

Warszawa, 3 lipca 2024r.

Prof. dr hab. n.med. i n. o zdr. Agnieszka Ługowska  
Zakład Genetyki  
Instytut Psychiatrii i Neurologii  
Al. Sobieskiego 9  
02-957 Warszawa,  
E-mail:alugipin@yahoo.com

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora**  
**w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki**  
**biologiczne**  
**Pani magister Joanny Brokowskiej**  
**na temat**  
**„Nowe aspekty patogenezy mukopolisacharydoz –**  
**molekularne mechanizmy zmian**  
**w przebiegu cyklu komórkowego oraz apoptozy”.**  
**Promotor: Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn**

#### **Ocena formalna**

Rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Brokowskiej tworzy cykl artykułów spójnych tematycznie, gdyż dotyczą one badań związanych z poznawaniem podstaw patomechanizmu mukopolisacharydoz. Na rozprawę składają się artykuły opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (3 prace). Stwierdzam, więc, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.).

Dołączone do rozprawy doktorskiej oświadczenia współautorów są poprawnie sformułowane i pozwalają ocenić wkład doktorantki oraz innych autorów w powstanie powyższych artykułów; konkretnie: wkład pracy doktorantki polegał na planowaniu i realizacji przeprowadzonych eksperymentów, analizie uzyskanych wyników, opracowaniu rycin i materiałów

uzupełniających oraz uczestnictwie w przygotowaniu manuskryptów i ich ostatecznych wersji.

Stwierdzam, że dostarczona rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Brokowskiej pod tytułem „Nowe aspekty patogenezы mukopolisacharydoz – molekularne mechanizmy zmian w przebiegu cyklu komórkowego oraz apoptozy” stanowi zbiór trzech publikacji zaliczanych do kategorii artykułu oryginalnego. Przedstawione prace są tematycznie spójne, a ich treść jest adekwatna do tytułu rozprawy. Artykuły, składające się na rozprawę doktorską ukazały się w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym: *Experimental Biology and Medicine*, *Cell Biology International* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. Doktorantka jest pierwszą autorką wszystkich prac. Doktorantka nie była autorką korespondującą w żadnej pracy. Wszystkie czasopisma o zasięgu międzynarodowym mają przypisany wskaźnik cytowań czyli impact factor (IF; łącznie 13,873).

Recenzowana rozprawa doktorska składa się ze streszczenia w jęz. polskim i angielskim, załączonego zbioru artykułów, oświadczeń autorów artykułów oraz dorobku naukowego.

Doktorantka postawiła sobie następujące cele badawcze:

- **Cel główny:** zbadanie molekularnego mechanizmu zmian w cyklu komórkowym i apoptozie we wszystkich typach i podtypach mukopolisacharydoz (MPS).
- **Cele szczegółowe:**
  - a) zbadanie poziomu ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w cyklu komórkowym oraz apoptozie,
  - b) określenie molekularnego mechanizmu zmian przebiegu cyklu komórkowego i apoptozy,
  - c) badanie wpływu genisteiny (potencjalnego leku) oraz terapii enzymatycznej na zmiany w przebiegu cyklu komórkowego.

Wśród rzadkich, genetycznie uwarunkowanych chorób metabolicznych wyróżnia się grupę lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LSD). Są one spowodowane niedoborem aktywności hydrolazy lizosomalnej lub brakiem funkcjonalnego białka błony lizosomalnej, transportera, aktywatora lub innych białek. Rolą enzymów lizosomalnych jest degradacja związków wielkocząsteczkowych, co umożliwia homeostazę metaboliczną. LSD są zatem

wynikiem zaburzonej funkcji aparatu lizosomalnego, odpowiedzialnego za degradację wielkocząsteczkowych związków chemicznych w komórce i ściśle współpracującego z systemem endosomalnym, retrosomalnym i autofagosomalnym. Aparat lizosomalny jest więc zaangażowany w metabolizm komórkowy i stały obrót związków chemicznych, tzn. syntezę nowych i degradację starszych cząsteczek.

Uszkodzenie aparatu lizosomalnego stymuluje wiele procesów kompensacyjnych, po wyczerpaniu których złożona funkcja i struktura komórki ulega zniszczeniu prowadząc do nieodwracalnych zmian w komórkach i tkankach chorego organizmu, co przekłada się na fenotyp kliniczny.

W patomechanizmie chorób lizosomalnych kluczowe znaczenie mają nie tylko mechaniczne skutki akumulacji związków wielkocząsteczkowych, jak wcześniej sądzono, ale również inne częściowo tylko poznane mechanizmy i szlaki komórkowe.

Dotychczasowe wyniki badań naukowych wskazują, że w poszczególnych chorobach lizosomalnych aktywowane są procesy autofagii i apoptozy. Wykazano toksyczne działanie lizo- pochodnych związków lipidowych, zaburzenie wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów  $Ca^{2+}$ , wtórne spichrzanie związków wielkocząsteczkowych, aktywację przekąźnictwa sygnałów i procesów zapalnych, deficyt związków pośrednich oraz wiele innych.

Wśród chorób lizosomalnych wyróżnia się grupę mukopolisacharydoz (MPS), których częstość występowania ogółem szacuje się na 1: 22 000, ale częstość występowania poszczególnych typów MPS jest dużo niższa i zależy od badanej populacji. Z wyjątkiem MPS II (choroby Huntera) sprzężonej z chromosomem X, MPSy dziedziczą się w sposób autosomalny recesywny.

W ich skład wchodzi 14 jednostek chorobowych: MPS I – X, u podłoża których leży deficyt aktywności jednego z enzymów zlokalizowanych w aparacie lizosomalnym oraz zespół MPS-Plus (MPS-Plus syndrome, MPSPS), będący wynikiem mutacji w genie VPS33A. Brak aktywności danego enzymu skutkuje blokadą szlaku degradacji glikozoaminoglikanów (GAG) i następnie spichrzaniem tych związków w komórkach, tkankach i narządach. Akumulacja wielkocząsteczkowych GAG i wtórne gromadzenie innych związków oraz aktywacja różnych mechanizmów patogennych prowadzą w efekcie do objawów klinicznych.

Pod względem klinicznym MPS stanowią bardzo zróżnicowaną grupę chorób o szerokim spectrum objawów nawet w obrębie jednego typu. Nasilenie objawów i dynamika przebiegu choroby może wahać się od postaci ciężkich,

wrodzonych do postaci łagodnych, przewlekłych. Objawy kliniczne dotyczą przede wszystkim dyzmorfii, zaburzeń i deformacji kostnych, powiększenia organów wewnętrznych, zmętnienia rogówki, utraty słuchu, opóźnienia rozwoju psycho-ruchowego i neurodegradacji.

Jak wcześniej wspomniano, wiedza na temat patomechanizmu chorób lizosomalnych, a wśród nich również mukopolisacharydoz, jest fragmentaryczna. Tym bardziej podjęcie tematu rozprawy doktorskiej mgr Brokowskiej jest trafione i uzasadnione.

W ramach badań transkryptomicznych zanalizowano zróżnicowanie poziomu ekspresji genów zaangażowanych w procesy cyklu komórkowego oraz apoptozy za pomocą techniki RNAseq w materiale od pacjentów z 11 typami i podtypami MPS oraz osoby kontrolnej (posłużono się liniami fibroblastów skóry).

Wyniki opisane w artykule nr 1, opublikowanym w *Exp Biol Med.* 2022, wykazały, że ekspresja relatywnie wielu genów, kodujących białka zaangażowane w cykl komórkowy, była zmieniona. W linii komórkowej każdego typu MPS obserwowano zmiany w ekspresji – zarówno wzmożenie, jak i hamowanie. Należy tu odnotować, że zmiany miały jednak taki sam charakter we wszystkich badanych typach MPS w przypadku danego genu, co pozwala przypuszczać istnienie wspólnego mechanizmu tych zmian we wszystkich typach MPS. W przypadku MPS IX, MPS IIID i MPS VII liczba transkryptów genów o zmienionej ekspresji była szczególnie wysoka.

Wyłoniono 18 genów, których transkrypty wykazywały zaburzoną ekspresję w przynajmniej 6 spośród 11 badanych typów MPS. Wśród nich do genów o ekspresji zmienionej w największej liczbie linii komórkowych należały: ID2 (wzrost), DYNC1L1 (spadek), MAP2K1 (spadek) oraz TADA3 (wzrost).

W kolejnym etapie za pomocą cytometrii stwierdzono zwiększenie frakcji komórek w fazie G0/G1 we wszystkich typach MPS z wyjątkiem MPS IVB i MPS VII oraz zmniejszenie frakcji komórek w fazie G2/M. Te wyniki wskazują, że w komórkach wszystkich typów MPS procesy cyklu komórkowego są opóźnione w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zaburzenia te ulegały naprawie po ograniczeniu spichrzania GAG stosując genisteinę (substrate reduction therapy) lub alfa-iduronidazę albo sulfatazę siarczanu iduronianu w przypadku odpowiednio - komórek MPS I lub MPS II (enzyme replacement therapy).

Doktorantka zbadała również poziom cyklin D1, E1, A2 i B1 za pomocą techniki Western-blotting w liniach komórkowych wszystkich typów MPS, ponieważ związki te odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego. W większości komórek MPS poziom cykliny D1 był wyższy w porównaniu do kontroli. Ponadto czas pojawiania się cykliny D1 był zmieniony w porównaniu z komórkami kontrolnymi, co dodatkowo potwierdza zaburzenia w regulacji cyklu komórkowego w MPS.

W artykułach nr 2 i 3 (opublikowanych odpowiednio w Cell Biol Int 2021 oraz Int J Mol Sci 2023) mgr Brokowska skupiła się na badaniach ekspresji genów związanych z apoptozą w komórkach od pacjentów z różnymi typami MPS, ponieważ wyniki wcześniejszych prac innych autorów wskazywały, że jest to proces o zaburzonej regulacji w komórkach LSD, w tym również MPS. Zastosowała, podobnie jak wcześniej, technikę RNAseq, a materiałem do badań były hodowane fibroblasty skóry od pacjentów z różnymi typami i podtypami MPS. Zidentyfikowane zostały różne transkrypty związane z apoptozą w każdym typie MPS o wzmożonej lub zahamowanej ekspresji. Najwięcej zmienionych transkryptów wykazano w MPS IVB (73), a najmniej w MPS VI (19). Otrzymane wyniki wskazują, że ekspresja wielu genów związanych z apoptozą jest zaburzona w komórkach MPS w porównaniu z komórkami kontrolnymi, a konkretnie procesy kontrolne apoptozy były najbardziej uszkodzone. Największą liczbę genów ze zmienioną ekspresją zakwalifikowano do następujących kategorii wg bazy QuickGO:

- szlak sygnałowy apoptozy
- negatywna regulacja apoptozy
- pozytywna regulacja apoptozy
- regulacja procesu apoptozy
- zmiany apoptotyczne w mitochondriach.

Wyróżniono 6 genów o zakłóconej ekspresji w komórkach przynajmniej 7 różnych typów MPS: BNIP3, C1D, CLU, GPER1, KREMEN1 i PRKCD. Moją uwagę zwróciły zwłaszcza geny CLU (o wzmożonej ekspresji) i KREMEN1 (o obniżonej ekspresji), których ekspresja była najbardziej zmieniona w komórkach MPS w porównaniu do kontroli ( $\log_2FC > 2.0$ ) i zmiany obserwowano w największej liczbie komórek z różnymi MPS. Fakt ten potwierdza przypuszczenie, że regulacja apoptozy jest znacząco zaburzona, a zmiany mają podobny charakter we wszystkich typach MPS.

Gen CLU koduje białko klusteryny, która promuje zapoczątkowanie apoptozy przez aktywację kaspazy 3 i cytochromu c. Natomiast gen KREMEN1

koduje białko kremen 1 o funkcjach pro-apoptotycznych. Niski poziom tego białka (na skutek inhibicji ekspresji genu) może negatywnie wpływać na jego multimeryzację prowadząc do dimeryzacji cząsteczek. Dimery kremen 1 mogą stymulować transdukcję sygnału, powodującego indukcję apoptozy.

Dodatkowo wzrost aktywności kaspazy 3/7 w komórkach MPS IVA i MPS IX przemawia za stałym pobudzeniem apoptozy przynajmniej w niektórych typach MPS.

Dokładniejsze badania nad procesem apoptozy w przypadku MPS IVA i MPS IVB przedstawiono w publikacji nr 3 (opublikowanej w Int J Mol Sci 2023). Analiza transkryptomyczna potwierdziła zaburzenia regulacji apoptozy w liniach komórek od pacjentów z MPS IVA i MPS IVB. Do genów o najwyższych wartościach FC (Fold change; krotność zmiany) zaliczały się:

- geny o wzmożonej ekspresji: CLU, CRIP1, MAX, NLRP1, TOP2A, XIAP
- geny o zahamowanej ekspresji: CDKN1A, GPER1, IGFBP3, KPNB1, KREMEN1, PDK1.

W kolejnym etapie eksperymentów doktorantka poddawała hodowane komórki fibroblastów skóry działaniu staurosporyny, która indukuje apoptozę. Uwalnianie cytochromu c z mitochondriów było bardziej nasilone w komórkach MPS IVA i IVB niż w komórkach kontrolnych zarówno w warunkach standardowych (podstawowy poziom apoptozy), jak i po podaniu staurosporyny. Spostrzeżenie to znalazło również potwierdzenie w wyższym poziomie kaspazy 3, 6, 7 i białka PARP w komórkach MPS IV niż w komórkach kontrolnych. Na podstawie powyższych wyników doktorantka wyciąga wniosek, że apoptoza jest wzmożona w komórkach MPS IVA i IVB, a zwłaszcza etap wykonawczy tego procesu jest bardziej wydajny w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Z obowiązku recenzenta podaję również uwagi, które nasunęły mi się podczas czytania streszczenia: na str. 6 – prawidłowa nazwa enzymu, którego deficyt warunkuje MPS II to sulfataza siarczanu iduronianu (a nie sulfataza iduronianu); ponadto wystąpiło kilka błędów literowych w odniesieniu do nazwy białka PARP.

Muszę jednak podkreślić, że są to tylko uwagi edytorskie.

W podsumowaniu, pragnę stwierdzić, że rozprawa mgr Joanny Brokowskiej stanowi cenny wkład do badań nad patomechanizmem mukopolisacharydoz. Artykuły tworzące rozprawę doktorską mgr Brokowskiej prezentują wysoki poziom merytoryczny i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest pytanie o patomechanizm chorób

lizosomalnych, a zwłaszcza mukopolisacharydoz. Kandydatka dała dowód swojej głębokiej wiedzy zarówno teoretycznej, jak i praktycznej (laboratoryjnej). Omawiane artykuły oraz wkład autorki w ich powstanie świadczą, że posiada ona umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Recenzowana praca stanowi samodzielny i oryginalny dorobek autorki. Osiągnięcie celów, które postawiła sobie doktorantka wymagało doskonałego przygotowania w zakresie technik genetyki molekularnej, bioinformatyki oraz biochemii. Otrzymane wyniki wnoszą istotne wartości poznawcze i stanowią podłoże do dalszych badań nad patogenezą chorób lizosomalnych oraz opracowaniem nowych terapii w leczeniu mukopolisacharydoz z uwzględnieniem uszkodzenia regulacji procesu apoptozy. Należy podkreślić, że dotychczasowe doniesienia na temat molekularnych i komórkowych przyczyn MPS były fragmentaryczne i nie uwzględniały wykorzystania w badaniach porównawczych komórek od wszystkich typów MPS.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr Joanny Brokowskiej oceniam celująco i uważam, że spełnia ona wymogi określone w art. 13 Ustawy z dn. 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art.179. Ustawy z dn. 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz.1669 z późn. zm.) i uzasadnia nadanie Kandydatce stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych. Zwracam się zatem z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Brokowskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się również z prośbą o **wyróżnienie pracy doktorskiej** przedstawionej przez mgr Brokowską ze względu na:

- innowacyjne zastosowanie techniki RNAseq w badaniach nad patomechanizmem mukopolisacharydoz
- równoczesne wykorzystanie do badań porównawczych linii komórkowych wszystkich typów i podtypów MPS
- stwierdzenie, że jednym z procesów tłumaczących patomechanizm MPS jest zaburzona regulacja apoptozy, a szczególnie jej etap wykonawczy oraz zaburzenia cyklu komórkowego.

*Agnieszka Lugowska*