

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**Pani mgr Volhy Dzianisavy**  
**pt. „Opracowanie strategii terapii genowej**  
**progerii Hutchinsona-Gilforda”**

Choroby genetyczne należą z jednej strony do schorzeń o skomplikowanych mechanizmach i zazwyczaj ciężkim przebiegu klinicznym, a z drugiej strony niezwykle trudnych do leczenia. Złożone mechanizmy molekularne dotyczą zarówno chorób wielogenowych jak też tych spowodowanych mutacjami w pojedynczych genach, ze względu na skomplikowane sieci powiązań strukturalno-funkcjonalnych makrocząsteczek występujących w komórkach. Trudności w opracowaniu skutecznych terapii chorób genetycznych wynikają głównie z faktu, że zmienione są wszystkie komórki w organizmie, a defekty funkcjonalne wynikają nie z pojawiania się patologicznych czynników zewnętrznych (które można by na różne sposoby eliminować) ale z wewnętrznych cech materiału genetycznego pacjentów. Chorób genetycznych dla których wprowadzono specyficzne terapie jest bardzo niewiele, co w świetle tego, że schorzeń z tej grupy znanych jest ponad 20 tysięcy, w tym ponad 7 tysięcy chorób jednogenowych wskazuje na złożoność i poziom komplikacji zagadnienia. Wobec takiej skali problemów, opracowanie nowych terapii w celu zniwelowania efektów genetycznych nieprawidłowości w komórkach wymaga działań nie tylko lekarzy, ale przede wszystkim specjalistów z zakresu genetyki i biologii molekularnej oraz biotechnologii.

Rozprawa doktorska Pani mgr Volhy Dzianisavy dotyczy prób opracowania specyficznej terapii progerii Hutchinsona-Gilforda. Schorzenie to wywołane jest specyficzną mutacją w genie *LMNA*, skutkującą nieprawidłowym splicingiem

transkryptu tego genu i pojawieniem się nieprawidłowej formy laminy A, zwanej w tym przypadku progeryną. Mutacja ta ma charakter dominujący, co powoduje, że znalezienie skutecznego leku jest tym bardziej trudne. Doktorantka jako strategię terapeutyczną wybrała użycie małych interferujących RNA, które specyficznie rozpoznają mRNA kodujące progerynę i powodują w efekcie obniżenie poziomu tego białka. Było to zadanie bardzo ambitne, a z drugiej strony trudne, szczególnie zważywszy na konieczność utrzymania odpowiedniego poziomu prawidłowej laminy A w komórce w celu uniknięcia poważnych efektów niepożądanych.

Pani mgr Volha Dzianisava złożyła rozprawę doktorską w formie tradycyjnego manuskryptu, który przygotowany jest w konwencji standardowej dla tego typu dysertacji z zakresu nauk biologicznych. W części wstępnej Doktorantka opisała progerię Hutchinsona-Gilforda oraz modele badawcze stosowane w pracach nad tą chorobą, a następnie przedstawiła strategię terapii genowej, ze szczególnym uwzględnieniem procedur opartych na zastosowaniu antysensownych oligonukleotydów. Nieco zbyt ogólnie potraktowany jest opis samej choroby, jej mechanizmów, a w szczególności efektów klinicznych. Niemniej można zwrócić uwagę, że przedstawiona rozprawa została złożona w ramach procedury zmierzającej do nadania stopnia doktora nauk biologicznych, zatem mało szczegółowy opis symptomów choroby można w tym przypadku uznać za wystarczający. Uważam w takim razie, że tak przedstawiony wstęp potwierdza ogólną wiedzę Doktorantki w zakresie tematyki prowadzonej przez nią badań. Opis materiałów i metod jest szczegółowy, pozwalający na zrozumienie szczegółów technicznych przeprowadzonych doświadczeń oraz ich ewentualne powtórzenie.

Jako głównego modelu badawczego Doktorantka użyła linii komórek HeLa nadprodukcujących białka fuzyjne: GFP-progerynę, GFP-laminę A oraz GFP. Celem szczegółowym pracy było opracowanie i optymalizacja potencjalnej terapii z wykorzystaniem małych interferujących cząsteczek RNA, selektywnie rozpoznających mRNA progeryny i prowadzących do jego degradacji. Skutkować to powinno obniżeniem poziomu progeryny w komórkach. Pani mgr Volha Dzianisava zaprojektowała i scharakteryzowała wiele wariantów RNA, o różnych sekwencjach nukleotydowych. Celem tych analiz by wybór najbardziej efektywnych i

specyficznym oligonukleotydów, które w efekcie powodują istotne zmniejszenie poziomu progeryny, pozostawiając niezmienny poziom właściwej laminy A.

Po wyselekcjonowaniu oligonukleotydów o najlepszych z punktu widzenia przyszłej terapii właściwościach, Pani mgr Volha Dzianisava zbadła efektywność terapii łączonej, przy zastosowaniu wybranych oligonukleotydów oraz różnych związków, które wcześniej były stosowane lub rozważane do zastosowania w terapii progerii. Najbardziej zachęcające wyniki Doktorantka uzyskała w przypadku kombinacji jednego z oligonukleotydów oraz lonafarnibu, leku już stosowanego w leczeniu progerii, który działa jako inhibitor procesu farnezytacji.

W celu zwiększenia stabilności oligonukleotydów, poddane one zostały modyfikacjom chemicznym. Takie manipulacje okazały się skuteczne w przypadku jednego rodzaju modyfikacji, który jednocześnie nie wpływał znacząco na aktywność biologiczną cząsteczek RNA. W ostatnim etapie pracy, Doktorantka wykazała, że testowane oligonukleotydy są aktywne nie tylko w modelu opartym na modyfikowanych komórkach HeLa lecz także w fibroblastach pochodzących od pacjentów cierpiących na progerię.

Uzyskane przez Panią mgr Volhę Dzianisavę wyniki są obiecującym punktem wyjścia do dalszych prac nad opracowaniem specyficznej terapii progerii Hutchinsona-Gilforda. Są one dojrzałe omówione w rozdziale pt. „Dyskusja”, aczkolwiek w rozdziale tym znajduje się nieco zbyt dużo powtórzeń opisów rezultatów, które wcześniej przedstawiono w rozdziale pt. „Wyniki”. Niemniej całość pracy jasno wskazuje, że Pani mgr Volha Dzianisava potrafi prowadzić samodzielnie badania naukowe oraz rozwiązać problem naukowy.

W trakcie szczegółowej lektury rozprawy doktorskiej Pani mgr Volhy Dzianisavy nasunęły mi się różne uwagi, wątpliwości i pytania, które przedstawiam poniżej (poproszę Doktorantkę o odpowiedzi podczas obrony rozprawy doktorskiej na te z punktów, które są dyskusyjne):

1. W pracy występuje stosunkowo duża liczba błędów literowych i innych drobnych błędów pisarskich.
2. W Tabeli 1.1 (str. 23) podano, że rapamycyna zwiększa aktywność proteasomalną. Z dostępnych danych literaturowych wynika, że głównym efektem działania rapamycyny jest stymulacja procesu

- autofagii (w wyniku hamowania aktywności kinazy mTOR), a nie aktywacja proteasomu.
3. Str. 30 – sformułowanie „wydłużenie długości życia” jest niezręczne; lepiej byłoby napisać „wydłużenie życia”.
  4. Str. 55 – Zbiory linii komórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN nie są pierwotnym źródłem komórek HeLa. W opisach materiałów należy podawać także oryginalne źródło lub odnośnik literaturowy.
  5. Na str. 62 podana jest informacja, że „hodowla komórek była prowadzona zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej”. Czy faktycznie przestrzegane były zasady dobrej praktyki laboratoryjnej (ang. *Good Laboratory Practice*) zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 4 czerwca 2003 roku w sprawie kryteriów, które powinny spełniać jednostki organizacyjne wykonujące badania substancji i preparatów chemicznych, oraz kontroli spełnienia tych kryteriów (Dz.U. z 2003 r. nr 116, poz. 1103)? Jeśli tak, to czy faktycznie było konieczne przestrzeganie tak rygorystycznych przepisów w trakcie wykonywania tych badań?
  6. W opisie niektórych doświadczeń, np. zaprezentowanych na Rycinie 4.13, 4.14 i innych, wskazano  $n=1$ , zatem eksperyment został wykonany tylko raz. Proszę o komentarz Doktorantki na temat jej opinii o wiarygodności wyników doświadczeń wykonanych zaledwie jednokrotnie.
  7. Str. 93, 123, 141 i 147 w opisach i analizie wyników wskazano na wzrost albo obniżenie wielkości badanych parametrów, mimo braku istotności statystycznej różnic wartości w stosunku do doświadczeń kontrolnych. Mam odmienne zdanie odnośnie do takiej interpretacji wyników. Brak statystycznie istotnych różnic wskazuje na to, że zmierzone różne wartości danych parametrów odpowiadają jedynie przypadkowej fluktuacji wartości, wynikającej z istnienia losowych zmian. Nie można zatem mówić w takim przypadku o wzroście lub obniżeniu wielkości mierzonego parametru pod wpływem badanego czynnika, a raczej

- powinno się wskazywać na brak różnic w stosunku do warunków kontrolnych. Proszę Doktorantkę o komentarz i stwierdzenie czy zgadza się z taką interpretacją, a jeśli nie, to dlaczego.
8. Str. 94 i 147 – Określenia „lub/oraz” a także „i/lub” nie mają w języku polskim logicznego sensu. Określenie „oraz” tak samo jak „i” mieści się już w znaczeniu słowa „lub”, zatem aby zachować logikę zdania i wyrazić to, że dana cecha dotyczy jednego z wymienionych czynników bądź obu, należało użyć słowa „lub” (koniunkcji nierozłącznej).
  9. Str. 96 – Doktorantka pisze: „Brak istotnych statystycznie różnic wynika z istoty metody western blot”. Następnie na str. 147 czytamy: „Brak istotnych statystycznie różnic analizy densytometrycznej poziomu GFP-progeryny dla niektórych siRNA wynika z dużego zróżnicowania wyników i jest spowodowany kumulacją błędów przypadkowych występujących na różnych etapach analizy western blot, które są niemożliwe do eliminacji”. Uważam, że jest to zbyt daleko posunięta interpretacja wyników. Co prawda może tak być, jak napisała Doktorantka, ale można sobie również wyobrazić przynajmniej kilka innych przyczyn uzyskania takich wyników. Należało zatem przedstawić powyższe twierdzenia nie jako wnioski, ale jako jedne z możliwych hipotez.
  10. Nie zgadzam się z interpretacją wyników przedstawionych na str. 98, wyrażonych następująco: „Podsumowując można wnioskować o wysokiej specyficzności analizowanych siRNA wobec mRNA GFP-progeryny...”. Z rezultatów przedstawionych na Ryc. 4.18 wynika, że taka interpretacja jest możliwa tylko w przypadku siRNA oznaczonego jako Prog5, gdzie po jego zastosowaniu nie było istotnych różnic w poziomie GFP-laminy zaś uzyskano statystycznie istotne obniżenie poziomu GFP-progeryny. W przypadku wszystkich innych siRNA, albo istotne różnice występowały dla poziomów obu badanych białek albo nie było ich w przypadku żadnego z nich.
  11. Na str. 131 czytamy: „Dla próbki po traktowaniu siRNA scr nałożono zbyt mało białka ścieżkę, żeby uzyskać sygnał, który można porównywać

do reszty próbek”. Dlaczego nie powtórzono tego doświadczenia, nakładając odpowiednią ilość białka? Czy ten eksperyment został wykonany tylko raz? Nawiązuje też tutaj do problemu opisanego w punkcie 6 (powyżej).

W podsumowaniu uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Volhy Dzianisavy spełnia warunki określone w odpowiednich przepisach określających kryteria jakie muszą spełnić kandydaci do stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani Volhy Dzianisavy do dalszych etapów procedury zmierzającej do nadania jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.



*prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn*