



WYDZIAŁ BIOLOGII  
I OCHRONY  
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 22 lipca 2025 r.

Prof. dr hab. Tomasz Śliwiński  
Katedra Genetyki Molekularnej UŁ  
Dyrektor Instytutu Biochemii UŁ

### O c e n a

**pracy doktorskiej mgr inż. Mateusza Nowaczyka**

**pt.: „Identyfikacja procesów zaangażowanych w skracanie ciągu powtórzeń**

**CAG w wyniku indukcji dwuniciowych pęknięć DNA w genie HTT”**

Choroby poliglutaminowe (polyQ) to grupa rzadkich schorzeń neurodegeneracyjnych, związanych ze specjalnym typem mutacji w filogenetycznie nie powiązanych genach. Mutacja wywołana ekspansją polegającą na zwiększeniu liczby powtórzeń trójnukleotydowych CAG w sekwencji kodującej genu. Toksyczne białko powstające z takiej sekwencji zawiera długie domeny poliglutaminowe, które zmieniają funkcję tego białka i fizjologię komórek nerwowych. Niektóre z najbardziej rozpowszechnionych chorób polyQ to choroba Huntingtona (HD), czy ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu (SCA) typy 3 czy 7. Pacjenci cierpiący na te choroby doświadczają poważnych objawów motorycznych, ostatecznie prowadzących do niepełnosprawności i utraty niezależności. Obecnie brakuje leczenia ukierunkowanego na mechanizmy związane z patogenezą choroby.

Poszczególne choroby charakteryzują się różnym poziomem niestabilności długości ciągów, a w przypadku wszystkich chorób poliQ obecność dłuższego ciągu powtórzeń skutkuje silniejszymi objawami i wcześniejszym ich ujawnieniem.

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki  
ul. Pomorska 141/143 12/16, 90-236 Łódź, fax (42) 635 44 84

Dyrektor Instytutu Biochemii: prof. dr hab. Tomasz Śliwiński  
tel. (42) 635 44 86, e-mail: tomasz.sliwinski@biol.uni.lodz.pl



W chorobach tych pojawia się zjawisko antycypacji polegające na wzroście liczby powtórzeń i nasilaniu się objawów w kolejnych pokoleniach. Jest to związane z niestabilnością zachodzącą w komórkach rozrodczych. W przypadku wielu tego typu schorzeń, oprócz niestabilności germinalnej, obserwuje się również niestabilność somatyczną. Powoduje ona stopniowe zwiększanie liczby powtórzeń w określonych tkankach organizmu, prowadząc do mozaicyzmu somatycznego, w którym różne komórki mogą zawierać różną liczbę powtórzeń CAG. W przypadku chorób neurodegeneracyjnych, takich jak HD dochodzi do bardzo dużych ekspansji powtórzeń CAG w komórkach nerwowych, w których procesy replikacji DNA czy rekombinacji są zahamowane. Rodzi to sugestię, że mechanizmy naprawy DNA mogą być zaangażowane w ekspansje tych powtórzeń w tego typu komórkach, a za główny mechanizm zaangażowany w ekspansję powtórzeń CAG w HD uważa się MMR (ang. mismatch repair). Paradoksalnie mechanizmy naprawy DNA, których rolą jest utrzymywanie stabilności genomu, mogą działać nieprawidłowo, przyczyniając się do ekspansji somatycznych, a w konsekwencji patogenezy chorób takich jak HD w przypadku obecności wydłużonych ciągów powtórzeń CAG (w postaci pętli czy struktur spinki do włosów).

Zrozumienie natury uszkodzeń DNA oraz mechanizmów pozwalających na ich naprawę może okazać się kluczowe w projektowaniu różnego rodzaju strategii terapeutycznych chorób genetycznych opartych o właściwą i celowaną edycję genomu. Wśród tych metod pojawiły się również takie, które umożliwiają indukowanie dwuniciowych pęknięć DNA (DSBs, ang. double strand breaks) w konkretnym miejscu genomu, pomimo iż dwuniciowe pęknięcia DNA stanowią jedno z najbardziej niebezpiecznych zjawisk zachodzących w komórce, mogące skutkować powstaniem mutacji, rearanżacją chromosomów, utratą części materiału genetycznego czy transformacją nowotworową komórki. Dzięki kierowanym nukleazom możliwe jest wprowadzanie precyzyjnych zmian w sekwencjach odpowiedzialnych za wywoływanie chorób tj. anemia sierpowata czy talasemia beta. Również w przypadku chorób wywołanych ekspansją powtórzeń mikrosatelitarnych nadzieję na przyszłą terapię genową mogą budzić obserwacje skracania ciągów powtórzeń CAG w wyniku indukcji w ich obrębie dwuniciowych pęknięć DNA.

Jednym z najnowocześniejszych narzędzi inżynierii genetycznej, pozwalającym na indukcję DSB w konkretnym, zaplanowanym miejscu, jest system CRISPR-Cas9 (ang. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR associated 9). Narzędzie to zostało wykorzystane do wyjaśnienia naturalnego pęknięcia długich ciągów powtórzeń trójnukleotydowych w komórkach drożdży. Dzięki tym i podobnym podejściom zaobserwowano skracanie ciągu, bądź jego całkowite wycięcie, w komórkach drożdży, modelach mysich, jak również w komórkach ludzkich.



Pomimo dużej liczby podejść eksperymentalnych, koncentrujących się na zagadnieniu skracania ciągów powtórzeń CAG, tylko nieliczne skupiły się na identyfikacji zaangażowanych w ten proces mechanizmów naprawy DNA. Zwłaszcza brak jest prac, które skupiałyby się i wyjaśniałyby rolę mechanizmów naprawy DSB, indukowanych w powtórzeniach CAG w endogennym *locus* w ludzkim modelu komórkowym.

Dlatego też, uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Praca doktorska mgr inż. Mateusza Nowaczyka została wykonana pod kierunkiem Pani Profesor Marty Olejniczak w Zakładzie Inżynierii Genomowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Układ rozprawy doktorskiej jest o prawidłowy o strukturze tradycyjnej dla prac doświadczalnych. W poniższej recenzji odniosłem się do jej poszczególnych części (rozdziałów):

#### *Cześć teoretyczna*

W rozdziale tym, mgr inż. Mateusz Nowaczyk w sposób zwięzły, w nawiązaniu do prowadzonych badań, wprowadza czytelnika w zakres tematyczny i cel pracy. W pierwszej części Doktorant charakteryzuje sekwencje mikrosatelitarne w genomie człowieka. Następnie Autor skupia się na dokładnym opisie chorób związanych z ekspansją sekwencji mikrosatelitarnych oraz na przybliżeniu natury niestabilności powtórzeń CAG w kontekście naprawy DNA. W kolejnej części mgr inż. Mateusz Nowaczyk dokonuje dokładnej charakterystyki wszystkich mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. W ostatniej części tego rozdziału pracy Autor zapoznaje czytelnika ze skracaniem ciągów powtórzeń CAG w efekcie naprawy DNA oraz z narzędziami inżynierii genetycznej do indukcji dwuniciowych pęknięć DNA. Rozdział kończy opis wykorzystania systemu CRISPR-Cas9 do skracania ciągów powtórzeń CAG. Informacje zawarte w tej części rozprawy oraz sposób ich przedstawienia świadczą o bardzo ugruntowanej, szerokiej wiedzy mgr inż. Mateusza Nowaczyka.

#### *Uzasadnienie i Cel pracy*

Cel pracy sformułowany jest w sposób klarowny i jednoznaczny, a jest nim dokładniejsze poznanie mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w regionach powtórzeń CAG w endogennym *locus* w komórkach ludzkich. Jako model wybrano zmodyfikowane komórki HEK293T z ekspansją powtórzeń CAG w *locus* HTT. Na realizację celu pracy składają się cztery zadania szczegółowe:



- scharakteryzowanie produktów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w regionie powtórzeń CAG w genie *HTT* w komórkach ludzkich,
- określenie udziału i zasięgu resekcji końców DNA w czasie naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w regionach powtórzeń CAG w komórkach ludzkich,
- określenie wpływu miejsca indukcji dwuniciowego pęknięcia DNA względem ciągu powtórzeń CAG oraz sekwencji flankujących ciąg na przebieg i rezultat naprawy,
- identyfikację białek zaangażowanych w skracanie ciągu powtórzeń CAG.

Podjęcie realizacji celu rozprawy doktorskiej zostało uzasadnione stosownym odniesieniem do danych literaturowych.

### *Materiały i Metody*

W pracy wykorzystywano dwie linie komórkowe:

- 1) linia HEK293T posiadająca 41 powtórzeń CAG na obu allelach *HTT* (HEK293T\_41CAG).
- 2) fibroblasty GM04208 pozyskane z Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA) posiadające 21 oraz 44 powtórzenia CAG w genie *HTT*.

W poszczególnych eksperymentach korzystano z jednego z dwóch systemów: rybonukleoproteiny (RNP) składającej się z białka Cas9 w kompleksie z odpowiednim gRNA (gRNA1, gRNA2 lub gRNA4) lub plazmidu z sekwencją kodującą Cas9, białko zielonej fluorescencji (GFP) oraz wstawioną sekwencją kodującą odpowiedni sgRNA (sgRNA1, sgRNA2 lub sgRNA4).

W pracy wykonano wiele złożonych, wymagających wysokiej wprawy, metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, podejść molekularnych niezbędnych do realizacji postawionych celów. Była to m.in.: ekspresja systemu CRISPR-Cas9 z plazmidu, transfekcja komórek metodą elektroporacji, transfekcja komórek siRNA za pomocą lipofektaminy, analiza produktów naprawy DNA w *locus HTT* z wykorzystaniem metody NGS, analiza dynamiki skracania ciągu powtórzeń CAG w punktach czasowych, analiza resekcji końców DNA, czy analiza udziału białek naprawy DNA w skracaniu ciągu powtórzeń CAG.

### *Wyniki*

Doktorant w usystematyzowany sposób zinterpretował wyniki prac doświadczalnych odnosząc się do kolejnych etapów badań.

Kluczowym w pracy była analiza wpływu miejsca indukcji DSB oraz sekwencji flankujących na naprawę DNA. Do tego celu użyto trzech gRNA indukujących DSBs w różnych miejscach



względem ciągu powtórzeń CAG w genie *HTT*. Wykorzystano: gRNA1 indukujący DSB na początku ciągu powtórzeń, gRNA2 tnący DNA w obrębie ciągu powtórzeń, oraz gRNA4 indukujący DSB poniżej ciągu powtórzeń.

W celu scharakteryzowania produktów naprawy DSBs indukowanych w regionach z powtórzeniami CAG, wykorzystując model HD (komórki HEK293T\_41CAG) wykonano sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) produktów PCR, powstałych po amplifikacji regionu z powtórzeniami CAG w genie *HTT*, edytowanego z udziałem różnych gRNA.

Dokonano indukcji DSB w obrębie powtórzeń CAG w genie *HTT*, co pozwoliło zaobserwować różnice w efektach naprawczych, zależnych od miejsca pęknięcia. Dotyczył to zarówno efektu końcowego naprawy DNA, ale także poszczególnych jej etapów wraz z zaangażowaniem poszczególnych czynników. Naprawa DSB indukowanych na początku ciągu powtórzeń z wykorzystaniem gRNA1 skutkowała w większości przypadków przesunięciem ramki odczytu i jednonukleotydowymi insercjami. Zaobserwowano, że w czasie naprawy DSB indukowanych z udziałem gRNA1 w komórkach HEK293T\_41CAG dochodziło do resekcji końców DNA, gdzie regiony jednoniciowe wynosiły około 1100 nukleotydów po obu stronach flankujących DSB.

Indukcja DSB w obrębie ciągu powtórzeń CAG w genie *HTT* (z udziałem gRNA2) skutkowała głównie skróceniami ciągu z zachowaniem ramki odczytu. Po edycji z udziałem gRNA2 zaobserwowano, że maksymalna intensywność resekcji była po 24 godzinach od transfekcji komórek, a resekcje końców DNA obejmowały nawet 5000 nukleotydów. Ten wynik jest bardzo istotny, gdyż wskazuje on na to, że NHEJ nie jest jedynym mechanizmem naprawy zaangażowanym w tym procesie. Potwierdzeniem tego jest znaczna długość resekcji końców oraz to, że sam proces jest dłuższy niż ten, w którym bierze udział NHEJ.

Efekt naprawy DSB w regionie znajdującym się w pewnym oddaleniu, poniżej ciągu powtórzeń CAG w genie *HTT* (edycja z udziałem gRNA4) również skutkował skracaniem ciągu powtórzeń lub jego całkowitym wycięciem. Wątek ten jest bardzo ciekawy i wart wyjaśnienia. W pracy tej nie został on jednak rozwijany ze względu na najniższą efektywność gRNA4 w porównaniu do pozostałych użytych gRNA.

Przedstawione wyniki potwierdzają zaangażowanie w naprawę DSBs, indukowanych w obrębie ciągu powtórzeń CAG/CTG, białek uczestniczących w mechanizmach naprawy wykorzystujących resekcje końców DNA.

Efektom wykonanej pracy przedstawionej w recenzowanej dysertacji jest stworzenie modeli naprawy DNA w regionach z powtórzeniami CAG u ludzi.



Wyniki badań własnych Doktorant zilustrował za pomocą bardzo czytelnych, dobrze wykonanych 33 rycin i jasno opisanych 6 tabel.

### *Dyskusja i Wnioski*

Właściwie zaplanowany projekt badawczy i jego realizacja z wykorzystaniem odpowiednio dobranych metod, jak również wnikliwa statystyczna ocena otrzymanych wyników zaowocowała uzyskaniem interesujących, oryginalnych ustaleń, m.in.

- Naprawa DSBs w regionach powtórzeń CAG w komórkach ludzkich jest procesem złożonym, angażującym różne białka i mechanizmy naprawy DNA.
- Naprawa DSBs zlokalizowanych w powtórzeniach CAG odbywa się przy zaangażowaniu mechanizmów wykorzystujących resekcje końców DNA.
- Lokalizacja DSB względem ciągu powtórzeń CAG oraz sekwencje flankujące ciąg silnie wpływają na wybór mechanizmu naprawy DNA.
- Indukcja DSB na początku ciągu powtórzeń CAG skutkuje wycięciem całego ciągu, angażując mechanizm naprawy zależny od POL $\theta$  (TMEJ).
- Indukcja DSB wewnątrz ciągu powtórzeń CAG skutkuje skracaniem ciągu z zachowaniem ramki odczytu, wykorzystując mechanizm NHEJ, jak również zależną od dużych resekcji końców DNA naprawę z udziałem białek charakterystycznych dla rekombinacji homologicznej.

Dyskusja jest bardzo silną stroną rozprawy. W tej części pracy Doktorant odnosi się krytycznie to uzyskanych w ramach pracy wyników badań naukowych, konsekwentnie do poszczególnych jej etapów, w zestawieniu do aktualnych danych literaturowych.

Jednak ze względu na pionierskie analizy wykonane w ramach pracy doktorskiej brak jest możliwości ich całkowitego porównania z literaturą światową. Uzyskane wyniki stanowią element poznawczy w zakresie wykazania złożoności funkcjonowania naprawy DNA w regionach powtórzeń CAG, gdzie angażowane są różne mechanizmy naprawy na jej odmiennych etapach.

W pracy znalazły się nieliczne błędy edytorskie, co na tak obszerną rozprawę (145 str.) jest godne podkreślenia, czy nomenklaturowe tj. szlaki zamiast ścieżki naprawy DNA. W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam swoje uwagi oraz sugestie:

- W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano bardzo ważną rolę polimerazy *POLQ* w skracaniu ciągu powtórzeń CAG w trakcie naprawy DNA. Jest to kluczowe białko w kontekście powstawania wielu chorób człowieka tj. nowotwory czy neurodegeneracyjnych i dlatego w celu pełnego wyjaśnienia udziału tego białka w



procesie tworzenia zidentyfikowanych insercji warto dokonać knock out-u jego genu w badanych komórkach.

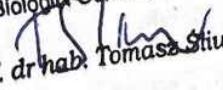
- W jaki sposób modyfikacje epigenetyczne chromatyny w obrębie powtórzeń CAG mogą skutkować wyborem rodzaju naprawy DNA?

Praca ta wpisuje się w ramy samodzielnego rozwiązania projektu badawczego, który w przyszłości może zaowocować stworzeniem nowych podejść terapeutycznych chorób poliQ, jak również pozwoli przybliżyć mechanizmy naprawy DSBs w regionach powtórzeń CAG w komórkach ludzkich. Przedstawiona do recenzji dysertacja jest wypadkową ogromnego wysiłku włożonego przez jej promotora Panią Profesor Martę Olejniczak oraz Doktoranta.

Warte jest podkreślenia, że niniejsza praca powstała jako pochodna projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki noszącego tytuł „Badanie mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w regionach mikrosatelitarnych z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9”, a jej wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 40/2025/Internet/RN\_140 z dnia 18 marca 2025 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgra inż. Łukasza Nowaczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie wnoszę do Wysokiej Rady wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej ze względu na zastosowanie nowatorskiego rozwiązania, wykorzystującego edycję genomu, pozwalającego na dokładniejsze poznanie zjawisk odpowiedzialnych za niestabilność ciągów powtórzeń CAG. Rozwiązanie to oparte zostało o najnowocześniejsze techniki genetyczne i molekularne, takie jak CRISPR-Cas9, wnikliwą analizę rezultatów badań, co może w niedalekiej przyszłości skutkować nowymi, strategiami leczenia chorób poliQ.

**DYREKTOR**  
INSTYTUTU BIOCHEMII  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ  
  
prof. dr hab. Tomasz Stwiński