

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz  
Kierownik Pracowni Molekularnych  
Podstaw Ruchów Komórkowych  
Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 30 listopada 2021 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ulman pt.:

**"Study of SNAI1 gene impact on differentiation of induced pluripotent stem cells into skeletal muscle in the context of rhabdomyosarcoma development"**

***(Badanie wpływu SNAI1 na proces różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych do mięśni szkieletowych w kontekście rozwoju mięsaka prążkowanokomórkowego)***

wykonanej w Zakładzie Transplantologii, Wydział Lekarski Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Majki i dr Klaudii Skrzypek

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Ulman dotyczy istotnego problemu regulacji miogenezy, procesu istotnego nie tylko podczas rozwoju zarodkowego, ale również w późniejszym okresie życia - podczas regeneracji i naprawy mięśni szkieletowych. To zagadnienia ważne nie tylko w aspekcie fizjologii mięśni, ale także w aspekcie ich patologii, m.in. miopatii i mięsaków. Doktorantka w swojej rozprawie skupiła się na czynniku transkrypcyjnym SNAI1 i jego związku z rozwojem mięsaka prążkowanokomórkowego. Doktorantka opracowała nie tylko sposoby obniżenia poziomu syntezy tego czynnika w komórkach, wykazując, że prowadzi to do wzrostu potencjału miogennego modyfikowanych komórek. Zoptymalizowała również sposoby różnicowania pluripotentnych komórek macierzystych w kierunku miogennym, co może w przyszłości (oby nie dalekiej) być wykorzystane w opracowaniu skutecznych terapii chorób mięśni, na które w zasadzie nie ma skutecznego lekarstwa.

### Formalny opis rozprawy

Doktorantka skorzystała z możliwości, jaką daje Art. 187 pkt. 3 ustawy o Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i przedstawiła rozprawę jako „(...) *zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych (...)*”. Na rozprawę składają się dwa artykuły spełniające ustawowy wymóg spójności tematycznej, oba zostały opublikowane w latach 2020-2021 w czasopiśmie *Cells* (IF 6,6) i mają charakter eksperymentalny; w obu Doktorantka jest pierwszym autorem. Pierwszy artykuł zatytułowany: „*Genome Editing of the SNAI1 Gene in Rhabdomyosarcoma: A Novel Model for Studies of Its Role*” zawiera 4 złożone ryciny, zaś drugi, p.t.: „*Myogenic Differentiation of iPS Cells Shows Different Efficiency in Simultaneous Comparison of Protocols*”, zawiera 5 złożonych rycin i tabelę. Do rozprawy zostały dołączone oświadczenia wszystkich współautorów, z których jednoznacznie wynika, że mgr Ulman miała wiodący udział w powstaniu tych publikacji. Poza kopiami rzeczonych artykułów (w formie załączników) oraz ww. oświadczeniami rozprawa zawiera liczące 24 strony wprowadzenie/autoreferat, na które składają się: (i) lista artykułów składających się na rozprawę wraz z informacją o ich wartościach współczynnika przebiccia (IF) i punktach ministerialnych (na marginesie od ponad roku ministerstwo zajmujące się nauką i szkolnictwem wyższym zmieniło i formułę - zostało połączone z ministerstwem zajmującym się oświatą, i nazwę), (ii) Listę skrótów, (iii) krótkie Wprowadzenie w tematykę rozprawy (namiastka wstępu), (iv) Cele pracy, (v) Materiały i metody, (vi) Biblio-

grafię (31 pozycji), (vii) Streszczenia artykułów w języku polskim i angielskim, (viii) Wyniki i wnioski oraz (ix) Podsumowanie.

### Ocena merytoryczna

W sytuacji, gdy na rozprawę składają się opublikowane artykuły recenzent ma teoretycznie ułatwione zadanie, gdyż zawarte w publikacjach wyniki zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów, wyznaczonych przez redakcje czasopism, którzy z reguły nie mają obiekcji do ostrej krytyki i wskazywania konieczności wykonania dodatkowych doświadczeń. W praktyce to trudne, gdyż czasem nie można określić, które wyniki przedstawione w danym artykule są autorstwa doktoranta, zwłaszcza w przypadku publikacji wieloautorskich. Idealną sytuacją byłoby zatem, gdy autorami artykułów byłiby jedynie doktorant i jego promotor/promotorzy (opiekunowie naukowci) oraz ewentualnie osoba wspierająca stronę metodyczno-techniczną. Jest to - z uwagi na wymagania redakcji dobrych czasopism dbających o poziom naukowy nadsyłanych manuskryptów - praktycznie niemożliwe. W pierwszej z publikacji (z 2020 r.) obok Doktorantki jest jeszcze pięcioro innych współautorów, a w drugiej (z 2021 r.) - czworo. Szkoda, że Doktorantka nie zaznaczyła wyraźnie, które doświadczenia zostały przez nią wykonane i przeanalizowane, oświadczenia pozostałych autorów są bowiem bardzo ogólnikowe. Mam nadzieję, że Doktorantka podczas obrony rozprawy dokona „wiwisekcji” swojego wkładu w powstanie tych artykułów. Poza tym, dobrą praktyką przy tej formie rozpraw jest dołączenie artykułu przeglądowego, który potwierdzałby gruntowną znajomość tematyki i umiejętność samodzielnego przygotowywania tekstów naukowych (co - jak wynika z uwag wymienionych w dalszej części recenzji - byłoby bardzo zasadne, zwłaszcza po polsku).

*Lista skrótów* jest wyczerpująca, ale Doktorantka chyba zbyt dokładnie tłumaczyła anglojęzyczne nazwy, co czasem powodowało lapsusy. Zastanawiam się np. jak bardzo nerwowa jest cząsteczka CD56... Nie podoba mi się też występująca ostatnio tendencja do „uprzymiotnikowywania” wszystkiego – np. histonowa zamiast histonu, dlatego *myogenic* raz występuje jako mięśniowy, raz jako miogenny, a raz jako miogeniczny. No i wreszcie - po polsku *aldehyde* to aldehyd (PFA).

*Wprowadzenie* to krótkie podsumowanie tematyki rozprawy, dość lakoniczne, podobnie jak i *Introduction* w obu artykułach. Trudno przy tej formie rozprawy wymagać dłuższego tekstu, natomiast informacje, które Doktorantka zawarła w tej części umożliwiają zrozumienie problemu badawczego i podejmowanych przez nią działań. Jednakże z pewnością można wymagać bardziej precyzyjnego języka w opisywaniu poruszanych zagadnień, no i poprawnej polszczyzny. Rażą mnie zwłaszcza zwroty „gorszy przebieg” w odniesieniu do choroby, „konkretne” w odniesieniu do mRNA. Zauważyłam też błędy gramatyczne – np. wiązanie się do czegoś zamiast wiązanie z czymś, czy też nieprawidłowa deklinacja – stosowanie dopełniacza zamiast biernika (np. dodaje się coś do roztworu, a nie czego do roztworu...). Zasady interpunkcji również wydają się Doktorantce obce. Zauważyłam również błędy w cytowaniu literatury i to od pozycji nr 1. Co więcej, zastosowanie formy biernej – „chciano” może sugerować, że Doktorantka nie była samodzielną w swoich badaniach, w co raczej nie wierzę. Mam nieodparte wrażenie, że Doktorantka pisała tę część i pozostałe części rozprawy napisane w ojczystym języku w olbrzymim pośpiechu, nie poświęcając im należytej staranności, a szkoda.

*Cele pracy* zostały jasno przedstawione i – co Doktorantka udowodniła w toku badań – w pełni zrealizowane. Główne cele, które sobie postawiła to: (i) porównanie i optymalizacja systemów do regulacji ekspresji genu kodującego czynnika transkrypcyjny *SNAI1* w komórkach mięsaka prądkowanokomórkowego (RMS); (ii) ocena wpływu *SNAI1* na rozwój RMS; (iii) opracowanie i optymalizacja sposobu różnicowania indukowalnych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSC) w kierunku komórek miogennych w celu stworzenia narzędzia



do dalszych badań nad rozwojem tego typu mięsaka oraz (iv) analiza komórek uzyskanych na drodze różnicowania.

Dla realizacji swoich ambitnych zamierzeń Doktorantka wykorzystwała wiele metod, w tym nowoczesne techniki biologii molekularnej i komórkowej, mikroskopię świetlną i cytometrię przepływową. Takie szerokie spektrum metodyczne zasługuje na uznanie. W *Materiałach i metodach* opisała pokrótce te wybrane przez siebie, odsyłając po więcej informacji do artykułów, gdzie opisy też są, niestety, bardzo lakoniczne. Muszę też skrytykować kalkę z języka angielskiego w odniesieniu do pożywki hodowlanej – Doktorantka używa słowa medium, które po polsku bardziej kojarzy się z seansem spirytystycznym niż z hodowlą komórek, a w liczbie mnogiej - ze środkami masowego przekazu.

W pierwszym z artykułów Doktorantka wykorzystwała trzy dostępne techniki regulacji ekspresji genów (TALEN, CRISPR/Cas9 i shRNA) w celu obniżenia poziomu ekspresji *SNAI1* w komórkach RMS, wykorzystując komercyjnie dostępną linię RH-30. Badania Doktorantki wykazały, że systemy CRISPR/Cas9 i TALEN mogą być wykorzystane do całkowitego zablokowania ekspresji *SNAI1*, acz ich zastosowanie może prowadzić do powstania mutacji w wyniku procesu naprawy DNA poprzez scalanie niehomologicznych końców DNA (NHEJ). Doktorantka słusznie postuluje, że dla właściwej interpretacji wyników powinno się analizować sekwencję DNA, a także ocenić ekspresję danego genu na poziomie transkryptu i białka. Jej badania wykazały, że wszystkie trzy zastosowane metody regulacji ekspresji *SNAI1* wywołały podobne efekty biologiczne metody, tzn. wzrost ekspresji genów zaangażowanych w regulację miogenezy (np. *MYOD*, *MYH2*, *MYOG* i *MEF2A*). Doktorantka zbadała również poziom deacetylaz histonów (*HDAC1* i *HDAC2*), które wraz ze *SNAI1* biorą m.in. udział w regulacji ekspresji genu kodującego E-kadherynę i wykazała tendencję spadkową, acz bez istotności statystycznej. Doktorantka wykazała również, że komórki RH-30 z obniżonym poziomem *SNAI1* są bardziej wydłużone, przyjmując kształt wrzeciona, co jest charakterystyczne dla wstępnych etapów różnicowania mioblastów. W tym cyklu doświadczeń zabrakło mi jednak wykazania, że modyfikowane przez Doktorantkę komórki są faktycznie w stanie różnicować w miotuby oraz ilościowej analizie tego procesu. Wysoko oceniam tę część badań, dostarczyły one nie tylko informacji o funkcji *SNAI1* w procesie miogenezy i rozwoju RMS, ale także cennych wskazówek metodycznych, które mogą być zaadoptowane do regulacji ekspresji innych genów.

W kolejnym artykule Doktorantka postanowiła dokonać analizy porównawczej trzech z wielu opisanych protokołów różnicowania komórek iPSC w celu zróżnicowania ich w komórki o potencjale miogennym. Jako materiał wyjściowy stanowiły komercyjnie dostępne iPSC wywodzące się z ludzkich fibroblastów. W toku dobrze zaprojektowanych badań Doktorantka wykazała, że wszystkie trzy sposoby uzyskania mioblastów były skuteczne, tzn. zaobserwowała właściwą dla różnicowania mioblastów kolejność ekspresji genów zaangażowanych w różnicowanie, fuzję mioblastów w wielojądrzaste struktury (niedojrzałe miotuby) oraz ekspresję genów kodujących ciężkie łańcuchy izoform miozyny: szybkiej (*MYH2*) i embrionalnej (*MYH3*). Badania Doktorantki wykazały natomiast, że to protokół III, oparty o hodowlę komórek w monowarstwie (a nie tworzenie ciałek embrionalnych, co miało miejsce w przypadku protokołów I i II) oraz aktywację szlaku WNT i zahamowanie aktywności szlaków TGF- $\beta$  i BMP, wydaje się być najbardziej wydajny. Wydajność ta znacznie wzrastała, gdy wydłużono czas różnicowania z 23 do 42 dni, aczkolwiek Doktorantka oparła swoje wnioski dotyczące wydłużenia czasu różnicowania jedynie na podstawie określenia poziomu ekspresji czynników miogennych, bez analizy morfometrycznej komórek. Zastanawiam się, dlaczego nie wykonała tych prostych analiz i liczę, iż przedstawi mi powód braku takiej analizy podczas obrony rozprawy. Ważną obserwacją jest też, że w przypadku protokołu III komórki syntetyzowały czynnik PAX7, także w trakcie wydłużenia czasu różnicowania, co świadczy o ich dużym potencjale miogennym. Ta obserwacja jest ważna z punktu widzenia możliwości wykorzystania mioblastów powstałych z iPSC w opracowaniu potencjalnych

terapii miopatii i uszkodzeń mięśni szkieletowych. Doktorantka zauważyła również, że antygen CD56, postulowany wcześniej jako marker do otrzymywania komórek progenitorowych z mięśni myszy, nie jest jednak dobrym markerem do oceny wydajności procesu różnicowania iPSC w komórki miogenne.

Przedstawienie rozprawy w postaci publikacji skutkuje brakiem tradycyjnej dyskusji, pozostają zatem odpowiednie podrozdziały w artykułach. Ich lektura wskazuje na znajomość problematyki badawczej, zdolność do konstruktywnej krytyki, także własnych obserwacji i wysnuwania właściwych wniosków, opartych o uzyskane wyniki, a nie spekulacje. Doktorantka sprawnie posługuje się warsztatem badawczym, opartym w dużej mierze o nowoczesne techniki. Wszystko to świadczy to o niewątpliwie o jej dojrzałości naukowej. Autorka wskazuje też na potencjalną aplikacyjność uzyskanych przez siebie wyników w terapii RMS i miopatii, pozostaje więc mieć nadzieję, że będzie mogła rozwijać swoje zainteresowania badawcze. Nie mogę zatem zrozumieć, dlaczego młoda adeptka nauki, z takim potencjałem badawczym, zlekceważyła poza-publikacyjne części rozprawy, które też przecież podlegają ocenie. Moje zdziwienie potęguje fakt, że strona edytorska obu artykułów, sposób przedstawienia wyników i opisy zamieszczonych rycin nie budzą zastrzeżeń.

### Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Ulman ma niewątpliwie charakter nowatorski i bardzo dużą wartość poznawczą. Dostarcza bowiem nie tylko nowych informacji o roli *SNAI1* w komórkach miogennych i rozwoju mięsaka prążkowanokomórkowego, ale również nowoczesnych narzędzi do badania procesu miogenezy, które w przyszłości mogą być wykorzystane w celach terapeutycznych. Wysoko oceniam część merytoryczną rozprawy i mam nadzieję, że moje uwagi krytyczne do polskojęzycznej części rozprawy pomogą Doktorantce w przygotowaniu artykułów i wygłaszaniu wykładów w ojczystym języku.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Aleksandry Ulman spełnia warunki kryteria stawiane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o nauce i szkolnictwie wyższym o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych wnioski o dopuszczenie mgr A. Ulman do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez nią stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Podpis jest prawidłowy

Dokument podpisany przez  Maria Jolanta Rędowicz  
Data: 2021.11.30 12:34:23 CET

**Maria Jolanta Rędowicz**