



Bydgoszcz 28 wrzesień 2024 r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Anny Pauliny Jędrzejak

pt.: „Rola genu *AMOTL2* w pluripotencji i różnicowaniu ludzkich komórek macierzystych”

Cukrzyca stanowi ogromny problem medyczny. Obecnie na świecie na cukrzycę choruje ponad 537 mln osób. Szacuje się, że liczba ta wzrośnie do 643 mln chorych do roku 2030 i 783 mln chorych do roku 2045. Szczególnie wymagającą grupą pacjentów są pacjenci z tzw. chwiejną cukrzycą typu I (ang. brittle diabetes), u których nie da się kontrolować glikemii poprzez insulinoterapię. Jedyną metodą leczenia tej grupy pacjentów pozostaje transplantacja trzustki lub izolowanych wysp trzustkowych pochodzących od zmarłych dawców. Problemami są niewystarczająca liczba dawców wielonarządowych, duża liczba wysp trzustkowych koniecznych do przywrócenia insulino-niezależności oraz powikłania wynikające z leczenia immunosupresyjnego.

Poznanie mechanizmów różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych w komórki trzustki, pozwoli w przyszłości na opracowanie skutecznych protokołów różnicowania komórek macierzystych w komórki produkujące insulinę i ich zastosowanie w terapii cukrzycy. Konieczne jest prowadzenie badań mających na celu poznanie roli poszczególnych genów w organogenezie trzustki. Mając na względzie powyższe, tematyka badań podjętych przez Doktorantkę mgr Annę Jędrzejak i Jej Promotora prof. Małgorzatę Borowiak dotycząca analizy genu *AMOTL2* w pluripotencji i różnicowaniu komórek oraz jego roli w rozwoju trzustki jest wysoce interesująca, bardzo aktualna i potrzebna.



Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim i ma układ typowy dla tego typu publikacji. Praca zawiera 126 stron wydruku komputerowego podzielonego na 7 podrozdziałów tj. Wstęp, Cele pracy, Wyniki, Dyskusję, Materiały i Metody, Spis rycin oraz Piśmiennictwo. Dodatkowo przedstawiono streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazy stosowanych skrótów oraz skrótów nazw genów. Brakuje mi tutaj jedynie oddzielnego rozdziału Wnioski zestawiającego najważniejsze konkluzje płynące z przeprowadzonych badań. Rozprawa zawiera 37 rycin. Rozdział piśmiennictwo zawiera 222 pozycje.

W liczącym 18 stron rozdziale „Wstęp” scharakteryzowano pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. Pluripotent Stem Cells, PSCs), przedstawiono ścieżki sygnałowe regulujące pluripotencję, oraz opisano kluczowe czynniki pluripotencji. W dalszej części rozdziału opisano zagadnienia związane z decyzją o losie komórki w rozwijającym się embrionie. Ostatnia część wstępu dotyczy trzustki, opisano budowę i funkcję trzustki, rozwój trzustki *in vivo* oraz różnicowanie ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku komórek trzustkowych *in vitro*. Scharakteryzowano również gen *AMOTL2*. Tak przygotowany wstęp doskonale wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy doktorskiej.

Celami pracy było:

1. ustalenie wzoru ekspresji genu *AMOTL2* w rozwijającej się ludzkiej trzustce *in vivo* i potwierdzenie obecności endokrynych komórek progenitorowych NGN3(+)/*AMOTL2* (+);
2. ustalenie wzoru ekspresji genu *AMOTL2* w ludzkich pluripotencjalnych komórkach macierzystych *in vitro* i potwierdzenie obecności endokrynych komórek progenitorowych NGN3(+)/*AMOTL2* (+);
3. ocena różnic transkrypcyjnych pomiędzy populacjami *AMOTL2* (+) i *AMOTL2* (-) w endokrynych komórkach progenitorowych;
4. zaprojektowanie i wytworzenie ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych z wyłączoną (ang. knockout, KO) ekspresją genu *AMOTL2*;



5. zidentyfikowanie fenotypu z wyłączoną ekspresją genu *AMOTL2* w ludzkich pluripotencjalnych komórkach macierzystych;
6. zidentyfikowanie wpływu genu *AMOTL2* na pluripotencję i los komórek.

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała przyjętą metodologię badawczą. Dobór technik oraz przeprowadzenie badań świadczy o znakomitym warsztacie naukowym Doktorantki. Godna uznania jest nie tylko rozległość i mnogość wykonanych analiz, ale również wykorzystanie najnowocześniejszych narzędzi badawczych, takich jak system CRISPR/Cas9 czy sekwencjonowanie RNA.

Wyniki badań są dobrze udokumentowane i przedstawione w przejrzysty sposób na licznych rycinach. Przeprowadzone badanie wykazało po raz pierwszy istnienie populacji NGN3(+)/AMOTL2(+) w endokrynnych komórkach progenitorowych człowieka zarówno *in vitro* i *in vivo*. Doktorantka z sukcesem wyprowadziła linię hPSCs z wyłączoną ekspresją genu *AMOTL2* z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9. Kolonie hPSCs z wyłączoną ekspresją genu *AMOTL2* charakteryzowały się odmiennym niż kolonie typu dzikiego fenotypem- były bardziej nieregularne i mniej ciasno upakowane oraz wykazywały zwiększoną konfluencję. Sekwencjonowanie RNA ujawniło liczne zmiany w aktywacji szlaków molekularnych związanych między innymi z organizacją cytoszkieletu, metabolizmu komórkowego, adhezji i migracji komórek, macierzy zewnątrzkomórkowej czy różnicowania komórkowego. Zaobserwowano, że komórki hPSCs z wyłączoną ekspresją genu *AMOTL2* wykazują tendencję różnicowania w kierunku linii ektodermalnych kosztem linii endodermalnych czy mezodermalnych. Są to wszystko niezwykle ważne i ciekawe informacje, które wnoszą nowe informacje do istniejącego stanu wiedzy w tym obszarze.



Wyniki pracy zostały omówione w rozdziale „Dyskusja” opartym o współczesne, dobrze dobrane piśmiennictwo. Przeprowadzona dyskusja świadczy o dużej wiedzy Doktorantki. Dyskusję podzielono na podrozdziały, co czyni ją bardzo przejrzystą i ułatwia ocenę. Pracę kończą rozważania Autorki dotyczące przyszłych kierunków badań. Z przyjemnością mogę stwierdzić, że nie dostrzegam żadnych uchybień merytorycznych w recenzowanej rozprawie.

W czasie publicznej obrony rozprawy doktorskiej proszę Doktorantkę o próbę odpowiedzi na pytanie: Czy, a jeżeli tak to w jaki sposób, wiedza dotycząca roli AMOTL2 w pluripotencji i różnicowaniu komórek oraz rozwoju trzustki zdobyta w wyniku przeprowadzonego badania i/lub doniesienia innych autorów w tym zakresie mogą przyczynić się do udoskonalenia protokołów różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych w komórki produkujące insulinę?

Podsumowując, nie mam wątpliwości, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest pracą nowatorską, wartościową i stanowi oryginalny i twórczy wkład w rozwój badań nad pluripotencją i różnicowaniem komórek macierzystych. Dlatego z wielką satysfakcją stwierdzam, że dysertacja mgr Anny Pauliny Jędrzejak pt.: „Rola genu *AMOTL2* w pluripotencji i różnicowaniu ludzkich komórek macierzystych” odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim, określonym w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023), co upoważnia mnie do przedłożenia Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosku o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie biorąc pod uwagę liczne walory recenzowanej rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

Katedra Urologii i Andrologii

prof. dr hab. Marta Pokrywczyńska