

prof. dr hab. Michał Witt  
Instytut Genetyki Człowieka PAN  
ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gaffke**

**pt.**

***Zmiany w procesach komórkowych jako nowy aspekt patogenezy mukopolisacharydoz:  
badania transkryptomiczne***

Przedstawiona do oceny praca doktorska poświęcona jest określeniu zmian w ekspresji genów zaangażowanych w poszczególne procesy komórkowe w komórkach pochodzących od chorych na mukopolisacharydozy. Praca wykonana została w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego pod znakomitym promotorskim okiem prof. dr. hab. Grzegorza Węgrzyna.

Choroby rzadkie, zwane też chorobami sierocymi, to problem zdrowotny dotyczący parudziesięciu milionów ludzi na całym świecie. Wg definicji WHO to choroby pojawiające się rzadziej niż 1:2.000 żywych urodzeń. Znaczna ich większość to choroby uwarunkowane genetycznie, połowę chorych na choroby rzadkie stanowią dzieci, w sumie liczbę chorych ocenia się na ok. 60 mln w skali świata. Dla olbrzymiej większości tych chorób nie znamy dokładnej przyczyny, a metody leczenia opracowane zostały zaledwie dla 4% z nich. Mniej więcej ¼ chorych umiera przed osiągnięciem 5 roku życia. Obraz kliniczny chorób jest bardzo zróżnicowany, objawy mogą występować w różnym nasileniu, występując z reguły w postaci zaburzeń wielonarządowych. Wielu z tych chorób nie udało się dotąd poznać wystarczająco dla opracowania jasnych kryteriów diagnostycznych, stąd ich rozpoznanie często następuje olbrzymie trudności, co prowadzi do często wieloletnich wędrówek rodzin od lekarza do lekarza, z niejasnym efektem. Ze względu na złożoną patogenezę, dla większości z chorób rzadkich żadne leczenie celowane nie istnieje – o ile w sensie naukowym choroby rzadkie stanowią atrakcyjny obiekt badawczy, o tyle prowadzenie prób lekowych nie spełnia wymaganych minimów opłacalności, co w zdehumanizowanej medycynie czasów obecnych daje małe szanse na szybki postęp w tej dziedzinie.

Znane mi są dobrze badania prowadzone od lat w pracowni prof. Węgrzyna, które m.in. doprowadziły do opracowania, a następnie szczegółowego rozpracowania genisteiny jako potencjalnego środka leczniczego w mukopolisacharydozie Sanfilippo. Sam pomysł redukcji substratu był wynikiem kombinacji intelektualnej, która doprowadziła do bardzo obiecującego wyniku. W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej p. Lidii Gaffke mamy do czynienia z

sytuacją w pewnym sensie analogiczną, choć dotyczącą zupełnie innego aspektu tej grupy chorób. Podobieństwo polega na postawieniu pytania na pozór prostego i oczywistego, jednak dopiero szerokość uzyskanej odpowiedzi pozwala docenić jego celność. W grupie prof. Węgrzyna zwrócono uwagę, że różnorodność uszkodzeń wielonarządowych sugeruje, że powodowane one są nie tylko samym spichrzeniem glikozaminoglikanów, ale mogą powstawać w efekcie działania także innych mechanizmów biologicznych, które wcale nie muszą być traktowane jako wtórne, ale mogą stanowić równoprawny element patomechanizmu mukopolisacharydoz. Po to żeby je zidentyfikować i scharakteryzować, analiza transkryptomu komórek pochodzących od osób chorych na mukopolisacharydozy stała się, słusznie, podejściem pierwszego wyboru.

Na rozprawę doktorską mgr Gaffke składa się 5 publikacji poprzedzonych zwięzłym streszczeniem, które krótko podsumowuje cel oraz całość dokonań badawczych będących przedmiotem projektu doktorskiego. Opisują one logiczny i konsekwentny ciąg myślowy, najpierw uzasadniający przyjętą filozofie badawczą, a potem opisujący jej rozwinięcie i uzyskane wyniki. Cel swej rozprawy doktorskiej Doktorantka sformułowała jako określenie zmian w ekspresji genów zaangażowanych w poszczególne procesy komórkowe w komórkach pochodzących od chorych na MPS.

Znakomite wprowadzenie do części badawczej rozprawy stanowią dwie prace przeglądowe. Pierwsza z nich, „How close are we to therapies for Sanfilippo disease?”, *Metab Brain Dis* (2018), daje szerokie tło zagadnień związanych z patomechanizmami mukopolisacharydoz, lokując na tym tle MPS typ III (Sanfilippo). Artykuł, po krótkim opisie tego typu choroby, opisuje szczegółowo rozwój eksperymentalnych strategii terapeutycznych, bazując na najnowszej literaturze tematu (z ostatnich trzech lat), zwracając uwagę na różnorodność objawów klinicznych oraz znaczną rzadkość tej choroby, co stanowi istotne utrudnienie w tej kwestii. Autorka uwzględnia tu terapię enzymatyczną, terapię poprzez redukcję substratu oraz terapie bazujące na użyciu związków niskocząsteczkowych (koenzym Q10, glukozamina, modyfikowane U1 snRNA, aminoglikozydy oraz nieaminoglikozydowe związki umożliwiające translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP). Wiele miejsca poświęciła również opisowi prób terapeutycznych na modelach zwierzęcych, wieńcząc tę pracę szczegółowym opisem prowadzonych obecnie prób klinicznych, w większości nie dających jak dotąd spektakularnie pozytywnych rezultatów.

Kolejna praca, tym razem w formacie mini-review, „Changes in cellular processes occurring in mucopolysaccharidoses as underestimated pathomechanisms of these diseases”,

*Cell Biol Int* 2019, poświęcona jest złożonemu patomechanizmowi poszczególnych typów mukopolisacharydoz, prowadzącym do mnogości objawów dla nich charakterystycznych. Autorzy pracy wyszli z przywołanego już wcześniej założenia, że to nie tylko akumulacja GAG w lizosomach powoduje chorobę, ale wiele innych różnorodnych procesów komórkowych ulega tutaj zaburzeniu. W pracy przedstawili aktualne podsumowanie poszukiwań literaturowych w tej kwestii. Takie ujęcie problemu patomechanizmów MPS ma istotne przełożenie na planowanie potencjalnych podejść terapeutycznych, tłumacząc jednocześnie nikły efekt kliniczny terapii skupiających się wyłącznie na zmniejszeniu depozytów GAG w lizosomach. W pracy przedstawiono dane dotyczące zmian dotyczących funkcji cytoszkieletu, zaburzenia transportu wakuolarnego (zmieniona ekspresja genów białek wakuolarnych, zaburzenia strukturalno-funkcjonalne aparatu Golgiego i retikulum endoplazmatycznego), zaburzenia cyklu komórkowego (blok na etapie G1/S), zaburzenie funkcji mitochondriów (zmiana morfologii, obniżenie transportu jonów  $Ca^{++}$ , obniżenie potencjału błonowego), intensyfikacja apoptozy, zaburzenia autofagii. Autorzy stawiają tezę, że ten zestaw głębokich zaburzeń funkcji komórkowych nie powinien być traktowany jako dodatkowy, ale zasadniczy czynnik patogenetyczny w MPS.

Kolejna praca "Underestimated aspect of mucopolysaccharidosis pathogenesis: global changes in cellular processes revealed by transcriptomic studies", *Int J Mol Sci* 2020, stanowi zasadniczy wkład doświadczalny do przedstawionej do oceny rozprawy. Podążając za tropem wyłożonym w poprzednim artykule przeglądowym, posługując się klasycznym podejściem transkryptomycznym (RNAseq, RT-qPCR) i badając fibroblasty od chorych na różne typy MPS, wykazali zaskakująco (jak sami zauważają) duże zmiany ilościowe w ekspresji wielu różnych genów związanych z różnymi procesami komórkowymi. Stwierdzono, że zmiany te spowodowane są zaburzeniami w regulacji ekspresji genów, które prowadzą zarówno do wspólnych cech strukturalno-funkcjonalnych komórek MPS, jak i do cech różnicujących badane różne typy MPS. Rzuca to nowe światło na patomechanizm MPS i chorób genetycznych w ogóle, wskazując jak mutacja jednego genu, w wyniku zaburzenia sieci interakcji wewnątrzkomórkowych, może uruchamiać złożony patomechanizm prowadzący na poziomie klinicznym do wielorakich objawów. Autorzy słusznie zwracają uwagę na istotne implikacje terapeutyczne: przyjmując taki obraz patogenezy MPS, konieczne staje się wdrażanie terapii złożonych, redukujących nie tylko spichrzanie GAG, ale także korygujących inne procesy komórkowe zaburzone w MPS. Użycie w tych badaniach fibroblastów, uzasadnione względami ekonomiczno-praktycznymi, oczywiście może być kwestionowane, gdyż nie są to komórki

akurat w MPS najbardziej narażone na zmiany patologiczne i wynikające stąd konsekwencje kliniczne. Jednakże pamiętać trzeba, że przebadanie 11 różnych linii komórkowych, każdej pochodzącej od innego typu MPS, jest pierwszym takim badaniem znanym w literaturze tematu. Wśród wielu genów dla których znaleziono istotne zmiany w ekspresji, utworzono także listę genów, których zmieniona ekspresja wykryta została w kilku różnych typach MPS - może to oznaczać, że ich zaburzona ekspresja odpowiedzialna jest za osiowe objawy choroby bez względu na to, w jakim typie MPS występują.

O ile poprzednia praca daje ogólne spojrzenie na całą transkryptomikę fibroblastów w MPS, kolejna praca „Changes in expression of genes involved in the regulation of cellular processes in mucopolysaccharidoses as assessed by fibroblast culture-based transcriptomic analyses”, *Metab Brain Dis* 2020, zawęża grupę badanych genów do genów kodujących białka regulatorowe odpowiadające specyficznemu za regulację procesów komórkowych. Przyjmując podobny schemat badawczy jak poprzednio autorzy wykazali, że ekspresja 10 genów regulatorowych jest w istotny sposób zmieniona (dodatnio lub ujemnie) w fibroblastach 9 typów/podtypów MPS (z 11 badanych): *IER3IP1*, *SARIA*, *TMEM38B*, *PLCB4*, *SIN3B*, *ABHD5*, *SH3BP5*, *CAPG*, *PCOLCE2*, *MNI*. Ewidentnie wskazuje to na fakt, że ekspresja całych grup genów regulatorowych jest podobnie zmieniona w różnych typach MPS, wskazując że całe grupy procesów komórkowych ulegają podobnemu zaburzeniu w większości MPS. Jest to niezwykle oryginalne i nowatorskie osiągnięcie, dające nowy pogląd na patomechanizmy prowadzące do zaburzeń wielonarządowych w MPS, co skutkuje również zmianą widzenia dogmatu chorób jednogenowych i zastąpienie go terminem chorób „formalnie jednogenowych” – co przewija się kilkakrotnie w tekstach publikacji i wprowadzenia do rozprawy.

Nawiązanie do najbardziej aktualnego problemu medycznego w skali świata stanowi ostatnia praca w przedstawionym cyklu „Transcriptomic analyses suggest that mucopolysaccharidosis patients may be less susceptible to COVID-19”, *FEBS Lett* 2020. Z wyników analizy transkryptomicznej 6 genów kodujących białka mające wpływ na interakcję wirusa z komórkami gospodarza, autorzy wyciągają dość zaskakujący wniosek, że komórki chorych na MPS są mniej podatne na zakażenie SARS-CoV-2 od komórek osób zdrowych. Niestety bardzo niska ekspresja genów dwóch zasadniczych białek uczestniczących we wnikiwaniu wirusa do komórki gospodarza *ACE2* i *TMPRSS2* nie pozwoliła uwzględnić ich w tej analizie, pokazując pewne niedostatki badawcze modelu fibroblasta w tym aspekcie. Pamiętać trzeba, że faktyczna podatność na infekcję pacjentów wynika z całościowego stanu klinicznego

i statusu immunologicznego, które swą złożonością i wieloczynnikowością daleko wykraczają poza poziom doświadczalnie ocenianej ułatwionej lub utrudnionej interakcji molekularnej.

Muszę przyznać, że jestem pod głębokim wrażeniem jakości naukowej przedstawionej rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gaffke. Dwie z prac doświadczalnych (*Int J Mol Sci*, *Metab Brain Dis*) uznać trzeba za znakomite, wnoszące wiele nowego do naszego powszechnego, a jak się okazuje dość naiwnie mylnego, rozumienia podstawowych pojęć w genetyce człowieka. Kolejna praca doświadczalna (*FEBS Lett*) jest ich wartościowym uzupełnieniem. Poprzedzające dwie prace przeglądowe, w szczególności *Cell Biol Int*, stanowią świetne kompendium wiedzy o molekularnych aspektach złożoności biochemicznej komórek od chorych na MPS. Budują też skutecznie filozofię naukową, która w jasny sposób ukierunkowuje następujący po nich cykl badawczy.

Rozprawa doktorska w postaci cyklu publikacji stanowi bez wątpienia optymalny model rozprawy doktorskiej, preferowany w naukach biologicznych. We wszystkich pięciu publikacjach p. Gaffke jest pierwszym autorem, a dołączone oświadczenia współautorów, nie pozostawiają wątpliwości co do istotnego wkładu merytorycznego Doktorantki w ich powstanie.

Dodać tutaj należy, że mgr Lidia Gaffke jest współautorką w sumie 22 publikacji naukowych, z czego 5 stanowi materiał niniejszej rozprawy doktorskiej, oraz jednego rozdziału w monografii książkowej. Jest również kierownikiem dwóch grantów dla Młodych Naukowców uzyskanych przez Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz grantu Preludium 15 z Narodowego Centrum Nauki. Na tym etapie kariery naukowej jest to dorobek imponujący.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Lidii Gaffke spełnia wszelkie warunki określone przepisami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Lidii Gaffke do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wybitny poziom naukowy przedstawionej rozprawy, z pełnym przekonaniem i prawdziwą przyjemnością wnoszę o jej wyróżnienie.



Michał Witt

Poznań, 17 listopada 2020 roku