

Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgra Macieja Dąbrowskiego

Tytuł rozprawy: *Stymulowany aminoglikozydami translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP w wybranych genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD).*

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgra Macieja Dąbrowskiego została przygotowana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Ewy Ziętkiewicz (promotor) oraz Pani dr Zuzanny Bukowy-Bieryłło (promotor pomocniczy) w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Badania zostały sfinansowane z dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki: grantu OPUS pt. „*Analiza wpływu wybranych związków chemicznych na translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP (PTC readthrough) w genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek*”; nr 2011/01/B/NZ4/04840) oraz grantu PRELUDIUM pt. „*Translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP (PTC readthrough) w genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek – stymulacja związkami nie-aminoglikozydowymi jako alternatywa dla antybiotyków aminoglikozydowych*”; nr 2016/20/T/NZ4/00525, w którym to projekcie Pan mgr Maciej Dąbrowski jest kierownikiem.

Autor podjął się badań nad biologiczną skutecznością antybiotyków aminoglikozydowych, jako związków drobnocząsteczkowych, zwiększających „przepuszczalność” przedwczesnego kodonu STOP (PTC od ang. *premature termination codon*), a także szerzej – badań oceniających możliwość wykorzystania w/w związków w terapii pacjentów z pierwotną dyskinezą rzęsek (PCD od ang. *primary cililary dyskinesia*). Warianty patogenne typu „kodon STOP” stanowią dużą część zmian chorobotwórczych, identyfikowanych u pacjentów z różnymi zespołami lub schorzeniami genetycznymi. Ogółem szacuje się, że ok. 20% wariantów patogennych to zmiany typu kodonu STOP. W przypadku PCD, częstość alleli patogennych zawierających kodon przedwczesnej terminacji syntezy białka to nawet ok. 33%. Ze względu na autosomalne recesywne uwarunkowanie PCD, przynajmniej jeden allel z kodonem STOP ma wobec tego ok. 56% chorych. To czyni niniejszą jednostkę chorobową atrakcyjnym obiektem badań nad potencjalnym terapeutycznym zastosowaniem związków zwiększających wydajność translacyjnego odczytu PTC (ang. *PTC readthrough*). Biorąc pod uwagę fakt, że Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka PAN posiada największą w Polsce ekspertyzę w dziedzinie etiopatogenezy, w tym genetycznego uwarunkowania PCD, a także oceniając znaczący, udokumentowany publikacjami, dorobek naukowy Doktoranta, dotyczący tematyki translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP, wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za logiczny i słuszny. Badania podjęte przez Pana mgra Macieja Dąbrowskiego są uzasadnione nie tylko

względnymi naukowo-poznawczymi, ale również praktycznymi. Wyniki pracy mogą bowiem okazać się bardzo istotne naukowo i użyteczne w terapii chorych na PCD lub inne wybrane choroby genetyczne człowieka. Dlatego też już na początku recenzji chciałbym podkreślić dużą potencjalną wartość aplikacyjną przeprowadzonych badań.

Przedstawiona mi do oceny dysertacja ma typowy dla rozpraw doktorskich układ redakcyjny. Zawiera 143 strony maszynopisu (w tym informacje o źródłach finansowania, wykaz publikacji, wystąpień oraz nagród i wyróżnień Doktoranta, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści, spis skrótów oraz 123 strony tekstu pracy, włączając w to materiały dodatkowe). Pracę cechuje tradycyjny podział na wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, materiały dodatkowe oraz spis tabel i rycin. W pracy umieszczono 18 tabel i 37 rycin oraz 209 pozycji piśmiennictwa.

Dysertację otwiera obszerny „Wstęp”, w którym Doktorant opisał krótko proces terminacji translacji u prokariotów i eukariotów, a następnie szczegółowo scharakteryzował naturalnie występujące, biologiczne zjawisko translacyjnego odczytu kodonów STOP i czynniki wpływające na efektywność tego procesu. W kolejnych podrozdziałach Autor przedstawił zagadnienia dotyczące wystąpienia w materiale genetycznym przedwczesnego kodonu STOP (PTC), wraz z biologicznymi konsekwencjami na poziomie komórki i organizmu. W wielu przypadkach oczywistym skutkiem wystąpienia PTC u człowieka jest choroba genetyczna, a fenomen translacyjnego odczytu przedwczesnego kodonu STOP można wykorzystać w celu zwiększenia ekspresji białka produkowanego przez uszkodzony gen i osłabienia lub zniwelowania objawów schorzenia genetycznego. Istnieje szereg substancji chemicznych o znanej aktywności zwiększającej prawdopodobieństwo odczytania przedwczesnego kodonu STOP przez aparat translacyjny komórki (są to tzw. supresory odczytu PTC). Doktorant pisze o nich szczegółowo w dalszej części wstępu, omawiając przy tym ich terapeutyczny potencjał. Najlepiej zbadanymi związkami z tej grupy są antybiotyki aminoglikozydowe (AAGs), choć znane są także substancje o odmiennej budowie chemicznej, jak np. antybiotyki makrolidowe, escyna, czy też ataluren, jedyny zarejestrowany w Europie preparat wykorzystywany w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne’a, spowodowanej mutacjami typu kodonu STOP. W dalszej części pracy mgr Maciej Dąbrowski opisuje podłoże genetyczne PCD, uzasadniając wybór powyższej jednostki chorobowej do badań nad terapeutycznym zastosowaniem związków chemicznych, wzmagających translacyjny odczyt PTC. Pomimo silnie heterogennego uwarunkowania genetycznego (ok. 40 genów znanych z zaangażowania w patogenezę choroby), pierwotna dyskineza rzęsek wydaje się być bardzo dobrym obiektem do badań, gdyż duża część wariantów patogennych (ok. 1/3) to zlokalizowane w różnych genach zmiany typu kodonu STOP (tzw. warianty *nonsense*).

W mojej ocenie wstęp stanowi szczegółowe i rzetelne omówienie poruszanych zagadnień w świetle bogatego i aktualnego piśmiennictwa. Autor w przystępny i ciekawy sposób pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problematyką, której dotyczy Jego praca naukowa. Lektura wstępu dowodzi, że Doktorant ma bardzo dobre przygotowanie teoretyczne do realizacji podjętych zadań badawczych.

Głównym celem rozprawy doktorskiej Pana mgra Macieja Dąbrowskiego była analiza efektywności stymulacji odczytu („przepuszczalności”) przedwczesnego kodonu STOP dla kilkunastu różnych mutacji typu PTC, zlokalizowanych w pięciu genach (*DNAH5*, *RSPH4A4*, *DNAH11*, *CCDC40*, *SPAG1*) zaangażowanych w patogenezę PCD. Jako stymulatorów odczytu PTC użyto czterech antybiotyków aminoglikozydowych (gentamycyny, paromomycyny, amikacyny i G418). Celem wyłonienia związków o najwyższej skuteczności, przeprowadzono badania w dwóch układach eksperymentalnych – *in vitro* i *ex vivo* – przy różnych stężeniach antybiotyków. Dodatkowym celem pracy, ze względu na znaną aktywność toksyczną aminoglikozydów względem niektórych typów komórek (głównie nefro- i ototoksyczność), była ocena cytotoksyczności badanych związków w stosunku do komórek nabłonka oddechowego oraz ocena ich wpływu na funkcję i rozwój rzęsek (ciliotoksyczność).

W rozdziałach „Materiały” i „Metody” Doktorant rzetelnie i starannie opisuje wykorzystany w badaniach materiał biologiczny, a także użyte do eksperymentów odczynniki i sprzęt. Następnie Autor niezwykle szczegółowo, wraz z protokołami, podaje metodykę badań, na którą składała się bardzo duża liczba wykorzystywanych technik laboratoryjnych. Różnorodność zastosowanych metod jest wręcz imponująca. Obejmują one klonowanie DNA w celu przygotowania rekombinowanych wektorów, transformację i hodowlę bakterii celem namnożenia rekombinowanych plazmidów, transkrypcję i translację *in vitro*, hodowle komórkowe linii ustalonych (HEK293) oraz wyprowadzonych od pacjentów (komórki nabłonka oddechowego), transfekcję komórek, barwienie immunofluorescencyjne, skaningową mikroskopię elektronową, wideomikroskopię i inne. Co warto podkreślić, większość badań została przeprowadzona w Polsce, a jedynie nieliczne analizy (jak np. szybkoklatkowa wideomikroskopia *Time-lapse*), w trakcie zagranicznego pobytu stypendialnego Doktoranta na Uniwersytecie w Southampton. O rzetelności naukowego podejścia Pana mgra Macieja Dąbrowskiego świadczy dodatkowo szczegółowy i drobiazgowy suplement metodyczny, który Autor umieścił w rozdziale 9.

Podsumowując tę część rozprawy stwierdzam, że jestem pod dużym wrażeniem różnorodności metod i technik laboratoryjnych zastosowanych przez Pana mgra Macieja Dąbrowskiego. W mojej ocenie, ten rozdział dysertacji jednoznacznie dowodzi, że Doktorant jest wszechstronnie wykształconym biologiem molekularnym, umiejętnie wykorzystującym istniejące techniki badawcze dla rozwiązania skomplikowanych problemów naukowych z zakresu medycyny molekularnej.

W pierwszej części rozdziału „Wyniki” Doktorant dokonał wyboru zmian patogennych wprowadzających PTC, które miały stać się obiektem dalszych badań nad skutecznością stymulacji odczytu PTC. Do badań wybrano 17 wariantów patogennych, położonych w pięciu genach (*DNAH5*, *RSPH4A4*, *DNAH11*, *CCDC40*, *SPAG1*), w których uszkodzenia powodują PCD. Wybór wariantów został logicznie uzasadniony i dotyczył on wyłącznie zmian identyfikowanych w przynajmniej kilku rodzinach z populacji polskiej. W dalszej części pracy przygotowano 17 wstawek odwzorowujących w/w warianty patogenne, które wklonowano następnie do wektora pDluc. Co ciekawe, droga chemicznej syntezy oligonukleotydów okazała

się lepszym sposobem uzyskania wstawek niż amplifikacja produktów PCR na matrycy DNA pacjentów.

Do tej części pracy miałbym jedynie drobne uwagi. Pierwsza dotyczy tabeli nr 1, która przedstawia procentowy rozkład częstości występowania 17-tu wyselekcjonowanych wariantów patogennych w grupie 295 polskich chorych z PCD oraz ryciny nr 21. Zarówno w tabeli nr 1, jak i na rycinie nr 21 przedstawiono opisy wariantów, które nie są zgodne z aktualnymi wytycznymi HGVS, tj. Stowarzyszenia ds. Zmienności Genomu Ludzkiego (ang. Human Genome Variation Society). Według obecnie obowiązującej nomenklatury HGVS, zalecane jest umieszczenie „p.” przed opisem wariantu na poziomie białkowym. Preferowane jest także posługiwanie się trójliterowym kodem przy zapisie aminokwasów. Usprawiedliwiając drobne, nic nieznaczące uchybienie Doktoranta, muszę zaznaczyć, że w ostatnich latach zasady nomenklaturowe HGVS ulegają częstym modyfikacjom i nawet liczne medyczne laboratoria diagnostyki genetycznej nie nadążając za zmianami, nie przestrzegają aktualnych wytycznych odnośnie zapisu wariantów genetycznych. Warto także podkreślić, że zgodnie z nowymi wytycznymi ACMG (Amerykańskiego Kolegium Genetyki i Genomiki Medycznej; ang. American Society of Medical Genetics and Genomics) używane we wszystkich częściach niniejszej dysertacji pojęcie „mutacja”, czy to w odniesieniu do wariantu patogennego, czy też w odniesieniu do zmiany o częstości populacyjnej $<1\%$, nie powinno być już używane. Zgodnie z nowymi trendami nomenklaturowymi, środowiska naukowe genetyków używają obecnie pojęcia „wariant” i określają go w sposób opisowy (wariant patogenny, prawdopodobnie patogenny, o niejasnym znaczeniu (VUS), prawdopodobnie łagodny, łagodny). Zwyczajowe pojęcie „mutacji” wrosło do tego stopnia w język naukowy, że i tak większość genetyków używa go w wystąpieniach konferencyjnych, choć jednocześnie unika tego sformułowania w pisemnych opracowaniach naukowych.

Ponadto w trakcie lektury tabeli nr 1 nasunęła mi się pewna refleksja, także do przemyślenia przez Autora. Być może warto byłoby umieścić w podrozdziale 1.10.3 wstępu (pt. „Genetyczne podłoże PCD”) informacje o rozkładzie najczęstszych alleli patogennych, zidentyfikowanych w populacji polskiej. Możliwość zestawienia częstości wszystkich alleli patogennych z częstościami wybranych 17-tu wariantów, ułatwiłaby czytelnikowi ocenę na ile powszechne wśród chorych z PCD, a tym samym ważne z klinicznego punktu widzenia, są warianty poddane dalszym analizom.

Kolejna część sekcji „Wyniki” poświęcona jest analizie efektywności procesu odczytu PTC stymulowanego AAGs w systemie transkrypcji/translacji (TnT) *in vitro*. Początkowo przeprowadzono testy AAGs, by wyeliminować związki o niskim potencjale indukcji odczytu PTC. Spośród czterech badanych antybiotyków (gentamycyna, amikacyna, paromomycyna, G418), jedynie amikacyna została wykluczona z dalszych testów ze względu na niską skuteczność. Do badań zakwalifikowano 16 z 17 przygotowanych uprzednio konstruktorów, z których jedynie pięć wykazało zdolność stymulacji odczytu PTC w obecności AAGs. „Przepuszczalność” badanych kodonów STOP indukowana aminoglikozydami wahała się od ok. 2 do 28%, w zależności od analizowanego kodonu i użytego antybiotyku. Następnie powyższy eksperyment

odtworzono *ex vivo*, w hodowli komórek nabłonkowych HEK293, które transfekowano za pomocą pięciu najbardziej responsywnych konstruktów. Wyniki eksperymentów wykazały, że wszystkie AAGs skutecznie indukowały odczyt PTC także w hodowli komórkowej, choć uzyskany efekt był przynajmniej kilkakrotnie słabszy niż w układzie *in vitro* (maks. 6%). W dalszej części pracy, Autor ocenił cytotoksyczność aminoglikozydów względem komórek nabłonka oddechowego, stwierdzając niekorzystny wpływ tej grupy związków na nabłonek. Następnie poddał ocenie wpływ AAGs na budowę i funkcję rzęsek nabłonka, stwierdzając, że spośród wszystkich testowanych antybiotyków, jedynie G418 wykazuje silny negatywny wpływ na ciliogenezę. W podsumowaniu wyników Doktorant wskazał konieczność podjęcia dalszych badań nad nie-aminoglikozydowymi (NAGs) związkami stymulującymi PTC *readthrough*, jako mniej cytotoksyczną alternatywą dla AAGs. Co więcej, Pan mgr Maciej Dąbrowski już podjął takie badania w trakcie swojego stażu naukowego finansowanego z programu ETIUDA NCN, które obecnie kontynuuje jako kierownik projektu przyznanego w ramach grantu PRELUDIUM NCN.

W „Dyskusji”, obejmującej 17 stron i podzielonej na osiem podrozdziałów, Autor przystąpił do interpretacji uzyskanych rezultatów w odniesieniu do danych z piśmiennictwa. Doktorant rzetelnie omówił wyniki własnych badań, które w większości przypadków są zgodne z danymi z piśmiennictwa. Autor nie zadowolili się wynikami badań dotyczącymi wyłącznie zmian poziomu transkryptu, ale pokusił się także o próbę przewidzenia wpływu PTC *readthrough* na funkcjonalność białek kodowanych przez poddane analizom, uszkodzone geny „rzęskowe”. Pomimo obiecującej jak by się wydawało skuteczności biologicznej AAGs w indukcji odczytu PTC, biologiczna funkcjonalność białek stałaby pod dużym znakiem zapytania (analizy *in silico* z tabel nr 7 i 8). Doktorant zachował zatem stosowny krytycyzm i z dużą ostrożnością przedyskutował perspektywy klinicznego zastosowania terapii wykorzystujących podejście PTC *readthrough*, a także problemy z tym związane. Na zakończenie dyskusji Pan mgr Maciej Dąbrowski wskazał konieczność dalszych badań nad innymi, mniej toksycznymi od aminoglikozydów związkami, których prawdopodobieństwo wykorzystania w praktyce klinicznej jest znacznie większe.

Wnioski wypływające z pracy zostały sformułowane poprawnie i w całości odpowiadają powziętym do realizacji celom. Stanowią one logiczne uogólnienia, wyprowadzone ze szczegółowych wyników pracy. Co warto podkreślić, dzięki sformułowaniu wniosku dotyczącego mniejszego niż przypuszczano wpływu cytozyny w pozycji +4 (pierwszy nukleotyd za kodonem STOP) na proces PTC *readthrough*, poszerzona została wiedza biologiczna nt. zjawiska odczytu przedwczesnego kodonu STOP i jego regulacji.

Uzyskane wyniki Doktorant omówił w odniesieniu do szerokiego, trafnie dobranego piśmiennictwa, obejmującego łącznie 209 pozycji. Praca została napisana poprawną polszczyzną, z niezwykłą dbałością o szczegóły. Cechuje ją poprawność stylistyczna, składniowa, ortograficzna i interpunkcyjna, co sprawia, że czyta się ją z dużą przyjemnością. W całej pracy znalazłem jedynie kilka drobnych błędów interpunkcyjnych i nieprawidłową odmianę nazwisk zagranicznych w dopełniaczu I. poj. (powinno być zespół Ulricha i zespół

Retta, a nie z. Ulrich'a i z. Rett'a, ponieważ nazwiska te kończą się spółgłoską). Tekst pracy uzupełniają i wzbogacają czytelne ryciny oraz starannie przygotowane tabele. Sposób redakcji tekstu, tabel i rycin uważam za wzorowy.

Na zakończenie recenzji chciałbym wyraźnie podkreślić, że rozprawę doktorską Pana mgra Macieja Dąbrowskiego oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w toku realizacji pracy rezultaty mają istotne znaczenie dla nauki, a w dalszej perspektywie także dla praktyki klinicznej. Pragnę zauważyć, że wyniki rozprawy stanowią rzeczywisty wkład w rozwój wiedzy w reprezentowanej przez Doktoranta dziedzinie badań. Jestem także przekonany, że zostaną one opublikowane w dobrych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgra Macieja Dąbrowskiego spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgra Macieja Dąbrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgra Macieja Dąbrowskiego, z uwagi na wysoką wartość poznawczą wyników badań oraz ich duże znaczenie praktyczne.

Poznań, 08.06.2018

Z wyrazami szacunku,

A. Jamsheer

Dr hab. n. med. Aleksander Jamsheer

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Uniwersytet Medyczny

im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań

tel. 61 854 76 18

email: jamsheer@ump.edu.pl lub jamsheer@wp.pl