



Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz  
Kierownik Pracowni Molekularnych Podstaw  
Ruchów Komórkowych

Warszawa, 22 września 2016 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piekarowicz  
pt. "Wektor wirusowy zawierający mięśniowo-specyficzny promotor hybrydowy  
jako narzędzie w terapii genowej laminopatii"  
wykonanej pod kierunkiem: dr hab. Ryszarda Rzepeckiego, prof. nadzw. UW  
w Pracowni Białek Jądrowych Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa dotyczy ważkiego i aktualnego problemu, jakim jest opracowanie podstaw skutecznej terapii genowej miopatii, a w szczególności dystrofii Emery-Dreifussa, należącej do laminopatii, grupy schorzeń związanych z mutacjami m.in. w genach kodujących laminę A i emerynę. Pomimo wieloletnich badań i podjęcia szeregu mniej lub bardziej udanych prób opracowania terapii genowej tych miopatii, wciąż daleko do przełomu. W przedstawionej mi do recenzji rozprawie Doktorantka postanowiła zająć się tym problemem, stawiając sobie za nadrzędny cel stworzenie promotora specyficznego dla mięśni poprzecznie prążkowanych, który stanowiłby podstawę wektora wirusowego, nie wykazującego efektów toksycznych dla organizmu i produkującego pożądaną i trwałą transgen w tkance mięśniowej. Uzyskane przez nią wyniki otwierają możliwości do opracowania skutecznej terapii, które - jeśli zostaną właściwie wykorzystane - otworzą nowe perspektywy w leczeniu tych wprawdzie rzadkich, ale uciążliwych i często śmiertelnych schorzeń.

### Formalny opis rozprawy

Licząca aż 186 stron rozprawa została przygotowana w formie tradycyjnej i posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich. Praca jest zredagowana w sposób bardzo staranny, napisana w zasadzie poprawną polszczyzną, aczkolwiek Doktorantce nie udało się uniknąć szeregu mniej lub bardziej istotnych błędów stylistycznych i interpunkcyjnych oraz uchybień w nazewnictwie. To prawdę powiedziawszy nieuniknione, zwłaszcza przy opracowaniu tak obszernego dzieła. Poniżej omówię te, które są moim zdaniem najistotniejsze.

Rozprawa rozpoczyna się jednostronicowymi streszczeniami (w języku angielskim i polskim), po których znajduje się liczący 32 strony *Wstęp teoretyczny* [zawierający 7 rycin (nie rysunków!)] i 2 tabele. Po sprecyzowaniu *Założeń i celu pracy* (3 strony) znajduje się liczący 32 strony rozdział *Materiały i metody*. W tym rozdziale Autorka zamieściła 2 ryciny i 12 tabel. *Wyniki* liczą aż 61 stron i zawierają 59 rycin i 4 tabele. Po nich następują: 18. stronicowa *Dyskusja* oraz *Podsumowanie*, w którym Doktorantka w 11. punktach streściła swoje osiągnięcia. Kolejne części rozprawy to: *Wykaz skrótów* (wyjątkowo na końcu rozprawy), *Spis tabel* (jest ich łącznie 18) i *Spis rysunków* (jest ich łącznie 68) oraz *Bibliografia*, na którą składa się ok. 260 pozycji literatury, w tym znaczna ich część to prace z ostatniej dekady, co świadczy o aktualności prowadzonych przez Doktorantkę badań. Rozprawę zamyka lista publikacji (trzy już opublikowane i kolejna jest przygotowywana do druku) i osiągnięć Doktorantki wraz ze spisem doniesień prezentowanych na konferencjach krajowych i

międzynarodowych (doliczyłam się 18.), z czego w zdecydowanej większości jest ona pierwszym autorem.

## Ocena merytoryczna

*Wstęp* miał służyć jako podsumowanie dotychczasowej wiedzy o dziedzinie, której poświęcona jest rozprawa, czyli o mechanizmach dystrofii mięśniowych, w tych laminopatii oraz o mniej lub bardziej skutecznych próbach opracowania podstaw terapii miopatii. Niestety, już na pierwszej stronie tego rozdziału zauważyłam kilka poważnych uchybień w opisie dystrofii. W pierwszym zdaniu Doktorantka mówi o objawach dystrofii, wskazując, że dochodzi do osłabienia i degeneracji tkanki mięśniowej. Czy tylko i czy zawsze dochodzi do degeneracji? Prosiłabym Doktorantkę o rozwinięcie tego zagadnienia podczas obrony rozprawy. Szkoda również, iż Autorka posłużyła się pracami przeglądowymi sprzed ponad dekady. Gdyby zapoznała się z najnowszymi, dowiedziałaby się, że np. dystrofie obręczowo-kończynowe mogą być spowodowane mutacjami w ponad 30 genach (powoli zaczyna brakować liter w klasyfikacji LGMD typu 2...) i że miopatie to w większości schorzenia oligogenowe, a nie monogenowe, jak stwierdza m.in. na stronie 21. Nie lubię też stosowania określeń N-koniec i C-koniec w odniesieniu do końców aminowego i karboksylowego (ale tu chyba jestem już w mniejszości...). Zastanawiam się też, który fragment ryciny 1.2 został powiększony (i ile razy) w zamieszczonym w lewym rogu okienku. Wydaje mi się też, że angielski termin Ig-fold to po prostu domena immunoglobulinowa. Nie bardzo wiem, co Doktorantka ma na myśli pisząc "fosforylacje"; fosforylacja białek to enzymatyczne przeniesienie reszty grupy fosforanowej na resztę aminokwasową (najczęściej zawierająca grupę hydroksylową, która może być obecna w reszcie serynowej, treoninowej czy tyrozynowej). Czy chodziło jej o to, że różne reszty łańcucha polipeptydowego laminy mogą być fosforylowane? Nie wiem również, czy w odniesieniu do mięśni można stosować termin komórki mięśniowe; włókna mięśniowe oraz powstałe z mioblastów miotuby (nie miocyty!) to typowe przykłady syncytiów. Dużo lepiej jest napisana część Wstępu poświęcona terapii dystrofii mięśniowych (aczkolwiek czytając pierwsze zdanie można by odnieść wrażenie, że były kiedyś dostępne jakieś terapie, ale teraz już nie są stosowane...) oraz konstruowaniu i zastosowaniu wektorów w terapii tychże dystrofii.

Zasadniczy cel pracy to „(...) opracowanie strategii, układu modelowego i nośnika do terapii genowej terapii mięśniowych na przykładzie EDMD”. Doktorantka dość obszernie wyjaśnia zasadność podjęcia tego typu badań i opisuje kolejno podejmowane kroki. To bardzo ambitne zamierzenia, aczkolwiek podczas lektury uzasadnienia miałam wrażenie, że w wielu miejscach było to powielenie informacji zawartych we Wstępie. Ponadto, proszę Doktorantkę o podanie rozwinięcia nazwy IMDiK PAN, nie ma tego w wykazie skrótów. Pragnę również zauważyć, że ten Instytut to placówka badawcza, w której nie są hospitalizowani pacjenci i nie dokonuje się w niej żadnych zabiegów, w tym pobrania wycinków skóry, o czym pisze doktorantka w dalszej części rozprawy. Badacze z Instytutu pracują w szpitalach i stamtąd pochodzą pacjenci (*nota bene* - nie współpracujący, ale godzący się na pobranie materiału do badań). Myślę, że Doktorantka (o ile to możliwe) powinna była wymienić szpital(e), w których pobierano wycinki; to one bowiem poniosły koszty zabiegów i wynagrodzenia osób je wykonujących.

Dla realizacji tych ambitnych zamierzeń Doktorantka zastosowała wiele różnorodnych technik badawczych, opisanych wyczerpująco w rozdziale *Materiały i metody*. Ten rozdział rozpoczęła od listy odczynników wykorzystanych w toku badań, podając zarówno nazwę producenta, jak i numer katalogowy - to dobry zwyczaj. Doktorantka zwróciła się do specjalistów o pomoc w realizacji części swoich zamierzeń, o czym jasno informuje podczas opisywania poszczególnych wyników. Nie jestem do końca przekonana, czy wszystkie powinny być zamieszczone w rozprawie, a nie tylko krótko omówione w *Wynikach* czy *Dyskusji*, tym bardziej, że rozprawa jest bardzo obszerna, a część danych - choć bardzo interesujących - to w zasadzie wyniki wstępne. Autorka szczegółowo opisuje zastosowane metody biologii molekularnej, podając sekwencje wykorzystanych w toku badań starterów; procedury hodowli komórek i ich analiz cytometrycznych oraz barwień histochemicznych i immunofluorescencyjnych, a także techniki przyżyciowej FRAP. Nie mam

poważniejszych uwag do tej przejrzystości napisanej części, ale zauważyłam kilka nieścisłości w opisie niektórych technik. Nie podoba mi się zwłaszcza nazwanie systemu z wykorzystaniem plazmidu pDRIVE5-Lucia systemem z *wydzielniczą* lucyferazą; w oryginalnej nazwie jest „*secreted*”, a nie „*secretory*”, a więc wydzielanej, nie wydzielniczej. Po polsku wydzielniczy odnosi się przede wszystkim do gruczołów (komórek) wydzielniczych, wydzielających hormony i inne substancje. Razi mnie też słowo „titracja”, wywodzące się z *titration*, terminu oznaczającego miareczkowanie lub oznaczanie miana. Brakuje mi również informacji, jakiej i czy tej samej grubości warstwa konfokalna (z) została zastosowana na rycinach prezentujących wyniki z mikroskopu konfokalnego. Nie znalazłam również informacji o szczepie myszy wykorzystanym do testowania opracowanych przez Doktorantkę konstruktów.

W rozdziale *Wyniki* Doktorantka przejrzysto opisuje uzyskane przez siebie dane, przy czym należy podkreślić, że jest ich niemało. Tak jak wcześniej wspomniałam imponujący jest również jej warsztat badawczy. Na pochwałę zasługuje sposób przedstawienia wyników - zamieszczone ryciny są czytelne i w zasadzie wszystkie wyniki zostały poddane analizie statystycznej (aczkolwiek nie zawsze podano narzędzie zastosowane do konkretnej analizy), a także wykonano w zasadzie wszystkie możliwe do wykonania kontrole.

Pracę rozpoczęła Doktorantka od utworzenia bazy hodowli pierwotnej komórek otrzymanych z biopsji skóry pacjentów z mutacjami w genach kodujących laminę A (jeden pacjent) i emerynę (trzech pacjentów) dzięki współpracy z badaczami z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Przy okazji mam pytanie: co wg Autorki oznacza termin komórki pierwotne. Ciekawi mnie, czy pacjenci 3 i 4 (wymienieni w Tabeli 4.1) byli ze sobą spokrewnieni i czy mieli podobne objawy. Doktorantka sprawdziła lokalizację lamin i emeryny, zauważając zmianę jedynie w dystrybucji lamin w fibroblastach pacjenta z mutacją w laminie A. W rycinie 4.1 brakuje mi barwienia komórek kontrolnych, otrzymanych od pacjentów bez objawów laminopatii. Doktorantka przeprowadziła również analizę „modelowych linii komórkowych” pod kątem poziomu ekspresji lamin A i C, wykazując znaczne zróżnicowanie pomiędzy badanymi liniami. Na tej podstawie do dalszych analiz postanowiła wykorzystać trzy linie: HEK293, HeLa i NHDF. Następnie wprowadziła do wybranych linii przygotowane przez siebie konstrukty kodujące laminę A (w fuzji z EGFP) oraz jej mutanty ze zmianami w pozycjach zidentyfikowanych wcześniej u pacjentów (krótki opis pacjentów zamieszczono w tabeli 4.2) z laminopatiami oraz progerią (czyli chorobą spowodowaną delecją 50 reszt aminokwasowych w rejonie końca karboksylowego laminy A). Okazało się, że egzogenne białka nie tylko wykazywały zróżnicowaną lokalizację, ale i w różnym stopniu wpływały na lokalizację innej izoformy laminy - C, co Doktorantka tłumaczy toksycznością badanych mutantów oraz degradacją egzogennej laminy A. Zauważyłam, że w rycinie 4A wkraść się błąd w obrazie „nałożenie” dotyczącym analizy niemodyfikowanej laminy. Mam też wrażenie, że w tych komórkach coś niepokojącego się dzieje z cytoszkieletem aktynowym.

Doktorantka wyprowadziła sublinie komórek HEK293 stabilnie nadprodukujące laminę A i jej mutanty (w tym progerinę), wykazując iż mutanty nie wpływają w zasadzie na tempo proliferacji komórek, podczas gdy lamina i samo EGFP obniżają tempo proliferacji. Przy okazji mam pytanie - czy komórki były synchronizowane przed dokonaniem analizy rozkładu faz cyklu?

Doktorantka w toku dalszych badań mających na celu stworzenie użytecznych linii komórkowych do testowania swoich konstruktów skupiła się na linii mioblastów C2C12, wyprowadzonych z mięśni szkieletowych kończyny tylnej myszy. Właściwie to zastanawiam się, dlaczego Doktorantka od początku nie zajęła się jedynie tą linią, od lat stosowaną jako model miogenezy. Co więcej, miotuby wykazują najbardziej zbliżony poziom ekspresji genów do tego występującego w dojrzałym mięśniu.

Część poświęcona przygotowaniu i analizie powstałych konstruktów to znacząca (aż 44 strony) i najbardziej pracowita część *Wyników*, w zupełności mogąca samodzielnie stanowić podstawę rozprawy. Wykorzystując dotychczasową wiedzę na temat aktywności promotorów różnych genów charakterystycznych dla mięśni szkieletowych, dokonując wielu prób, analiz i testów aktywności przygotowanych przez siebie promotorów, Doktorantka skonstruowała i następnie

scharakteryzowała nowatorski hybrydowy promotor (MH), w skład którego wchodziły, zaczynając od końca 5', sekwencje wzmacniające ekspresję pochodzące z genu desminy, sekwencje wzmacniające ekspresję pochodzące z genu mięśniowej izoforny kinazy kreatyny (MCK), promotor podstawowy pochodzący z genu MCK oraz intron z sekwencją wiążącą rybosomy, również pochodzący z genu MCK. Wykazała, że ten stworzony *de novo* promotor miał w miotubach C2C12 i kardiomiocytach wyższą aktywność niż dotychczas wykorzystywane promotory oparte głównie na sekwencjach promotorów genu desminy i wirusa cytomegalii (CMV). Doktorantka zajęła się następnie przygotowaniem specyficznego dla mięśni kasety ekspresyjnej w oparciu o wektor lentiwirusowy, wybrany na podstawie informacji o dłuższym niż w przypadku innych systemów wirusowych utrzymywaniu się w komórkach transgenów oraz możliwości uzyskania populacji komórek zbliżonym poziomie ekspresji. Doktorantka wykorzystwała i zoptymalizowała nowatorską i bezpieczną metodę produkcji wektorów lentiwirusowych w systemie II generacji, którą szczegółowo opisała w *Materiałach i metodach*. Dokonała następnie analizy ekspresji i dystrybucji białka reporterowego EGFP na plazmidzie pLB, stosowanym do pakowania wirusów, wykazując największy poziom transfekcji w komórkach C2C12 w przypadku opracowanego przez siebie promotora MH. Ta obserwacja nie została niestety potwierdzona w przypadku transdukcji komórek wirusem. W toku szeregu pracochłonnych i żmudnych analiz wykazano, że to kwestia niskiej aktywności transkrypcji po wbudowaniu kasety ekspresyjnej do genomu gospodarza, a nie liczby kopii prowirusa w komórce, czy mniejszej efektywności produkcji wirusa. Doktorantka następnie przekłonowała gen laminy A do wektorów lentiwirusowych i wykazała, że egzogenna lamina wykazywała prawidłową lokalizację w kardiomiocytach i mioblastach, niezależnie od zastosowanego promotora, a proces transdukcji nie wpływał ani na morfologię komórek, ani jąder, ani na lokalizację emeryny.

Zwieńczeniem pracy były badania *in vivo*, przeprowadzone na myszach, ale tym razem Doktorantka zastosowała skonstruowany na jej potrzeby wektor AAV-9, o którym wiadomo, że wykazuje wysoką aktywność w mięśniach i innych tkankach (nie organach!!!). Wektory z różnymi promotorami wstrzyknięto do mięśni kończyn mysich noworodków (rozumiem, że w stadium P0-P5) i po upływie 6 tygodni analizowano obecność białka reporterowego EGFP zarówno w kończynie nastrzykniętej, jak i kontralateralnej oraz w mięśniu sercowym, wątrobie i płucach. Uzyskane dane, uwzględniające również standaryzację pomiarów pod względem liczby kopii wirusa, wskazują, że wektor pod kontrolą promotora MH wykazuje największą aktywność w mięśniach nastrzykniętych, a najniższą w badanych tkankach miękkich. Obserwację tę potwierdzono za pomocą mikroskopii konfokalnej. Doktorantka stosując barwienia histochemiczne wykazała następnie, że wprowadzenie wektorów wirusowych, zwłaszcza tego pod kontrolą promotora MH nie spowodowało zmian w morfologii mięśni. Dane te wskazują, że opracowane przez nią konstrukty nie są toksyczne dla tkanki mięśniowej i nie akumulują się w tkankach miękkich, co sugeruje ich specyficzność tkankową i wskazuje na konieczność prowadzenia dalszych badań nad ich zastosowaniem w celu opracowania skutecznej terapii laminopatii, a być może i innych miopatii. Jedyna moja uwaga dotyczy liczby zbadanych zwierząt, jest ona zbyt mała do rzetelnej analizy statystycznej, przez co wyniki uzyskane w tej części rozprawy powinny być traktowane jako wstępne, stanowiące zaczątek do dalszych badań.

Dyskusja jest długa (bo i wiele było kwestii do przedyskutowania), podzielona na części odnoszące się do poszczególnych partii wyników. Czyta się ją niezle, aczkolwiek momentami jest "przegadana". Na podstawie lektury tego rozdziału można stwierdzić dojrzałość naukową Doktorantki, znajomość literatury w zakresie tematyki prowadzonych badań (no może z wyjątkiem części poświęconej mechanizmom miopatii, o czym już pisałam wcześniej), umiejętność wysnuwania wniosków i planów badawczych.

W części *Podsumowanie* zabrakło mi jednozdaniowego wniosku (typu "take home message"), który choć nie jest niezbędny czyniłby przekaz rozprawy bardziej nośny.

Wykaz skrótów jest dość długi, skróty są rozwinięte poprawnie; moim zdaniem nie powinno się w wykazie zamieszczać pozycji, które były tylko raz wymienione w tekście. Podoba mi się natomiast podanie anglojęzycznych nazw, od których najczęściej skróty były utworzone.

Bibliografia jest kompletna, nie udało mi się znaleźć brakujących pozycji. Zastosowany niekonwencjonalny sposób wymieniania pozycji utrudnia czasem znalezienie tej pożądanej.

### Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Piekarowicz ma dużą wartość nie tylko poznawczą, ale i aplikacyjną, stwarzającą podstawy do opracowania metody podawania leku genetycznego pacjentom z laminopatią (a być może i innymi miopatiami). Za główne osiągnięcie Doktorantki uważam utworzenie i scharakteryzowanie nowatorskiego promotora hybrydowego MH, który wydaje się specyficznie działać w mięśniach poprzecznie prążkowanych i komórkach miogennych, a opracowane przez nią wektory wirusowe oparte o tenże promotor zdają się nie mieć efektów toksycznych na tkankę mięśniową. Praca jest spójna tematycznie, z wyraźnie postawionym celem i kolejno stawianymi ambitnymi zadaniami, które doktorantka zrealizowała w całej rozciągłości. Trudny i wyjątkowo obszerny zakres badań (od komórek pobranych od pacjentów, poprzez linie komórkowe i manipulacje narzędziami biologii molekularnej po tkanki zwierzęce), niezwykle bogaty warsztat metodyczny oraz bardzo dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej. Wykazała się ona umiejętnością zdefiniowania problemu badawczego i jego rozwiązania, a także zdolnością do krytycznej analizy własnych wyników badań w oparciu o dane literaturowe. Uzyskane przez nią wyniki są nowatorskie i stanowią - co jak sama wskazuje - podstawę do dalszych badań. zaś wyciągnięte w rozprawie wnioski są uzasadnione. Przedstawione w recenzji uwagi i krytyczne komentarze nie umniejszają wysokiej oceny tej rozprawy, aczkolwiek mam nadzieję, że podczas obrony Doktorantka "zrehabilituje się" odnosząc się do tejsze krytyki.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Piekarowicz spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Wydziału Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Piekarowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez nią stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii.

Ponadto, zważywszy na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną recenzowanej rozprawy doktorskiej, o czym świadczy również opublikowanie omówionych w rozprawie wyników w postaci trzech artykułów (w tym dwóch pierwszoautorских), które już ukazały się w wiodących czasopismach naukowych i kolejnego w przygotowaniu oraz zgłoszenia patentowego opartego o przedstawiony w rozprawie promotor hybrydowy MH, wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną dla Rady Wydziału Biotechnologii nagrodą.

*Rezdol*