



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
ul. Wołyńska 33
60-637 Poznań
tel. +48 61 846 61 15
e-mail: izabela.szczerebal@up.poznan.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pana mgr inż. Mateusza Nowaczyka

pt. „**Identyfikacja procesów zaangażowanych w skracanie ciągu powtórzeń CAG w wyniku indukcji dwuniciowych pęknięć DNA w genie *HTT***”

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, w Zakładzie Inżynierii Genomowej, pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Marty Olejniczak. Rozprawa doktorska została przygotowana jako klasyczne opracowanie monograficzne, obejmujące następujące rozdziały: *Streszczenie* w języku polskim i angielskim (po 1 stronie), *Wstęp* (24 strony), *Cel pracy* (1 strona), *Materiał* (10 stron), *Metody* (16 stron), *Wyniki* (45 stron), *Dyskusja* (12 stron), *Wnioski* (1 strona) oraz *Literatura* obejmujący 222 pozycje. Cała praca liczy 145 stron i jest bogata w liczne rysunki (46) i tabele (17). Badania do pracy sfinansowano w ramach projektu OPUS 15 Narodowego Centrum Nauki (nr 2018/29/N/NZ1/00293), którego kierownikiem jest promotor rozprawy doktorskiej. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane w oryginalnej pracy twórczej pt. „CRISPR/Cas9-induced double-strand breaks in the huntingtin locus lead to CAG repeat contraction through DNA end resection and homology-mediated repair” w czasopiśmie *BMC Biology* (IF₂₀₂₄=4,5) w 2024 roku, w której Doktorant dzieli pozycję pierwszego autora. Dodatkowo, Doktorant jest współautorem dwóch prac przeglądowych dotyczących stosowania metody CRISPR-Cas do edytowania genomu opublikowanych w czasopismach: *Cells* (IF₂₀₂₀=6,6) w 2020 roku oraz *Biotechnology Advances* (IF₂₀₂₁=17,6) w 2021 roku. Dorobek publikacyjny Doktoranta uważać należy za bardzo wartościowy.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy poznania mechanizmów odpowiedzialnych za niestabilność ciągów trinukleotydowych CAG. Ekspansja takich powtórzeń jest przyczyną dziedzicznych, neurodegeneracyjnych chorób człowieka, w tym choroby Huntingtona. Wskazuje się, że wybrane ścieżki naprawy DNA są przyczyną skracania lub wydłużania ciągów CAG, jednak szczegółowa wiedza o mechanizmach działania tych procesów jest ciągle niepełna. Doktorant podjął się ambitnego zadania dotyczącego poznania roli mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w obrębie powtórzeń CAG w ludzkim genie *HTT* w kontekście ich stabilności. Zastosował nowoczesne

techniki badawcze, m.in. metodę CRISPR-Cas9 do indukowania DSB i analizował jak różne mechanizmy naprawy DNA prowadzą do zmian długości ciągów. Wiedza o mechanizmach wpływających na niestabilność ciągów powtórzeń CAG stwarza podstawy do opracowania nowych podjęć terapeutycznych mających na celu skracanie długości patologicznych sekwencji trinkukloetydowych w chorobach neurodegeneracyjnych. Należy zaznaczyć, że zespół kierowany przez prof. dr hab. Martę Olejniczak od lat prowadzi kompleksowe badania ukierunkowane na rozwój nowoczesnych terapii molekularnych chorób neurodegeneracyjnych w oparciu o technikę RNAi czy edycji genomów i osiągnięcia tego zespołu mają istotny wkład w zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw patologii chorób poliglutaminowych. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w ten nurt badań i stanowi kolejne, ważne dokonanie naukowe na tym polu.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia, w języku polskim i angielskim, które są dość skrótowo przedstawione, jednakże pozwalają czytelnikowi na poznanie kluczowych elementów pracy doktorskiej. Rozdział *Wstęp* został bardzo starannie i wnikliwie napisany. Doktorant przedstawił w nim informacje o sekwencjach mikrostatelitarnych w genomie człowieka i dokonał przeglądu chorób związanych z ich ekspansją, szczegółowo opisał mechanizmy naprawy DNA oraz narzędzia inżynierii genetycznej do indukcji dwuniciowych pęknięć DNA w kontekście skracania ciągów CAG jako efekt naprawy DNA. Przedstawione treści dobrze wprowadzają czytającego do tematyki pracy doktorskiej. Rozdział wzbogaca liczne schematy i ryciny. Drobne uwagi czy wątpliwości budzą następujące kwestie poruszane w tym rozdziale:

- czy stwierdzenie na str. 15 o niepatologicznej liczbie powtórzeń w zakresie od 30-40 w chorobach poliQ można uznać za poprawne? Nawet w odniesieniu do tabeli 1.2, gdzie pokazano wiele przykładów powtórzeń, których zakres od 34 bywa już patologiczny?

- ponieważ głównym obiektem zainteresowania w prowadzonych badaniach jest choroba Huntingtona, można byłoby oczekiwać bardziej szczegółowego przedstawienia stanu zaawansowania badań przedklinicznych/klinicznych tej choroby np. w formie tabelarycznej. Stwierdzenie na stronie na str. 15 o braku skutecznej terapii jest oczywiście prawdziwe ale też nie informuje o wielu podjętych próbach leczenia tej choroby.

Inne drobne błędy w tym rozdziale to m.in.:

- zamiast „świeżo zsyntetyzowana nić DNA” na str. 18 - lepiej użyć sformułowania „nowo zsyntetyzowana”
- nazwy enzymów- np. ligaza DNA I zapisujemy małą literą - str. 19
- niektóre bardziej złożone ryciny wymagałyby bardziej szczegółowej legendy – np. na rys. 1.4.1.1 – brak informacji co oznacza znak zapytania, nie wynika to także z informacji podanych na str. 27 pracy



dla procesu TMEJ a jedynie dla SSA na str. 28. Dlaczego np. dla procesu NHEJ na tym schemacie pokazana jest LIG3 zamiast LIG IV jak w podano w pracy źródłowej?

W kolejnym rozdziale pracy doktorskiej sformułowano ogólny cel badań dotyczący dokładniejszego poznania mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w regionach powtórzeń CAG w endogennym locus *HTT* w komórkach ludzkich. Nie przedstawiono hipotez badawczych, które zwykle są oczekiwane w pracach o charakterze eksperymentalnym. Cel pracy realizowano w oparciu o 4 szczegółowe zadania badawcze obejmujące: i) charakterystykę produktów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w badanym locus; ii) określenie udziału i zasięgu resekcji końców DNA w czasie naprawy; iii) określenie wpływu miejsca indukcji dwuniciowych pęknięć DNA na przebieg naprawy i jego końcowy efekt; iv) identyfikację białek zaangażowanych w skracanie ciągów powtórzeń CAG. Przedstawione zadania badawcze są adekwatne do założonego celu, w sposób kompleksowy pozwalają na poznanie badanego mechanizmu i ich realizacja ma bardzo duży aspekt poznaczy.

Jako model badawczy wybrano zmodyfikowane komórki HEK293T z ekspansją powtórzeń CAG w genie *HTT* wynoszącą 41. Jak każdy model badawczy, również ten, ma swoje zalety i ograniczenia. Do zalet zaliczyć należy użycie endogennego locus *HTT* z dość prostym do badania ciągiem powtórzeń – umiarkowanym w swojej długości i w takim samym układzie na obu allelach. W kontekście badań translacyjnych model ten ma swoje ograniczenia, gdyż w komórkach pacjentów z chorobą Huntingtona ciągi powtórzeń są zwykle w układach heterozygotycznych, dlatego w kolejnych badaniach cenne byłoby użycie także takiego modelu, z silnej wydłużonymi ciągami. Rodzaj użytych komórek także ma znaczenie dla przebiegu eksperymentu - brak komórek neuronalnych, postmitotycznych o innym profilu ekspresji i innym profilu zmian epigenetycznych może warunkować typ naprawy DNA i wpływać na funkcjonowanie genu *HTT* po edycji jego locus. W pracy wykorzystano także fibroblasty GM04208 z Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA) posiadające 21 i 44 powtórzenia CAG w genie *HTT*, jednak w części pracy dotyczącej przedstawionych zadań badawczych nie wskazano celu ich użycia a informacja ta pojawia się w kolejnym rozdziale *Materiał* i dopiero w momencie czytania *Wyników* staje się jasne w jakim celu zostały zastosowane. Informacja ta mogła pojawić się wcześniej. Rozdział ten zawiera szczegółowe informacje o użytych odczynnikach, oligonukleotydach, przeciwciałach, inhibitorach czy enzymach oraz składach stosowanych buforów oraz sprzęcie. W przypadku większości użytych materiałów podawano numery katalogowe, co jest cenne w sytuacji potrzeby powtarzania eksperymentów, czasami jednak tych szczegółowych danych zabrakło.

W rozdziale *Metody* opisano prowadzenie hodowli komórkowych, stosowanie systemu CRIPR-Cas9, metody transfekcji w oparciu o elektroporację i za pomocą lipofektaminy lub polietylenoiminy, stosowanie inhibitorów chemicznych białek, analizę produktów po NGS, analizę dynamiki skracania

ciągu powtórzeń z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej, analizę resekcji końców DNA w oparciu o trawienie restrykcyjne fragmentów i następnie wykonanie qPCR, analizę udziału białek naprawy DNA. Opis metod badawczych jest bardzo precyzyjny a przedstawione warunki i składy poszczególnych reakcji pozwalają na wykorzystania niniejszej pracy doktorskiej jako materiału źródłowego do dalszych eksperymentów. Wszystkie analizy przeprowadzono w odpowiednich powtórzeniach biologicznych i technicznych, z zastosowaniem właściwych metod statystycznych. Rozdział ten obrazuje jak szeroki wachlarz metod badawczych zastosowano w pracy i jak wielki nakład pracy i oponowanie szeregu technik badawczych było wymagane od Doktoranta. Ze względu na obszerną metodykę badań, w niektórych miejscach opis metodyki bywa trudny do zrozumienia, zanim czytelnik nie zapozna się z wynikami. Przykładem może być analiza resekcji końców DNA, w którym nie wyjaśniono czym są analizowane regiony oznaczone poszczególnymi literami i warto byłoby schemat pokazany na str.72 i 75 pokazać już w części metodycznej.

W rozdziale *Wyniki* Doktorant szczegółowo opisuje przeprowadzone eksperymenty a uzyskane wyniki prezentuje na bardzo dobrze opracowanych rycinach i wykresach. Pierwsza część pracy dotyczy wykorzystania 3 różnych gRNA wiążących się w różnych miejscach względem ciągu powtórzeń CAG (gRNA1 - przed sekwencją CAG, gRNA2 - w wielu miejscach ciągu powtórzeń CAG, gRNA4 - 58 nt poniżej powtórzeń CAG) do indukcji pęknięć DNA i następnie oceny efektów naprawy na podstawie oceny fragmentów po sekwencjonowaniu (NGS). Zidentyfikowane warianty sekwencji przypisano do 6 różnych kategorii (41 CAG — sekwencja nieedytowana; Ins CAG — wzrost liczby powtórzeń CAG, bez przesunięcia ramki odczytu; Del CAG — spadek liczby powtórzeń CAG, bez przesunięcia ramki odczytu; Ins — insercje prowadzące do przesunięcia ramki odczytu; Del — delecje prowadzące do przesunięcia ramki odczytu; Indel — złożone zmiany prowadzące do przesunięcia ramki). Podejście takie pozwala na zaprezentowanie uzyskanych wyników z odczytów sekwencjonowania w formie graficznej i ich porównanie między sobą. Ponieważ w próbie nieedytowalnej częstość wariantu wyjściowego „41 CAG” jest na poziomie ~50%, pojawia się pytanie w jaki sposób oceniano efektywność edycji badanego locus i czy było możliwe występowanie heterogennej populacji komórek poddanych edytowaniu? Czy oceniano także wpływ edycji na przeżywalność i proliferację komórek, mając na uwadze dane dowodzące, że dwuniciowe pęknięcia DNA wywołane przez CRISPR-Cas9 mogą prowadzić do zatrzymania cyklu komórkowego (m.in. za pośrednictwem p53)? Wyniki uzyskane po zastosowaniu poszczególnych gRNA pokazano jako częstość występowania poszczególnych wariantów wraz z pokazaniem trzech najczęściej obecnych zmienionych sekwencji, co jest bardzo dobrym podejściem. Wszystkie wyniki dla poszczególnych gRNA1,2,4 oraz kombinacji gRNA1+gRNA4 szczegółowo omówiono i wykazano jak złożone kombinacje różnych wariantów sekwencji były efektem wprowadzonych dwuniciowych pęknięć DNA. Do najważniejszych wyników z tej części pracy uznać należy wykazanie, że sposób skracania ciągu CAG jest zależny od umiejscowienia podwójnego pęknięcia DNA oraz sekwencji otaczających a także zidentyfikowanie takiego mechanizmu naprawy



(przy zastosowaniu gRNA2), przy którym większość uzyskanych produktów sekcjonowania (~90%) wykazywała delecje powtórzeń CAG w obrębie ramki odczytu. Odkrycie to ma duży potencjał aplikacyjny (terapeutyczny). W tym kontekście warto byłoby dodatkowo wykonać sekwencjonowanie całego genomu lub chociaż sekwencjonowanie długich fragmentów DNA, w celu identyfikacji czy nie dochodzi do rearanżacji w innych, bardziej odległych miejscach genomu. Mając na uwadze potencjalny aspekt terapeutyczny prowadzonych badań, należałoby także ocenić czy edytowanie locus *HTT* wpływa na jego funkcjonowanie.

Następnym etapem badań była ocena dynamiki procesu skracania ciągu powtórzeń CAG jako efekt indukowanych dwuniciowych pęknięć DNA. Komórki z wprowadzonymi edycjami genomu za pomocą gRNA1 i gRNA2 badano w następujących punktach czasowych – 1h, 4h, 24h po transfekcji RNP. Wykazano odmienną dynamikę tego procesu w zależności od użytego gRNA - w przypadku gRNA1 skrócenie ciągu CAG obserwowano dopiero po 24h a w przypadku gRNA2 już po 4h i dalsze skracanie w kolejnych godzinach. Wyniki te sugerują udział odmiennych mechanizmów naprawczych DNA, jednak nie zostały omówione w tym kontekście. Były jednak wiążące dla kolejnego eksperymentu, w którym określono zasięg i intensywność resekcji końców DNA. Do tego celu zastosowano bardzo interesującą metodę opartą o qPCR na genomowym DNA wyizolowanym z komórek edytowanych i trawionych przez zestaw enzymów restrykcyjnych. Poziom resekcji określano porównując wartości ΔC_t uzyskane we frakcjach strawionych i niestrawionych. Optymalizacja metody była czasochłonna i pracochłonna (wiele testowanych enzymów restrykcyjnych i miejsc cięcia, w tym analiza drugiego locus innego niż *HTT* oraz dodatkowo badany inny typ komórek – fibroblasty GM04208 poza HEK293T) ale ostatecznie pozwoliła na uzyskanie bardzo cennych wyników. Analizie poddano po 4 miejsca restrykcyjne zlokalizowane powyżej i poniżej w różnych odległościach od powtórzeń CAG w locus *HTT*. Za najważniejsze wyniki z tej części badań uznać należy wykazanie, że zasięg, intensywność i czas resekcji końców DNA w czasie naprawy dwuniciowych pęknięć DNA są uwarunkowane lokalizacją cięcia i typem komórki (niższa intensywność procesu resekcji w fibroblastach). Stwierdzono zależność pomiędzy intensywnością resekcji a długością ciągu powtórzeń, przy czym dłuższe ciągi promowały mechanizm naprawy wykorzystujący resekcję końców DNA. Dane te wskazują na potrzebę badania innych modeli komórkowych, szczególnie komórek neuronalnych i powiązania analizy naprawy pęknięć DNA w czasie w odniesieniu do cyklu komórkowego w danym typie komórek.

Ostatni wątek badawczy poruszany w pracy doktorskiej dotyczył określenia roli wybranych białek naprawczych w skracaniu ciągu powtórzeń CAG w genie *HTT*. Wybrano 7 białek zaangażowanych w różne mechanizmy naprawy DNA: MRE11, CTIP i EXO1 (resekcje), KU70/80 i Artemis (NHEJ), POL θ (TMEJ) i RAD51 (HR). W tabeli 5.5 wskazano tylko 6 białek. Inhibicję białek wykonano chemicznie lub z wykorzystaniem siRNA. Indukcję dwuniciowych pęknięć DNA

przewodzone przy pomocy sgRNA1 i sgRNA2 i wyniki prezentowano jako zmiany procentowe w udziale produktów zawierających skrócone ciągi powtórzeń. Wyniki szczegółowo zaprezentowano w postaci elektroforegramów po rozdziale produktów PCR po amplifikacji i zbiorczo w postaci wykresów. W przypadku działania sgRNA1 redukcje skróceń ciągu powtórzeń względem kontroli była obserwowana dla POLθ, EXO1 i KU70/80, natomiast dla sgRNA2 dla MRE11, RAD51, CTIP i KU70/80. Wskazuje to na zróżnicowanie zaangażowanie różnych białek naprawy DNA w zależności od lokalizacji pęknięć. Dodatkowo, bardziej szczegółowej analizie poddano POLθ, którego inhibicja chemiczna i za pomocą siRNA spowodowała zmniejszenie skróconych ciągów o ~30% w przypadku gRNA1. Białko to jest kluczowe dla mechanizmu naprawy DNA –TMEJ, co może sugerować znaczącą rolę tego procesu i poznanie tego mechanizmu w niniejszej pracy doktorskiej stanowi ważne osiągnięcie, które może mieć istotne znaczenia dla dalszych badań nad opracowaniem metod efektywnego skarcenia patologicznych ciągów CAG w chorobie Huntingtona.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorant umiejętnie dokonał interpretacji uzyskanych wyników i odwołał się do innych pozycji literaturowych. Nie jest ich niestety zbyt dużo (kilkanaście pozycji), z czego w dużej części rozważania prowadzi się do pracy własnej (z BMC Biology), której Doktorant jest współautorem. Ta część pracy jest poprawna a na uznanie zasługuje opracowanie dwóch modeli naprawy dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych na początku oraz wewnątrz ciągu powtórzeń CAG w komórkach ludzkich. Rozprawę doktorską kończy rozdział *Wnioski*, w którym sformułowano 5 kluczowych wniosków. W pierwszym z nich użyto sformułowania „w komórkach ludzkich”, co jest nawiązaniem do postawionego celu badań, może jednak sugerować objęcie badaniami znacznie większej liczby typów komórek. Wydawałoby się bardziej zasadne odwołanie do użytego modelu komórkowego. Pozostałe wnioski nie budzą zastrzeżeń.

Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane za pomocą adekwatnych i nowoczesnych metod badawczych. Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań i bardzo dobrze poradził sobie z interpretacją wielu szczegółowych wyników, co potwierdza jego dużą wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne. Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi istotny wkład w badania nad poznaniem procesów naprawy DNA, które są przyczyną stabilności ciągów CAG, w chorobach neurodegeneracyjnych człowieka i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Uzyskane wyniki są niezwykle ważne ze względów poznawczych i otwierają nowe perspektywy badań w zakresie opracowania nowych terapii molekularnych chorób neurodegeneracyjnych w oparciu o techniki edycji genomów. Na uznanie zasługuje także opublikowanie wyników badań w prestiżowym czasopiśmie naukowym.



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
ul. Wołyńska 33
60-637 Poznań
tel. +48 61 846 61 15
e-mail: izabela.szczerebal@up.poznan.pl

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Identyfikacja procesów zaangażowanych w skracanie ciągu powtórzeń CAG w wyniku indukcji dwuniciowych pęknięć DNA w genie HTT*” autorstwa Pana mgr inż. Mateusza Nowaczyka spełnia wszystkie wymogi formalne 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.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr inż. Mateusza Nowaczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Biorąc pod uwagę zakres i wysoki poziom przeprowadzonych badań, duże walory poznawcze uzyskanych wyników oraz fakt ich opublikowania w prestiżowym czasopiśmie naukowym wnoszę również o wyróżnienie rozprawy.



Signed by /
Podpisano przez:

Izabela Maria
Szczerebal

Date / Data:
2025-08-08 12:16

Poznań, dn. 8 sierpnia 2025r.

/~ prof. dr hab. Izabela Szczerebal/