są bardzo dobrze umotywowane. Z całą pewnością można uznać przeprowadzone badania za nowatorskie. Część uzyskanych wyników została już opublikowana (Stępniewski i wsp., 2015, Scientific reports). Ponadto, Doktorant jest współautorem 8 innych prac dotyczących tematyki związanej z prowadzonymi przez niego badaniami. Prace te były już cytowane ponad 80 razy. Stwierdzam więc, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Jacka Stępniewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę ważkość rozprawy doktorskiej, zgłaszam wniosek o nagrodzenie pracy stosowną nagrodą.

**KIEROWNIK**  
ZAKŁADU CYTOLOGII INSTYTUTU ZOOLOGII  
Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego  
*M. A. Ciemerych-Litwinienko*  
**prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko**