



Prof. dr hab. Krzysztof Sobczak
kierownik Zakładu Ekspresji Genów

Poznań, 25 listopada 2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Volhy Dzianisavy zatytułowanej „Opracowanie strategii terapii genowej progerii Hutchinsona-Gilforda”

Niniejszą ocenę wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, Uniwersytetu Wrocławskiego (UW). Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Volhy Dzianisavy została wykonana w Pracowni Białek Jądrowych, Wydziału Biotechnologii UW pod opieką merytoryczną prof. dr hab. Ryszarda Rzepeckiego, pełniącego funkcję promotora w przewodzie doktorskim oraz dr Katarzyny Piekarowicz, pełniącej rolę promotora pomocniczego.

Wcześniejsze badania zespołu kierowanego przez pana profesora koncentrowały się na poznaniu funkcji białek wewnętrznej warstwy otoczki jądrowej (tzw. blaszki jądrowej), w tym lamin, w regulacji funkcji jądra komórkowego w procesach fizjologicznych i w patologii chorób monogenowych, w tym laminopatii. Jedną z takich chorób jest progeria Hutchinsona-Gilforda (HGPS), w której mutacji ulega gen *LMNA* kodujący laminę A i C. Mutacja genu powoduje wprowadzenie alternatywnego miejsca 5' splicingu w eksonie 15, w wyniku czego dochodzi do wadliwego splicingu mRNA *LMNA*, a w konsekwencji do syntezy skróconej formy laminy A, zwanej progeryną. Ta ciężka, autosomalna, dominująca choroba genetyczna jest dotąd nieuleczalna i prowadzi do śmierci nosicieli mutacji w wieku dziecięcym. Dlatego też zasadnym było postawienie za cel badań opracowanie podstaw strategii terapeutycznej celującej bezpośrednio w zmutowaną cząsteczkę RNA. Elementy tego szerokiego zagadnienia stały się podstawą



projektu doktorskiego mgr Volhy Dzianisavy. Zasadniczym celem badań było zaprojektowanie i przetestowanie narzędzi interferencji RNA (RNAi) w postaci dupleksów siRNA, wiążących się selektywnie do zmutowanego mRNA progeryny, ale nie do prawidłowego mRNA *LMNA*, inicjując degradację zmutowanego mRNA, a tym samym istotnie ograniczając produkcję toksycznej progeryny.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Pierwszą stanowi obszerny, liczący ponad 40 stron, wstęp omawiający wnikliwie istniejący stan wiedzy w zakresie tematyki projektu. Doktorantka opisuje w nim zarówno podstawy genetyczne jak i mechanizmy molekularne stojące u podstaw HGPS, jak i dotąd opracowane strategie terapeutyczne tej choroby. W dalszej części wstępu opisano zastosowanie krótkich terapeutycznych oligonukleotydów antysensowych, w tym narzędzi RNAi, uwzględniając chemiczne modyfikacje tych reagentów oraz sposób ich dostarczania do komórek. Część ta napisana jest w sposób bardzo kompetentny i informatywny, i doskonale wprowadza czytelnika w tematykę badawczą.

Druga część zawiera bardzo konkretnie nakreślony i szczegółowo umotywowany cel badań z uwzględnieniem przyjętej strategii badawczej. Trzecim, najobszerniejszym elementem rozprawy jest drobiazgowy opis zasadniczej części pracy, rozpoczynający się omówieniem metodyki badawczej, a kończący się przedstawieniem i przedyskutowaniem uzyskanych wyników prowadzonych badań. Jest to tradycyjny układ pracy dyplomowej pozwalający na logiczne wprowadzanie poszczególnych treści. Na uwagę zasługuje bardzo klarowny opis poszczególnych podrozdziałów, rozpoczynających się krótkim wprowadzeniem, ukazującym celowość podjęcia konkretnych zadań badawczych, a kończących się konkluzjami nie wykraczającymi w większości przypadków poza realny wynik przeprowadzonych eksperymentów, głębiej przedyskutowanymi w ostatniej części pracy z dotychczasową wiedzą z zakresu przedmiotu prowadzonych badań. Generalnie badania zostały dobrze zaplanowane, wykonane i w większości właściwie zinterpretowane. Z obowiązku recenzenta zwrócę jednak uwagę na pewne niedoskonałości pracy, aby umożliwić wprowadzenie ewentualnych zmian w manuskrypcie, przed wysłaniem go do recenzji w czasopiśmie naukowym.

Celem pierwszej części realizowanych badań było stworzenie i scharakteryzowanie dwóch modeli komórkowych ze stabilną ekspresją albo zmutowanej postaci mRNA kodującej progerynę w fuzji z GFP, albo modelu kontrolnego, służących w dalszej części projektu do testowania projektowanych siRNA. Ta część pracy jest w pełni czytelna i pokazuje staranność w doborze i wnikliwej charakterystyce modelu komórkowego,



będącego podstawą dalszych badań. Zaskakującym okazało się jednak, że jedna z cech komórek HGPS, jaką jest zaburzenie kształtu jąder komórkowych, nie odtworzyła się w stworzonym modelu. Doktorantka przytacza kilka możliwych wyjaśnień tej obserwacji. Chciałbym jednak spytać czy obecność GFP w fuzji z progeryną nie może być czynnikiem utrudniającym metabolizm i lokalizację tego białka w blaszce jądrowej. Ponadto czy podjęto próbę porównania poziomu progeryny pochodzącej z transgenu i prawidłowej laminy A. Różnica w poziomie tych białek również mogłaby stanowić alternatywne wyjaśnienie nieoczekiwanej obserwacji.

W dalszych badaniach Doktorantka zaprojektowała szereg dupleksów siRNA i zoptymalizowała warunki wprowadzania tych reagentów do modelowych komórek. Jednym z problemów, który nie został podjęty w tej części pracy jest potencjalna immunogenność zaprojektowanych dupleksów siRNA. Jest to jedno z ograniczeń stosowania narzędzi interferencji RNA. Ze względu na obecność pewnych sekwencji nukleotydowych, dupleksy siRNA mogą aktywować na przykład receptory TLR7/8, powodując aktywację produkcji przez komórki interferonu, cytokin prozapalnych i chemokin. Na przykład sekwencje 5'-GUUC-3' obecne były w siRNA Prog1-Prog4. Innym białkiem, które może być aktywowane w zależności od cech sekwencyjnych siRNA jest RIG1. Ponadto nie znalazłem w pracy analizy sekwencyjnej, dedykowanej poszukiwaniu potencjalnych niepożądanych celów badanych siRNA. Na przykład dla jednego z siRNA potencjalnym celem może być mRNA *GTPBP3* lub *STK16*, ale też kilka innych mRNA. Może warto by sprawdzić tych kilka mRNA jako tzw. off-targets. Oczywiście taka analiza mogłaby być przeprowadzona jedynie dla tych najbardziej efektywnie działających siRNA. Najlepiej byłoby zbadać wyselekcjonowane siRNA w kontekście całego transkryptomu, ale to z pewnością już wykracza poza ramy ocenianego projektu. Takie badania pozwoliłyby również na udzielenie odpowiedzi na pytania odnośnie immunogenności dupleksów siRNA.

W tej części pracy, ale również w kolejnej pojawiło się kilkanaście nie do końca uprawnionych stwierdzeń. Na przykład napisano, że „dla siRNA progH3 zaobserwowano podwyższenie intensywności fluorescencji GFP dla linii HeLa GFP-lamina A do 111-120% w zależności od stężenia siRNA”. Tego nie można powiedzieć dopóki nie zostanie zastosowany odpowiedni test statystyczny, ukazujący istotność stwierdzanej różnicy. Podobnie w innym zdaniu mówiącym, że „zwiększenie stężenia siRNA progH3 z 12 nM do 48 nM przy zastosowaniu 0,2% Lipofectamine doprowadziło do obniżenia intensywności fluorescencji z 60% do 49%”. Takie konkluzje pojawiły się na przykład przy interpretacji wyników przedstawionych na rycinach 4.12, 4.14 czy części 4.16. Ponadto



nie do końca wiadomo jak wyniki uzyskane z zastosowaniem cytometrii przepływowej były normalizowane, aby znosić efekt różnic liczebności komórek, na którą potencjalnie może wpływać na przykład różnica podczas pasażowania komórek czy toksyczność siRNA, prowadząca do większej śmiertelności komórek, lub ograniczenia tempa proliferacji?

W kolejnych seriach eksperymentalnych zbadano wpływ kombinacji zastosowania siRNA i Ionafarnibu, leku stosowanego u pacjentów z progerią, na poziom białek egzogennych w modelowych komórkach HeLa. Badania te jednoznacznie pokazały wzmocnienie efektu terapeutycznego na zasadzie addytywnego działania dwóch stosowanych związków chemicznych.

Do dalszych badań zaprojektowano liczne chemicznie modyfikowane duplekisy siRNA w celu zwiększenia ich stabilności w środowisku komórki. Część z nich zawierała oligonukleotydy RNA z fluororybozą, część modyfikację 2'-O-Me na jednej (AS-Fluoro) lub obu (DS-Fluoro) niciach. Stabilność zaprojektowanych siRNA badano inkubując je w roztworze surowicy mysiej. Analizy ujawniły szereg prawidłowości, ale trudno zgodzić się ze stwierdzeniem, że istnieje zależność dodatkowych modyfikacji na stabilność siRNA laminy A/C, prog9, prog12 i prog14. Rycina 4.33 pokazuje pewną prawidłowość dla siRNA lamina A/C, ale dla prog12 już zdecydowanie nie. Nie pokazano miary statystycznej przedstawionych porównań, dlatego trudno te zależności jednoznacznie określić.

Zdumiewające wyniki przyniosły testy funkcjonalne nowych serii siRNA. Nieoczekiwanie wprowadzenie modyfikacji w łańcuchach RNA, z wyłączeniem siRNA lamina A/C i prog9, 12 i 14 z modyfikacją fluororyboz, przyniosło znaczne pogorszenie aktywności stosowanych narzędzi interferencji RNA. Jak można to wyjaśnić, a zwłaszcza co może tłumaczyć efekt wzrostu ilości GFP-progeryna (Rycina 4.34)? Nie znalazłem również wyjaśnienia podstaw projektowania takich, a nie innych scenariuszy modyfikacji odpowiednich pozycji w dupleksach testowanych siRNA?

W ostatniej części, która jest najważniejszym elementem pracy, wybrane siRNA przetestowano w bardziej naturalnych modelach choroby, jakimi były pierwotne kultury fibroblastów pochodzących od pacjentów z progerią Hutchinsona-Gilforda. Badania wykonane z zastosowaniem zarówno dwóch niemodyfikowanych jak i odpowiadających im sekwencyjnie dwóch siRNA zawierających fluororybozy, jednoznacznie wykazały zarówno dość wysoką skuteczność jak i selektywność wybranych narzędzi w redukcji



poziomu białka pochodzącego ze zmutowanego mRNA *LMNA* - progeryny. To oczywiście jest najważniejszy wynik ocenianej pracy. To, czego zabrakło mi w tej części to jednoznaczne potwierdzenie mechanizmu działania wybranych siRNA. Myślę, że praca byłaby pełniejsza gdyby zbadać efekt siRNA również na poziomie mRNA i wykazać ich aktywność na drodze interferencji RNA, ponieważ potencjalnie wiązanie komplementarnych nici siRNA, w połączeniu z białkami kompleksu RISC, mogłoby wpłynąć na redukcję efektywności translacji.

Chciałbym również zwrócić uwagę na kilka sformułowań zawartych w pracy:

- „...skutki uboczne stosowania wektorów lentiwirusowych, wiążące się z potencjalną onkogennością na skutek integracji plazmidu do genomu”. Rozumiem, że nie chodziło o integrację plazmidu tylko DNA wektora lenti.
- „Są to związki jednoniciowe działające jako nukleotydy antysensowne”. Rozumiem, że chodziło o oligonukleotydy, a nie nukleotydy. Te pomyłki znalazły się w kilku innych miejscach pracy.
- W opisie pożywek zapisano, że zawierają 0,1% insuliny i 0.1% hFGF-B. Czy na pewno?
- W niektórych miejscach opisu metod brak szczegółów wymaganych do odtworzenia eksperymentów. Na przykład zapis, że procedurę wykonano zgodnie z rekomendacją producenta.

Podsumowując chciałbym jednak powiedzieć, że praca doktorska jest bardzo solidna i odpowiada na kilka ważnych pytań biologicznych. W znakomitej większości jest napisana zrozumiałym językiem, a narracja prowadzona w logiczny sposób. Wskazane powyżej uchybienia i wątpliwości interpretacyjne nie wpływają w istotny sposób na moją wysoką ocenę niniejszej rozprawy.

Wnioski końcowe

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Volhy Džianisavy spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 2021 r., poz. 478, 619, 1630).



Zapoznając się z rozprawą odczuwałem satysfakcję zetknięcia się z rzetelnie i kompleksowo prowadzonymi badaniami, które doprowadziły do sformułowania kilku wniosków istotnych z poznawczego, ale również praktycznego punktu widzenia. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zaplanowała logiczny ciąg poszczególnych etapów badań. Pokazała, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać z rozmaitych narzędzi badawczych. Uzyskała istotne wyniki, poprawnie je opisała i w większości wyciągnęła uprawnione wnioski. Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Volhy Dzianisavy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Krzysztof Sobczak