UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko

Warszawa, 19 maja 2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sary Henry
Rola czynników transkrypcyjnych *ETV4* i *ETV5* w przejściach między stanami pluripotencji ludzkich komórek macierzystych.

Praca doktorska mgr Sary Henry została wykonana na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorką była dr hab. Małgorzata Borowiak, prof. UAM. Rozprawa składa się ze streszczeń, wstępu, celów pracy, materiałów i metod wyników, dyskusji, podsumowania, spisu figur, tabel i wykazu skrótów oraz spisu literatury. Spełnia wymogi formalne stawiane przed rozprawami doktorskimi.

Tematyka rozprawy

Tytuł bardzo dobrze odzwierciedla treść pracy doktorskiej. Problematyka przeprowadzonych badań, a więc zrozumienie podłoża molekularnego pluripotencji komórek macierzystych, jest niezwykle istotna z punktu widzenia wykorzystania tych komórek zarówno w badaniach podstawowych jak i w opracowywaniu terapii. Testowane podejścia terapeutyczne coraz częściej bazują bowiem na wykorzystaniu komórek takich jak indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. iPSC) czy zarodkowe komórki macierzyste (ang. ESC). Prof. Borowiak ma na polu analiz różnicowania PSC ale także badań podłoża pluripotencji bardzo duże doświadczenie, a prace realizowane przez jej zespół wnoszą znaczący wkład w poszerzenie wiedzy na temat komórek macierzystych. Cele postawione w rozprawie, przeprowadzone doświadczenia i przedstawione wyniki mają charakter nowatorski. Dotyczyły one określenia roli czynników ETV4 i ETV5 w regulacji tzw. stanu „naiwnego" (ang. naïve) oraz ugruntowanego (ang. primed), a także przejścia między tymi stanami, ludzkich zarodkowych komórek macierzystych (hESC). W swoich badaniach Doktorantka wykorzystała linie komórek pozbawionych ekspresji *ETV4* albo *ETV5* a także takie, w których dokonano nadekspresji każdego z ww. czynników.

Wiedza i samodzielność doktorantki

Poziom wiedzy teoretycznej doktorantki oceniam bardzo wysoko. Robię to w oparciu o **Wstęp, Wyniki** i **Dyskusję**. Wstęp jest świetną charakterystyką komórek pluripotencjalnych zarówno mysich jak i ludzkich, opisującym kluczowe szlaki przekazywania sygnału aktywne w komórkach w stanie naiwnym i ugruntowanym. Świetnie zdefiniowane zostały także badane czynniki *ETV4*

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: m.ciemerych-li@uw.edu.pl

i *ETV5* oraz ich rola w różnych procesach rozwojowych. **Wstęp** zapewnia bardzo dobre wprowadzenie do lektury wyników, jest świetnie ilustrowany co ułatwia jego lekturę i zrozumienie opisywanych procesów. Rozdział **Wyniki** został bardzo dobrze poprowadzony. Doktorantka przeprowadziła liczne doświadczenia wykorzystując różnorodne podejścia badawcze – od hodowli komórkowych, uzyskiwania i inaktywacji MEF, modyfikacji genetycznych hESC (CRISPR/Cas9, *piggyBac*), poprzez analizy ekspresji genów, sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek, ATAC-seq, cytometrię przepływową, immunodetekcję wybranych epitopów i obserwacje mikroskopowe, analizy bioinformatyczne uzyskanych wyników. Wyniki opisane są w sposób sprawny co świadczy o rozległej wiedzy doktorantki i jej przygotowaniu do pracy z tak „rozległymi" danymi. **Dyskusja** doskonale podsumowuje uzyskane dane i zestawia je z tymi pochodzącymi z innych badań. Może jest nieco zbyt przeciążona powracaniem do wyników, ale spełnia swoją rolę i także świadczy o wiedzy doktorantki i krytycznym podejściu do własnych analiz. Ergo, uważam że praca dostarcza dowodów na to, że autorka jest samodzielną i krytyczną naukowczynią, doskonale przygotowaną do dalszej pracy badawczej.

Oryginalność rozprawy

Rozprawa stanowi w pełni oryginalne podejście do analizy roli *ETV4* oraz *ETV5* w ludzkich zarodkowych komórkach macierzystych. Doktorantka wykazała, że do przeżycia hESC konieczna jest obecność jednego z tych czynników. Nie udało jej się uzyskać komórek pozbawionych obu z nich. Białka są więc kluczowe dla tych komórek. Istotnym byłoby ustalenie dlaczego, ale to nie było celem prowadzonych badań. Analiza komórek *ETV4*-/-, *ETV5*-/- oraz tych, w których doprowadzono do nadekspresji badanych czynników wykazała, że mają one prawidłową morfologię, ekspresję czynników pluripotencji, te pozbawione funkcjonalnych genów są nieco mniejsze. Analizy uzyskanych linii komórkowych, z których uzyskiwano komórki w stanie naiwnym lub ugruntowanym wykazała istnienie zarówno subtelnych jak i znaczących różnic w między nimi. Szczególnie interesujące są wnikliwe analizy wyników badań transkryptomicznych oraz epigenetycznych. Nie wykryto dramatycznych a jedynie subtelne, jednak istotne, różnice w funkcji obu czynników. Wykazano, że czynniki te raczej, jak napisała autorka, modulują niż determinują reakcje komórek na indukcję zmiany stanu z naiwnego na ugruntowany lub ugruntowanego na naiwny. Delecja *ETV5* przyspieszała a jego nadekspresja spowalniała zmianę stanu z naiwnego na ugruntowany, co wyrażało się zmianami w ekspresji markerów charakterystycznych dla tych rodzajów ESC. Delecja zarówno *ETV4* jak i *ETV5* prowadziła do wzrostu ekspresji genów związanych z organizacją cytoszkieletu, adhezją. Spadała ekspresja genów związanych z nurogenezą. Istotne było wykazanie, że przy braku *ETV5* zwiększa się dostępność chromatyny w loci genów kodujących tubuliny lub białka związane z reorganizacją cytoszkieletu. Powiązano więc funkcje ETV4/5 z białkami strukturalnymi. Oprócz tych odkryć praca zawiera cały szereg wyników, które z całą pewnością staną się początkiem nowych badań nad pluripotencją i różnicowaniem komórek PSC. Wkład doktorantki w poszerzenie tego obszaru wiedzy oraz oryginalność uzyskanych przez nią wyników nie budzą żadnych wątpliwości.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: m.ciemerych-li@uw.edu.pl

Pytania i uwagi krytyczne

1. W opisie Materiałów i Metod zabrakło mi informacji w oparciu o jakie zgody analizowane były zmodyfikowane genetycznie ludzkie ESC.

2. Praca zwiera stwierdzenie: „Zarówno ludzkie, jak i mysie komórki macierzyste są komórkami pluripotencjalnymi, a ich właściwości zależą od warunków hodowli" (str. 14). Pominięty został fakt, że w zasadzie każda linia iPSC czy ESC jest różna. Nawet jeżeli uzyskiwane są od tego samego osobnika (iPSC) czy niemal identycznych blastocyst pochodzących od myszy szczepów wsobnych. Istnieje bardzo dużo danych na ten temat. Wyciągnięcie ogólnych wniosków w oparciu o analizę jedynie jednej linii komórkowej może stanowić problem. Czy myślała Pani chociażby o weryfikacji uzyskanych danych z wykorzystaniem innych niż badane linii komórek?

3. Na stronie 46 opisywana jest hodowla MEF. To jest hodowla pierwotna a nie hodowla linii ustanowionej. Nie jest jasne dlaczego konieczna była hodowla na MEF. Czy hodowla ludzkich komórek na mysich fibroblastach, produkujących „nieludzkie" czynniki, może mieć wpływ na wyniki analiz?

4. Na stronie 62, na rycinie 7 pojawia się morula przed specyfikacją. Czy chodzi o morulę przed kompakcją?

5. Rycina 10 na stronie 65 ilustruje skuteczność inaktywacji genów kodujących ETV4 lub ETV5. Zabrakło mi analizy poziomu mRNA lub białka pokazującej co się dzieje w komórkach KO. Czy ekspresja drugiego ETV ulega zwiększeniu? Nie jest to widoczne na preparatach, ale też taka analiza nie jest ilościowa.

6. Czy pisząc, że SOX17 jest markerem endodermy pisze Pani o endodermie pierwotnej czy ostatecznej? Jest on eksprymowany przez oba rodzaje komórek. Ciekawym byłoby stwierdzić, które z nich uzyskała Pani w hodowli.

7. W jakim kierunku powinny pójść dalsze badania?

Inne uwagi, na które nie oczekuję odpowiedzi:

1. Praca jest napisana dobrze. Język jest w zasadzie poprawny. Cierpi nieco z powodu „akapitozy" – potrzeby umieszczenia w oddzielnym akapicie 1-3 zdań zamiast całego wątku, żargonu w rodzaju: markery ugruntowane (np. str. 9), komórki naiwne (np. str. 75), z nokautem genu (np. str. 64), fenotyp zbliżony do naiwnego (str. 77), czy niezbyt „zręcznych" stwierdzenia rodzaju: komórki pobrane w trzech punktach czasowych protokołu cofania (str. 89), przyspiesza dynamikę procesu cofania (str. 97), uporządkowanie komórek wzdłuż kontinuum rozwojowego (str. 101). Ale oczywiście rozumiem, że niektóre angielskie określenia trudno jest przetłumaczyć na język polski (oczywiście z wyjątkiem tych, które już zostały przetłumaczone, o czym poniżej).

2. Cytowana na stronie 30 praca nr 83 – Lian et al. 2013, o ile dobrze pamiętam nie dotyczy mioblastów, a jedynie kardiomiocytów.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: m.ciemerych-li@uw.edu.pl

3. Na stronie 33, na rycinie 6 przedstawiony jest szlak aktywacji Hippo/YAP-TAED. W jaki sposób aktywowane są kinazy MST1/2.

4. W opisach komórek pozbawionych funkcjonalnych genów lub tych, w których dokonano ich nadekspresji używany jest spójnik „ETV4 i ETV5" co sugeruje, że manipulowano oboma genami jednocześnie. Powinno być „ETV4 albo ETV5".

5. Ryciny 11A, 15, 33, 37A, są nieostre lub powiększenie jest zbyt małe, lub jest ich za dużo aby przeanalizować lokalizację badanych epitopów.

6. Rycina 25A i B – wyniki nie zostały w zasadzie opisane.

7. Uwaga, którą od kilkunastu już lat umieszczam chyba w co drugiej recenzji pracy doktorskiej z zakresu biologii rozwoju czy biologii komórek macierzystych, dotyczy niczym moim zdaniem nie uzasadnionej potrzeby tworzenia *de novo* polskiej nomenklatury. Zazwyczaj opartej o własne tłumaczenia z języka angielskiego. Mamy więc wewnętrzną masę komórkową zamiast węzła zarodkowego (ang. inner cell mass) blastocyty czy bruzdę pierwotną zamiast smugi pierwotnej (ang. primitive streak). Gorąco polecam nabycie podręcznika autorstwa prof. Zofii Bielańskiej-Osuchowskiej, świetnej biolożki rozwoju, pt. „Zarys organogenezy. Różnicowanie komórek w narządach" (PWN, 2004, wznowione w 2021 roku). Polecam też polskojęzyczne prace przeglądowe z zespołów prof. Andrzeja K. Tarkowskiego czy prof. Haliny Krzanowskiej. Już kilkadziesiąt lat temu wprowadzili oni do polskiego języka słownictwo, które biolodzy rozwoju z powodzeniem stosują. Niestety tych mistrzów polskiej biologii rozwoju nie ma już z nami ale ich wkład w rozwój tej dziedziny jest niezaprzeczalny i trwały i nie należy o tym zapominać. Tak więc lektura podręcznika Bielańskiej-Osuchowskiej pozwoli uniknąć bezpośrednich i niepotrzebnych tłumaczeń z angielskiego a co za tym idzie mas komórek, bruzd pierwotnych, czy ciałek/ciał embrioidalnych, które też mnie tu i ówdzie (szczęśliwie nie w tym doktoracie) prześladują, i innych określeń.

Ocena końcowa:

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Sary Henry spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Sary Henry do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie biorąc pod uwagę jakość przedstawionej rozprawy, uzyskanie i przetestowanie nowych narzędzi badawczych (linie komórkowe) oraz uzyskanie cennych wyników, które zapewne, ze względu na swoje nowatorstwo, zostaną opublikowane w renomowanym czasopiśmie, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowaną nagrodą.

Podpisany elektronicznie przez

Maria Anna Ciemerych-Litwinienko; Uniwersytet Warszawski

19.05.2026

16:24:04 +02'00'

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: m.ciemerych-li@uw.edu.pl