



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

III Katedra Pediatrii

Klinika Pneumologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej

ul. Szpitalna 27/33
60-572 Poznań

tel.: 61 8491313
fax: 61 8480111
e-mail: klinikapad@skp.ump.edu.pl

Dr hab. n. med. Aleksandra Szczepankiewicz
Pracownia Badań Komórkowych i Molekularnych
Kliniki Pneumologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 10.06.2018

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Macieja Dąbrowskiego

pt. „Stymulowany aminoglikozydami translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP w wybranych genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD)”

Promotor: Prof. dr hab. Ewa Ziętkiewicz

Choroby genetyczne spowodowane przez mutacje prowadzące do powstania przedwczesnego kodonu STOP stanowią ok. 30% wszystkich chorób genetycznych człowieka. Poza metodami terapii genowej, jedną z możliwości leczenia tych chorób może być zastosowanie związków chemicznych, które wspomagają translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP wywołanych mutacją. Możliwość wykorzystania związków aminoglikozydowych do stymulacji translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP jest od lat przedmiotem intensywnych badań. Wpływ aminoglikozydów i związków nieaminoglikozydowych był szeroko badany w chorobach uwarunkowanych jednogеноowo m.in. mukowiscydozie czy dystrofii mięśniowej Duchenne’a. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że związki te mogą znaleźć zastosowanie w terapii tych chorób.

Sprawa jest bardziej złożona w przypadku chorób uwarunkowanych wielogenowo takich jak pierwotna dyskineza rzęsek (PCD). W piśmiennictwie światowym, za wyjątkiem

pracy opublikowanej w 2016 roku z udziałem Doktoranta, brak jest badań dotyczących możliwego wpływu związków aminoglikozydowych na translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP w przypadku mutacji w genach leżących u podłoża PCD. Tym większa jest w tym względzie wartość rozprawy doktorskiej, która uzupełnia lukę badawczą w temacie możliwości zastosowania prostych związków chemicznych (aminoglikozydów) do stymulacji odczytu przedwczesnych kodonów STOP wywołanych przez mutacje w wielu różnych genach.

Dokonując oceny przedstawionej rozprawy należy przede wszystkim wskazać na trafność wyboru jej tematu. Poszukiwanie związków wspomagających mechanizm stymulowanego odczytu przedwczesnych kodonów STOP w genach leżących u podłoża pierwotnej dyskinezy rzęsek jest istotne nie tylko w aspekcie poznawczym, ale i klinicznym, ponieważ stwarza nowe możliwości leczenia dla pacjentów z tego typu mutacjami.

Praca doktorska jest obszerna, liczy łącznie z piśmiennictwem i załącznikami 143 strony, z tego 27 stron stanowi „Wstęp”, 1 strona „Cele pracy” „Materiał i metody – 19 stron, „Wyniki” – 26 stron, „Dyskusja” – 16 stron, „Wnioski” 1 strona, zamieszczono też streszczenie w języku polskim i angielskim, spis tabel i rycin oraz wykaz stosowanych skrótów i piśmiennictwa liczącego 209 pozycji literaturowych. Dodatkowo, na początku rozprawy Doktorant umieścił informacje o źródłach finansowania, publikacjach własnych i wyróżnieniach, a na końcu zamieszczono materiały dodatkowe z wynikami sekwencjonowania konstruktów ze wstawkami oraz skład buforów i spis aparatury i odczynników wykorzystanych w pracy oraz skan zgody Komisji Etycznej na prowadzenie badań. Została zachowana właściwa proporcja między poszczególnymi częściami rozprawy doktorskiej. Cytowane piśmiennictwo jest dobrze dobrane, aktualne. Na uznanie zasługuje bardzo jasny i przejrzysty styl pracy, a zilustrowanie opisywanych mechanizmów wieloma rycinami i tabelami ułatwia zrozumienie tematu. Praca jest napisana bardzo starannie, bez uchybień edytorskich.

Rozprawę doktorską rozpoczyna bardzo dobrze napisany i wyczerpujący Wstęp, który wprowadza w zagadnienia poruszane w pracy. Na początku Doktorant opisuje proces terminacji translacji, ze szczególnym uwzględnieniem czynników wpływających na efektywność translacyjnego odczytu kodonów STOP. Następnie omówiono rolę tego procesu u eukariontów z podaniem przykładów genów, dla których proces ten jest elementem regulacji ekspresji. W kolejnym rozdziale Doktorant szczegółowo omawia wpływ przedwczesnych kodonów STOP na fenotyp produkowanych białek oraz strategię eksperymentalne służące przywróceniu ekspresji funkcjonalnych białek i redukcji objawów chorób wywołanych przez mutacje prowadzące do powstania przedwczesnych kodonów STOP. Zaprezentowano również

dane z piśmiennictwa dotyczące związków aminoglikozydowych, mechanizmu ich działania oraz potencjału terapeutycznego. W dalszych podrozdziałach wstępu Doktorant przedstawia problem toksyczności tych związków oraz metod ich łagodzenia z użyciem związków kompleksujących czy przeciwutleniaczy. Szczegółowo opisano także mechanizmy działania związków nie-aminoglikozydowych, przy czym biorąc pod uwagę tytuł i cel rozprawy, rozdział ten jest aż nazbyt szczegółowy. Na zakończenie Doktorant omawia możliwości zastosowania stymulowanego odczytu translacyjnego w genach związanych z pierwotną dyskinezą rzęsek. Dane z piśmiennictwa zawarte we Wstępie wskazują na bardzo dobrą znajomość zagadnienia i merytoryczne przygotowanie Doktoranta do prowadzenia badań eksperymentalnych.

Celem pracy była analiza efektywności związków aminoglikozydowych w stymulacji translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP dla 17 mutacji w pięciu genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek. Celem równorzędnym była ocena toksyczności badanych związków dla komórek nabłonka oddechowego i rozwoju rzęsek. Postawione cele Doktorant realizował z wykorzystaniem licznych technik biologii molekularnej oraz biologii komórki w szeregu dobrze zaplanowanych eksperymentów. Cele te zostały w pełni osiągnięte w pracy.

Kolejny rozdział stanowi opis materiału badawczego oraz stosowanych metod. Opis tej części rozprawy został zaprezentowany w sposób przejrzysty, ze szczegółowym opisem wykonywanych procedur, co pozwala na ocenę poprawnego doboru metod oraz wskazuje na olbrzymią pracę Doktoranta w realizację części eksperymentalnej rozprawy.

Rozdział „Wyniki” zasługuje na wyróżnienie ze względu na niezwykle uporządkowany i jasny opis wyników przeprowadzonych badań. Doktorant wykazał, że związkami aminoglikozydowymi najefektywniej stymulującym translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP były G418, paromomycyna i gentamycyna, przy czym najbardziej efektywne stężenie G418 było wysoce toksyczne dla komórek nabłonka oddechowego. Natomiast amikacyna w żadnym z badanych stężeń nie stymulowała translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP w badanych genach. Interesującym spostrzeżeniem jest duża rozbieżność między efektywnością tego procesu w systemie *in vitro* w porównaniu do systemu *ex vivo*, co może wskazywać na ograniczoną zdolność przenikania badanych związków przez błony komórkowe nabłonka oddechowego, zmniejszając ich biodostępność i potencjał terapeutyczny. Obszerność tego rozdziału, bogactwo wykorzystanych technik, a także opis eksperymentów wstępnych, służących optymalizacji wybranych metod są dowodem na bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego przez Doktoranta.

W rozdziale „Dyskusja” przeanalizowano znaczenie badanych stężeń związków aminoglikozydowych, jak również otoczenia kodonu STOP na efektywność translacyjnego odczytu PTC w odniesieniu do istniejącego piśmiennictwa. Omówiono również aspekt toksyczności badanych związków porównując wyniki własne z tymi dostępnymi w literaturze. Istotnym elementem Dyskusji jest również próba wyjaśnienia przez Doktoranta problemów związanych z zastosowaniem podejścia translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP w praktyce klinicznej. Dyskusja przeprowadzona jest w sposób systematyczny wraz z krytyczną oceną wyników własnych i świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia i dużej dojrzałości naukowej Autora.

Sformułowane wnioski są adekwatne do celu pracy i w pełni poparte wynikami, aczkolwiek trzy pierwsze stanowią raczej podsumowanie wyników niż wnioski płynące z rozprawy.

Z obowiązku recenzenta poniżej załączam nieliczne, drobne uwagi do pracy, które nie wpływają na moją wysoką ocenę:

1. Przy opisie celu – pierwszy akapit bardziej pasowałby do wstępu jako akapit kończący i podkreślający lukę w badaniach, natomiast cel powinien zwięźle określać, co będzie przedmiotem pracy
2. W opisie materiałów wyjaśnienia wymaga sformułowanie „komórki ... były izolowane od zdrowych dawców z usuwanych polipów nosowych” (str. 48). Polipy są zazwyczaj manifestacją schorzenia toczącego się w układzie oddechowym, stąd trudno mówić o pacjentach poddanych polipektomii jako o „zdrowych dawcach”.
3. Sformułowanie „Niniejszy projekt...”, „...w opisanym projekcie” należałoby zastąpić „Niniejsza praca...”, „w opisanej pracy” (str. 47, 110)
4. Drobne uchybienia natury językowej: „trafiają do cytoplazmy” zamiast „lokalizują się w cytoplazmie” (str. 26); „komórek człowieka” zamiast „komórek ludzkich” (str. 25, 29, 102); „pilotażowe próby” zamiast „pilotowe próby” (str. 33).

Pomimo kilku uwag natury porządkującej, pragnę podkreślić, że nie zmniejszają one wartości merytorycznej zarówno przeprowadzonych badań jak i wnioskowania. Reasumując mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska Pana mgr Macieja Dąbrowskiego dotyczy ważnego problemu skuteczności związków aminoglikozydowych w stymulacji translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP w genach związanych z PCD, a także ich toksyczności dla komórek nabłonka oddechowego w dwóch systemach eksperymentalnych. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że badania tego typu są złożone i trudne metodologicznie. Pomimo to Doktorant przeprowadził je bezbłędnie. Praca jest również nowatorska wskazując, jak istotne

jest poszukiwanie związków o mniejszej toksyczności i większym potencjale stymulacji, co będzie przedmiotem dalszych badań Doktoranta w ramach przyznanego grantu NCN Preludium.

W świetle przedstawionej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Macieja Dąbrowskiego spełnia wszystkie kryteria wynikające z Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym. W związku z tym przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu wniosek o dopuszczenie Pana mgr Macieja Dąbrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na dużą wartość merytoryczną pracy, zgłaszam wniosek o jej wyróżnienie.

Aleksandra Szczepankiewicz

Dr hab. Aleksandra Szczepankiewicz