

Kraków, 28.08.2023 r.



OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
PANI MGR VOLHY DZIANISAVA ZATYTUŁOWANEJ:
„Opracowanie strategii terapii genowej progerii Hutchinsona-Gilforda”

Progeria Hutchinsona-Gilforda (HGPS, ang. *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*) to rzadka, uwarunkowana genetycznie choroba, która charakteryzuje się przedwczesnym procesem starzenia, w tym postępującą miażdżycą naczyń krwionośnych czy nieprawidłowościami w funkcjonowaniu nerek i innych narządów. Choć minęło już 20 lat od opisanie molekularnego podłoża choroby i identyfikacji mutacji w genie *LMNA*, co prowadzi do produkcji progeryny, skróconej formy białka otoczki jądrowej - laminy A, choroba do tej pory jest nieuleczalna. Leczenie HGPS zakłada wykorzystanie środków farmakologicznych, niespecyficznie obniżających poziom niepożądanego białka, albo terapii genowych, mających na celu zahamowanie syntezy progeryny.

Mgr Volha Dzianisava skupiła się na wykorzystaniu drugiej strategii i postanowiła wykorzystać możliwości biologii molekularnej w celu zaprojektowania i sprawdzenia działania małych interferujących RNA specyficznie rozpoznających mRNA progeryny i powodujących obniżenie poziomu progeryny, ale nie laminy A. Badania te zrealizowała w Pracowni Białek Jądrowych Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem promotora, Pana prof. dr hab. Ryszarda Rzepeckiego oraz promotora pomocniczego, Pani dr Katarzyny Piekarowicz.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania formalne. Jest podzielona na klasyczne rozdziały, napisana w języku polskim, prawidłowo sformatowana i starannie opracowana. Na 186 stronach zamieszczono kolejno: Streszczenie i angielskojęzyczny Abstract, Wykaz skrótów, Wstęp teoretyczny, Założenia i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję i Podsumowanie. Pracę kończą Spisy tabel i rycin, Bibliografia a także Lista osiągnięć Doktorantki.

Praca zawiera nieliczne błędy językowe/stylistyczne/literowe, np.:

- Str. 12. Pierwsza próba hodowli *in vitro* fibroblastów uzyskanych od dawców z HGPS należy do 1969 roku.

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

- Str. 22. Biorąc pod uwagę ten fakt, że obniżenie poziomu progeryny lub farnezylowanej prelaminy A odwraca oznaki starzenia komórkowego, można zrobić wnioski o tym, że akumulacja progeryny jest jednym z czynników indukujących procesy starzenia.

- Str. 35. Jednocześnie nie przedstawiono danych odnośnie odporności tak zmodyfikowanych oligonukleotydów na działanie rybonukleaz.

- Ponadto, zastanawia mnie, dlaczego wybrane skróty w **Wykazie skrótów** mają zarówno polską nazwę jak i tłumaczenie w języku angielskim a dla niektórych podano jedynie nazwę w języku polskim.

Pomimo tych (wskazanych tu jedynie z obowiązku Recenzenta) i innych pomyłek językowych, pracę pod względem edytorskim oceniam wysoko – jest starannie przygotowana, ryciny są czytelne, tabele dobrze opisane. Pracę czyta się bardzo dobrze.

Ocena merytoryczna rozprawy

Mgr Volha Dzianisava postawiła sobie za cel opracowanie strategii terapii genetycznej progerii Hutchinsona-Gilforda, podjęła się więc ważnego i trudnego zadania. W swojej pracy laboratoryjnej przeprowadziła szereg kolejnych etapów optymalizacji transfekcji komórek specyficznymi siRNA targetującymi progerynę i weryfikowała wyniki tych analiz stosując różne metody biologii molekularnej, m.in. wykorzystywała cytometrię przepływową, wykonywała barwienia immunofluorescencyjne, badała ekspresję genów i białek z użyciem (odpowiednio) metody PCR w czasie rzeczywistym i Western blot.

Zanim jednak opisała wyniki doświadczeń, bardzo dobrze wprowadziła w temat badanej choroby i możliwości jej leczenia. We **Wstępie**, liczącym 41 strony, zobrazowanym aż 10 rycinami, Doktorantka skupiła się na opisie HGPS, opisała główne modele komórkowe i zwierzęce do jej badania oraz przedstawiła potencjalne możliwości terapeutyczne. W drugiej części Wstępu skoncentrowała się na przybliżeniu możliwości modyfikacji nukleotydów w terapii genowej a na koniec, w Rozdziale 1.6, opisała zastosowanie oligonukleotydów w terapiach chorób genetycznych. Ten ostatni rozdział jest w mojej opinii zbyt obszerny, pewne zawarte tam informacje, biorąc pod uwagę temat rozprawy można ograniczyć.

Wstęp czyta się dobrze i uważam, że świetnie wprowadza czytelnika do lektury dalszych części rozprawy. Do tej części pracy mam następujące pytanie/komentarze:

1. Opisując różne modele badawcze, Doktorantka dość pobieżnie przedstawiła możliwości wykorzystania technologii indukowanych komórek pluripotencjalnych, (iPSC) do modelowania progerii i nie wspomniała o niewątpliwiej zalecie jaką jest



Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

stosowanie linii izogenicznych. Chętnie wysłucham opinii Doktorantki na ten temat podczas obrony pracy. Ciekawa jestem czy są opublikowane prace doświadczalne z użyciem takiego modelu. W bazie PubMed znajdują się prace opisujące wykorzystanie komórek iPSC różnicowanych do komórek śródbłonka czy kardiomiocytów i ich zastosowania w badaniach nad HGPS (np. DOI: 10.3389/fphys.2022.1007418; DOI: 10.3389/fphys.2022.1007418), ale akurat w tych publikacjach nie wykorzystywano linii izogenicznych. Czy Doktorantka zna prace, w których do modelowania progerii użyto właśnie linii izogenicznych?

2. Na Ryc. 1.2. – nie wytłumaczono co oznacza skrót CSIM a w legendzie Ryc. 1.7 warto byłoby podać co oznacza skrót MOE.
3. Na str. 42 Doktorantka pisze o aptomerze, zamiast o aptamerze. Dalej na tej samej stronie wspomina o PEG czyli raczej o glikolu polietylenowym a nie polimerze polietylenglikolowym.
4. Chciałabym zwrócić również uwagę, że zapis „Nrf2” biorąc pod uwagę właściwą nomenklaturę nie jest poprawny – skrót białka powinien być pisany wielkimi literami (NRF2).

W dalszej części pracy Doktorantka przedstawiła główne **Założenia** i sformułowała **Cel** swojej rozprawy doktorskiej. Jak już napisano powyżej, głównym zadaniem było opracowanie strategii terapii genowej progerii Hutchinsona-Gilforda. Doktorantka pisze, że „Do osiągnięcia celu niniejszej pracy jako lek genetyczny wybrano siRNA” (str. 51). W mojej opinii, zdanie to nie jest do końca poprawne. siRNA to raczej metoda a nie lek.

Rozdział **Materiały i Metody** zawiera szczegółowe opisy przeprowadzonych eksperymentów. Na pochwałę zasługuje fakt, że dokładnie określono zaangażowanie innych osób w przeprowadzone doświadczenia, np. uzyskanie sublinii HeLa z nadprodukcją GFP, GFP-laminy A i GFP-progeryny oraz ich sortowanie. Autorka podała dane dotyczące wszystkich odczynników, w tym przedstawiła ich numery katalogowe, co jest bardzo cenne, szczególnie dla osób, które chciałyby powtórzyć wykonane doświadczenia.

Mam kilka sugestii do tej, starannie opracowanej, części rozprawy:

1. Skróttem myślowym jest zapis na str. 55 – „Do uzyskania sublinii HeLa z nadprodukcją GFP, GFP-laminy A i GFP-progeryny komórki były transdukowane retrowirusem”. Jak rozumiem, Autorka miała na myśli wektor retrowirusowy a nie *strice* wirus.



Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6412
fax. +48 12 664 6918
agnieszka.loboda@uj.edu.pl
<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

2. Str. 55 – przy opisie warunków hodowli linii komórkowych, Doktorantka pisze o dodawaniu 1% mieszaniny antybiotyków (zapewne chodzi o ampicylinę i penicylinę ale nie podano dokładnie); sugeruję podawać wartości antybiotyków w jednostkach/stężeniach a nie w procentach.
3. Przy opisie pozyskania komórek fibroblastów pacjentów z HGPS, Autorka powieła pełną nazwę Fundacji na Rzecz Badań Progerii, zamiast stosować wprowadzony w pracy skrót PRF.
4. Mgr Dzianisava pisze, że badała czy komórki nie są zakażone mykoplazmą, ale stosowała w tym celu jedynie barwienie DAPI, co nie jest specyficzną metodą, obawiam się też, że takie badanie należy wykonywać nie tylko przy pierwszym rozmrożeniu komórek ale systematycznie w trakcie ich hodowli.
5. Zastanawia mnie czy prawidłowo zapisano nazwy w 1 kolumnie w tabeli 3.2. a także później, np. w sekcji wyniki (zapis siRNA Prog1/prog1 etc).
6. Szkoda, że przy opisie odczynników do analizy western blot nie podano spodziewanych mas np. białek fuzyjnych, identyfikowanych w kolejnym rozdziale.
7. Doktorantka używa sformułowania „leki drobnocząsteczkowe”/„leki genetyczne”. Biorąc pod uwagę, fakt, że stosuje m.in. sulforafan, i prowadzi analizy *in vitro* lepszym sformułowaniem w mojej opinii wydaje się być określenie „związki drobnocząsteczkowe”.
8. Opis transfekcji na str. 62-63 byłby bardziej czytelny, gdyby główne parametry zestawiono w tabeli.
9. Zastanawia mnie dlaczego, tak jak napisano na str. 66 – „Żele poliakrylamidowe przygotowywano 1-5 dni przez elektroforezą”. Z czego wynika fakt przygotowania żelu na 5 dni przed planowanym rozdziałem elektroforetycznym?
10. Str. 67 – z opisu przygotowania próbek do analizy Western Blot wynika, że nie mierzono stężenia białka, ale lizowano określoną liczbę komórek i taki lizat wykorzystywano w dalszych etapach procedury. Nie jest to (chyba) powszechny sposób przygotowania próbek – z czego wynika takie podejście?
11. W tej części Doktorantka nadużywa słowa „analiza/analizować” (dla przykładu, na str. 64 użyto go 9 razy). Warto stosować zamienne wyrażenia.
12. W opisie procedur zdarzają się niefortunne sformułowania, jak np. „mieszano mieszaniny ze sobą z użyciem vortex”
13. Prawidłowa nazwa firmy to Sigma-Aldrich a nie Sigma.



Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

Zakres metod opanowanych przez Doktorantkę wskazuje na jej duże zaangażowanie w pracę laboratoryjną. Mgr Dzianisava biele posługuje się różnymi technikami biologii molekularnej, a biorąc pod uwagę specyfikę przeprowadzonych analiz, należy podkreślić, że musiała spędzić długie godziny pod laminarem, wykonując kolejne etapy optymalizacji protokołu prowadzącego do wydajnego obniżenia poziomu progeryny w badanych komórkach.

Rozdział **Wyniki** jest obszerny, zawiera aż 49 rycin i 14 tabel, z danymi liczbowymi do odpowiednich rycin. Doktorantka w logiczny sposób przedstawiła kolejne etapy doświadczeń i dobrze je opisała. Wiele z przeprowadzonych analiz nie dało pozytywnych wyników, ale ich rezultaty skłaniały mgr Dzianisavę do kolejnych testów. W pierwszym etapie badań, Doktorantka scharakteryzowała używany model komórkowy, tj. linię komórkową HeLa, zmodyfikowaną poprzez wprowadzenie plazmidów kodujących GFP, GFP-laminę A lub GFP-progerynę a następnie opisała badania nad projektowaniem siRNA specyficznie rozpoznających mRNA progeryny. Nie było to łatwe zadanie, ze względu na identyczność fragmentów eksonu 11 i 12 mRNA laminy A i progeryny, co może prowadzić do potencjalnego oddziaływania siRNA z mRNA laminy A.

Autorka przetestowała kilkanaście sekwencji siRNA targetujących progerynę oraz sekwencję kontrolną (scrambled). Badała różne ilości/stężenia siRNA i sprawdzała wydajność kilku odczynników transfekcyjnych. Wyniki zmian intensywności fluorescencji pokazane na Ryc. 4.15 wskazują, że najlepiej działającymi i specyficznymi wobec mRNA GFP-progeryny były (nazwane przez Doktorantkę) siRNA prog5 i prog6, co zostało również potwierdzone w dalszych analizach metodą Western blot poziomu GFP-progeryny. Dobrze działającymi okazały się także siRNA prog9, prog12 i prog14, w związku z czym do dalszych analiz wyselekcjonowano powyższe 5 sekwencji jako najbardziej efektywne i specyficzne wobec mRNA progeryny. W kolejnym etapie badań mgr Dzianisava określiła jak na komórki HeLa z nadprodukcją GFP-progeryny zadziałają wyselekcjonowane związki małowcząsteczkowe - sulforafan (SFN), rapamycyna, lonafarnib i ATRA. Celem tych doświadczeń był wybór najefektywniejszego związku obniżającego poziom progeryny, który mógłby być zastosowany razem z testowanymi wcześniej siRNA. Związkiem tym okazał się być lonafarnib – *nota bene* jedyny klinicznie stosowany lek w terapii progerii. Po przeprowadzeniu testów optymalizacyjnych, właściwe doświadczenie wykazało, iż zastosowanie kombinacji lonafarnibu i siRNA prog6 działa addytywnie. Ostatnim etapem badań było sprawdzenie, czy na efekt wyciszenia ekspresji progeryny wpłynie zastosowanie modyfikowanych siRNA. Doktorantka postawiła hipotezę, że siRNA zawierające atom fluoru



Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6412

fax. +48 12 664 6918

agnieszka.loboda@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

lub grupę metoksyłową w pozycji 2' rybozy zwiększy ich odporność na degradację enzymatyczną. Zauważyła różnicowany wpływ modyfikacji na stabilność i efektywność rozpoznawania docelowego transkryptu. Ostatnie eksperymenty przeprowadzone zostały z wykorzystaniem fibroblastów od dawców z progerią. Wyniki pierwszych eksperymentów mających na celu wyciszenie ekspresji progeryny nie były zadowalające, w związku z czym Doktorantka zmodyfikowała protokół transfekcji. Dzięki dwukrotnej transfekcji niskimi dawkami siRNA w odstępie tygodnia mgr Dżianisawa uzyskała satysfakcjonujące wyniki, tj. obniżenie poziomu progeryny poniżej 20% jej wyjściowego poziomu.

Po analizie rozdziału Wyniki, proszę o doprecyzowanie następujących zagadnień:

1. Na Ryc. 4.8 pokazano, że w przypadku siRNA znakowanych Cy3 nie obserwowano spadku poziomu laminy A i C zarówno po 3, jak i 6 dniach po transfekcji ale uzyskano bardzo wydajne obniżenie po zastosowaniu nieznakowanego siRNA lamina A/C i lipofektaminy po 3 dniach. Czy przeprowadzono równocześnie analizę z nieznakowanym siRNA po dłuższym czasie, tj. po 6 dniach? Czy efekt wyciszenia się utrzymywał?
2. Sprawdzenie różnych stężeń siRNA lamina A/C i lipofektaminy pokazane na Ryc. 4.9 wskazuje, że już 15 nM stężenia działa bardzo wydajnie. Pytanie podobne jak powyżej – jak długo ten efekt się utrzymuje?

Podsumowując, należy stwierdzić, że wszystkie przeprowadzone analizy koncentrowały się na ustaleniu najlepszych parametrów procesu transfekcji i zoptymalizowaniu użytych siRNA w celu obniżenia poziomu progeryny. Zdaję sobie sprawę z ogromu pracy włożonej w te badania, jednak muszę wskazać na fakt, że (spora) część eksperymentów była wykonana tylko jednokrotnie, niektóre wykresy nie zawierają odchyłek standardowych ($n=1$). Wyciąganie wniosków z takich analiz może być obciążone dużym błędem (np. Ryc. 4.11 – Autorka konkluduje, że uzyskano znaczne obniżenie intensywności fluorescencji – nie jestem przekonana do stwierdzenia, że widać to dla siRNA progH3, w porównaniu do sekwencji scrambled, wyciągniętego z jednego powtórzenia). Zauważyłam, że Tabela 4.6. nie przedstawia, tak jak opisano, danych liczbowych dla wykresu na Rycinie 4.27A a jest zduplikowaniem Tabeli 4.1. Szkoda, że doświadczenia zostały wykonane jedynie w modelach komórkowych. Doktorantka zdaje sobie sprawę z tego ograniczenia i w **Dyskusji** nakreśla plan dalszych eksperymentów *in vivo* w mysim modelu zawierającym kopię ludzkiego genu *LMNA*^{G608G}. Należy podkreślić, że rozdział Dyskusja jest dobrze napisany, Doktorantka swobodnie interpretuje swoje wyniki,



Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6412
fax. +48 12 664 6918
agnieszka.loboda@uj.edu.pl
<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>

analizując je i porównując z danymi literaturowymi. Cytuje wiele nowych i najnowszych publikacji. Mała uwaga edytorska do tej części rozprawy dotyczy odwoływania się do konkretnych rycin z sekcji Wyniki - nie jest to błąd, ale w pracach naukowych raczej nie stosuje się takiego podejścia.



Podsumowanie

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego planowania, wykonania i opracowania rezultatów swojej pracy naukowej. Pani mgr Volha Dzianisava uzyskała wyniki, które mogą stać się podwaliną do przeprowadzenia dalszych doświadczeń, w tym kluczowych badań w modelu *in vivo* progerii Hutchinsona-Gilforda.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i stanowi dowód na posiadaną przez Doktorantkę wiedzę teoretyczną i praktyczną znajomość technik metod biologii molekularnej niezbędnych do prowadzenia pracy badawczej.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Volhy Dzianisavy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Agnieszka Łoboda

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

Prof. dr hab. Agnieszka Łoboda

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6412
fax. +48 12 664 6918
agnieszka.loboda@uj.edu.pl
<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm>