



**INSTYTUT
GENETYKI CZŁOWIEKA**
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

Poznań, 1.08.2025

Dr hab. Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk, prof. IGC PAN
Zakład Patologii Molekularnej

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Mateusza Nowaczyka zatytułowanej
„Identyfikacja procesów zaangażowanych w skracanie ciągu powtórzeń CAG w wyniku indukcji
dwuniciowych pęknięć DNA w genie *HTT*”**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Marty Olejniczak. Rozprawa ma charakter monografii i posiada klasyczny dla tej formy układ. Praca napisana jest w języku polskim, liczy 145 stron, rozpoczyna się spisem publikacji Doktoranta i wykazem skrótów oraz streszczeniem w języku angielskim i polskim. Zgodnie z zawartymi w rozprawie informacjami, wyniki prezentowane w rozprawie zostały też ujęte w artykule naukowym opublikowanym w BMC Biology, w którym Doktorant dzieli pierwsze autorstwo. Dodatkowo mgr Nowaczyk jest współautorem dwóch prac przeglądowych z tematyki CRISPR/Cas9, co wskazuje na sprecyzowane zainteresowania naukowe.

Tematyka badawcza rozprawy dotyczy charakterystyki mechanizmów naprawy dwuniciowych złamań DNA (DSB) w kontekście chorób neurodegeneracyjnych związanych z ekspansją sekwencji mikrosatelitarnych i była realizowana w ramach grantu Opus NCN, kierowanego przez Panią prof. Martę Olejniczak. Głównym celem rozprawy było dokładniejsze poznanie mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA generowanych w regionach powtórzeń CAG w komórkach ludzkich w endogennym locus genu *HTT*, powiązanego z patogenezą choroby Huntingtona. Jako cele szczegółowe określono: 1) scharakteryzowanie produktów naprawy DSB w powyższym regionie; 2) określenie udziału i zasięgu resekcji końców DNA w procesie naprawy; 3) określenie wpływu miejsca indukcji dwuniciowego pęknięcia DNA na przebieg i rezultat naprawy; 4) identyfikację białek zaangażowanych w skracanie ciągu powtórzeń CAG. W tym miejscu nadmienię tylko, że czytając cele szczegółowe, a później wyniki, odniosłam wrażenie, że cel 1) zawiera się w celu 3) (produkty naprawy

DNA to przecież to samo co rezultat naprawy). Pęknięcia DNA były indukowane przy pomocy techniki CRISPR/Cas9, która w ostatnich latach zrewolucjonizowała biologię molekularną i z którą wiązane są również nadzieje na rozwój nowych terapii. Mimo coraz lepszego poznania molekularnych mechanizmów działania CRISPR/Cas9 i opracowania różnych wariantów tej techniki, wciąż trudno przewidzieć dokładny przebieg i efekt naprawy celowo wywołanych pęknięć DNA, zwłaszcza w tak szczególnym przypadku, jakim są długie ciągi powtórzeń mikrosatelitarnych. Mając na uwadze potencjalne lecznicze zastosowanie CRISPR/Cas9 do korekty ekspansji powtórzeń mikrosatelitarnych, niezbędne jest szczegółowe zrozumienie tego procesu, tak aby móc zaoferować bezpieczne i skuteczne podejście terapeutyczne. Badania takie nie były dotąd przeprowadzone w komórkach ludzkich, w endogennym locus zawierającym powtórzenia CAG w obrębie genu *HTT*. W tym względzie temat podjęty przez Pana mgr. Nowaczyka jest niezwykle istotny i na czasie.

W liczącym 24 strony wstępie Doktorant omawia kolejno zagadnienia dotyczące sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka i chorób związanych z ich ekspansją, różnorodnych mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA oraz narzędzi inżynierii genetycznej wykorzystywanych do skracania ciągów powtórzeń CAG, ze szczególnym naciskiem na system CRISPR/Cas9. Rozdział ten ma logiczną, uporządkowaną strukturę i stanowi przejrzyste, usystematyzowane wprowadzenie w tematykę rozprawy, uwzględniające aktualny stan wiedzy i najnowsze doniesienia z dziedziny. Autor zdołał osiągnąć złoty środek i zawarł we wstępie wszystkie informacje niezbędne do zrozumienia zagadnień poruszanych w rozprawie, ale bez nadmiernego zagłębiania się w szczegóły. Dodatkowo wartość rozdziału podnoszą przejrzyste ryciny. Całość świadczy o szerokiej wiedzy Doktoranta i umiejętności zrozumiałego jej przedstawienia.

W rozdziałach 3. „Materiały” i 4. „Metody” opisany jest imponujący wachlarz technik biologii molekularnej zastosowanych w niniejszej pracy. W zależności od celu i układu eksperymentalnego, Cas9 i sgRNA były dostarczane bądź w postaci kompleksów rybonukleoproteinowych (RNP), bądź jako plazmid. Stosowano też różne metody transfekcji: elektroporację w przypadku kompleksów RNP, lipofektaminę dla siRNA lub polietylenoiminę do wprowadzenia plazmidu. W przypadku lipofektaminy posłużono się tzw. odwróconą transfekcją – chciałabym w tym miejscu zapytać, czy było to podyktowane względami praktycznymi (wygoda przeprowadzenia eksperymentu) czy też może podejście to okazało się bardziej efektywne? Z dużym zainteresowaniem przeczytałam część dotyczącą analizy resekcji końców DNA, która wykorzystuje fakt, iż enzymy restrykcyjne przecinają dwuniciowy DNA, lecz nie jednoniciowy, z którym mamy do czynienia w przypadku wystąpienia resekcji końców DNA. Przekłada się to następnie na wartość parametru Ct podczas amplifikacji analizowanego regionu za pomocą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Metodologia tego eksperymentu została przejrzysto wyjaśniona oraz zilustrowana ryciną. W równie klarowny sposób przedstawiono inną kluczową dla niniejszej rozprawy analizę, polegającą na ilościowej i jakościowej ocenie dynamiki i wydajności procesu skracania ciągu powtórzeń CAG po edycji genomu z udziałem sgRNA. Oba te

rozdziały wskazują na rzetelne przeprowadzenie prac badawczych, a ich stopień szczegółowości umożliwia powtórzenie eksperymentów.

Modelem badawczym była ludzka linia komórkowa HEK293T, zmodyfikowana w taki sposób, że zawiera 41 powtórzeń CAG na obu allelech genu *HTT*. Zastosowane gRNA zlokalizowane były w różnych miejscach względem ciągu powtórzeń: na początku, w obrębie (cięcie wielokrotne) oraz poniżej. W pierwszym kroku Pan mgr Nowaczyk wykonał analizę efektywności systemu CRISPR/Cas9 w skracaniu ciągu powtórzeń CAG. W tym celu przeprowadzono celowane sekwencjonowanie następnej generacji badanego regionu w komórkach po edycji z udziałem trzech gRNA. Wyniki przedstawiają się bardzo ciekawie. W przypadku gRNA1, indukującego DSB na samym początku ciągu powtórzeń, jedynie 4,9% sekwencji zachowało pełną sekwencję, natomiast w aż 61% doszło do całkowitego wycięcia tego ciągu; w większości wiązało się to również z wycięciem sekwencji flankujących. gRNA2, który może prowadzić do wielu cięć w obrębie regionu powtórzeń, był także wydajny, gdyż niezmienną sekwencją pozostała jedynie w 7% odczytów. Zaobserwowano szerokie spektrum liczby pozostałych powtórzeń, najczęściej między 4 a 10, a do wycięcia całego ciągu doszło w 13% przypadków. Co interesujące, w przypadku tego gRNA zmiany widoczne były już po 4 godzinach, a w miarę upływu czasu dochodziło do kolejnych skróceń, najprawdopodobniej w wyniku kolejnych rund cięcia. Najmniej wydajny okazał się gRNA4, wiążący się za ciągiem powtórzeń – w 18% (wg tekstu, bo na rycinie 5.1.3 wygląda to na ponad 20%) nie doszło do zmiany. Poza tym przeważało usunięcie 1-2 powtórzeń, a cały ciąg został wycięty jedynie w 12% sekwencji. Można by się spodziewać, że jednoczesne zastosowanie gRNA1 i gRNA4, flankujących ciąg powtórzeń CAG, doprowadzi do skutecznego wycięcia tego fragmentu. Okazało się jednak, że stało się tak jedynie w przypadku 51% odczytów – a więc mniej niż w przypadku samego gRNA1 (61%). Doktorant w dyskusji omawia możliwe mechanizmy prowadzące do wycięcia całego ciągu powtórzeń w przypadku gRNA1, mnie natomiast ciekawi również, dlaczego łączne zastosowanie gRNA1 i gRNA4 nie było skuteczniejsze w tym aspekcie?

Aby przeprowadzić analizę resekcji końców DNA w trakcie naprawy DSB indukowanych przez gRNA, najpierw Pan mgr Nowaczyk przeanalizował szereg enzymów restrykcyjnych, wybierając te najbardziej efektywne. Tutaj również zasięg i dynamika tego procesu interesująco różniły się w zależności od miejsca indukcji DSB. W przypadku gRNA1 do resekcji dochodziło blisko edytowanego miejsca (do 1000 pz) i w krótkim czasie po edycji (po 24 h poziom resekcji nie różnił się już od próby nieedytowanej). Natomiast dla gRNA2 resekcje były wykrywane nawet do 5000 pz od miejsca DSB, osiągając maksymalny poziom po 24 h i wciąż obecne nawet po 48 h.

Cennego wglądu w mechanizmy naprawy DSB i skracania ciągu powtórzeń CAG dostarcza ostatnia część rozprawy, w której Doktorant analizował udział poszczególnych białek naprawczych. Przebadano tutaj sześć białek zaangażowanych w różne mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA,

stosując inhibitory chemiczne i/lub siRNA. Zgodnie z zaobserwowanymi różnicami w rozkładzie liczby powtórzeń po edycji, w dynamice procesu naprawy oraz w zasięgu resekcji, białka biorące udział w tych procesach także się różniły. W przypadku gRNA1 zaobserwowano obniżenie efektywności skracania ciągu powtórzeń w przypadku inhibicji bądź wyciszenia KU70/80, POLQ oraz EXO1, podczas gdy dla gRNA2 były to KU70/80, MRE11, CTIP oraz RAD51. Patrząc na rozkład pików na elektroforegramach można zauważyć jednak, że w przypadku gRNA1 i niektórych białek, niezależnie od tego, czy całościowo odnotowano istotne różnice, czy nie, wydaje się, że zmniejszyła się liczba sekwencji z wycięciem całego ciągu powtórzeń (tj. przy inhibicji/wyciszeniu CTIP, POLQ, Artemis, EXO1). Rzeczywiście, bardziej szczegółowa analiza jakościowa produktów naprawy po wyciszeniu POLQ wykazała, że udział sekwencji z całkowitym wycięciem tego regionu spadł z 39% do 31%. Zaobserwowano też dodatkowe różnice, wskazujące na przełączanie się komórek na inny mechanizm naprawczy. Czy zdaniem Doktoranta można by wykorzystać tę wiedzę do bardziej precyzyjnego sterowania procesem wycinania powtórzeń CAG celem osiągnięcia optymalnego rezultatu?

W dyskusji Pan mgr Nowaczyk porusza między innymi kwestię potencjalnego terapeutycznego zastosowania CRISPR/Cas9 w płasowicy Huntingтона i proponuje gRNA2 jako najlepszego kandydata, argumentując to dużą wydajnością wycinania powtórzeń z zachowaniem ramki odczytu. Co jednak z możliwym negatywnym wpływem na komórki spowodowanym indukcją wielu DSB? Prosiłabym Doktoranta o rozważenie tej kwestii. Ponadto, co byłoby bardziej pożądane z terapeutycznego punktu widzenia: wycięcie całego ciągu powtórzeń czy też raczej jego skrócenie poniżej liczby uważanej za patologiczną?

Wyniki uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej pozwoliły Panu mgr. Nowaczykowi na pogłębioną charakterystykę przebiegu procesu naprawy DSB w ciągu powtórzeń CAG genu HTT i produktów tej naprawy, jak również dostarczyły informacji na temat zaangażowanych białek. Pozwoliło to na zaproponowanie modeli naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w zależności od miejsca indukcji DSB. Ryciny 6.1 i 6.2 stanowią przejrzyste podsumowanie całej pracy.

Rozprawa jest przygotowana starannie, poprawnym naukowym językiem. Z obowiązku recenzenta nadmienię jedynie pewne drobne uchybienia:

- „mikrosatelita” to rzeczownik rodzaju męskiego, zatem w dopełniaczu liczby mnogiej: „mikrosatelitów”, a nie „mikrosatelit”;
- Cas9 to nukleaza (rodzaj żeński), zatem: „najpowszechniej stosowana Cas9 pochodząca... posłuży”, a nie „najpowszechniej stosowane Cas9 pochodzące... posłuży”;
- interpunkcja – miejscami brakuje, a miejscami jest za dużo przecinków.

Podsumowując, Pan mgr Mateusz Nowaczyk w rozprawie doktorskiej dokonał wnikliwej analizy procesu naprawy dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych w regionie powtórzeń CAG genu

HTT. Cele rozprawy zostały osiągnięte i dostarczyły istotnych, oryginalnych wyników. Wysoko oceniam zarówno walory poznawcze, jak i aplikacyjne tej pracy. Jest to piękny przykład badań podstawowych w swej istocie, przeprowadzonych w celu poznania fundamentalnych procesów komórkowych, które jednocześnie dostarczają wiedzy o potencjale translacyjnym. Wciąż trudno przewidzieć rezultat edycji za pomocą techniki CRISPR/Cas9, zwłaszcza w tak szczególnych przypadkach, jakimi są sekwencje mikrosatelitarne. Na wybór mechanizmu naprawczego wpływ mogą mieć różne czynniki, w tym lokalizacja nacięcia, sekwencja otaczająca, faza cyklu komórkowego i inne. Mając na uwadze potencjalne terapeutyczne zastosowanie CRISPR/Cas9 w chorobach związanych z ekspansją sekwencji mikrosatelitarnych, niezwykle istotne jest wcześniejsze zrozumienie procesu naprawy w konkretnym przypadku. Rozprawa Pana mgr. Nowaczyka przede wszystkim udowadnia, że możliwe jest skuteczne skrócenie lub nawet całkowite wycięcie patologicznego ciągu powtórzeń w genie *HTT*, a ponadto poprzez identyfikację zaangażowanych białek wskazuje na potencjalne możliwości manipulacji przebiegiem i rezultatem naprawy dla osiągnięcia optymalnego efektu.

Stwierdzam zatem, że rozprawa Pana mgr. Mateusza Nowaczyka zatytułowana „Identyfikacja procesów zaangażowanych w skracanie ciągu powtórzeń CAG w wyniku indukcji dwuniciowych pęknięć DNA w genie *HTT*” stanowi istotne poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w obrębie powtórzeń mikrosatelitarnych. 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 mgr. Mateusza Nowaczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę kompleksowy charakter przedstawionych badań i analiz oraz nowatorstwo uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk