Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82
jacek.malejczyk@wum.edu.pl

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. JUSTYNY AUGUSTYNIAK PT. „ROZWOJOWO-ZALEŻNA INDUKCJA BIOGENEZY MITOCHONDRIÓW PODCZAS RÓŻNICOWANIA NEURALNEGO LUDZKICH INDUKOWANYCH PLURIPOTENCJALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (hiPSC)."

Przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dziedzinie medycyny mgr Justyny Augustyniak dotyczy zagadnienia dotyczącego uzyskiwania ludzkich indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (hiPSC) i ich wtórnego różnicowania w inne komórki organizmu. Komórki macierzyste dzięki swojej nieograniczonej możliwości do podziałów, możliwości różnicowania w kierunku różnych typów komórek oraz interesującym właściwościom immunoregulacyjnym są przez niektórych uważane za niezwykle cenne narzędzie terapeutyczne. Niestety nasza dotychczasowa wiedza na temat ich pozyskiwania i praktycznego zastosowania jest ciągle niezadowalająca i wymaga dalszych badań. Temat rozprawy jest zatem bardzo aktualny i poza aspektem poznawczym ma również odniesienie do wykorzystania komórek macierzystych w terapii komórkowej człowieka. Pragnę również nadmienić, że rozprawa została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Leonory Bużańskiej w zespole, który ma wieloletnie doświadczenie i ogromne sukcesy w dziedzinie badań nad uzyskiwaniem i różnicowaniem komórek macierzystych.

Rozprawa została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w języku angielskim w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Taka forma przedstawienia rozprawy doktorskiej jest zgodna z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym i nie budzi najmniejszych zastrzeżeń. Przedstawianie rozprawy doktorskiej w formie „spinki" wcześniej opublikowanych prac powoli staje się coraz bardziej powszechne. Osobiście uważam, że wcześniejsze opublikowanie wyników doktoratu

jest formą weryfikacji jego poziomu naukowego. Dlatego też rozprawa doktorska w postaci opublikowanych prac jest bardzo wartościowa i zasługuje na uznanie.

Całość przedstawionej mi rozprawy poza kopiami opublikowanych wcześniej artykułów zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, informację na temat innowacyjności pracy, wstęp, cel pracy, zadania badawcze, omówienie zalet i ograniczeń metod badawczych użytych w pracach oryginalnych, podsumowanie i omówienie najważniejszych wyników, wnioski oraz bibliografię. Ta część rozprawy została napisana po polsku.

Część rozprawy nie stanowiąca kopii artykułów jest przydatnym, zwięzłym wprowadzeniem czytelnika w ogólne aspekty, cel i metodykę rozprawy oraz stanowi kompendium uzyskanych wyników i zawiera wnioski z całości badań. Oceniam ją bardzo dobrze. We wstępie Autorka w bardzo przystępny sposób opisuje podstawowe informacje dotyczące tematu badań, szczególnie w kontekście funkcji i biogenezy mitochondriów. Związane z różnicowaniem zmiany w metabolizmie hiPSC zostały tu pięknie zilustrowane kolorową ryciną. W części poświęconej zadaniom i metodyce badawczej uwagę zwraca opis przeprowadzanych eksperymentów zilustrowany dwoma klarownymi schematami. Ciekawym, choć w mojej opinii zbędnym elementem jest omówienie zalet i ograniczeń stosowanych przez Doktorantkę metod badawczych. Używane przez nią metody są powszechnie stosowane w naukach biologiczno-medycznych i ich zalety i ograniczenia są wszystkim doskonale znane. Ponadto, ograniczenia wynikające z zastosowanych modeli i metodyki są na ogół przedstawiane i dyskutowane w publikacji.

Na rozprawę mgr Augustyniak składają się trzy publikacje:

1. Augustyniak J, Zychowicz M, Podobińska M, Barta T, Bużańska L: Reprogramming of somatic cells: possible methods to derive safe, clinical-grade human induced pluripotent stem cells. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 74(4):373-82, 2014.

2. Augustyniak J, Lenart J, Zychowicz M, Lipka G, Gaj P, Kolanowska M, Stępień PP, Bużańska L: Sensitivity of hiPSC-derived neural stem cells (NSC) to Pyrroloquinoline quinone depends on their developmental stage. *Toxicol. In Vitro* 45(Pt 3):434-444, 2017.

3. Augustyniak J, Lenart J, Zychowicz M, Stępień PP, Bużańska L: Mitochondrial biogenesis and neural differentiation of human iPSC is modulated by idebenone in a developmental stage-dependent manner. *Biogerontology*. 18(4):665-677, 2017.

Pierwsza publikacja ma charakter pracy przeglądowej zaś pozostałe dwie mają charakter prac oryginalnych. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR. Łączny pięcioletni impact factor (IF) publikacji wynosi 8,409 co jest wynikiem wyróżniającym na tle innych podobnych rozpraw doktorskich. We wszystkich pracach Kandydatka jest pierwszym autorem. Wszyscy współautorzy wyżej wymienionych publikacji złożyli oświadczenia o swoim wkładzie w prace. Na podstawie tych oświadczeń oraz wglądu w treść rozprawy mogę stwierdzić, że mgr Augustyniak miała wiodący wkład w wykonanie badań i przygotowanie manuskryptów prac i tym samym uważam, że przedstawione publikacje są jej osobistym, oryginalnym osiągnięciem, uprawniającym ją do ubiegania się o stopień doktora.

Pierwsza publikacja, która ukazała się w *Acta Neurobiol. Exp.* (pięcioletni IF = 1,631) jest przeglądem aktualnej wiedzy i piśmiennictwa dotyczącym reprogramowania komórek somatycznych w pluripotentne komórki macierzyste. Autorzy opisali tu podstawowe metody stosowane w uzyskiwaniu iPSC i przedyskutowali je w kontekście nowych strategii molekularnych nie opartych o transfekcję komórek z użyciem obcego materiału genetycznego.

Ogólnym celem badań przedstawionych w dwóch pozostałych pracach oryginalnych opublikowanych w *Toxicol. In Vitro* (pięcioletni IF = 3,197) i *Biogerontology* (pięcioletni IF = 3,581) było sprawdzenie czy wrażliwość hiPSC na czynniki indukujące biogenezę mitochondriów takie jak pyrroloquinoline quinone (PQQ, metoksatyna) oraz idebenon (IDB) podczas różnicowania neuralnego zależy od stadium rozwojowego komórek i ma związek z ich kierunkiem różnicowania. W tym celu Doktorantka przeprowadzała doświadczenia nad różnicowaniem hiPSC w neuralne komórki macierzyste (NSC), wczesne komórki progenitorowe (eNP) i dojrzałe komórki progenitorowe (NP) oraz dokonała charakterystyki molekularnej uzyskanych linii. Następnie oceniała wrażliwość komórek na badane związki oraz analizowała biogenezę mitochondriów stosując cały wachlarz metod od oceny żywotności komórek do oznaczania zmian w profilu ekspresji specyficznych genów.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wykazała, że wrażliwość hiPSC na czynniki indukujące biogenezę mitochondriów (PQQ oraz IDB) podczas różnicowania neuralnego zależy od stadium rozwojowego komórek i ma związek z ich kierunkiem różnicowania. Ustaliła, że na wczesnych etapach rozwoju neuralnego hiPSC można wyodrębnić trzy stadia rozwojowe (NSC, eNP, NP) różniące się istotnie ekspresją swoistych genów i białek oraz że w różnicowanych w kierunku neuronalnym hiPSC istnieje przedział „wrażliwości rozwojowej" na badane czynniki stymulujące biogenezę mitochondriów a aktywacja biogenezy mitochondriów zarówno za pomocą PQQ jak i IDB w tym przedziale jest związana z różnicowaniem w kierunku astrocytarnym. Jednocześnie Doktorantka nie potwierdziła znaczenia zmiany potencjału błony mitochondrialnej oraz

reaktywnych form tlenu w regulacji różnicowania neuralnego hiPSC. Wykryła natomiast, że zależność molekularna stymulacji biogenezy mitochondriów i zmiany drogi różnicowania w stadium eNP w kierunku astrocytarnym dotyczy aktywacji drogi przekazywania sygnału spowodowanej wzrostem ekspresji genu *PPARGC1A*. W związku z tym można pokusić się o stwierdzenie, że zarówno PQQ jak i IDB promują różnicowanie astrocytarne przez aktywację szlaków zależnych od PGC-1α oraz receptora PPARα. Dodatkowy wniosek wynikający z prac mgr Augustyniak to to, że komórki w stadium NSC, eNP, NP otrzymane przez różnicowanie hiPSC stanowią dobry model *in vitro* do badań wczesnych etapów rozwoju neuralnego. Wyniki te są oryginalne i uważam, że stanowią istotny wkład w wiedzę na temat różnicowania pluripotentnych komórek macierzystych w komórki układu nerwowego.

Opisane wyżej wyniki prac, które składają się na niniejszą rozprawę zostały wcześniej zrecenzowane i opublikowane w renomowanych, międzynarodowych czasopismach. Zwalnia mnie to od obowiązku szczegółowego recenzowania założeń prac, poprawności ich metodyki oraz uzyskanych wyników i sposobu ich interpretacji. Mogę natomiast jednoznacznie stwierdzić, że badania przeprowadzone zostały bardzo rzetelnie i poprawnie.

Podsumowując, przedstawiony mi materiał spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Doktorantka wykazała się dużą erudycją i umiejętnością przygotowania pracy naukowej oraz posiadła bogaty warsztat badawczy oparty na bardzo nowoczesnej metodologii badań doświadczalnych. Posiadła również umiejętność pracy w wieloprofilowym zespole badawczym. Uważam zatem, że osiągnęła ona stopień dojrzałości naukowej uprawniający ją o ubieganie się o stopień doktora. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego o dopuszczenie mgr inż. Justyny Augustyniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie mając na uwadze fakt, że rozprawa i przedstawione w niej wyniki są oryginalne, mają wysoki poziom merytoryczny i wnoszą wiele nowych informacji do wiedzy na temat mechanizmów różnicowania hiPSC w komórki układu nerwowego oraz że rozprawa ta jest zbiorem prac opublikowanych w dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym wnoszę również o nadanie mgr Justyny Augustyniak stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dziedzinie medycyna z wyróżnieniem.

Warszawa, 30/08/2017

Jacek Malejczyk