



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma, Prof. nadzw. UJ
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 27 kwietnia 2016r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Winieckiej-Klimek

pt. „Porównanie wydajności otrzymywania indukowanych neuralnych komórek macierzystych (iNS) metodą bezpośredniego reprogramowania i różnicowania z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS)”

wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. med. Piotra Rieske
i promotora pomocniczego dr n. med. Eweliny Stoczyńskiej-Fidelus
we współpracy Zakładu Biologii Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
oraz Laboratorium Naukowo-Badawczego Celther Polska Sp. Z o.o.

Komórki macierzyste (KM) jako komórki o wysokim potencjale różnicowania, od kilku dekad budzą nadzieje na ich praktyczne zastosowania kliniczne, w tym w leczeniu uszkodzeń tkanek i narządów. Procesy endogennej regeneracji tkanek, które od lat próbuje się wspomagać poprzez przeszczepianie egzogennych frakcji KM i progenitorowych, stanowią ważne mechanizmy naprawcze umożliwiające utrzymanie struktury anatomicznej oraz funkcjonalnej poszczególnych organów oraz całych organizmów.

Obok KM pozyskiwanych z tkanek organizmów w okresie postnatalnym - często określanymi, jako KM dojrzałe (z *ang. adult stem cells*), do których należą m.in. krwiotwórcze KM i progenitorowe szpiku kostnego od lat skutecznie stosowane w hematologii klinicznej, ogromną nadzieję i zainteresowanie badawcze budzą KM o charakterze embrionalnym, określane jako KM pluripotencjalne. Historycznie KM o właściwościach pluripotencjalnych, czyli zdolności do różnicowania w komórki *de facto* każdego typu tkankowego, w tym komórki szeregu tkanek niekrwiotwórczych – a co istotne z punktu widzenia regeneracji kluczowych organów ludzkich, w tym struktur układu nerwowego -

pozyskiwano m.in. ze stadium blastocysty w okresie embriogenezy, jako tzw. KM embrionalne (ESCs). Ze względu m.in. na kontrowersje etyczne, wspomniane źródło KM pluripotencjalnych nie było jednak optymalne i stawiało przed badaczami wyzwanie do poszukiwania innych alternatywnych źródeł komórek o wysokim potencjale różnicowania. W 2006r. przełom przyniosły badania zespołu prof. Shinya Yamanaki z Uniwersytetu w Kyoto, który opracował metodę „wytwarzania” KM pluripotencjalnych *de novo* z komórek terminalnie zróżnicowanych, poddanych reprogramowaniu genetycznemu. Powstałe w wyniku takiego procesu indukowane KM pluripotencjalne, tzw. komórki iPS (z ang. *induced pluripotent stem cells*), wykazują szereg cech zbliżonych do KM embrionalnych, w tym szeroki potencjał do różnicowania i są obecnie szeroko badane na świecie, również pod kątem ich potencjalnego wykorzystania w regeneracji tkanek. Wyzwaniem w praktycznym wykorzystaniu komórek iPS w klinice, pozostają jednak wciąż po pierwsze - optymalne protokoły reprogramowania genetycznego, bezpieczne dla pacjenta, oraz po drugie - endogenny potencjał teratogenny, który przypisany jest KM pluripotencjalnym.

W związku z powyższym uwaga szeregu laboratoriów badawczych na świecie koncentruje się dziś przede wszystkim na optymalizacji bezpiecznych procedur indukcji komórek iPS *in vitro* oraz na opracowywaniu alternatywnych podejść w reprogramowaniu genetycznym, które umożliwiłyby pozyskanie bezpośrednio komórek progenitorowych o określonym ukierunkowaniu tkankowym, z pominięciem stanu pluripotencjalności, który niesie ryzyko powstania potworniaka po przeszczepieniu takich komórek *in vivo*.

W przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej, doktorantka wychodzi na przeciw wymienionym wyzwaniom i oczekiwaniom badawczym. Doktorantka podjęła wpisując się w powyższe najnowsze światowe trendy badawcze - ważną próbę uzyskania ludzkich komórek progenitorowych neuralnych na drodze bezpośredniego reprogramowania genetycznego (czyli tzw. komórek iNS), oraz porównania skuteczności tej strategii do powszechnie stosowanej metody pozyskania progenitorów neuronalnych na drodze różnicowania z komórek iPS. W swojej pracy doktorantka wybrała dwie strategie bezpośredniego reprogramowania fibroblastów ludzkich do komórek iNS *in vitro*: 1) z zastosowaniem jednego czynnika transkrypcyjnego (CT), jakim był SOX2 – kluczowy CT regulujący neurogenezę, oraz 2) z zastosowaniem dwóch CT – SOX2 oraz c-MYC, który stanowi ważny aktywator proliferacji komórek, sprzyjający zwiększeniu efektywności reprogramowania genetycznego. Doktorantka w swoich badaniach zastosowała również ludzkie komórki iPS wyprowadzone przez nią na drodze reprogramowania czynnikami transkrypcyjnymi regulującymi pluripotencję KM – OCT-4, SOX-2, KLF-4 oraz c-MYC, które następnie wykorzystwała jako źródło komórek neuronalnych (tzw. komórek ebiNS), wyprowadzonych na drodze ukierunkowanego

różnicowania w hodowli *in vitro*. W swojej pracy doktorantka przeprowadziła szereg badań porównujących właściwości uzyskanych populacji KM neuralnych na poziomie fenotypowym, genetycznym i funkcjonalnym, jak również przeprowadziła szereg prób optymalizacji protokołów ich pozyskiwania oraz hodowli i różnicowania *in vitro*.

Formalny opis rozprawy i ocena edytorska

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska liczy 117 stron i rozpoczyna się od spisu treści i wykazu skrótów, po których następuje *Wstęp* liczący 27 stron i zawierający informacje odnośnie technologii i molekularnego podłoża reprogramowania komórek do stadium iPS oraz pozyskiwania neuralnych KM i ich zastosowań w regeneracji. Po nim następuje zwięzłe przedstawienie *Celów pracy* oraz 1-o stronicowy podrozdział *Materiał*, w którym doktorantka opisuje linie komórkowe, które zostały wstępnie pozyskane, jako materiał wyjściowy do dalszych doświadczeń. Po nim umieszczono 12-o stronicowy podrozdział *Metody* zawierający opis metod oraz przebieg poszczególnych doświadczeń, które doktorantka przeprowadzała w czasie swoich badań. Podrozdział zawiera dwie tabele obejmujące sekwencje starterów stosowanych w reakcjach PCR oraz opis przeciwciał zastosowanych do barwień immunocytochemicznych. Kolejny rozdział zatytułowany *Wyniki i ich omówienie* liczy 26 stron i zawiera najważniejsze wyniki uzyskane przez doktorantkę, które przedstawiła na 22 rycinach i w 2 tabelach. W rozdziale *Dyskusja* liczącym 13 stron, doktorantka zawarła podsumowanie rezultatów swoich badań oraz odniosła je do dotychczasowego stanu wiedzy światowej odwołując się do 238 pozycji literaturowych, które przytoczyła na końcu swojej rozprawy w rozdziale *Piśmiennictwo*. Pracę kończy 1-o stronicowy rozdział *Wnioski* oraz *Streszczenie* pracy umieszczone na 3 stronach rozprawy, po którym następuje również krótkie streszczenie w języku angielskim (2-u stronicowy *Abstract*). Na zakończenie doktorantka podaje Wykaz dokumentów i artykułów przedstawionych w czasie przewodu doktorskiego oraz podaje *Spis Rycin i Tabel*.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska zawiera wszystkie części formalne przewidziane dla prac doktorskich i spełnia wymogi formalne takiej rozprawy.

Pod względem edytorskim praca doktorska jest przygotowana bardzo starannie. W czasie czytania zwracają uwagę jedynie nieliczne, drobne błędy interpunkcyjne oraz stylistyczne – np. wielokrotne stosowanie określenia „ilość” zamiast „liczba” w odniesieniu do rzeczowników policzalnych (np. „ilość komórek”), czy też stosowanie różnych skrótów na komórki iPS, zamiast jednego wybranego (tj. iPS,

iPSc, iPSC). Tabele i ryciny zostały również przygotowane w sposób staranny, a poniżej przedstawione uwagi nie umniejszają wysokiej oceny strony edytorskiej rozprawy.

Uwagi do części edytorskiej:

1. Ryciny złożone z kilku paneli zdjęć (w szczególności uzyskanych przy powiększeniu obiektywu 20x) mogłyby być większe, co ułatwiłoby interpretację wyników barwienia immunocytochemicznego (np. Rysunek 2, 11, 12).
2. Wykaz dokumentów i artykułów przedstawionych w czasie przewodu doktorskiego powinien być raczej umieszczony na końcu rozprawy, po rozdziale *Piśmiennictwo*, tak aby zachować ciągłość typowych części rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

We *Wstępie* doktorantka przedstawiła w sposób bardzo staranny i niezwykle wnikliwy, zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie celów pracy oraz działań eksperymentalnych przedstawionych w dalszej części rozprawy doktorskiej.

W pierwszej części *Wstępu* doktorantka w sposób systematyczny i wyczerpujący omawia zagadnienia dotyczące strategii reprogramowania komórek somatycznych do komórek iPSc oraz molekularne podłoże reprogramowania, w tym szczegółowo opisuje wirusowe oraz niewirusowe techniki wprowadzania transgenów wraz z ich zaletami i wadami, także pod względem potencjalnych zastosowań klinicznych uzyskanych komórek iPSc.

W dalszej części *Wstępu* doktorantka koncentruje się na strategiach bezpośredniego reprogramowania komórek somatycznych do komórek progenitorowych ukierunkowanych tkankowo, jako alternatywy dla komórek iPSc, przytaczając konkretne przykłady badań światowych, które zakończyły się sukcesem. Doktorantka przedstawiła także przykłady badań, w których podejmowano próby indukowania genetycznego i pozyskiwania KM i progenitorowych o charakterze neuronalnym dla celów regeneracji tkanki nerwowej (tzw komórek iNS), w której to części wyjaśnia znaczenie poszczególnych czynników transkrypcyjnych stosowanych do reprogramowania dla indukcji konkretnego fenotypu tych KM. Dalszą część *Wstępu* doktorantka poświęca aspektom niszy komórek neuronalnych, opisując dwie najważniejsze nisze KM neuralnych w mózgu ludzkim (strefy SVZ oraz SGZ) oraz zwraca uwagę na udział składników molekularnych niszy, w tym białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wydzielanych tam czynników wzrostowych, na regulację fenotypu i funkcji KM neuralnych, w tym na ich potencjał różnicowania. Choć doktorantka nie poświęca więcej uwagi tym aspektom w swej dalszej pracy doświadczalnej,

wyraźnie wskazuje na fakt, że obok reprogramowania genetycznego, również wpływ elementów niszy komórkowej powinien być w przyszłości brany pod uwagę w indukcji konkretnego fenotypu komórek iNS. W ostatniej części *Wstępu* doktorantka przedstawia przykłady praktycznych zastosowań indukowanych KM neuralnych oraz komórek progenitorowych wyprowadzonych z komórek iPS w regeneracji tkanek układu nerwowego zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w badaniach klinicznych u ludzi.

Podsumowując, *Wstęp* jest przygotowany bardzo starannie, wnikliwie i wyczerpująco w kontekście dotychczasowego stanu wiedzy i literatury oraz logicznie uzasadnia cel jaki doktorantka postawiła sobie w swojej pracy doktorskiej.

Uwagi do Wstępu:

1. We *Wstępie*, który obejmuje tak rozległy obszar wiedzy, z pewnością pomocne byłoby umieszczenie rycin lub tabel podsumowujących oraz ilustrujących dany omawiany aspekt wiedzy. Przykładowo wskazane byłoby umieszczenie tabeli podsumowującej zalety i wady oraz efektywność reprogramowania omawianych metod wirusowych i niewirusowych stosowanych w technologii iPS oraz schematu przedstawiającego standardowe reprogramowanie tzw. „czynnikami Yamanaki” do stanu komórek iPS w porównaniu do strategii bezpośredniego reprogramowania do komórek iNS, np. z zastosowaniem czynnika transkrypcyjnego SOX2, co ułatwiłoby zrozumieniu strategii eksperymentalnej przyjętej przez doktorantkę w dalszej części pracy, szczególnie dla szerszego grona czytelników dysertacji. Podobnie przy opisie niszy SVZ i SGZ, cennym byłoby przedstawienie schematów struktury obu obszarów z zaznaczeniem elementów opisywanych przez doktorantkę, w szczególności umiejscowienia w obu strefach KM neuralnych.

Tego typu uproszczone lub przykładowe schematy porządkujące informacje podane we *Wstępie* z pewnością ułatwiłyby czytelnikowi dalsze podążanie za działaniami podjętymi w pracy oraz interpretację wyników. Myślę, że doktorantka będzie miała okazję przedstawić przynajmniej niektóre z tych schematów w swojej prezentacji pracy doktorskiej w czasie jej obrony.

2. Na stronie 23 rozprawy doktorantka stwierdza, że „(...) stosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w terapiach zaburzeń OUN, stanowi przedmiot spornych dyskusji, podważających zdolność mezenchymalnych komórek macierzystych do transróżnicowania do linii komórek neuronalnych.” Ze względu na fakt, że szereg badań światowych wskazuje jednak na pozytywne efekty zastosowania MSCs w regeneracji uszkodzeń układu nerwowego, rodzi się pytanie o mechanizmy aktywności komórek macierzystych, w tym MSCs, w miejscu ich przeszczepienia.

Jakie inne właściwości KM - oprócz bezpośredniego różnicowania się w komórki docelowe, np. neuronalne – mogą mieć znaczący wpływ na procesy regeneracji uszkodzonych tkanek? Jakie właściwości regeneracyjne przypisywane są komórkom MSCs i czy brak bezpośredniego różnicowania tych komórek w dany typ komórki docelowej, wyklucza zastosowanie MSCs w celu regeneracji uszkodzonej tkanki?

W następnej części rozprawy doktorantka przedstawiła *Cel pracy*, który formułuje właściwie oraz jasno uzasadnia w kontekście wiedzy omówionej we *Wstępie*.

W rozdziałach *Materiał* i *Metody* liczących 13 stron, doktorantka w sposób zwięzły opisała zarówno wyjściowy materiał badawczy, jak również protokoły eksperymentalne zastosowane w pracy doświadczalnej.

Materiał badawczy stanowiły ludzkie linie komórkowe wyjściowe do dalszego reprogramowania genetycznego oraz różnicowania do linii komórek neuralnych (m.in. fibroblasty napyłka ludzkiego). Protokoły eksperymentalne oraz schematy prowadzonych doświadczeń opisano w sposób wyczerpujący i wystarczający, aby uzyskać informacje co do sposobu ich wykonania oraz możliwości ich powtórzenia przez innych badaczy. Rozdział uzupełniono także o dwie tabele zawierające sekwencje nukleotydowe starterów oraz opis przeciwciał zastosowanych w pracy.

Wyniki oraz główne osiągnięcia swoich badań doktorantka przedstawiła w rozdziale *Wyniki*. W pierwszej części rozdziału doktorantka opisała doświadczenia, w których udało jej się wyprowadzić własne linie komórek iPS z fibroblastów ludzkich na drodze reprogramowania „czynnikami Yamanaki” z wykorzystaniem wektorów lentiwirusowych, które w następnej części pracy wykorzystwała, jako komórki wyjściowe do różnicowania w kierunku komórek progenitorowych neuralnych (tzw. komórek ebiNS).

W dalszej części pracy doktorantka wykonała szereg doświadczeń mających na celu bezpośrednio reprogramowanie fibroblastów ludzkich w kierunku komórek macierzystych neuronalnych z zastosowaniem samego czynnika transkrypcyjnego kluczowego dla neurogenezy (SOX2) lub SOX2 z czynnikiem c-MYC - z wykorzystaniem wektorów wirusowych i episomalnych.

Doktorantka potwierdziła wysoką efektywność transdukcji w/w czynnikami w przypadku zastosowania wektorów lentiwirusowych, a także potwierdziła ekspresję markerów komórek neuronalnych w transdukowanych fibroblastach, m.in. SOX1, SOX2 i nestyny, co mogłoby świadczyć o indukcji zmiany

fenotypu w reprogramowanych komórkach. Doktorantka nie zaobserwowała jednak typowej zmiany fenotypowej świadczącej o przejściu komórek w kierunku linii neuronalnej, co nasunęło doktorantce słuszny opis uzyskanych komórek (o morfologii raczej komórek mezenchymalnych) - jako komórki „iNS- podobne”. Jednocześnie doktorantka zaobserwowała, że dodatkowa nadekspresja genu c-MYC zwiększała efektywność indukcji komórek iNS-podobnych w komórkach transdukowanych SOX2, jak również pozytywnie wpływała na poziom proliferacji tych komórek, co doktorantka opisała w dalszej części pracy.

W przypadku zastosowania wektorów episomalnych doktorantka nie zaobserwowała indukcji fenotypu neuronalnego w fibroblastach ludzkich, co związane było z bardzo niską wydajnością transfekcji obserwowaną zarówno przez doktorantkę w jej badaniach, jak również powszechnie opisywaną przez innych badaczy w przypadku zastosowania tego typu wektorów.

Uwagi:

1. Tu rodzi się pytanie, jaki mógł być wpływ geny c-MYC na indukowane komórki, co miało przełożenie na obserwowaną efektywność indukcji fenotypu SOX1+SOX2+nestyna+ w komórkach transdukowanych lentiwirusami przenoszącymi SOX2 i c-MYC? Czy obok zwiększenia efektywności proliferacji komórek reprogramowanych SOX2 i c-MYC w porównaniu z komórkami reprogramowanymi tylko genem SOX2, doktorantka obserwowała zmiany w innych aspektach funkcji tych komórek lub ekspresji innych genów? Czy efektywność proliferacji korelowała np. z odsetkiem komórek SOX1+SOX2+nestyna+ pomiędzy eksperymentami?
2. Skoro SOX2 jest kluczowym regulatorem neurogenezy, to czy w przypadku komórek „iNS- podobnych”, które wykazywały ekspresję tego czynnika, ale wciąż fenotypowo zachowywały morfologię fibroblastów/ komórek mezenchymalnych, doktorantka próbowała zmienić pożywkę hodowlaną np. na bardziej wzbogaconą w czynniki wzrostowe stymulujące różnicowanie neuronalne? Być może takie dodatkowe dostarczenie czynników stymulujących neurogenezę pozwoliłoby komórkom „iNS- podobnym” na przejście w stadium komórek progenitorowych neuronalnych. Myślę, że tego typu eksperymenty mogłyby stanowić ciekawy aspekt nowych przyszłych badań zwiększających efektywność strategii reprogramowania zaproponowanych przez doktorantkę w niniejszej pracy.
3. Czy doktorantka widzi potencjalnie możliwość zwiększenia efektywności reprogramowania czynnikami SOX2 i c-MYC za pomocą wektorów episomalnych, które z pewnością byłyby bezpieczniejszą alternatywą dla stosowania wektorów wirusowych, w szczególności w kontekście potencjalnych zastosowań klinicznych wyprowadzonych komórek iNS?

W dalszej części rozdziału *Wyniki* doktorantka opisuje badania, w których komórki macierzyste/progenitorowe neuronalne wyprowadzała z wcześniej uzyskanych komórek iPS, na drodze ich ukierunkowanego różnicowania neuronalnego poprzedzonego stadium ciałek embrionalnych. Wyprowadzone komórki doktorantka określa mianem „komórek ebiNS”.

W przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla strategii bezpośredniego reprogramowania, doktorantce udało się uzyskać na drodze różnicowania z komórek iPS, komórki o ekspresji szeregu markerów typowych dla KM/progenitorowych neuralnych (w tym m.in. SOX1, MSI1) oraz o morfologii typowej dla takich komórek, co doktorantka porównała także z linią KM neuralnych (nazwaną w pracy NSC) wyprowadzonych z ludzkich KM embrionalnych (H9).

Doktorantka porównała ekspresję szeregu genów związanych z różnicowaniem w kierunku linii neuronalnych, w tym SOX2, MSI1, NKX2.2 i nestyny, pomiędzy m.in. komórkami wyprowadzonymi na drodze ukierunkowanego różnicowania z komórek iPS (ebiNS) i z komórek embrionalnych (NSC) oraz komórkami „iNS-podobnymi” uzyskanymi na drodze bezpośredniego reprogramowania (czyli komórkami SiNS i SMiNS). Doktorantka wykazała upregulację markerów neuronalnych oraz spadek ekspresji markerów mezenchymalnych we wszystkich wyprowadzanych liniach neuronalnych w porównaniu z wyjściowymi fibroblastami ludzkimi, co świadczy o indukcji fenotypu neuralnego w reprogramowanych i różnicowanych komórkach. Co ciekawe, wykazała także, że poziom ekspresji markerów neuronalnych w komórkach ebiNS jest bardziej zbliżony do poziomu obserwowanego w komórkach „iNS-podobnych” uzyskanych na drodze bezpośredniego reprogramowania (czyli komórek SiNS i SMiNS), niż w komórkach NSC wyprowadzonych z hESCs.

Uwaga:

Powyższa obserwacja może potwierdzać wcześniej zasygnalizowane przypuszczenie, że „komórki iNS-podobne” są molekularnie „gotowe” do przejścia fenotypowego w komórki progenitorowe iNS przy dodatkowym ich zastymulowaniu (np. przez odpowiednie czynniki wzrostowe obecne w zoptymalizowanej pożywce).

Jednocześnie, doktorantka wykazała, że komórki ebiNS różnicowały w różne typy komórek tkanki nerwowej podobnie jak komórki NSC wyprowadzane z komórek embrionalnych H9, a w przeciwieństwie do komórek „iNS-podobnych” wyprowadzonych na drodze bezpośredniego reprogramowania, których potencjał różnicowania neuronalnego był ograniczony.

W dalszej części pracy doktorantka przedstawia wyniki odnoszące się do poziomu proliferacji wszystkich badanych frakcji komórek neuralnych, jak również poziomu ich senescencji, świadczącym m.in. o szybkości starzenia się komórek w hodowlach *in vitro*. Co ciekawe, doktorantka ponownie wskazała na podobieństwa pomiędzy komórkami ebiNS i NSC - wyprowadzonymi odpowiednio z komórek iPS i komórek hESCs. Obie populacje wykazywały znamienne wyższą aktywność proliferacji w porównaniu z komórkami „iNS- podobnymi” uzyskanymi na drodze bezpośredniego reprogramowania. Niższy poziom proliferacji korelował z wyższym odsetkiem komórek wykazujących aktywność β -galaktozydazy związanej z senescencją, w komórkach iNS- podobnych.

Uwagi:

1. Doktorantka stwierdza, że pomimo zastosowania różnych pożywek (ReNcell, StemPro NSC) i substratów pokrywających podłoże hodowlane, komórki „iNS- podobne” wchodziły w stan senescencji i obniżały tempo proliferacji w hodowli *in vitro*, co może świadczyć, że jakieś inne mechanizmy mogą być odpowiedzialne za ten stan. Czy doktorantka przypuszcza, jakie inne czynniki mogłyby być za to odpowiedzialne i co można by potencjalnie zoptymalizować w celu zwiększenia żywotności i efektywności funkcjonalnej komórek iNS pozyskiwanych na drodze bezpośredniego reprogramowania.
2. Rodzi się także pytanie o wyjściowy poziom proliferacji oraz sensencji samych fibroblastów ludzkich wykorzystywanych do bezpośredniego reprogramowania. Czy doktorantka badała stan funkcjonalny tych komórek przed reprogramowaniem oraz w dłuższej hodowli *in vitro*? Nie można wykluczyć, że wyjściowy stan funkcjonalny fibroblastów mógł mieć przełożenie na wyprowadzone z nich komórki SiNS i SMiNS.

Podsumowując, rozdział Wyniki opisujący najważniejsze wyniki badań doktorantki został przygotowany w sposób obszerny i logiczny, a przedstawione wyniki zilustrowano informatywnymi rycinami oraz tabelami.

W rozdziale *Dyskusja* autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych oraz wskazuje na potencjalne obszary, gdzie wyniki uzyskane w jej pracy doktorskiej mogą być potencjalnie wykorzystane w przyszłości oraz gdzie zaproponowane przez nią strategie mogą ulec dalszej optymalizacji. Dyskusja jest napisana bardzo starannie i wskazuje na dojrzałość naukową doktorantki.

Rozprawę kończy rozdział *Wnioski*, w których doktorantka przedstawiła w punktach główne osiągnięcia badawcze oraz konkluzje płynące z przeprowadzonych przez nią badań, oraz informatywne *Streszczenie* pracy, przygotowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim.

Podsumowując, w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pani Marty Winieckiej-Klimek, autorka podjęła się ważnego wyzwania, jakim jest optymalizacja metody pozyskiwania komórek progenitorowych neuralnych na drodze bezpośredniego reprogramowania genetycznego, z pominięciem stadium pluripotencjalności, z jakim mamy do czynienia w przypadku wyprowadzania komórek bezpośrednio z komórek iPS. Próby podejmowane przez badaczy w celu opracowania takich metod, które przybliżyłyby nas z pewnością do praktycznych, bezpiecznych zastosowań indukowanych komórek progenitorowych w praktyce klinicznej, pomimo tego, że są już podejmowane na świecie – wciąż stanowią ważne wyzwanie, które może przynieść wymierny wkład nie tylko w badania podstawowe, ale i przedkliniczne, a przede wszystkim kliniczne.

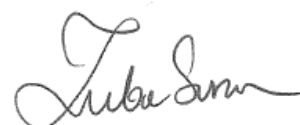
Doktorantka w swojej pracy doktorskiej również podjęła tego typu ważną próbę pozyskania komórek progenitorowych neuralnych, indukowanych na drodze bezpośredniego reprogramowania z zastosowaniem technik transdukcji wirusowej i transfekcji episomalnej, jednocześnie porównując własności otrzymanych komórek z komórkami progenitorowymi wyróżnionymi bezpośrednio z KM embrionalnych oraz komórek iPS. Wykazała istotne różnice fenotypowe, genetyczne i funkcjonalne pomiędzy tymi komórkami i pomimo pewnych obserwowanych ograniczeń w efektywności opracowywanych przez nią metod bezpośredniego reprogramowania, wskazała na potencjalne obszary dalszych optymalizacji i przyszłych wyzwań, co należy ocenić bardzo wysoko.

Ważne obserwacje doktorantki przedstawione w jej rozprawie doktorskiej, otwierają drogę do dalszych badań i optymalizacji metod bezpośredniego reprogramowania komórek somatycznych do progenitorów neuralnych i czynią pracę doktorantki ważną w kontekście przyszłych możliwości pozyskiwania takich komórek z pominięciem stadium komórek iPS, przy odpowiedniej stymulacji komórek bezpośrednio reprogramowanych czynnikami takimi jak m.in. SOX2 lub innymi, których rola lub współdziałanie z czynnikiem SOX2 powinny zostać również zbadane. To z kolei przybliży nas do potencjalnych praktycznych zastosowań komórek indukowanych w praktyce klinicznej. Uzyskane w pracy wyniki, stanowią ważny, własny wkład doktorantki w światową naukę i z pewnością stanowią podstawę do dalszych badań własnych oraz innych grup badawczych.

Rozprawę doktorską Pani Marty Winieckiej-Klimek Marty oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym i edytorskim. Przedstawione w recenzji uwagi, w tym merytoryczne, w żadnym stopniu nie wpływają na pozytywną ocenę całej rozprawy doktorskiej, a przeciwnie świadczą o zainteresowaniu wynikami tej rozprawy.

Wnoszę zatem do Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani Marty Winieckiej-Klimek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoki dotychczasowy dorobek naukowy doktorantki oraz znaczenie wyników jej badań dla dalszych przyszłych zastosowań praktycznych, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie rozprawy.



(Ewa Zuba-Surma)