

Warszawa, 3 grudnia 2021 r.

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Ulman,**

pt. „Badanie wpływu genu *SNAIL1* na proces różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych do mięśni szkieletowych w kontekście rozwoju mięsaka prążkowanokomórkowego”

*(Study of SNAIL gene impact on differentiation of induced pluripotent stem cells into skeletal muscles in the context of rhabdomyosarcoma development)*

---

Szkoła Główna  
Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

Katedra Nauk  
Fizjologicznych

Instytut Medycyny  
Weterynaryjnej

ul. Nowoursynowska 159  
bud. 24, pok. 37,  
02-776 Warszawa  
+48 22 593 62 30  
+48 22 593 62 31  
knf@sggw.edu.pl  
www.sggw.edu.pl

Pani mgr Aleksandra Ulman zrealizowała pracę doktorską w Zakładzie Transplantologii, Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badania zostały wykonane oraz dysertacja doktorska przygotowana pod opieką promotora Pana prof. dr hab. Marcina Majki, a także promotora pomocniczego Pani dr Klaudii Skrzypek.

W przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej, jako jednotematyczny cykl publikacji wskazano dwa artykuły opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie *Cells* wydawanym przez MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute), znajdującym się w wykazie czasopism naukowych *Journal Citation Reports* oraz w wykazie Ministra Edukacji i Nauki (wykaz z dn. 1 grudnia 2021 r.).

Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu:

Ulman A, Skrzypek K, Konieczny P, Mussolino C, Cathomen T, Majka M.

Genome Editing of the *SNAIL* Gene in Rhabdomyosarcoma: A Novel Model for Studies of Its Role. *Cells*. 2020 Apr 28;9(5):1095. doi: 10.3390/cells9051095.

oraz

Ulman A, Kot M, Skrzypek K, Szewczyk B, Majka M. Myogenic Differentiation of iPS Cells Shows Different Efficiency in Simultaneous Comparison of Protocols. *Cells*. 2021 Jul 2;10(7):1671. doi: 10.3390/cells10071671.

Obie prace są pracami oryginalnymi, o powiązanej tematyce, a ich sumaryczny współczynnik wpływu (ang. *impact factor*) oraz punktacja wg listy ogłoszonej przez Ministra Edukacji i Nauki wynosi obecnie odpowiednio: 13,2 oraz 280 punktów. Doktorantka jest pierwszym autorem obu publikacji, a analiza oświadczeń współautorów pozwala stwierdzić, iż udział Pani mgr Aleksandry Ulman w każdej z nich jest znaczący i stanowi 65%.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Ulman badania dotyczyły ważnego problemu jakim jest zrozumienie mechanizmów powstawiania mięsaka prążkowanokomórkowego (ang. *rhabdomyosarcoma*, RMS). Wykazujący cechy komórek mięśniowych, mięsak prążkowanokomórkowy jest najczęstszym nowotworem tkanek miękkich u dzieci, który powstaje w wyniku zaburzeń różnicowania miogennej komórek macierzystych lub progenitorowych. Z badań własnych zespołu promotora Doktorantki Pana prof. dr hab. Marcina Majki wynika, iż gen *SNAIL* charakteryzuje się podwyższoną ekspresją w guzach pozyskanych od pacjentów oraz w przypadku linii komórkowych typu pęcherzykowego mięsaka prążkowanokomórkowego – postaci najbardziej agresywnej, w porównaniu do typu zarodkowego, a zmniejszenie poziomu ekspresji *SNAIL*, w przypadku postaci pęcherzykowej RMS prowadzi do obniżenia potencjału proliferacyjnego komórek oraz do wejścia na drogę różnicowania miogennej.

W pierwszym artykule wchodzącym w skład jednotematycznego cyklu publikacji zatytułowanym „Genome Editing of the *SNAIL* Gene in Rhabdomyosarcoma: A Novel Model for Studies of Its Role” opisano badania, w których Doktorantka podjęła próbę zoptymalizowania trzech metod całkowitej inaktywacji lub wyciszenia ekspresji genu *SNAIL* w komórkach mięsaka prążkowanokomórkowego – linii RH30, metodami: TALEN (ang. *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*), CISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*)

oraz shRNA (ang. *short hairpin RNA*), w celu porównania ich efektywności oraz możliwości użycia, jako narzędzia do dalszych badań prowadzonych przez zespół promotora Pana prof. dr hab. Marcina Majki. Doktorantka zaprojektowała i wprowadziła do komórek linii mięsaka prążkowanokomórkowego (RH30) każdy ze wskazanych powyżej systemów, a także shRNA. Efekty ich działania Doktorantka potwierdziła analizując sekwencję genu *SNAIL* oraz jego ekspresję na poziomie transkryptu i białka. Autorka wykazała wpływ inaktywacji lub wyciszenia genu na istotne statystycznie zmiany ekspresji czynników regulujących proces miogenezy, na obniżenie poziomu deacetylazy histonowej (tendencja), a także morfologię komórek, które były najbardziej widoczne w komórkach, w przypadku których zastosowano wyciszenie przy pomocy interferencyjnego RNA shSNAIL. Pozostałe systemy okazały się również skuteczne, ale wykazywały mniejszą wydajność. Przeprowadzone badania pozwoliły na stworzenie modelu, który będzie stanowił podstawę do dalszych eksperymentów nad identyfikacją mechanizmu działania SNAIL.

Drugi artykuł włączony do jednotematycznego cyklu pt. „Myogenic Differentiation of iPS Cells Shows Different Efficiency in Simultaneous Comparison of Protocols” dotyczy badań Doktorantki mających na celu zastosowanie indukowanych pluripotentnych komórek (iPS, ang. *induced pluripotent stem cells*) w celu ich miogenicznego różnicowania, a następnie wykorzystania w badaniach zespołu nad rolą SNAIL oraz innych czynników w transformacji nowotworowej, w tym powstawaniu mięsaka prążkowanokomórkowego. Doktorantka, korzystając z danych literaturowych, wybrała i zastosowała trzy protokoły pozwalające na różnicowanie komórek iPS oraz przeprowadziła szczegółową charakterystykę uzyskanych komórek. Zastosowano protokoły oparte na: I) tworzeniu ciałek embrionalnych; II) suplementacji insuliną, transferyną oraz selenem (ITS, ang. *Insulin-Transferrin-Selenium*); oraz III) adhezji komórek do kolagenu typu I. Weryfikacja uzyskanych wyników opierała się na analizie ekspresji miogennych czynników regulatorowych, ekspresji ciężkich łańcuchów miozyny, analizie cytometrycznej obecności białek powierzchniowych CD10, CD24 i CD56, a także zdolności komórek do fuzji oraz obecności wimentyny – markera przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki potwierdzają skuteczność wszystkich trzech protokołów, wskazując jako najbardziej wydajny protokół wykorzystujący adhezję komórek do kolagenu I (III), co może być związane z wykazaną istotnie wyższą ekspresją mięśniowych czynników regulatorowych. Badania prowadzone przez Panią mgr Aleksandrę Ulman poddały w wątpliwość zastosowanie markera CD56, jako wskaźnika miogennego różnicowania komórek, w zastosowanych modelach doświadczalnych.

Wskazane powyżej artykuły zostały już ocenione przez recenzentów i opublikowane na łamach czasopisma naukowego Cells MDPI. Przyłączam się do ich pozytywnej opinii o pracach włączonych przez mgr Aleksandrę Ulman do jednotematycznego cyklu prac stanowiących dysertację doktorską. Jak wcześniej wspomniano, doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich załączonych prac. Oświadczenia pozostałych autorów wskazują na zasadniczy wkład Doktorantki (65%) w zaplanowanie i realizację badań, interpretację wyników i przygotowanie manuskryptów prac.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej zachowano układ charakterystyczny dla opracowań naukowych. W pierwszej części praca Doktorantka zawarła spis treści, informację o publikacjach wchodzących w skład jednotematycznego cyklu, wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi oraz wykaz skrótów. Właściwa część pracy rozpoczyna się wstępem, w którym Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę dysertacji doktorskiej. Następnie Autorka wskazuje cele pracy, najważniejsze materiały i metody użyte podczas realizacji badań oraz wybrane piśmiennictwo, które w mojej opinii powinna być zamieszczone pod koniec pracy. Streszczenia obu artykułów zarówno w języku polskim, jak i angielskim poprzedzają wnioski i podsumowanie. Ta część manuskryptu uzupełnia i streszcza treść publikacji zawartych w rozprawie. Jako załączniki, Doktorantka dołączyła do pracy publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu publikacji, wraz z oświadczeniami współautorów. Wstęp do niniejszej rozprawy oraz do obu załączonych artykułów, a także opis metodyki, świadczą o dobrej znajomości literatury, jak i warsztatu metodycznego specyficznych dla tematyki badawczej Doktorantki. Utrudnieniem w śledzeniu dyskutowanych w obu artykułach wyników jest brak bezpośrednich odnośników do rycin i tabel zamieszczonych w wynikach. Badania zostały prawidłowo zaplanowane przez Doktorantkę, a uzyskane dane eksperymentalne zostały poddane odpowiednim analizom statystycznym i bioinformatycznym, zgodnie ze standardami przyjętymi w tego typu badaniach. Przedstawione wyniki są oryginalne i stanowią cenne źródło informacji dla przyszłych badań zarówno podstawowych, jak i stosowanych, pozwolą na wzbogacenie metodyki zespołu, umożliwią dalszą eksplorację tego istotnego problemu jakim jest rola SNAI1 w rozwoju mięsaka prądkowanokomórkowego. Przedstawione wnioski dobrze podsumowują uzyskane wyniki oraz ich dyskusję w świetle dostępnej literatury naukowej, wskazując na najważniejsze osiągnięcia Doktorantki.

Warto podkreślić, iż Doktorantka w latach 2018-2019 odbyła roczny staż naukowy w University of Virginia w Charlottesville, USA, którego efektem jest współautorstwo pracy naukowej pt. „UTX condensation underlies its tumour-suppressive activity”, opublikowanej przez Shi i wsp. w 2021 roku w czasopiśmie Nature, o imponującym współczynniku wpływu IF= 49,962. Obecny, sumaryczny współczynnik wpływu doktorantki wynosi IF=73,78.

W podsumowaniu mojej recenzji stwierdzam, iż uzyskane wyniki mają charakter nowatorski, przyczyniają się do lepszego poznania mechanizmów działania *SNAIL* oraz metod różnicowania iPS w kierunku komórek miogennych, przez co stanowią wartościowy materiał w perspektywie dalszych badań. Wymienione powyżej uwagi i komentarze nie umniejszają wartości naukowej wykonanej pracy oraz wyników przedstawionych przez Doktorantkę.

Mając na uwadze powyższe stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Aleksandry Ulman pt. „Badanie wpływu genu *SNAIL* na proces różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych do mięśni szkieletowych w kontekście rozwoju mięsaka prądkowanokomórkowego (*Study of SNAIL gene impact on differentiation of induced pluripotent stem cells into skeletal muscles in the context of rhabdomyosarcoma development*)” spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2021 poz. 478 z późn. zm.) oraz wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Ulman do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Dr hab. Tomasz Sadkowski