



Poznań, 17 lipca 2025 r

Dr hab. Mirosława Siatecka, prof. UAM
Zakład Genetyki
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Recenzja pracy doktorskiej mgr Alicji Rabiasz zatytułowanej:

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Alicji Rabiasz została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr. hab. Ewy Ziętkiewicz w Instytucie Genetyki Człowieka, Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Wpisuje się ona w nurt badań zespołu Pani Profesor dotyczący ciliopatii, czyli chorób rzęskowych o podłożu genetycznym, których przyczyną jest dysfunkcja rzęsek.

Praca Pani mgr Alicji Rabiasz dotyczy badań nad pierwotną dyskinezą rzęskową, PCD (ang. Primary ciliary dyskinesia), która należy do chorób rzadkich dotykających około 1:10 000 – 1:20 000 osób. Poprzez swoją heterogenność choroba PCD jest trudna do diagnozowania, które może trwać nawet kilkanaście lat. Dlatego też każde badanie nowego podłoża genetycznego dotyczącego patogenezy PCD przyczynia się do szybszej i trafniejszej diagnozy. Zakres i nasilenie objawów pierwotnej dyskinezy rzęskowej zależy od zmutowanego genu i wpływu dysfunkcyjnego białka na strukturę i/lub funkcję rzęsek. Nadal u około 30% chorych podłoże genetyczne PCD nie jest poznane, stąd wyniki badań Pani mgr Alicji Rabiasz stanowiące rozprawę dokorską są merytorycznie ważne. Do tej pory wykazano, że w patogenezie PCD bierze udział około 50 genów dla białek zaangażowanych w strukturę i funkcję ruchomych rzęsek. Wkład badań Doktorantki potwierdza udział wybranych genów w patogenezie PCD dobrze wpisuje się w zapotrzebowanie udoskonalania testów diagnostycznych tej rzadkiej choroby.

Przedstawiona do oceny praca doktorska składa się z czterech opublikowanych artykułów, trzy z nich to prace oryginalne oraz jedna praca przeglądowa, całość o łącznym IF 21,373 i 520 punktach MNiSW

Prace oryginalne są wieloautorskie, w dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym autorem i również autorem korespondującym. Dodatkowo Doktorantka jest autorką dwóch publikacji, które nie są ujęte w rozprawie doktorskiej. Tak więc dorobek publikacyjny Pani mgr Alicji Rabiasz jest bardzo dobry.

Praca doktorska obejmuje 163 strony, rozpoczyna się wykazem skrótów i obszernym wykazem nazw genów. We wstępie Autorka wprowadza czytelnika w najważniejsze zagadnienia, które podejmuje w pracy doktorskiej. Cel pracy jest jasno postawiony i podzielony jest na cztery zadania badawcze. Kolejne strony zawierają cztery opublikowane artykuły wraz z materiałami uzupełniającymi, każdy artykuł jest poprzedzony kilkustronicowym wprowadzeniem w języku polskim streszczającym główne założenia pracy i osiągnięte wyniki. Rozprawę doktorską kończą wnioski, streszczenia w języku polskim i języku angielskim oraz bibliografia. Prace zamykają oświadczenia współautorów publikacji.

Pierwszym omawianym artykułem jest obszerna praca przeglądowa, która w wyczerpujący, dogłębny sposób wprowadza w problematykę chorób o podłożu zaburzeń rzęskowych. Główny nacisk pracy położony jest na przedstawienie organizmu modelowego - robaka płaskiego/płazińca *Schmidtea mediterranea*. Brzuszna strona płazińca pokryta jest rzęskami, których skoordynowany ruch pozwala na przemieszczanie się planarii. Organizmy te świetnie nadają się do badań chorób rzęskowych.

Warto podkreślić, że praca przeglądowa powstała w oparciu o 246 pozycji literaturowych i świadczy to o doskonałej znajomości tematu przez Autorkę. *Chciałabym tu zapytać jakie są niedoskonałości, ograniczenia tego modelu badawczego, na które należy zwrócić uwagę interpretując otrzymane wyniki? Czy płazińce nadają się do badań nad innymi chorobami niż ciliopatie?*

We wszystkich pracach doświadczalnych Doktorantka z sukcesem wykorzystwała modelowy organizm płazińca. Po analizie *in silico* genów *S. mediterranea*, mimo dużej odległości ewolucyjnej Autorka potrafiła zidentyfikować geny ortologiczne do genów człowieka, które potencjalnie są zaangażowane w strukturę i funkcjonalność rzęsek. Udział ortologicznych genów planarii, u człowieka odpowiedzialnych na patogenezę PCD, Doktorantka analizowała poprzez wyciszenie danego genu przy pomocy RNAi, co prowadziło do zaburzenia ruchu płazińca. Fenotypy takie były łatwo zauważalne i mieralne. W ten sposób Doktorantka wykorzystywała modelowy organizm płazińca do badania nowych wariantów genów mających udział w patogenezie PCD. Model ten nadaje się również do analiz tzw. genów kandydujących potencjalnie biorących udział w biogenezie i funkcji rzęsek.

Dwie pierwsze prace doświadczalne opisują wykorzystanie modelowego organizmu płazińca do potwierdzenia możliwości zaangażowania wariantów genów CFAP300 i CFAP221 oraz ich białkowych produktów w patologii rzęsek prowadzącą do PCD.

Wariant genu CFAP300 wybrany przez Doktorantkę do analiz wykryty był w badaniach przesiewowych populacji słowiańskiej, zawierał mutację powodującą skrócenie genu w eksonie 3 CFAP300. Wprowadza ona przedwczesny kodon stop (p.F67Pfs*10), który powoduje poważne skrócenie przewidywanego białka.

Doktorantka wykorzystwała zaawansowane techniki biologii molekularnej, komórkowej i mikroskopii, aby wykazać wpływ efektu wyciszenia ortologa CFAP300 u płazińca na zaburzone poruszanie się. Potwierdziła więc, że mutacje w tym genie mogą być podłożem genetycznym ciliopatii.

Wysoka częstość występowania c.[198_200 delTTTinsCC] wśród pacjentów słowiańskich z PCD sugeruje, że może to być skutkiem słowiańskiego efektu założyciela. *Czy mogłaby Pani podać przykłady wariantów PCD, które występują w innych populacjach niż słowiańska? Czy znane są przykłady ciliopatii powiązanych z efektem założyciela? Jaka jest różnica pomiędzy genami homologicznymi a ortologicznymi? Zauważyłam, że w publikacjach używa Pani określenia „geny ortologiczne”, natomiast w rozprawie doktorskiej „geny homologiczne”.*

Drugi analizowany gen, którego funkcjonalność badała Doktorantka przy pomocy wyciszenia ekspresji u płazińca to CFAP221. Został on pierwotnie zidentyfikowany przez analizy eksomowe WES (whole exome sequencing), które ujawniły homozygotyczny wariant przesunięcia ramki odczytu w eksonie 16 CFAP221 (PCDP1). Efektem tej mutacji był całkowity brak mRNA, jak i białka CFAP221. Wyciszając poziom Smed-cfap221 u płazińca Doktorantka analizowała parametry ruchu rzęsek np. CBF (Ciliary beat frequency), potwierdziła rolę tego genu w ruchu rzęsek i dostarczyła kolejnych dowodów na to, że CFAP221 jest genem wywołującym PCD u pacjentów.

W ostatniej przedstawionej pracy oryginalnej Doktorantka analizowała, przy pomocy modelowego organizmu płazińca, udział dużej delecji obejmującej fragmenty genów SPAG1 i POLR2K w tworzeniu patogennego fenotypu PCD u pacjentów. Udział wariantów genu SPAG1 był znany w patologii rzęsek, natomiast białko POLR2K stanowiące jedną z podjednostek polimeraz RNA nie było łączone z dysfunkcją rzęsek. Intrygującym faktem tego podłoża genetycznego PCD był brak homozygot z podwójną delecją eksonów genów SPAG1 i POLR2K. Ponownie wykorzystując model płazińca Doktorantka poprzez wyciszenia po kolei pojedynczych genów wykazała, że przy obniżeniu poziomu ortologa Smed-spag robak poruszał się trzy razy wolniej niż kontrola i był to ruch z wykorzystaniem mięśni a nie rzęsek (inchworming). Natomiast wyciszenie genu Smed-polr2r nie miało wpływu na poruszanie się płazińca. Zamiast tego, doprowadzało ono do poważnych zmian w ciele płazińca, zaburzało proces regeneracji i prowadziło do śmierci. Funkcje tego białka okazały się niezbędne dla organizmu i powodowały letalność przy jego braku. Doktorantka kontynuowała badania nad genem POLR2K w ludzkiej linii komórkowej HEK293T wykazując, że wyciszenie genu POLR2K powodowało wzrost liczby komórek apoptotycznych i obniżało tempo proliferacji. Białko to odgrywało istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórek i całego organizmu, stąd też brak homozygot z delecją obejmującą fragment genu POLR2K w obu allelach. Zatem za fenotyp PCD odpowiadała wyłącznie delecja fragmentu genu SPAG1.

W swojej pracy Doktorantka wykazała, że modelowy organizm płazińca jest nie tylko odpowiedni do badań nad chorobami rzęskowymi, ale również nadaje się do badań różnych wariantów genów niezbędnych do życia, których wyciszenie powoduje znaczne zmiany, prowadzące do śmierci. Nawet niezwykle skuteczne zdolności regeneracyjne płazińca nie są w stanie tego naprawić.

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej jednoznacznie dowodzą, że Pani mgr Alicja Rabiasz w pełni zrealizowała wszystkie założone cele badawcze. Badania zostały dobrze przemyślane, starannie przygotowane, zawierają odpowiednie kontrole pozwalające na wyciąganie poprawnych

wniosków. Dobrze przedstawiona metodyka, klarowne przedstawienie wyników i wyciągnięte z nich wnioski świadczą o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę.

Autorka posługuje się szerokim wachlarzem metod badawczych. Na podstawie analiz bioinformatycznych, *in silico*, prześledziła zakonserwowanie ewolucyjne wybranych genów pomiędzy płazińcami i człowiekiem. Pozwoliło to na znalezienie u robaków ortologów genów. Doktorantka była główną i jedyną osobą odpowiedzialną za ustawienie hodowli płazińców i za wykorzystanie ich do analiz funkcjonalnych wybranych genów zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek. Umiejętność posługiwania się różnorodnymi, zaawansowanymi technikami biologii molekularnej i komórkowej pozwoliło Doktorantce na wszechstronne podejście do realizacji założonych celów pracy doktorskiej.

Warto podkreślić dojrzałość naukową Doktorantki również od strony zakończonego sukcesem ubiegania się o środki finansowe na badania. Pani mgr Alicja Rabiasz była kierownikiem Grantu PRELUDIUM z Narodowego Centrum Nauki oraz Minigrantu Instytutu Genetyki Człowieka. W trakcie realizacji pracy doktorskiej Doktorantka miała okazję poszerzać swoją wiedzę i umiejętności laboratoryjne podczas stażów w laboratoriach w Portugalii. Wyniki badań Doktorantka przedstawiała w postaci posterów i ustnych prezentacji na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Wniosek końcowy:

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Rabiasz zawiera oryginalne rozwiązania problemów naukowych, wiedza teoretyczna Doktorantki w przedstawionym temacie jest rzetelna, szeroki warsztat metodyczny prowadzi do uzyskiwania ważnych wyników, właściwa ich interpretacja i wyciąganie wniosków świadczą o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

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 Pani mgr Alicji Rabiasz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ponadto wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej pani Alicji Rabiasz ze względu na wprowadzenie nowego modelowego organizmu do badań ciliopatii w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej, który z sukcesem wykorzystwała w swoich badaniach doktorskich, a także za zdobycie funduszy na finansowanie części badań.

Mirosław Siatecki

Dr hab. Mirosława Siatecka, prof. UAM