

Poznań, 14.06.2026



**INSTITUTE
OF HUMAN GENETICS**
POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Strzeszyńska 32
60-479 Poznań, Poland

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: igcz@man.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

dr hab. Natalia Rozwadowska, prof. IGC PAN
Kierownik Zakładu Patologii Molekularnej

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej:
„Rola czynników transkrypcyjnych ETV4 i ETV5 w przejściach między stanami
pluripotencji ludzkich komórek macierzystych”
autorstwa Pani mgr Sary Henry

Praca doktorska autorstwa Pani mgr Sary Henry została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Borowiak. Rozprawa została napisana w języku polskim i wykonana w kierowanym przez Promotorkę Laboratorium Komórek Macierzystych w Zakładzie Ekspresji Genów, Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Rozprawa doktorska została przedstawiona mi do oceny na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Biologicznych UAM w Poznaniu.

Modele badawcze oparte na komórkach pluripotencjalnych umożliwiły naukowcom identyfikację ścieżek oraz mechanizmów różnicowania w wiele typów komórek oraz coraz częściej także bardziej złożonych struktur tkankowych. Ten niezwykle wartościowy model jest stosowany nie tylko do dogłębnego poznania podstaw molekularnych procesów, ale także do modelowania chorób rzadkich i cywilizacyjnych, a także coraz częściej do prób zmierzających do uzyskania produktów leczniczych terapii zaawansowanych (ATMP - ang. *advanced therapy medicinal product*) mających na celu regenerację narządową i stanowią filar medycyny regeneracyjnej.

Badania prowadzone od ponad czterech dekad pozwoliły na poznanie nie tylko wielu szlaków i mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencji w przypadku linii embrionalnych komórek macierzystych (ESC - ang. *embryonic stem cells*), ale także za indukcję tego stanu w komórkach somatycznych poprzez zastosowanie czynników reprogramujących odkrytych przez Yamanakę i Takashiego. Komórki reprogramowane określamy mianem indukowanych komórek pluripotencjalnych, czyli iPSC (iPSC - ang. *induced pluripotent stem cells*). W toku badań

zdefiniowano także stochastyczną naturę pluripotencji charakteryzującą się dynamicznym przechodzeniem pomiędzy różnymi jej stanami oraz, co kluczowe w aspekcie pracy, zdefiniowano także znaczące różnice międzygatunkowe dotyczące zarówno komórek ESC, jak i iPSC.

Badania Zespołu kierowanego przez Promotorkę pracy, prof. dr hab. Małgorzatę Borowiak, skupiają się na tematyce mechanizmów morfogenetycznych, metabolicznych i transkrypcyjnych modelujących rozwój trzustki, w tym różnicowania progenitorów trzustkowych i powstawania komórek β produkujących insulinę. Drugi ważny obszar dotyczy modelowania chorób, zwłaszcza nietypowych i monogenowych postaci cukrzycy, z wykorzystaniem komórek pluripotencjalnych, edycji genomu oraz analiz omicznych, w tym na poziomie pojedynczej komórki. Przedstawiona mi do oceny dysertacja stanowi kontynuację lub rozwinięcie badań prowadzonych w zespole Promotorki, których istotnym elementem była praca opublikowana w *Nature Communications*, współautorstwa Doktorantki. Badania te wykazały znaczenie czynników ETV w regulacji różnicowania ludzkich komórek pluripotencjalnych poprzez wpływ na adhezję komórkową, organizację cytoszkieletu oraz szlak PI3K/AKT, a także na prawidłowe dojrzewanie progenitorów trzustkowych.

Praca stanowi szerokie opracowanie liczące 175 stron maszynopisu i ma niemal tradycyjny układ z wyodrębnionymi rozdziałami: *Wstęp* zakończony *Celem Pracy, Materiały i Metody, Wyniki* wraz z *Dyskusją i Podsumowaniem*. Praca zawiera także *Streszczenia* w języku polskim i angielskim oraz *Spisy: treści, stosowanych skrótów, tabel, rycin oraz literatury*. Do rozważenia przez Doktorantkę zostawiam włączenie do prezentacji w czasie obrony zarówno elementu postawienia *hipotezy badawczej* pracy, jak i wydzielenie *Wniosków z Podsumowania*.

Mgr Henry we *Wstępie* wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji, przedstawiając klasyczne definicje komórek macierzystych dotyczące zarówno ich pochodzenia, jak i potencjału różnicowania. Następnie płynnie przechodzi do szczegółowej analizy stanów pluripotencji, historii ich odkrycia oraz głównych kamieni milowych w tej dziedzinie. W dalszej części koncentruje się na bardzo obszernym opisie szlaków sygnałowych aktywnych w komórkach pluripotencjalnych, wskazując na bardzo istotne różnice pomiędzy komórkami gryzoni a komórkami człowieka. Po czym skupia się na opisach różnic pomiędzy badanymi przez doktorantkę stanami pluripotencji ugruntowanej (ang. *primed*) i naiwnej (ang. *naive*) oraz opisuje rodzinę czynników transkrypcyjnych ETS, do której należą badane przez doktorantkę białka ETV4 i ETV5.

W pracy zasadniczo stosowano poprawny zapis nazw genów/białek wielkimi literami i przy zapisach kursywą z rozróżnieniem dla człowieka i gryzoni, jednak miejscami pojawiają się niespójności dotyczące nomenklatury (np. str. 27 opis mysich kompleksów Smad1

współdziałających z Pou5f1). Warto byłoby ujednoczyć zapis nazw genów i białek oraz jednoznacznie wskazać przyjętą konwencję nomenklaturową, szczególnie w fragmentach porównujących dane uzyskane w modelach ludzkich i mysich. Warto również zaznaczyć, że słownictwo używane przez Doktorantkę zawiera kluczowe błędy, czego przykładem jest bezpośrednie tłumaczenie pojęcia „*inner cell mass*” jako „wewnętrzna masa komórkowa”, przy czym ta struktura już w podręcznikach szkół licealnych określana jest jako węzeł zarodkowy. Przy czym bardzo doceniam, że Doktorantka podjęła się napisania dysertacji w języku polskim, co powoli staje się wyjątkiem; niemniej jednak ważne jest, żeby przy takim wyborze szczególnie zadbać o prawidłowe tłumaczenia. W mojej ocenie przygotowany *Wstęp* zawiera informacje, które wprowadzą czytelnika w tematykę pracy doktorskiej i wskazują lukę w wiedzy, którą przedstawiona dysertacja, przy pomocy zaplanowanych eksperymentów, starała się wypełnić.

Cel pracy został zdefiniowany jako zbadanie roli czynników transkrypcyjnych ETV4 i ETV5 w przechodzeniu hESC między ugruntowanym a naiwnym stanem pluripotencji wraz ze zidentyfikowaniem mechanizmów molekularnych związanych z tym procesem. Cel ten został osiągnięty przez Doktorantkę poprzez zastosowanie komplementarnych technik biologii molekularnej, jak i komórkowej, takich jak immunofluorescencja, cytometria przepływową, scRNAseq, ATAC-seq, wspomaganych analizami bioinformatycznymi.

Przechodząc do rozdziału *Materiały i Metody* już na wstępie należy zaznaczyć, że ponieważ praca została wykonana z wykorzystaniem komórek linii embrionalnej (HUES8-iCAas9), do wszystkich wymogów formalnych należy podejść ze szczególną starannością. Tym samym już na początku tego rozdziału zabrakło mi szczegółowego opisu, na jakich zasadach i na podstawie jakich dokumentów linia została wykorzystana w pracy. W toku eksperymentów wykorzystano zarówno linie zmodyfikowane przez członków zespołu, jak i przez samą Doktorantkę. W związku z tym wymagana byłaby informacja o posiadanych zgodach na prowadzenie Zakładu Inżynierii Genetycznej oraz pozwoleniach na zamknięte użycie GMM dotyczących przeprowadzonych prac. Część metodyczna związana z hodowlą *in vitro* jest opisana szczegółowo i wyczerpująco. Uzupełnienia wymagają opisy procedury lipofekcji standardowej i odwrotnej, które – zaktadam – Doktorantka przeprowadzała osobiście przy próbie uzyskania podwójnego KO genów ETV4 i ETV5. Nie znalazłam także opisu stosowanych metod statystycznych, które pojawiają się w wynikach, przykładowo na Ryc. 18 dotyczącej analizy fenotypu naiwnego czy na Ryc. 20 dotyczącej analizy ilościowej odsetka komórek SUSD2-pozytywnych. Dodatkowo w mojej opinii, schematy dotyczące uzyskania linii z inaktywacją genów ETV4 i ETV5 oraz indukowaną ich nadekspresją lepiej pasują do rozdziału dotyczącego metodologii niż do *Wyników*. Niemniej jednak zastosowane w pracy metody

zostały dobrane prawidłowo, a zastosowanie kilku poziomów analizy obejmujących najbardziej zaawansowane metody oparte na technologii NGS stanowią atut pracy.

Wyniki badań są szczegółowo opisane na ponad 70 stronach manuskryptu i bogato zilustrowane. Układ odpowiada postawionym celom i prowadzi czytelnika przez pracę. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że wysiłek włożony w uzyskanie wyników zarówno pod kątem pracy z liniami komórkowymi, jak i analiz bioinformatycznych jest znaczący.

W pierwszym podrozdziale Doktorantka przedstawia dane dotyczące ekspresji genów *NANOG*, *ETV4* oraz *ETV5* w zarodku człowieka (od stadium zygoty). Ten fragment wymaga, w mojej ocenie, jednoznacznego doprecyzowania, ponieważ w pracy nie wskazano źródła analizowanych danych ani podstawy ich wykorzystania. Podkreślam, że przyjmując zasadę dobrej wiary oraz korzystną dla Doktorantki interpretację, zakładam, iż przedstawione wyniki pochodzą z publicznie dostępnych, legalnie pozyskanych i właściwie udokumentowanych zbiorów danych. Jednocześnie, ze względu na obowiązujące w Polsce ograniczenia prawne dotyczące badań na zarodkach człowieka, brak takiej informacji stanowi istotne uchybienie formalne i merytoryczne. W związku z powyższym dopuszczam rozprawę do dalszego procedowania i obrony pod warunkiem jednoznacznego wskazania źródła danych, zakresu ich wykorzystania oraz podstawy formalno-etycznej przeprowadzonej analizy. W przypadku, gdyby okazało się, że dane te zostały uzyskane bezpośrednio przez Doktorantkę lub zespół badawczy w ramach badań prowadzonych z naruszeniem obowiązujących przepisów, nie mogłabym – z przyczyn prawnych i etycznych – procedować oceny tej rozprawy.

Doktorantka, opisując wyniki, w logiczny sposób przechodzi od charakterystyki wykorzystywanych modeli *ETV4-KO*, *ETV5-KO* oraz *ETV4-OE* i *ETV5-OE*, przez ich szczegółową analizę podczas procesu przejścia ze stanu ugruntowanego do stanu naiwnego. Analiza ta obejmuje zarówno obserwacje morfologiczne i fenotypowe, jak i – przede wszystkim – dane uzyskane na podstawie analizy transkryptomu na poziomie pojedynczych komórek.

Wyniki badań wskazały, że delecja badanych czynników nie wpływa zasadniczo na potencjał ani podstawowe właściwości linii komórkowych. Jednak w procesie indukcji przejścia między stanami linie modyfikowane wykazywały odmienną charakterystykę w porównaniu z linią typu dzikiego. Doktorantka wykazała, że delecja genu *ETV5* znacząco zwiększała odsetek komórek o fenotypie naiwnym. Następnie, stosując eleganckie podejście eksperymentalne, w którym *ETV5* ulegał nasilonej ekspresji, potwierdziła, że modyfikacja ta wywołuje efekt odwrotny, spowalniając etapy przejścia z jednego stanu w drugi. Muszę przyznać, że ten element pracy, zarówno w aspekcie metodycznym, jak i merytorycznym, stanowi najmocniejszą stronę dysertacji. Pozostałe wyniki pozwoliły zidentyfikować także ścieżki wzmocnione w liniach modyfikowanych, które potencjalnie

mogą odpowiadać za obserwowany fenotyp i są powiązane z terminami GO związanymi z organizacją struktury komórki oraz cytoszkieletu. Szczegółowej analizie została poddana populacja *priming3*, gdzie to powiązanie było szczególnie widoczne w linii ETV5-KO.

Doktorantka wskazuje, bazując na Ryc. 43, że geny wchodzące w skład tzw. modułu tubulinowego ulegają najwyższej ekspresji w populacji *priming3*, co jest uzasadnione logicznie, natomiast nie znalazłam potwierdzenia tego wyniku poprzez przeprowadzenie analizy statystycznej. Czy mogłabym prosić o wyjaśnienie, na jakiej zasadzie został przeprowadzony test oceny aktywności modułu tubulinowego? Czy brane pod uwagę były subpopulacje czy całościowa ekspresja? Ponieważ Doktorantka wykazała najwyższą dysregulację w populacji *priming3* przy jednoczesnej najmniejszej istotności statystycznej różnicy w aktywności tego modułu w trakcie cofania (Ryc. 44), byłabym wdzięczna za przedstawienie podstawy obserwowanego zjawiska.

Dyskusja została przygotowana przez mgr Henry na 10 stronach maszynopisu i porusza elementy, które zostały zidentyfikowane w trakcie przeprowadzania badań. Doktorantka porusza się swobodnie w tematyce pracy doktorskiej, niemniej jednak wydaje się, że mogłaby położyć większy nacisk na odniesienie swoich wyników do prac innych autorów, ponieważ w tekście pojawia się mniej niż 30 odniesień literaturowych, co w przypadku tak obszernej pracy wydaje się stosunkowo niskim osadzeniem dyskusji w literaturze tematu.

Z obowiązku recenzenta, na koniec pozwolę sobie na prośbę o wyjaśnienie dodatkowych aspektów, mając nadzieję, że będzie to stanowić, oprócz kwestii poruszonych we wcześniejszych fragmentach recenzji, dobrą podstawę do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej.

W pracy opublikowanej przez zespół prof. Borowiak [Nat. Commun. 16, 1999 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56591-6>] dotyczącej czynników ETV1/ETV4 oraz ETV5 wygenerowano z sukcesem linie komórkowe z potrójną delecją. Czy możliwe jest hipotetyczne wyjaśnienie, na podstawie danych literaturowych lub danych pochodzących z laboratorium, dlaczego podejście tylko z podwójnym KO dotyczącym genów ETV4 i ETV5 nie zakończyło się sukcesem? Pracę wykonano tylko na jednej linii komórek pluripotentnych, która była uzyskana dwie dekady temu i poddana dodatkowym modyfikacjom genetycznym. Jakie, według Doktorantki wiążą się z tym ograniczenia? Czy rutynowo badane linie były monitorowane pod kątem stabilności genetycznej?

Bardzo ciekawym wątkiem pracy jest zwiększony odsetek populacji *priming3/formative* przy delecji ETV5. Stan formatywny jest wymieniany w aspekcie komórek pluripotentjalnych gryzoni, jako czynnik kluczowy w nabieraniu kompetencji do różnicowania w linię germinálną. Ze względu na różnice gatunkowe nie jest wiadomo, czy rzeczywiście ta sama zależność dotyczy komórek człowieka. Może, korzystając z dostępnych danych, Doktorantka mogłaby rozszerzyć

wpływ uzyskanych wyników o aspekt, który wykracza poza dynamikę przejść między stanami i obejmuje nową ścieżkę badawczą?

Znaczenie zidentyfikowanego modułu tubulinowego zostało przez Doktorantkę zweryfikowane na podstawie analizy dostępności chromatyny w wybranych genach z modułu oraz oznaczonej wyższej ekspresji białka TUBB przy pomocy techniki immunofluorescencji, która nie jest techniką idealną do porównań ilościowych. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować potencjalną ścieżkę kontynuacji badań i weryfikację funkcjonalną swoich odkryć przy pomocy innych technik?

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska potwierdza, że mgr Sara Henry prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne, a przedstawiona dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

W podsumowaniu stwierdzam, że zgodnie z art. 187 ust. 1-2 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2024 r. poza 1571 z późn. zm.), przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Sary Henry spełnia wszelkie wymogi stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Sary Henry do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Signed by /
Podpisano przez:

Natalia
Rozwadowska

Date / Data: 2026-
06-22 14:04

Prof. IGC PAN, dr hab. n. med. Natalia Rozwadowska