

Poznań, 02.07.2025r.

dr hab. Agnieszka Fiszer
Zakład Biotechnologii Medycznej
ICHB PAN w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Alicji Rabiasz p.t.:
„Analiza funkcjonalna wybranych genów zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy
rzęsek przy użyciu organizmu modelowego *Schmidtea mediterranea*”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod opieką Prof. dr. hab. Ewy Ziętkiewicz. Rozprawa stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, a dokładnie zawiera cztery publikacje naukowe, głównie z wiodącym udziałem Doktorantki.

Tematyka pracy jest związana z identyfikacją i analizą funkcjonalną mutacji w genach kodujących białka zaangażowane w budowę rzęsek ruchowych. W badaniach wykorzystano materiał pochodzący od pacjentów z ciliopatiami, ludzkie linie komórkowe oraz organizm modelowy *Schmidtea mediterranea*.

Identyfikacja oraz analiza funkcjonalna genów zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek stanowi istotny problem badawczy. Częstość występowania tego heterogenego pod kątem objawów klinicznych schorzenia, jest prawdopodobnie niedoszacowana. Poznawanie i szczegółowa analiza nowych wariantów przyczynia się do lepszej diagnostyki oraz umożliwia lepsze zrozumienie podstaw molekularnych pierwotnej dyskinezy rzęsek w celu opracowywania leczenia.

Rozprawa ma układ klasyczny dla tego typu opracowań: po Wstępie przedstawiony jest Cel badań oraz omówione publikacje wchodzące w skład rozprawy (które są następnie załączone). Zawarto również Wnioski i Streszczenie rozprawy. Na końcu załączone zostały oświadczenia współautorów publikacji z określeniem wkładu. Ogólnie uważam, że rozprawa została przygotowana bardzo starannie. Wstęp oraz omówienie publikacji zawierają bardzo klarowne, ciekawe i jednocześnie wyczerpujące opisy dotyczące przeprowadzonych badań.

Artykuł 1: Alicja Rabiasz, Ewa Ziętkiewicz „*Schmidtea mediterranea* as a Model Organism to Study the Molecular Background of Human Motile Ciliopathies” Int J Mol Sci. 2023 Feb 24;24(5):4472

Pierwsza przedstawiona praca to obszerny artykuł przeglądowy, w którym Doktorantka jest pierwszym autorem.

W artykule przedstawiono najpierw podstawowe informacje o budowie i funkcjonowaniu rzęsek oraz ciliopatiach, ze szczególnym uwzględnieniem pierwotnej dyskinezy rzęsek. Opracowano tabele z dotychczas poznanymi genami zaangażowanymi w to schorzenie, uwzględniając informację o funkcji kodowanego białka, powodowanej dysfunkcji w rzęskach oraz modelu zwierzęcego, który posłużył potwierdzeniu zaangażowania danego genu w pierwotną dyskinezę rzęsek.

Następnie przedstawiono organizm modelowy planarii z gatunku *Schmidtea mediterranea*, główne zalety w wykorzystaniu i cechy umożliwiające stosowanie w badaniach dotyczących ciliopatii. Następnie omówiono perspektywę badań z wykorzystaniem *S. mediterranea*. Na dzień 30 czerwca artykuł ma 4 cytowania (wg Web of Science, Core Collection).

→ Do tej części badań mam pytanie do Doktorantki odnośnie ograniczeń czy słabszych stron w badaniach ciliopatii z użyciem *S. mediterranea*. Zalety wykorzystanie tego modelu są niezaprzeczalne i bardzo klarownie przedstawione. Jak każdy model badawczy czy organizm modelowy, ten także zapewne ma pewne ograniczenia w wykorzystaniu. Proponuje przedstawić je krótko podczas obrony rozprawy, czy też przedyskutować w nawiązaniu do doświadczenia eksperymentalnego Doktorantki w pracy z tym modelem.

Artykuł 2: Ewa Ziętkiewicz, Zuzanna Bukowy-Bieryłło, Alicja Rabiasz, Patrycja DacRoszak, Alina Wojda, Katarzyna Voelkel, Ewa Rutkiewicz, Andrzej Pogorzelski, Margarida Rasteiro, Michał Witt „**CFAP300: Mutations in Slavic Patients with Primary Ciliary Dyskinesia and a Role in Ciliary Dynein Arms Trafficking**” Am J Respir Cell Mol Biol. 2019 Oct;61(4):440-449

Druga praca to publikacja eksperymentalna, gdzie Doktorantka jest trzecim autorem. W zaprezentowanym projekcie weryfikowano powiązanie określonego wariantu w genie CFAP300 z pierwotną dyskinezą rzęsek. Wkład Doktorantki w niniejszą pracę jest znaczący, niektóre z zadań (jak doświadczenia z wykorzystaniem *S. mediterranea*) są przypisane tylko jej w oświadczeniach o wkładzie, stąd uwzględnienie niniejszej pracy w rozprawie jest w pełni uzasadnione. Przeprowadzone badania wskazywały na konieczność uwzględnienia genu *CFAP300* w skriningach mutacji pacjentów z ciliopatiami. Na dzień 30 czerwca artykuł ma 18 cytowań (wg Web of Science, Core Collection).

→ Odniosę się głównie do części badań w niniejszej pracy, które stanowiły wkład Doktorantki. Zastanowiło mnie, że w rozprawie analiza *in silico* ewolucyjnego zakonserwowania *CFAP300* między człowiekiem a wybranymi organizmami modelowymi (w tym *S. mediterranea*) jest opisana w kontekście określonych sekwencji eksonowych, a nie domen białka. W oryginalnym artykule znalazłam odniesienie bezpośrednio do domeny DUF4498 białka CFAP300, która jest kodowana przez najbardziej zakonserwowane sekwencje i której dotyczy wiele wariantów patogennych. Ponieważ artykuł pochodzi z 2019 roku, będę wdzięczna za komentarz w czasie

rozprawy czy wg aktualnego przeglądu literatury udało się badaczom na świecie zaawansować badania w tym kontekście – poznania roli tej domeny w białku?

Ważnym elementem niniejszej publikacji były badania przeprowadzone przez Doktorantkę z wykorzystaniem *S. mediterranea*, uwzględniające wyciszenie ekspresji homologa *CFAP300* (*Smed-cfap300*) z użyciem interferencji RNA (RNAi). W tym układzie uzyskano zaburzenie funkcji rzęsek ruchowych, co dodatkowo potwierdziło istotność CFAP300 w funkcjonowaniu rzęsek. Na uwagę zasługuje fakt, że były to (z tego co zrozumiałam) pierwsze badania wykonane w Instytucie Genetyki Człowieka PAN z użyciem tego modelu i Doktorantka była zaangażowana w jego wprowadzenie i optymalizację metod.

Artykuł 3: Alicja Rabiasz, Zuzanna Bukowy-Bieryłło, Patrycja Kaźmierczak*, Hanna Przyszałowska-Maciola*, Marcin Mikoś, Irena Wojsyk-Banaszak, Ewa Ziętkiewicz *równorzędny wkład „**A novel pathogenic variant of CFAP221 is a cause of a mild form of primary ciliary dyskinesia**” *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2025 Apr 16;1871(6):167855

Kolejna publikacja to artykuł eksperymentalny formatu *Case Reports*, w którym Doktorantka jest pierwszym autorem i współautorem korespondencyjnym, opublikowany w renomowanym czasopiśmie *BBA – Molecular Basis of Disease*.

W niniejszym artykule Doktorantka była zaangażowana w szereg eksperymentów (w tym samodzielnie tych obejmujących analizę ekspresji genu *CFAP221* w materiale pacjenta oraz wyciszenia homologa *CFAP221* u *S. mediterranea*), które doprowadziły do wniosku, że patogenny wariant w genie *CFAP221* prowadzi do niepowstawania kodowanego białka i powoduje łagodną ciliopatię u pacjenta.

→ Opisany pacjent z pierwotną dyskinezą rzęsek posiadał również jeden allel z wariantem mutacyjnym dla genu *LRRC6*. Wariant ten był związany ze zmianą aminokwasu w białku, nie utratą funkcji (np. przez powstanie przedwczesnego kodonu stop). Dlatego mam pytanie na ile, oprócz wariantu patogennego genu *CFAP221* obecnego na obu allelach, ten wariant mógłby przyczyniać się do fenotypu chorobowego? Nie znalazłam nawiązania do tego wątku w opracowaniu w rozprawie, w dyskusji publikacji jest bardzo krótkie nawiązanie. Ogólnie będę wdzięczna za komentarz w trakcie obrony na ile różne warianty (nie typowo patogene, albo patogene, ale obecne na jednym allelu) w genach, które kodują białka odpowiadające za strukturę i funkcję rzęsek, mogą być tzw. *genetic modifiers*, czyli mieć wpływ na gorszy przebieg chorób np. układu oddechowego czy innych, w których nawet lekkie upośledzenie funkcjonowania rzęsek mogłoby się uwidaczniać.

Artykuł 4: Alicja Rabiasz, Monika Drobna-Śledzińska, Patrycja Kaźmierczak, Michał Witt, Ewa Ziętkiewicz „**The lack of homozygotes with a large deletion encompassing SPAG1 and POLR2K in primary ciliary dyskinesia patients suggests the lethal effect of the loss of POLR2K protein**” *Genes & Diseases*, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2025.101535>

Ostatnia publikacja wchodząca w skład rozprawy to artykuł eksperymentalny formatu *Rapid Communication*, w którym Doktorantka jest pierwszym autorem i współautorem korespondencyjnym.

Te badania umożliwiły poznanie przyczyny brak identyfikacji w populacji wariantów homozygotycznych dla delecji obejmującej geny *SPAG1* i *POLR2K*. Badania wykonane na linii komórek ludzkich oraz w modelu *S. mediterranea* sugerują letalność w przypadku braku ekspresji genu *POLR2K*.

Ogólnie przeprowadzone badania potwierdzają hipotezę badawczą Doktorantki, tj. zasadność użycia *S. mediterranea* do weryfikacji zaangażowania wybranych genów w dysfunkcję rzęsek ruchowych. Wyniki badań prowadzonych przez Doktorantkę zostały opublikowane w trzech czasopismach o IF około 5 oraz jednym około 7, co stanowi bardzo dobry wynik. Ponadto Doktorantka prezentowała wyniki badań na konferencjach w Polsce i zagranicą, w tym na konferencjach bardzo specjalistycznych i powiązanych ściśle z tematyką badań (*European Meeting on Planarian Biology, European Cilia Conference*). Poza czterema artykułami wchodzącymi w skład rozprawy, Doktorantka jest również współautorem dwóch dodatkowych publikacji (i posiada znaczący, jak na ten etap drogi naukowej, indeks Hirsch’a = 4). Ponadto, na podkreślenie zasługuje fakt zdobycia stypendium *EMBO Scientific Exchange Grant*, w ramach którego odbyła 3-miesięczny staż naukowy w *NOVA Medical School* w Lizbonie, prowadząc badania dla wariantu genu *CCDC39* i jego zaangażowania w dysfunkcję rzęsek. Opisane badania były prowadzone w ramach projektów OPUS kierowanych przez Promotor doktoratu oraz projektów pozyskanych i kierowanych przez Doktorantkę: PRELUDIUM z Narodowego Centrum Nauki oraz Minigrantu z Instytutu Genetyki Człowieka PAN.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam drobne uwagi, które nie wymagają odnoszenia się podczas obrony, ale mogą być może przydatne dla Doktorantki na przyszłość:

- W wykazie skrótów nie udało się uniknąć drobnych błędów: ATP nie ma podanego rozwinięcia w języku angielskim, cDNA to komplementarny DNA.

- Sformułowanie „zabezpieczenie środków finansowych” stosowane dla opisu udziału w badaniach jest wg mnie niezręczne. „Zabezpieczenie materiału do badań”, np. próbek pacjentów, jest jasne; natomiast dla środków finansowych lepsze było by bardziej precyzyjne określenie, np.: „pozyskanie środków finansowych na badania” – co rozumiem dotyczyło kierowanego przez Doktorantkę projektu.

- Jako że obowiązki autora korespondencyjnego są dzielone w dwóch publikacjach, warto by je doprecyzować.

W końcowych Wnioskach zabrakło mi pogłębionej dyskusji całościowej, lub dotyczącej wybranych wątków. Zapoznałam się z dyskusjami przedstawionymi w załączonych artykułach naukowych, jednak często publikacje rządzą się swoimi prawami, a w rozprawie można bardzo swobodnie, w wybranym kierunku poprowadzić dyskusję, np. przedstawić dodatkowe hipotezy, pogłębione odniesienie do najnowszej literatury, nawiązać do perspektywy rozwoju badań czy wykorzystania modelu.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że z przygotowaną przez mgr Alicję Rabiasz rozprawą zapoznawałam się z dużym zaciekawieniem, co było możliwe przez Doktorantkę poprzez przygotowanie bardzo dobrego tekstu wstępu i opisu prowadzonych badań. Doktorantka wykazała się wprowadzeniem nowych technik i wykorzystaniem ciekawego modelu badawczego oraz wykonaniem eksperymentów, które dostarczyły ciekawych odkryć dla analizowanych wariantów mutacji. Z przedstawionej rozprawy i załączonych publikacji wnioskuję, że Doktorantka cechuje się dużą samodzielnością w prowadzeniu badań i chętnie podejmuje wyzwania naukowe. Potrafi także z sukcesem pozyskiwać środki finansowe na badania i finalizować wykonane badania publikacjami.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Alicji Rabiasz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk medycznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tak więc, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska całkowicie spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. 1571 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Alicji Rabiasz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem,

