

Kraków, 3.10.2016



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

O C E N A

**Pracy doktorskiej mgr Katarzyny Piekarowicz,
doktorantki w Pracowni Białek Jądrowych
Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego**

**Tytuł pracy: "Wektor wirusowy zawierający mięśniowo-specyficzny promotor
hybrydowy jako narzędzie w terapii genowej laminopatii"**

Najważniejszym czynnikiem ograniczającym kliniczne wykorzystanie możliwości terapii genowych – które teoretycznie mogą korygować przyczyny chorób uwarunkowanych genetycznie, a nie jedynie łagodzić ich skutki – jest dostępność odpowiednich wektorów, pozwalających na skuteczne i bezpieczne dostarczenie transgenów do komórek. Ważnym elementem mogącym zwiększyć skuteczność i bezpieczeństwo terapii jest zastosowanie właściwych kaset ekspresyjnych, pozwalających na uzyskanie odpowiedniego poziomu ekspresji transgenów. W wielu przypadkach wskazane jest również jednoczesne ograniczenie ekspresji do konkretnego typu komórek. Dotyczy to np. potencjalnych terapii dystrofii mięśniowych, w których ekspresja prawidłowych wersji transgenów powinna osiągać fizjologiczny i stabilny poziom, a jednocześnie powinna ograniczać się do mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego. Jednym z najważniejszych czynników decydujących o jakości kasety ekspresyjnej, czyli o efektywności i specyficzności ekspresji transgenów jest wybór lub stworzenie odpowiedniego promotora. Tego zadania – konstrukcji promotora pozwalającego na uzyskanie wysokiej i specyficznej mięśniowo ekspresji transgenów – podjęła się w swojej pracy pani mgr Katarzyna Piekarowicz.

Doktorantka potraktowała swoje zadanie bardzo szeroko. Jej głównym celem była konstrukcja promotora, w tym określenie znaczenia funkcjonalnego jego części składowych. Ponadto, pani mgr Katarzyna Piekarowicz zdecydowała się na opracowanie modelu badawczego *in vitro* do analizy wpływu mutacji w genie kodującym laminę A na funkcje hodowanych komórek, oraz podjęła się przygotowania wektorów wirusowych do przetestowania skonstruowanego promotora w układzie *in vitro* i *in vivo*. Temat pracy był więc istotny tak poznawczo jak i aplikacyjnie. Było to też zadanie bardzo ambitne i obciążone dużym ryzykiem.

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Przygotowywanie konstruktów, a następnie ich testowanie jest czasochłonne, wymaga dużego nakładu pracy i często kończy się niepowodzeniem. Jeśli zadanie uda się zrealizować, jego efekty – mimo że stanowią podstawę przeprowadzonych badań – zwykle opisuje się jedynie w kilku zdaniach metodyki. Dlatego wybór tematu przez Doktorantkę był odważny i zasługuje na uznanie.

Realizacja projektu wymagała zastosowania przez Doktorantkę klasycznych technik z zakresu biologii komórki i biologii molekularnej, z elementami analiz bioinformatycznych. Metody obejmowały konstrukcję i namnażanie wektorów plazmidowych, wprowadzenie mutacji do transgenów, liczne i złożone ligacje, analizy restrykcyjne, tworzenie i namnażanie wektorów lentivirusowych i wektorów AAV, transfekcje i transdukcje komórek *in vitro*, analizy aktywności promotora z wykorzystaniem genu reporterowego, wyprowadzanie zmodyfikowanych genetycznie linii komórkowych, podstawowe testy funkcjonalne komórek (przeżywalności i proliferacji), analizy ekspresji genów na poziomie mRNA (qRT-PCR) i białka (western blotting, cytometria przepływową), analizy lokalizacji i mobilności białek w komórce (barwienia immunohistochemiczne i testy FRAP), analizy histologiczne tkanek uzyskanych od zwierząt po podaniu wektorów wirusowych itp. Metodyka pracy była więc różnorodna i dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań.

Badania przeprowadzone zostały przez Doktorantkę z wykorzystaniem kilku linii komórkowych: mysich mioblastów C2C12 i fibroblastów NIH3T3, szczurzych kardiomiocytów H9C2, ludzkich komórek embrionalnych nerki HEK293 i HEK293-FT, komórek raka szyjki macicy HeLa, nowotworu wątroby HepG2, śródbłonna mikronaczyniowego HDMEC oraz fibroblastów skóry NHDF. Doktorantka prowadziła również hodowle pierwotnych fibroblastów skóry uzyskanych od osób chorych na laminopatie. Część badań została przeprowadzona na myszach, u których analizowano poziom ekspresji transgeny po podaniu wektorów AAV.

Najważniejsze moim zdaniem wyniki uzyskane przez Doktorantkę to: i) skonstruowanie promotora pozwalającego na wysoki poziom ekspresji transgeny w mięśniach szkieletowych i w mięśniu sercowym, przy zachowaniu znacznej specyficzności tkankowej, ii) wykazanie, że najważniejszym elementem przygotowanego promotora, decydującym o poziomie ekspresji transgeny jest intron zawierający sekwencję SIE, iii) potwierdzenie braku toksyczności przygotowanego konstruktów tak *in vitro* jak *in vivo*.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Piekarowicz liczy 186 stron maszynopisu, w tym 68 rysunków i fotografii oraz 18 tabel. Cytowane piśmiennictwo to 285 pozycji. Praca zbudowana jest w sposób klasyczny i obejmuje: Streszczenie, anglojęzyczny Abstract, Wstęp z wyodrębnionymi w osobny podrozdział Założeńiami i Celami Pracy,

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję z wyodrębnionym Podsumowaniem. Całość poprzedzona jest Spisem Treści, a zakończona Wykazem Skrótów, Spisem Tabel, Spisem Rysunków, Bibliografią i listą osiągnięć Doktorantki. Zarówno kompozycja pracy jak i zawartość poszczególnych części jest prawidłowa, a spis treści oraz spisy tabel, rysunków i skrótów są dobrze przygotowane i ułatwiają lekturę pracy.

Streszczenie jest napisane poprawnie, choć w sposób nietypowy. Nie ma w nim klasycznego wprowadzenia, opisu badań i ich wyników zakończonego ogólnym podsumowaniem. Zamiast tego Streszczenie składa się z trzech raczej niezależnych części podsumowujących trzy etapy badań. Wolę układ klasyczny, ale taka forma jest również akceptowalna, zwłaszcza przy pracy metodycznej.

Liczący 32 strony Wstęp jest prawidłowo skomponowany, napisany ciekawie i dobrze wprowadza w tematykę badań. Wstęp rozpoczyna się od ogólnego omówienia dystrofii mięśniowych, w tym zwłaszcza dystrofii mięśniowej Emery'ego-Dreifussa, scharakteryzowania lamin i białek oddziałujących z laminami, przedstawienia komórkowych i zwierzęcych modeli laminopatii oraz krótkiego omówienia terapii stosowanych w dystrofiach, z zaznaczeniem potencjalnych możliwości wykorzystania terapii genowych. Ta część Wstępu napisana jest ciekawie, z wyraźnym nastawieniem na uzasadnienie podjęcia tematu badań. Opis świadczy o dobrym zrozumieniu przez Doktorantkę biologicznych konsekwencji mutacji występujących w laminach, a nie jedynie przytaczaniu danych korelacyjnych. Udało się przede wszystkim uniknąć leksykalności, która często charakteryzuje wstępy – tekst jest dobrze skomponowany, logicznie uporządkowany, bez przeładowania zbędnymi szczegółami. W kolejnej części Doktorantka omawia wektory stosowane w próbach terapii genowych dystrofii mięśniowych, zwłaszcza lentiwirusowe i AAV, co stanowi dobre wprowadzenie do głównego tematu pracy. Następna część to omówienie możliwości modyfikacji wektorów, tak by zwiększyć ich specyficzność na etapie transdukcji i transkrypcji. Ta część jest dobrym materiałem na pracę przeglądową. Wstęp kończy się krótkim opisem dotychczasowych prób terapii genowych dystrofii mięśniowych. Całość napisana jest dobrym językiem, choć zdarzają się potknięcia stylistyczne, nawiązujące do tekstów anglojęzycznych np. "badania kliniczne adresowane na terapię dystrofii". Mam też wątpliwości co do niektórych stwierdzeń. Doktorantka pisze np., że wektory adenowirusowe charakteryzuje bardzo duża pojemność – to prawda w odniesieniu do wektorów typu gutless, w których można umieścić kasetę wielkości nawet 35 kB. Typowe wektory adenowirusowe mają pojemność ok. 9.5 kB, czyli więcej niż AAV, ale wciąż niewystarczająco na umieszczenie dużych sekwencji kodujących. Brakuje mi też jasnego wskazania dlaczego podjęta została praca nad promotorem przeznaczonym



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

do terapii genowej dystrofii, skoro dotychczasowe próby terapii tego typu, mimo uzyskiwania ekspresji białka terapeutycznego, miały bardzo ograniczony efekt leczniczy. Można domyślać się, że kluczowe jest dążenie do zwiększenia poziomu ekspresji i specyficzności – warto byłoby to jednak wyraźniej podkreślić, zwłaszcza w kontekście informacji o możliwym toksycznym efekcie silnej nadekspresji transgenów. Generalnie, Wstęp tworzy jednak dobrą i logiczną całość, a dobór treści i sposób omawiania zagadnień potwierdzają bardzo dobrą orientację Doktorantki w tematyce badań.

Cele pracy omówione są wyczerpująco i szczegółowo. Są bardzo ambitne i mogą sprawiać wrażenie ujęcia zbyt szerokiego. Być może lepiej byłoby wskazać które zadania badawcze są kluczowe. Niemniej cele pracy są dobrze i przekonująco uzasadniane.

Doktorantka na 32 stronach opisuje metody stosowane w pracy. Opisy te są obszernie i dokładne, w pełni wystarczające do powtórzenia przeprowadzonych doświadczeń. Dobrym pomysłem jest podanie składu wszystkich buforów i numerów katalogowych używanych odczynników – to może być pomocne zwłaszcza w przypadku przeciwciał. Doktorantka podaje także informację gdzie były robione analizy i kto je wykonywał, jeśli nie były wykonywane przez nią osobiście. Opisana metodyka jest prawidłowa. Mam jedynie zastrzeżenie do potraktowania testu z zastosowaniem sulforodaminy B jako metody określania proliferacji komórek. Test ten pozwala na określenie poziomu białka, a pośrednio na porównanie liczby komórek (o ile nie dochodzi hipertrofii). Liczba komórek po okresie hodowli to jednak wypadkowa proliferacji i żywotności. Proliferacja powinna być analizowana z wykorzystaniem bardziej specyficznych testów, albo badany parametr powinien być określony precyzyjniej. Mam też wątpliwości co do podawania noworodkom mysim co najmniej 30 μ L roztworu domięśniowo. Jeśli było to faktycznie podanie domięśniowe, to trzeba się liczyć z uszkodzeniem mięśnia. "Co najmniej" sugeruje, że objętości nie były równe – to może mieć wpływ na lokalizację wektorów i skuteczność transdukcji. W jaki sposób podawano wektory? Ile było miejsc podania, do którego mięśnia i jaka była objętość jednorazowej iniekcji?

Wyniki (zajmujące 62 strony) są bardzo szczegółowo opisane i zilustrowane wykresami oraz zdjęciami. Są raczej dokładną analizą poszczególnych doświadczeń niż syntetycznym przedstawieniem postępu prac. To może być uzasadnione typem pracy, która ma charakter metodyczny. Niemniej zastanawiałabym się nad przedstawianiem analiz, które potem sama Doktorantka uznaje za mogące wprowadzać w błąd – np. przy pomiarach aktywności lucyferazy w medium bez uwzględnienia wpływu stopniowego zagęszczania pożywki. Analiza wyników jest



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

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

jednak ostrożna i uwzględniająca możliwe pułapki metodyczne, co wskazuje na dobre zrozumienie zarówno możliwości jak i ograniczeń stosowanych metod. Opis prowadzony jest konsekwentnie, może być więc uznany za prawidłowy.

Pierwsza część opisu dotyczy układów modelowych do badania konsekwencji mutacji w obrębie genu kodującego laminę A. Doktorantka wykorzystwała trzy strategie: i) izolację fibroblastów z biopsji skóry pobranych od pacjentów (udało się pobrać materiał od czterech osób, w tym od jednej z mutacją w laminie A), ii) hodowle linii komórkowych różniące się poziomem laminy A i C (to podejście budzi moje duże wątpliwości, ze względu na odmienność wykorzystywanych linii – różnice w poziomie laminy są tylko jednym z wielu czynników i różnice funkcjonalne między liniami w żadnym wypadku nie mogą być przypisywane odmienności w poziomie laminy A i C, poza bardzo specyficznymi sytuacjami np. wzajemnej proporcji czy lokalizacji obu białek), iii) transferu do linii komórkowej genu laminy, w tym laminy z wprowadzonymi mutacjami. Ta strategia wydaje mi się najbardziej obiecująca, zwłaszcza po wyprowadzeniu linii stabilnie zmodyfikowanych. Mogą być one wykorzystywane do analizy zmian funkcjonalnych w komórkach wykazujących ekspresję prawidłowej i zmutowanej laminy. Jestem też ciekawa, czy Doktorantka brała pod uwagę uzyskanie linii z nokautem laminy endogennej i ekspresją wyłącznie formy wprowadzonej w formie transgenu?

Prezentacja wyników jest prawidłowa, choć na Ryc. 4.1. przydała by się moim zdaniem kontrola pokazująca fibroblasty z laminą prawidłową, a nie wyłącznie formy zmutowane. Na str. 77 Doktorantka wspomina o odmiennej lokalizacji emeryny w trakcie mitozy, odwołując się do Ryc. 4.2, gdzie takiej informacji nie ma. To chyba niezręczność stylistyczna, ale lepiej było te wyniki pokazać, albo wspomnieć, że nie są prezentowane. Na Ryc. 4.10 wkraść się błąd – zdjęcie pokazujące nałożenie barwień przy prawidłowej laminie A jest duplikatem zdjęcia pokazującego komórki z mutacją D446V.

W kolejnej części Doktorantka opisuje konstrukcję promotora hybrydowego. Moim zdaniem to najbardziej wartościowa część pracy, zwłaszcza zastosowanie konstrukcji modułowej i analiza skutków delecji poszczególnych elementów promotora. Bardzo ciekawym wynikiem jest obserwacja znaczenia obecności sekwencji intronowej, a stosunkowo mniejszego wpływu typowych sekwencji enhancerowych. Doświadczenia związane ze specyficznością mięśniową są natomiast trudne do interpretacji, głównie z względu na odmienną efektywność transfekcji różnych linii komórkowych. Czy Doktorantka brała pod uwagę zastosowanie innej strategii do analizy specyficzności? Można by wykorzystać np. wektor z dwoma kasetami ekspresyjnymi, zawierającymi porównywane promotory regulujące



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

ekspresję dwóch białek fluorescencyjnych. W takim przypadku proporcja ekspresji obu form analizowana cytometrycznie mogłaby być miarą względnej aktywności promotorów w danym typie komórek, niewrażliwą na efektywność transfekcji. Kłopotliwa jest też interpretacja analizy statystycznej wyników przedstawionych na Ryc. 4.28, pokazujących wpływ delekcji na aktywność promotora hybrydowego. Opis nie w pełni przystaje do zaznaczonych istotności, Doktorantka wspomina też, że inne wnioski uzyskuje się po porównywaniu dwóch prób a nie wszystkich. Być może przyczyną kłopotu jest wybór testu posteriori (test Dunna) w analizie wariancji, który służy do porównań wielokrotnych. Lepszy chyba byłby test Dunnetta do porównań wielu grup z kontrolą.

W kolejnej części Doktorantka opisuje konstrukcje wektora lentiwirusowego. Na duże uznanie zasługuje systematyczność doświadczeń i wszechstronność badań mających na celu wykluczenie kolejnych przypuszczalnych przyczyn niespodziewanych wyników zarówno związanych ze zmniejszeniem miana uzyskiwanych wektorów lentiwirusowych jak i mniejszą skutecznością opracowanej kasety po wprowadzeniu jej do genomu transdukowanych komórek. Sądzę natomiast, że w badaniach wpływu różnicowania na aktywność promotorów lepiej byłoby użyć linii stabilnie stransdukowanych. Indukcja różnicowania stabilnych linii C2C12 pozwoliła by na uniknięcie wpływu utraty plazmidu podczas dłuższej hodowli. Pechowo na Ryc. 4.39 ponownie doszło do zduplikowania zdjęcia – ten sam obraz mikroskopowy podpisany jest jako EGFP w komórkach HEK298 MH-EGFP (błędnie) i DES-EGFP.

Ostatnia część Wyników poświęcona jest opisowi oceny aktywności i specyficzności promotora MH *in vivo*. To bardzo ciekawa część pracy, z analizą poziomu białka EGFP pozwalającą stwierdzić, że główny cel pracy – stworzenie silnego i specyficznego mięśniowo promotora – powiódł się. Największym ograniczeniem tej części badań jest zbyt mała liczba zwierząt. Rozumienie zasady 3R jako minimalizacji liczby zwierząt w grupie jest często przeciwnie skuteczne – doświadczenia muszą być powtórzone i nie pozwalają na wyciągnięcie ostatecznych wniosków. W takiej analizie powinno się użyć co najmniej 5 osobników na grupę. To nie zarzut w stosunku do Doktorantki, a raczej opinia o charakterze ogólnym. Analizy ekspresji transgenu na poziomie mRNA w tym doświadczeniu są trudne do interpretacji i generalnie nie pozwalają na jasną konkluzję. Dobrym pomysłem była normalizacja poziomu ekspresji transgenu do liczby kopii genomu wirusowego. Zastanawiałam się, czy bezpośrednie wykorzystanie detekcji sekwencji wirusowej jako genu referencyjnego nie pozwoliłoby ocenić poziomu ekspresji uwzględniającego poziom transdukcji. Analizy wykonane przez Doktorantkę na



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

poziomie mRNA pokazują, że uzyskany promotor jest aktywny. Wyniki detekcji białka są natomiast znacznie bardziej przekonujące i wskazują na wysoką aktywność, a jednocześnie specyficzność konstruktów.

Dyskusja obejmuje 18 stron i skupia się przede wszystkim na podsumowaniu uzyskanych wyników oraz ich omówieniu w świetle wcześniej opublikowanych prac i możliwych potencjalnych zastosowań praktycznych. Składa się z trzech głównych części odpowiadających głównym zagadnieniom, którym poświęcone były badania. Taka konstrukcja jest konsekwencją przyjętej koncepcji projektu. Materiał zawarty w doktoracie mógłby się stać dobrą podstawą do przygotowania trzech prac doktorskich. Wtedy możliwe byłoby głębsze potraktowanie każdego tematu i przeprowadzenie doświadczeń pozwalających na lepsze zrozumienie obserwowanych zależności. Doktorantka przyjęła inne rozwiązanie – przeprowadzanie badań bardzo szerokich, ukierunkowujących przyszłe doświadczenia. Przy takim założeniu badania muszą być bardziej opisowe, bez podejścia mechanistycznego, a wiele ciekawych pytań pozostaje na razie bez odpowiedzi. Doktorantka zadaje je w dyskusji i przypuszczalnie już zaczęła prowadzić doświadczenia by odpowiedzieć na niektóre z nich. Projekt był przede wszystkim metodyczny, nastawiony na przygotowanie narzędzi na przyszłość, i ryzykowny. Udało się go dobrze zrealizować, a najważniejszy cel – przygotowanie promotora – został osiągnięty.

W pierwszej części Dyskusji omówione są modele wykorzystywane w badaniach nad laminopatią. Dużo uwagi poświęca Doktorantka możliwości uzyskiwania fibroblastów (lub mioblastów) od pacjentów i ograniczeniom takiego podejścia, zwłaszcza dość krótkiemu czasowi możliwego utrzymania komórek w hodowli i trudnościom z uzyskaniem prawidłowej kontroli. Ciekawa jestem opinii Autorki na temat możliwości o której nie wspomina w Dyskusji, czyli możliwości przygotowania z uzyskanych fibroblastów indukowanych komórek pluripotencjalnych (iPSC). To pozwoliłoby na ich długotrwałe utrzymanie w hodowli, różnicowanie w kierunku kardiomiocytów lub mięśni szkieletowych i przygotowanie odpowiednich kontroli. Autorka stawia w Dyskusji dobre pytania i wskazuje doświadczenia jakie należałoby wykonać, by uzyskane dotychczas wyniki (które na razie mogą pozwolić na postawienie hipotez) doprowadziły do konkluzji. Niewątpliwie warto byłoby np. sprawdzić bezpośrednio czy lamina w komórkach HEK293 rzeczywiście podlega proelizie i co powoduje, że może to być aktywność specyficzna dla tej linii komórkowej. Byłabym natomiast bardzo ostrożna w wyciąganiu daleko idących wniosków dotyczących komórek pierwotnych czy sytuacji *in vivo* na podstawie wyników uzyskanych na nieśmiertelnych liniach komórkowych. Stwierdzenie, że HEK293 mają pewne cechy komórek nerwowych, nawet jeśli udokumentowane



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

publikacyjnie, nie pozwala na wnioskowanie na temat podobieństwa sugerowanego mechanizmu do opisanego dla komórek nerwowych, na co zresztą Doktorantka słusznie zwraca uwagę. Generalnie, wnioskowanie o patomechanizmie choroby na podstawie badań unieśmiertelnionych linii wymaga wyjątkowej ostrożności i zadawania jedynie takich pytań na które tego typu układ może dać odpowiedź.

Dalsze części Dyskusji poświęcone są konstrukcji mięśniowego promotora hybrydowego oraz badaniu jego aktywności i specyficzności *in vitro* i *in vivo*. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki pokazują, że udało jej się uzyskać wektor AAV zawierający kasetę ekspresyjną z promotorem pozwalającym na wysoką i mięśniowo specyficzną produkcję białka reporterowego. Co ważne, wektor był efektywny i w mięśniach szkieletowych i w mięśniu sercowym. Wybór promotora CMV i DES jako promotorów kontrolnych jest racjonalny, jeśli celem było scharakteryzowanie uzyskanego promotora. Jeśli jednak cel był przede wszystkim aplikacyjny – a tak można wnioskować z ukierunkowania pracy – to warto chyba było wykonać doświadczenia, przynajmniej w układzie *in vivo*, z promotorem E1 α . W doświadczeniach *in vitro* wykazywał on bardzo dużą aktywność, i w przeciwieństwie do promotora CMV, nie jest promotorem wirusowym. Wykazanie np. wyższej specyficzności promotora hybrydowego byłoby dobrym argumentem przemawiającym za wykorzystywaniem właśnie tego konstruktów. Warto byłoby również przeprowadzić doświadczenia zasugerowane przez Doktorantkę w Dyskusji – porównanie poziomów metylacji promotorów w różnych punktach czasowych i sprawdzenie na ile rola sekwencji intronowej wynika ze stabilizacji transkryptu a na ile z nasilania ekspresji i ułatwiania interakcji promotora z czynnikami transkrypcyjnymi.

Generalnie, Dyskusja napisana jest poprawnie. Unikałabym jedynie określeń wartościujących, typu "badania były wszechstronne", "analizy przeprowadzono starannie". To jednak tylko subiektywne odczucie dotyczące stylu, a nie meritum. Zawarte w Dyskusji wnioskowanie jest nieco spekulatywne ze względu na typ uzyskanych w pracy danych, ale uzasadnione. Wnioski wyodrębnione w osobny podrozdział stanowią listę najważniejszych obserwacji poczynionych w trakcie realizacji pracy. Są one jasno sformułowane i mają potwierdzenie w wynikach doświadczeń. Jedynie wniosek no 5 o stwierdzeniu dodatkowego mechanizmu kontroli potranskrypcyjnej w komórkach HEK293 jest zbyt silny, choć Doktorantka podkreśla, że temat wymaga dalszych badań.

Praca pod względem edytorskim przygotowana jest starannie, zawiera niewiele błędów literowych, pojawiające się czasem niezręczności stylistyczne są w pełni akceptowalne i nie do uniknięcia w tak długim tekście. Może warto jedynie



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621
fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

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

pamiętać że DNA i RNA to "ten" kwas, czyli raczej DNA był izolowany niż było izolowane.

Podsumowując, badania opisane przez Doktorantkę dotyczą bardzo ciekawego tematu, z dużym potencjałem poznawczym i aplikacyjnym. Wykonane zostały z wykorzystaniem dobrze dobranych metod i pozwoliły na realizację zamierzeń. Ich wykonanie wymagało ogromnego nakładu pracy oraz bardzo systematycznej optymalizacji każdego etapu. Uważam, że pani mgr Katarzyna Piekarowicz prawidłowo realizowała założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy doktorskiej. W związku z tym proszę wysoką Radę Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pani mgr Katarzyny Piekarowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

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