

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Alicji Małgorzaty Rabiasz

Tytuł rozprawy:

Analiza funkcjonalna wybranych genów zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek przy użyciu organizmu modelowego *Schmidtea mediterranea*

Rozprawa doktorska przygotowana w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk

Promotor: prof. dr hab. Ewa Ziętkiewicz

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Rabiasz została przygotowana pod kierunkiem promotor Prof. dr hab. Ewy Ziętkiewicz w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Praca poświęcona jest badaniom patogenezы pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD), a jej celami były poszukiwanie nowych wariantów patogennych w znanych genach związanych z PCD, identyfikacja kolejnych genów przyczynowych dla PCD, jak również ocena przydatności modelu płazińca (planarii) *Schmidtea mediterranea* do badań funkcjonalnych, potwierdzających związek defektów genetycznych z zaburzeniami rzęskowymi. Badanie nad poszukiwaniem nowych przyczyn dyskinezy rzęsek u pacjentów są niezmiernie potrzebne, ponieważ nadal pomimo zastosowania wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania DNA (w tym paneli NGS i WES) u ok. 1/3 pacjentów podłoże genetyczne pozostaje niewyjaśnione. Ocena chorobotwórczości (patogenności) nowych prawdopodobnie patogennych (LP) zmian genetycznych i wariantów o niepewnym znaczeniu klinicznym (VUS), których w coraz większej ilości dostarczają badania NGS, wymaga zastosowania analiz funkcjonalnych, które pozwolą rozstrzygnąć, które ze zmian mają rzeczywiste implikacje biologiczne. Zdecydowanie niewystarczające są tu badania rodzinnej segregacji wariantów, jak i predykcje *in silico*, toteż opracowanie szybkich i tanich modeli testowania *in vivo*, pozwalających odwzorować fenotypy zmian genetycznych w komórkach zwierzęcych, są nieodzowne we współczesnych badaniach genetycznych. Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu jest znany w środowisku medycznym z wysokiej jakości badań naukowych, zmierzających do identyfikacji nowych przyczyn genetycznych PCD oraz gromadzenia i coraz dokładniejszego charakteryzowania molekularnego kohorty polskich pacjentów z PCD. Wszystkie laboratoria diagnostyczne i naukowe, które identyfikują rzadkie warianty genetyczne, z których dużą część stanowią VUSy, borykają się z problemem klasyfikacji zmian i ostatecznego potwierdzania patogenności wariantów. Konieczne są szybkie i tanie testy funkcjonalne, których wykonanie będzie pozwalało rozstrzygać trudności interpretacyjne. Dlatego uważam za słuszne podjęcie przez Autorkę badań nad określeniem przydatności modelu *S. mediterranea* w odwzorowywaniu ciliopatii. Podobnie, wybór choroby do badań naukowych, polegających na znalezieniu nowych przyczyn PCD jest uzasadniony ze względu na dostępność dużej grupy pacjentów z ciliopatiami w miejscu realizacji pracy. Jest też uzasadniony względami poznawczymi, wynikającymi z faktu, że blisko 1/3 chorych nadal ma niepoznaną na poziomie molekularnym przyczynę zaburzeń.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zaprezentowana w formie hybrydowej i zawiera zbiór czterech opublikowanych, recenzowanych artykułów powiązanych ze

sobą tematycznie. Praca ma typowy dla tej formy układ redakcyjny, zawiera 163 strony maszynopisu (stronę tytułową, spis publikacji składających się na dysertację doktorską, wzmiankę o źródłach finansowania, spis pozostałych publikacji, listę doniesień zjazdowych i wystąpień konferencyjnych, listę nagród i stypendiów, spis treści i spis skrótów). Następnie zgodnie z przyjętym sposobem prezentacji wyników, następuje podział na: wstęp, cele pracy, zwięzłe omówienie opublikowanych artykułów wraz z pełnotekstowymi kopiami prac, wnioski. Po głównym tekście rozprawy następują kolejno: streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo i oświadczenia współautorów pracy o wkładzie poszczególnych osób w publikacje.

Rozprawę doktorską otwiera spis treści, po którym zamieszczono wykaz stosowanych w pracy skrótów i nazw genów. We wstępie Doktorantka wprowadza czytelnika w świat ciliopatii, czyli tematykę, którą postanowiła się zająć w swoich badaniach doktorskich. Po krótko omówiła budowę i podział rzęsek (łac. lub ang. *cilia*), a następnie bardziej szczegółowo opisała morfologię rzęsek ruchowych oraz pierwotną dyskinezę rzęsek (PCD, ang. *primary ciliary dyskinesia*), którą to chorobą w głównej mierze zajęła się w trakcie realizacji pracy. Następnie syntetycznie opisała molekularne podstawy zaburzeń funkcjonowania rzęsek ruchowych u pacjentów z PCD, by przejść na koniec wstępu do zagadnień analizy funkcjonalnej genów związanych z PCD w modelach komórkowych, w tym zwierzęcych. W przypadku identyfikacji rzadkich wariantów genetycznych w znanych genach lub genach kandydujących, konieczne jest przeprowadzenie badań funkcjonalnych, bez których nie można uzyskać ostatecznego dowodu na związek przyczynowo-skutkowy zmiany genetycznej z fenotypem. Dlatego ważnym elementem badań Doktorantki było wybranie odpowiedniego modelu do badań funkcjonalnych, którym został płazinić *Schmidtea mediterranea* (*S. mediterranea*), a następnie przetestowanie go *in vivo* do potwierdzania udziału badanych genów w patogenezie PCD. Lektura wstępu, wykształcenie Pani mgr Alicji Rabiasz oraz lista osiągnięć naukowych, w tym wystąpień konferencyjnych Doktorantki, dowodzą, że Autorka ma bardzo dobre przygotowanie do realizacji badań molekularnych przyczyn PCD u ludzi oraz modelowania funkcjonalnego choroby *in vivo*.

W kolejnej części pracy Autorka sformułowała dwa główne cele rozprawy doktorskiej, którymi były: 1) poszukiwanie nowych patogennych wariantów i identyfikacja kolejnych „nowych” genów związanych z pierwotną dyskinezą rzęsek, w celu uzyskania lepszego obrazu genetycznego i molekularnego PCD; oraz 2) zoptymalizowanie i praktyczne zastosowanie *S. mediterranea* jako organizmu modelowego do potwierdzania związku wybranych genów z zaburzeniami funkcji rzęsek ruchowych i patogenezą PCD. W mojej ocenie cele zostały sformułowane logicznie i poprawnie, w zgodzie z przedstawionym wstępem teoretycznym i publikacjami naukowymi, składającymi się na dysertację doktorską.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka dokonała omówienia poszczególnych publikacji wchodzących w skład cyklu prac, stanowiących rozprawę doktorską. Artykuł nr 1 pt. **“*Schmidtea mediterranea* as a Model Organism to Study the Molecular Background of Human Motile Ciliopathies”** to praca poglądowa, przedstawiająca aktualny stan wiedzy na temat genetycznego podłoża PCD i roli organizmów modelowych w zrozumieniu funkcji genów zaangażowanych w patogenezę PCD. Praca ta stanowi niezwykle cenny i wnikliwy przegląd aktualnego piśmiennictwa nt. rzęsek, ciliopatii i PCD oraz opisuje płazińca z gatunku *Schmidtea mediterranea*, jako organizmu modelowego do badań patologii molekularnej rzęsek w chorobach ludzkich. Ostatnia część pracy poświęcona jest szerszemu wykorzystaniu *S. mediterranea* jako łatwo dostępnego, względnie

taniego modelu funkcjonalnego odwzorowywania uszkodzeń genetycznych w chorobach monogenowych człowieka. Artykuł nr 1 został opublikowany w dobrze punktowanym czasopiśmie ***International Journal of Molecular Sciences*** w 2023 roku (IF=4,9 ; MNiSW=140), z pierwszym autorstwem Doktorantki i seniorskim autorstwem Pani Promotr prof. Ewy Ziętkiewicz. Obecność wyłącznie dwóch Współautorek pracy przeglądowej jednoznacznie świadczy o tym, że Doktorantka wzięła na siebie główny ciężar przygotowania tej publikacji, co przemawia za Jej dojrzałością i samodzielnością naukową.

Drugi artykuł składający się na cykl prac pt. „***CFAP300: Mutations in Slavic Patients with Primary Ciliary Dyskinesia and a Role in Ciliary Dynein Arms Trafficking***” został opublikowany w 2019 roku w *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (IF=5,373 , MNiSW=100). Publikacja jest efektem wieloletnich prac prowadzonych w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej, w toku których przeprowadzono sekwencjonowanie eksomu (WES) u 120 rodzin polskich pacjentów z PCD. Badania WES pozwoliły na identyfikację genów-kandydatów, potencjalnie zaangażowanych w powstawanie ciliopatii. Jednym z takich genów był *CFAP300*, w którym u 7 niespokrewnionych probandów zidentyfikowano homozygotyczny wariant skracający typu *frameshift* w eksonie 3. Dalsze analizy genu *CFAP300* metodą Sangera, przeprowadzone wśród kolejnych probandów z PCD, umożliwiły wykrycie 10 kolejnych przypadków chorych z obualelicznymi zmianami w genie. W celu lepszego zrozumienia udziału ww. genu w funkcjonowaniu rzęsek przeprowadzono analizę porównawczą profilu ekspresji *CFAP300* względem innych wybranych genów związanych z formowaniem rzęsek ruchowych. W badaniach stwierdzono, że profil ekspresji *CFAP300* (wzrost ekspresji między 3 a 11 dniem ciliogenezy) był zbliżony do profilu ekspresji kilku innych genów rzęskowych. Ostatnią częścią badań było potwierdzenie roli genu *CFAP300* w funkcjonowaniu rzęsek ruchowych z wykorzystaniem modelu *S. mediterranea*. Potwierdzono metodą interferencji RNA, że wyciszenie homologa *CFAP300* (*Smed-cfap300*) skutkuje zaburzeniem funkcji rzęsek i zmniejszeniem lokomocji robaków. Przygotowana ze współudziałem Doktorantki praca jest ważna z kilku powodów. Po pierwsze, opisane w niej badania pozwoliły na identyfikację względnie częstej w populacji słowiańskiej przyczyny PCD, która nie była dotąd opisana. Po drugie, wyniki badań umożliwiły poprawę diagnostyki molekularnej i interpretacji wyników badań genetycznych u większego odsetka pacjentów z PCD. Po trzecie, w pracy wykorzystano po raz pierwszy w Zakładzie oraz Instytucie Genetyki człowieka planarię *S. mediterranea*, jako modelowy organizm dla badania patogenyzy molekularnej chorób człowieka *in vivo*. Uruchomienie i optymalizacja takiego wdrożenia zasługuje na duże uznanie, a jak to wynika z opisu, odbyło się to przy głównym udziale Autorki rozprawy.

Artykuł nr 3 zatytułowany „***A novel pathogenic variant of CFAP221 is a cause of a mild form of primary ciliary dyskinesia***” ukazał się w *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease* (IF=4,2 ; MNiSW=140), a Doktorantka jest w nim pierwszym autorem. Celem niniejszej pracy było potwierdzenie roli genu *CFAP221* w patogenyzie pierwotnej dyskinezy rzęsek. W badaniu WES, u jednego z pacjentów z łagodną formą PCD z badanej kohorty, został zidentyfikowany obualeliczny wariant skracający w *CFAP221*. Doniesienia o związku wariantów w tym genie z PCD były już sugerowane w bazach danych (ClinGen). Autorka postanowiła przeprowadzić eksperymenty, które udowodnią związek pomiędzy uszkodzeniem genu a nieprawidłową funkcją rzęsek ruchowych. W tym celu przeprowadzone zostały badania przy użyciu hodowli komórkowych z nabłonka oddechowego pacjenta oraz zdrowych kontroli.

Udokumentowano 5-krotnie niższą prędkość transportu kuleczek przez komórki nabłonka oddechowego pacjenta w stosunku do zdrowej kontroli. W ostatnim etapie badań użyto organizm modelowy *S. mediterranea*. Wyciszenie homologu ludzkiego *CFAP221* u płazińca (tj. genu *Smed-cfap221*) spowodowało istotne statystycznie o 34% spowolnienie lokomocji robaka oraz wolniejsze i niesynchroniczne poruszanie się części rzęsek. Praca stanowi kolejny dowód na praktyczne opanowanie przez Doktorantkę warsztatu badań funkcjonalnych z wykorzystaniem *S. mediterranea* do modelowania funkcji genów związanych z PCD.

Ostatni artykuł – nr 4 – zatytułowany „**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**”, składający się na cykl publikacji, Doktorantka opublikowała w *Genes & Diseases* (w opisie podane IF=6,9, a obecnie 9,4; MNiSW=140), jako pierwszy autor. Praca stanowi cenne spostrzeżenie, że pomimo dość częstego występowania w rodzinach z PCD nosicielstwa haplotypu z delecjami obejmującymi geny *SPAG1* i *POLR2K*, nie obserwuje się homozygot z utratą *POLR2K*. Sugeruje to letalność obualelicznej utraty *POLR2K*, tym bardziej, że utrata obu kopii genu *SPAG1* jest dość częstą przyczyną PCD, ale zawsze drugi wariant patogenny jest zlokalizowany wewnątrz drugiej kopii *SPAG1*. Doktorantka postanowiła zbadać przyczynę braku homozygot z delecjami *SPAG1* i *POLR2K* wykorzystując płazińca *S. mediterranea* i udowodniła letalność wyciszenia funkcji genu *POLR2K* dla organizmu robaka. Dodatkowo, wyciszenie *POLR2K* w hodowli ludzkiej linii komórkowej (HEK293T) pozwoliło na potwierdzenie kluczowej funkcji genu dla przeżycia komórek. Przy tej okazji, chciałbym zapytać czy wiadomo cokolwiek na temat udziału homozygotycznych delecji lub innych zmian typu utraty funkcji *POLR2K* w poronieniach lub obumarciach zarodków ludzkich. Czy znane są prace na ten temat i ewentualnie w którym momencie rozwoju embrionalnego mogłoby nastąpić zahamowanie i obumarcie ciąży?

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska stanowi zbiór czterech prac, w których zweryfikowano możliwość użycia płazińca (*S. mediterranea*) do badania genów zaangażowanych w patogenezę PCD. Pierwsza publikacja, będąc pracą przeglądową, ukazuje aktualny na 2023 rok stan wiedzy dot. możliwości zastosowania płazińca do badań rzęsek ruchowych i nt. ciliopatii. Pozostałe trzy publikacje to prace oryginalne, których celem było potwierdzenie roli zidentyfikowanych patogennych wariantów w genach *CFAP300* i *CFAP221* w patogenezie PCD oraz zmian genu *POLR2K*, którego homozygotyczne delecje okazują się być letalne. Należy podkreślić, że wszystkie przedstawione prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, ze współczynnikiem oddziaływania (IF) powyżej 4 i punktacją MNiSW 100 lub 140. W trzech pracach Doktorantka jest pierwszą autorką, co poświadcza Jej wiodącą rolę w przeprowadzonych eksperymentach i pisaniu manuskryptów. W jednej z prac, powstałej w 2019 roku, Doktorantka jest trzecim autorem, ale jest to zrozumiałe, zważywszy na prawdopodobny początkowy okres Jej zaangażowania w tematykę badawczą poświęconą PCD. Publikacje stanowią przemyślany i spójny tematycznie cykl artykułów naukowych, z naddatkiem wypełniający wymogi stawiane rozprawom doktorskim, prezentowanym w tej formie. Doktorantka w realizacji badań wykorzystwała szeroki wachlarz metod i podejść badawczych, z których niektóre uruchomiła po raz pierwszy w laboratorium Instytutu. W dyskusjach swoich prac Autorka wykazała ostrożność i dużą dozę krytycyzmu w interpretacji wyników, co dodatkowo świadczy o Jej dojrzałości naukowej i gotowości do podjęcia dalszych badań. Nie mam żadnych uwag krytycznych w stosunku do

przedstawionych artykułów, tym bardziej, że wszystkie opublikowane zostały w wysokopunktowanych i recenzowanych czasopismach. Miałbym jedynie drobną uwagę dotyczącą ostatniego manuskryptu (artykuł nr 4), którego tematyka w części publikowanych wyników w mniejszym stopniu dotyczy PCD, a w większym funkcji genu *POLR2K*, częściowo wydeletowanego w haplocie z genem *SPAG1*, który jest jednym z genów przyczynowych dla PCD. Publikacja ta opisuje bardzo istotne spostrzeżenie dot. braku homozygot z dużą delecją *SPAG1* i *POLR2K* u pacjentów z PCD, chociaż w swej części funkcjonalnej, bardziej skupia się na funkcji *POLR2K* i letalności obuallelicznych defektów tego genu.

Wnioski pracy zostały sformułowane poprawnie i w pełni odpowiadają celom, których realizację Doktorantka założyła. Autorka zauważa we wnioskach, że *Schmidtea mediterranea* stanowi obiecujący model do analizy funkcjonalnej zakonserwowanych ewolucyjnie genów związanych z patogenezą PCD, potwierdza istotną rolę ludzkich genów *CFAP300* i *CFAP221* w funkcjonowaniu rzęsek, a tym samym patogenezie PCD, oraz że homozygotyczne delecje *SPAG1* nie występują u chorych z PCD ze względu na brak przynajmniej jednej funkcjonalnej kopii *POLR2K*, której obecność jest niezbędna do przeżycia komórki.

Ogólny opis artykułów Doktorantka odniosła do bogatego, trafnie dobranego, aktualnego piśmiennictwa, obejmującego łącznie 65 pozycji. Ponadto w każdym z opublikowanych 4 artykułów, cytowanych było łącznie kilkaset aktualnych publikacji. Rozprawa została napisana poprawną, precyzyjną polszczyzną, co sprawia, że bardzo dobrze się ją czyta. Całą pracę Doktorantka przygotowała niezwykle starannie pod względem redakcyjnym, edytorskim i graficznym. Muszę przyznać, że recenzja pracy była dużą przyjemnością ze względu na jakość publikacji oraz dbałość o szczegóły przy przygotowaniu opisu artykułów (pot. „zszywki”).

W podsumowaniu stwierdzam, że zgodnie z art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2024 r. poza 1571 z późn. zm.), przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Rabiasz spełnia wszelkie wymogi stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Alicji Rabiasz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Mając na uwadze wysoką wartość naukową i poznawczą całej rozprawy oraz stanowiących ją poszczególnych artykułów naukowych, zwracam się do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej. Uzasadniam to wysoką jakością naukową prac, popartą wysokimi parametrami naukowymi (sumaryczny IF publikacji = 21,373, punktacja MNiSW = 520).

Poznań, 31.07.2025

Prof. dr hab. n. med. Aleksander Jamsheer

Specjalista genetyki klinicznej i laboratoryjnej genetyki medycznej

Specjalista medycznej genetyki molekularnej

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@wp.pl , a.jamsheer@genesis.pl , jamsheer@ump.edu.pl