Kraków, 23.10.2023 r.

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
PANI MGR ZUZANNY ROGALSKIEJ ZATYTUŁOWANEJ:

„Określenie wpływu nieprawidłowości splicingu mRNA czynnika transkrypcyjnego NFIX na patomechanizm dystrofii miotonicznej oraz opracowanie narzędzia terapii genowej dla tej choroby"

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Zuzanny Rogalskiej dotyczy zrozumienia mechanizmów dystrofii miotonicznej (DM) a szczególnie DM typu 1 (DM1), dziedzicznej, dominującej choroby genetycznej. Choć etiologia DM1 jest dobrze poznana, choroba jest wciąż nieuleczalna. Praca zgłębia m.in. mechanizmy nieprawidłowego alternatywnego splicingu, które są istotną przyczyną rozwoju DM1. Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest więc niezwykle istotna i ma na celu poznanie mechanizmów procesów współodpowiedzialnych za przebieg dystrofii miotonicznej.

Praca została przygotowana pod opieką Pana prof. dr hab. Krzysztofa Sobczaka a badania wykonano w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, czyli w zespole mającym wieloletnie doświadczenie, poparte świetnymi publikacjami, w tematyce badania roli kwasów nukleinowych w rozwoju różnych chorób a także wykorzystania ich jako strategii/narzędzi terapeutycznych w postaci np. oligonukleotydów antysensownych. Oceniana praca doktorska wpisuje się właśnie w ten nurt badań.

Formalny opis rozprawy

Oceniana rozprawa zawiera zarówno opublikowane wyniki (oryginalny artykuł naukowy) jak i opis badań, które jeszcze nie zostały opublikowane, choć przedstawione zostały jak przygotowany manuskrypt, gotowy do wysłania do recenzji. Taka forma rozprawy jest jak najbardziej dopuszczalna i zgodna z odpowiednimi zapisami Ustawy o stopniach i tytułach naukowych.

Rozprawa napisana jest w języku angielskim. Pracę otwiera obszerne Streszczenie (w języku polskim) i odpowiadające mu Summary w języku angielskim. Kolejny rozdział to krótki Wstęp (Introduction) wprowadzający w temat badawczy. Mgr Rogalska, po nakreśleniu Celów pracy (Aims of the study) przedstawiła Wyniki, Dyskusję, Konkluzje, Materiały i Metody oraz Piśmiennictwo związane z badaniem zatytułowanym: *„Contribution of splicing abnormalities of NFIX exon 7 on pathomechanism of myotonic dystrophy"*. Ostatnią częścią rozprawy jest opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Molecular*

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

Therapy: Nucleis Acids w 2022 roku praca zatytułowana *"Sustainable recovery of MBNL activity in autoregulatory feedback loop in myotonic dystrophy"* (*Mol Ther Nucleic Acids.* 2022 Nov 3;30:438-448., doi: 10.1016/j.omtn.2022.10.023.). W przypadku skorzystania z możliwości jaką daje Ustawa o stopniach i tytułach naukowych, tzn. złożenia rozprawy doktorskiej w formie „(...) spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych (...)" niezbędne jest dołączenie oświadczenia wszystkich współautorów opublikowanej pracy. W analizowanym przypadku, takie oświadczenie można uznać za formalność, bowiem lista autorów wspomnianej publikacji obejmuje jedynie Doktorantkę oraz promotora, Pana prof. Sobczaka. W moim odczuciu jest to sytuacja wyjątkowa – najczęściej eksperymentalne prace naukowe z dziedziny nauk biologicznych są wieloautorskie – w tym przypadku cała praca badawcza została wykonana przez mgr Rogalską, która również uczestniczyła w opracowaniu wyników, przygotowaniu rycin i pisaniu manuskryptu. Nie ulega wątpliwości, że Doktorantka miała wiodący udział w powstaniu tej publikacji.

Skoncentrowanie się na badaniach w ramach wspomnianego powyżej opublikowanego manuskryptu, prawdopodobnie wpłynęło na to, że całkowity dorobek publikacyjny mgr Rogalskiej nie jest obszerny. Jednak to nie ilość, a jakość publikacji powinna być brana pod uwagę przy ocenie dorobku naukowego – w tym przypadku nie mam wątpliwości, że Doktorantka jest bardzo dobrym naukowcem. Na szczególne podkreślenie zasługuje również fakt, że mgr Rogalska była kierownikiem kilku własnych, małych projektów wydziałowych. Choć nie jest to wymóg formalny, to jednak szkoda, że nie przedstawiono informacji o innych aspektach działalności naukowej, w tym dotyczących wystąpień konferencyjnych, działalności organizacyjnej czy popularnonaukowej.

Merytoryczny opis rozprawy

Rozprawa doktorska, choć nie jest napisana w klasyczny sposób, jest dobrze przemyślanym i opracowanym zestawieniem aktualnej wiedzy dotyczącej dystrofii miotonicznej a przede wszystkim prezentuje wyniki badań, wskazujące na rolę czynnika NFIX w jej rozwoju oraz sugeruje potencjał terapeutyczny nadekspresji białka MBNL1 w DM.

W dobrze zredagowanym, liczącym 16 stron **Wstępie**, Doktorantka skupiła się w pierwszej części na przedstawieniu molekularnych mechanizmów dystrofii miotonicznej i potencjalnych eksperymentalnych terapii. W drugim punkcie **Wstępu**, podzielonym na sześć podrozdziałów, opisała czynnik transkrypcyjny NFIX, jego strukturę, funkcje, mechanizmy alternatywnego splicingu, mutacje prowadzące do chorób u ludzi a także nakreśliła fenotyp myszy pozbawionych ekspresji *Nfix*. Lektura tej części pracy wskazuje, że mgr

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

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

Rogalska dokonała wyboru najważniejszych informacji i przedstawiła kluczowe aspekty choroby oraz badanego czynnika transkrypcyjnego. Wstęp czyta się dobrze, jest on zilustrowany czytelnymi sześcioma rycinami zawierającymi dokładne legendy. Moja (drobna, edytorska) uwaga dotycząca tej oraz następnych części pracy (w sekcji Wyniki) dotyczy właśnie rycin, tzn. ich umiejscowienia w rozprawie. Bardziej czytelne w mojej opinii byłoby wstawienie ryciny w miejscu, gdzie wspomina się o niej po raz pierwszy, a nie na końcu, czasem bardzo obszernych, fragmentów tekstu (np. Ryc. 3 pojawia się na stronie 21, a pierwsza informacja o jej zawartości jest już na stronie 17). Nie jest to oczywiście błąd, ale w mojej ocenie takie ułożenie rysunków utrudnia nieco lekturę pracy.

Nie mam uwag do tej części, tekst jest napisany poprawnie, nie zawiera błędów językowych. Chciałam prosić jedynie o doprecyzowanie zdania na str. 19: *„The intramuscular injection of adeno-associated virus (AAV) encoding for MBNL1 induced the alternative splicing correction and rescued muscle hyperexcitability"*. Jak rozumiem, Autorka miała na myśli wektor AAV a nie *strice* wirus, dobrze byłoby również wskazać, który serotyp wektora AAV został wykorzystany w cytowanych badaniach.

Cele pracy zostały dobrze zdefiniowane, mgr Rogalska nakreśliła główne zadania projektu czyli lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za zmianę ekspresji genów w dystrofii miotonicznej oraz opracowanie potencjalnej strategii terapeutycznej wykorzystującej narzędzia terapii genowej.

Rozdział **Wyniki**, jak wspomniano powyżej, składa się z nieopublikowanych wyników, przygotowanych w formie manuskryptu (być może już wysłanego do recenzji?) oraz opublikowanej pracy. W przypadku oceny drugiej części, recenzent pracy doktorskiej ma ułatwione zadanie, bo wyniki zostały poddane wnikliwej ocenie ekspertów zapoznanych z tematyką projektu, wyznaczonych przez redakcję (*nota bene* bardzo dobrego) czasopisma *Molecular Therapy: Nucleic Acids*.

Realizując pierwsze zadanie, Doktorantka skoncentrowała się na analizie zaburzeń splicingowych czynnika NFIX i tego, jakie konsekwencje będzie mieć fakt włączenia eksonu 7 na jego aktywność. W ramach przeprowadzonych analiz mgr Rogalska zastosowała dwie strategie: w pierwszym podejściu uzyskała dwie stabilne linie komórek HEK z funkcjonalnym nokautem endogennego *NFIX* (*NFIX*-KO) ale z indukowalną nadekspresją izoform NFIX z eksonem 7 i bez eksonu 7 (nazwane jako NFIX+7 lub NFIX-7). Druga strategia zakładała manipulację włączania eksonu 7 do mRNA *NFIX* przy użyciu antysensownego oligonukleotydu (AON) nakierowanego na połączenie eksonu 7 z intronem 7. Pierwsze podejście nie pokazało znaczących różnic w aktywności transkrypcyjnej badanych izoform NFIX, co Doktorantka tłumaczy zbyt wysokim poziomem ekspresji egzogenów. W przeciwieństwie, zastosowanie AON w ludzkich

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

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

komórkach mięśni szkieletowych, w których dominuje izoforma NFIX+7, prowadziło do efektywnego pomijania eksonu 7 i produkcję głównie izoformy NFIX-7, co prowadziło do zmiany ekspresji setek genów (wyniki analizy RNA-seq). Analizowano również próbki mięśni od pacjentów z DM1 i co ciekawe, stwierdzono, że ekspresja wielu z nich była znacząco zmieniona w komórkach mięśniowych poddanych działaniu badanego antysensownego oligonukleotydu. Wyniki te wskazują, że zaburzenie splicingu *NFIX* może stanowić istotny element patogenezy DM1 a szczególnie wpływa na ekspresję genów kodujących składniki strukturalne macierzy zewnątrzkomórkowej i geny białek wiążących się z kolagenami. Wyniki te otwierają dalsze kierunki badań i jestem przekonana, że ich kontynuacja przyniesie szereg nowych danych dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za przebieg DM1.

Druga (opublikowana) część pracy koncentrowała się na uzyskaniu regulowanej nadekspresji białka MBNL1, będącego regulatorem alternatywnego splicingu, w komórkach mięśniowych. Celem tych badań była możliwość kontroli produkcji białka MBNL1 dostosowanej do poziomu aktywnej puli endogennych białek MBNL w komórce. Zapotrzebowanie na tego typu eksperymenty wynika z faktu, iż długotrwała i silna nadekspresja MBNL1 prowadzi do wielu niepożądanych konsekwencji, zarówno w modelu mysim jak i u pacjentów z DM1. Uzasadnione jest więc zastosowanie regulowanej nadekspresji badanego czynnika. By ten cel osiągnąć, Autorka stworzyła odpowiedni konstrukt gwarantujący ściśle kontrolowaną nadekspresję MBNL1 w zależności od stopnia niedoboru białka. Doktorantka nie tylko uzyskała taki konstrukt, ale przeprowadziła szereg doświadczeń wskazujących na jego potencjał terapeutyczny jako czynnika prowadzącego do korygowania nieprawidłowości alternatywnego splicingu o dużym potencjale w terapii DM.

Zakres przeprowadzonych analiz jest niezwykle szeroki. Mgr Rogalska (jak wskazuje lista współautorów opublikowanej pracy i brak informacji o współudziale innych osób w doświadczenia przeprowadzone w ramach pierwszego zadania) sama wykonała wszystkie badania i biegle posługuje się takimi technikami jak hodowla różnych typów komórek, manipulacje genetyczne i konstrukcja linii komórkowych z nadekspresją danych czynników, transfekcja komórek, izolacja RNA, analizy RT-PCR, badanie poziomu białek z wykorzystaniem metody Western Blot czy mikroskopii fluorescencyjnej, badanie aktywności lucyferazy etc. Co szczególnie istotne, wykonała eksperymenty sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq) oraz przeprowadziła również analizy bioinformatyczne.

Informacje te wskazują na duże zaangażowanie Doktorantki w pracę laboratoryjną. Nie mam wątpliwości, że mgr Rogalska jest bardzo dobrym eksperymentatorem, biegle posługującym się najnowszymi metodami biologii molekularnej.

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

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

Moje drobne uwagi do tej części pracy, zamieszczone poniżej, mają głównie charakter edytorski i mogą pomóc w przygotowaniu finalnej wersji manuskryptu (jeśli nie zostało to już zrobione):

1. Przy opisie hodowli komórek Flp-In™ T-REx™ 293 Doktorantka pisze o dodawaniu 1% mieszaniny antybiotyków/czynników anty-mitotycznych; sugeruję podawać wartości antybiotyków w jednostkach/stężeniach a nie w procentach. Taki opis (w mojej ocenie prawidłowy) zawarto w przypadku hodowli komórek HSkM (ludzkich mioblastów).

2. Zastanawia mnie dobór testu statystycznego – wszystkie wyniki przedstawione w pracy zostały poddane analizie za pomocą testu T- Studenta. Taka analiza jest uzasadniona dla porównania dwóch grup badawczych, a w pracy, w wielu przypadkach porównywane są trzy albo więcej grup. Proszę Doktorantkę o uzasadnienie doboru takiego a nie innego testu statystycznego do analizy wyników zaprezentowanych w pracy.

3. Tytuły niektórych rycin (np. Rycina 12, Rycina 13) wskazują, że zaprezentowano w nich jedynie wyniki z komórek HEK, podczas gdy przedstawiają one również dane z modelu mysiego, powinny więc zawierać tę informację, np. tytuł Ryc. 12 mógłby brzmieć *„The expression level of NFI family members in generated HEK293 cell models and Nfix-KO mice"*

4. Proszę o doprecyzowanie jak oszacowano względny poziom białka, pokazany na np. Rycinie 8f. Czy winkulina jest najlepszym tzw. „białkiem konstytutywnym" w badanym układzie?

5. Czy na pewno wykresy dla NFIA i NFIB na Ryc. 12 przedstawiają dane z czterech powtórzeń, jak podano w opisie ryciny?

6. Na Ryc. 13g przedstawiono dane ekspresji genów w mózgu myszy typu WT oraz *Nfix*-KO. Czy były jakieś specjalne przesłanki, że w tej analizie wykorzystano właśnie tę tkankę a nie mięśnie (analogicznie do wyników zaprezentowanych np. na Ryc. 12b).

7. Przedstawione wyniki niewątpliwie wskazują, że NFIX jest regulatorem ekspresji genów. W moim odczuciu, bardzo istotne są analizy przeprowadzone w komórkach mięśniowych. Choć Doktorantka nie obserwowała żadnego wpływu stosowanego AON na ekspresję *MYOD* czy *MYOG*, czy możliwe jest, że zastosowana strategia wpływa na np. regenerację komórek mięśniowych?

8. Część badań było prowadzonych na niezróżnicowanych i zróżnicowanych komórkach mięśniowych, jak oceniano zróżnicowanie komórek HSkM? Nie znalazłam w pracy wyników potwierdzających

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

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

wydajność zastosowanego protokołu różnicowania, czy wykonywano takie analizy?

Moja sumaryczna ocena przeprowadzonych badań i całej rozprawy doktorskiej jest bardzo wysoka. Uzyskane wyniki prawidłowo przeanalizowano i przedyskutowano na tle literatury przedmiotu. Doktorantka ze swobodą zinterpretowała wyniki swoich badań. Szkoda jedynie, że nie zamieściła końcowego podsumowania z najważniejszymi wnioskami/schematem podsumowującymi obie części pracy, stanowiącego globalne i całościowe opracowanie tematu.

Podsumowanie

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Pani mgr Zuzanna Rogalska posiada umiejętność samodzielnego planowania, wykonania i opracowania rezultatów swojej pracy naukowej. Co ważne, uzyskała wyniki wyjaśniające wybrane mechanizmy patologii dystrofii miotonicznej. Badania te mogą stać się podwaliną do przeprowadzenia dalszych doświadczeń i nakreślają, w którym kierunku może zmierzać eksperymentalna terapia badanej choroby.

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 im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Zuzanny Rogalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom rozprawy, fakt opublikowania wyników badań w bardzo dobrym czasopiśmie i pierwsze autorstwo Doktorantki, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku,

Agnieszka Łoboda

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

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