



dr hab. Paweł Pomorski prof. Inst.
Pracownia Molekularnych Podstaw
Ruchów Komórkowych,
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego, Polska Akademia Nauk
ul. L. Pasteura 3
02-093 Warszawa
e-mail: p.pomorski@nencki.edu.pl

Warszawa, 22 listopada 2020

Recenzja

*Rozprawy doktorskiej mgr Lidii Gaffke
„Zmiany w procesach komórkowych jako nowy aspekt patogenezy
mukopolisacharydoz: badania transkryptomowe.”*

Mukopolisacharydozy to genetyczne choroby spichrzeniowe pojawiające się na skutek mutacji w genach kodujących enzymy katalizujące w lizosomach rozkład glikozoaminoglikanów (GAG). Są to choroby rzadkie, występujące raz na sto tysięcy urodzeń lub rzadziej, dające jednak złe rokowania i skazujące chorych na długotrwałe cierpienie i przedwczesną śmierć. Badania nad nimi rzucają także światło na całościowy obraz regulacji metabolizmu komórki i pokazują, że żaden ze szlaków reakcji biochemicznych w organizmie żywym nie może być analizowany w oderwaniu od całości procesów metabolicznych i regulacyjnych zachodzących wokół niego. Tę właśnie drogę studiów nad mukopolisacharydozami obrała magister Lidia Gaffke w przedstawionej mi do recenzji rozprawie.

Magister Lidia Gaffke zdecydowała się przedłożyć swoją rozprawę doktorską w formie zestawu opublikowanych prac, poprzedzonego krótkim streszczeniem w języku polskim oraz angielskim. Streszczenie stanowi tak naprawdę wprowadzenie do zestawu i jest niezbędne do powiązania całości, jako że każda z prac tworzących rozprawę stanowi przecież osobną, zamkniętą całość. Wprowadzenie to jest napisane bardzo sprawnie i czyta się je doskonale. Spełnia swą rolę, choć pozostawia czytelnika z pewnym niedosytem, zwłaszcza jeśli zapoznamy się z nim po wnikliwym przestudiowaniu załączonych prac.

Nie ulega wątpliwości, że dorobek przedstawiony przez doktorantkę jest imponujący. Już samych pięć prac w impaktowanych czasopismach, które stanowią podstawę rozprawy, jest co najmniej przyzwoitym wynikiem. Magister Lidia Gaffke jest jednak także współautorem imponującej liczby

siedemnastu innych prac opublikowanych w czasopiśmie i współautorem monografii książkowej. Doktorantka kierowała również dwoma projektami finansowanymi przez Uniwersytet Gdański w ramach wsparcia prac młodych naukowców i co bardziej istotne, była kierownikiem projektu Preludium, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Zestaw prac stanowiących podstawę rozprawy jest zaiste imponujący. Cztery prace z pierwszym autorstwem doktorantki, wszystkie w przyzwoitych czasopiśmie międzynarodowych, pochodzą z ostatnich trzech lat. Tym bardziej godny zauważenia jest fakt, że zostały one już zacytowane dwadzieścia osiem razy! Zestaw otwierają dwie prace przeglądowe, stanowiące doskonały wstęp do tematu. Pierwsza z nich, „How close are we to therapies for Sanfilippo disease?” opublikowana w *Metabolic Brain Disease* w roku 2018, IF 2,726 (18 cytowań), skupia się na analizie problemów pojawiających się podczas prób leczenia zespołu Sanfilippo, jednej z lizosomalnych chorób spichrzeniowych o podłożu genetycznym, której towarzyszy gromadzenie się siarczanu heparanu w lizosomach. Choroba ma poważne objawy neurologiczne i psychiatryczne, wskazujące na postępujące uszkodzenie centralnego układu nerwowego. Pierwsze objawy pojawiają się między drugim a szóstym rokiem życia a większość pacjentów umiera przed dwudziestym rokiem życia. Magister Lidia Gaffke przedstawia aktualny stan prac nad próbami ulżenia pacjentom dotkniętym zespołem Sanfilippo. Dzieli je systematycznie na typy i po kolei opisuje zarówno zasady testowanych terapii jak i problemy powstające przy ich wdrażaniu. Jako, że zespół Sanfilippo dotyka centralny ośrodek nerwowy, wiele terapii, skutecznych w innych lizosomalnych chorobach spichrzeniowych zawodzi. Dzieje się tak ze względu na istnienie bariery krew-mózg, utrudniającej docieranie leków do dotkniętych chorobą komórek. Doktorantka wychodzi od powszechnego założenia, że przyczyną choroby jest gromadzenie się siarczanu heparanu w lizosomach dotkniętych nią komórek i po kolei opisuje stosowane dziś podejścia terapeutyczne. Terapia polegająca na dostarczeniu wadliwego enzymu trawiącego siarczan heparanu okazuje się nieskuteczna ze względu na słabe przenikanie białek z krwi do mózgu. Doktorantka opisuje tu próby takiej modyfikacji cząsteczek enzymów by były one przez tę barierę przepuszczane. Podobny problem trapi będące na wczesnym etapie rozwoju próby zastosowania terapii genowych: nawet gdyby udało się rozwiązać problemy z przywróceniem ekspresji prawidłowych enzymów w komórkach pacjentów, to bardzo trudno dotrzeć z taką terapią do komórek położonych wewnątrz centralnego układu nerwowego a próby podawania wirusów niosących prawidłowe geny do płynu mózgowo-rdzeniowego wydają się nieskuteczne. Doktorantka omawia również próby terapii polegającej na zmniejszeniu stężenia substratu wadliwego enzymu. Jako, że zastosowanie siRNA powodującego zmniejszenie stężenia glikozaminoglikanów wydaje się obiecujące w innych chorobach spichrzeniowych, podobną strategię podjęto w przypadku choroby Sanfilippo, niestety bez powodzenia. Doktorantka dość szeroko opisuje próby użycia genisteiny, izoflawonu z ziaren soi, który jak zaobserwowano, obniża poziom glikozaminoglikanów. Doktorantka powołuje się tu na trwające badanie kliniczne, które w międzyczasie się zakończyło dość zaskakującym wynikiem: poziom siarczanu heparanu w płynie mózgowo-rdzeniowym rósł zamiast spadać a wynik był znaczący statystycznie. Nasuwa się tu pytanie, czy próby hamowania syntezy glikozaminoglikanów

są obojętne dla innych funkcji organizmu i nie powodują prób kompensacji. Na zakończenie przeglądu podejść terapeutycznych, magister Lidia Gaffke dochodzi do konstatacji, że nawet ograniczenie gromadzenia się siarczanu heparanu w lizosomach ma tylko częściowy skutek i nie zapobiega rozwojowi choroby, co prowadzi ją logicznie do drugiej pracy przeglądowej, zatytułowanej „Changes in cellular processes occurring in mucopolysaccharidoses as underestimated pathomechanisms of these diseases” i opublikowanej w *Cell Biology International* w roku 2019, IF 2,571 (5 cytowań). To mini-review stanowi przegląd procesów subkomórkowych, które ulegają zakłóceniu w rozwoju mukopolisacharydoz. Obserwowane zmiany wybiegają daleko poza funkcje lizosomów i doktorantka oraz współautorzy stwierdzają, na podstawie gruntownego przeglądu literatury, że choroby te „powodują znacznie szersze spektrum defektów niż dotychczas przypuszczano”. Cytowane prace opisują zakłócenia struktury cytoszkieletu i transportu pęcherzykowego, zmiany w cyklu komórkowym, upośledzoną funkcję i strukturę mitochondriów, zmiany spoczynkowego stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie i siateczce śródplazmatycznej a także znaczną utratę zdolności do autofagii. Wszystkie te zmiany wykraczają dalece poza proste skutki gromadzenia się złogów w lizosomach. W takiej sytuacji doktorantka podjęła próbę analizy porównawczej ekspresji genów w komórkach fibroblastów pochodzących od chorych na mukopolisacharyd ozy i efektem tego projektu są kolejne trzy prace doświadczalne, oparte o sekwencje RNA z fibroblastów pacjentów chorych na mukopolisacharyd ozy, zdeponowane w Sequence Read Archive (SRA) prowadzonej przez NCBI pod sygnaturą PRJNA562649. Zestaw danych zawiera sekwencje transkryptomu dla jednej linii fibroblastów pobranej od pacjenta z każdej spośród grup na które dzieli się klinicznie mukopolisacharyd ozy (I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IVA, IVB, VI, VII i IX) oraz fibroblastów zdrowego człowieka jako referencję.

Pierwszą z nich jest praca pod tytułem „Underestimated Aspect of Mucopolysaccharidosis Pathogenesis: Global Changes in Cellular Processes Revealed by Transcriptomic Studies”, opublikowana w bieżącym roku w *International Journal Of Molecular Sciences*, IF 4,556 (4 cytowania). Zawiera ona bardzo szeroką analizę pozyskanych danych, pogrupowanych w kategoriach Gene Ontology. Praca została poświęcona kategorii GO „Procesy komórkowe”. Dla każdego genu, analizowanego w czterech powtórzeniach biologicznych sprawdzano istotność statystyczną różnicy poziomu transkryptu w stosunku do fibroblastów kontrolnych. Do dalszej analizy wyselekcjonowano te geny, których ekspresję uznano za istotnie zmienioną. Grupy genów z wyraźnie zmienioną ekspresją korelują z opisanymi w pracach przeglądowych defektami funkcjonowania komórek. Istotny też jest fakt, że nawet jeśli w danej grupie choroba dotyczy właściwie wyłącznie centralnego układu nerwowego, to efekty są wyraźnie widoczne w transkryptomie fibroblastów. Wśród szczególnie silnie dotkniętych genów jest tu gen kodujący łańcuch α kolagenu typu VIII. Swoją drogą ciekawe jest, dlaczego na krótkiej liście genów, których ekspresję doktorantka zdecydowała się dodatkowo sprawdzić metodą Real-time PCR gen kodujący łańcuch α kolagenu typu V. Kontynuacją tej pracy jest drugi artykuł, zatytułowany „Changes in expressions of genes involved in the regulation of cellular processes in mucopolysaccharidoses as assessed by fibroblast culture-based transcriptomic analyses”, opublikowany w tym samym roku w

Metabolic Brain Disease, IF 2,726 (1 cytowanie). Praca jest podobna do poprzedniej, poświęcona jest jednak innej kategorii Gene Ontology a mianowicie „Regulacji Procesów Komórkowych”. Obserwowane zmiany są bardzo podobne do tych, opisanych w poprzedniej pracy. Wśród genów szczególnie zmieniających swą ekspresję pod wpływem choroby znajdują się tu niezwykle ważne regulatory aktywności komórki. Z mojego punktu widzenia niezwykle interesującym genem jest ten kodujący fosfolipazę C, enzym odpowiedzialny za powstawanie trisfosforanu inozytoli, wtórnego przekaźnika wywołującego wyrzut wapnia z siateczki śródplazmatycznej. Trudne wydarzenia bieżącego roku skłoniły doktorantkę i jej współpracowników do sięgnięcia po zgromadzone dane transkryptomyczne i wykonania jeszcze jednej kwerendy baz danych. Autorzy publikacji “Transcriptomic analyses suggest that mucopolysaccharidosis patients may be less susceptible to COVID-19”, opublikowanej latem tego roku w FEBS Letters, IF 3,057, przeprowadzili analizę transkrypcji genów istotnych do namnażania się wirusów SARS-CoV-2. Autorzy posłużyli się tu mapą interakcji pomiędzy białkami człowieka a SARS-CoV-2 opublikowaną przez Gordona *et al.* w Nature w bieżącym roku. Wnioski wynikające z analizy są obiecujące i wskazują na zmniejszenie ekspresji większości z tych genów u chorych na mukopolisacharydozy. Takie wyniki sugerują, że mukopolisacharydozy nie należą do chorób towarzyszących, zwiększających ryzyko przy zakażeniu COVID-19.

Przedstawione prace pokazują bardzo głębokie zmiany w biologii komórek organizmów dotkniętych mukopolisacharydozami. Zmiany, które trudno będzie sprowadzić do prostego skutku powstawania złogów we frakcji lizosomalnej komórki. To jest bardzo poważny wniosek jak na rezultat pracy doktorskiej, mającej wszakże na celu zdobycie umiejętności samodzielnej pracy naukowej. Nie pomniejszając znaczenia i jakości przedstawionej mi rozprawy, chciałbym korzystając z wyjątkowych uprawnień recenzenta, zadać doktorantce kilka pytań, istotnych moim zdaniem dla przedstawionej rozprawy. Po pierwsze, dla samego zespołu Sanfilippo, znamy ponad 350 mutacji powodujących rozwój choroby. Doktorantka w pracach transkryptomicznych przyznaje, że decyzja o badaniu tylko jednej linii fibroblastów dla każdego z typów systematycznych mukopolisacharydoz była kompromisem. Nasuwa się jednak pytanie, jakie były kryteria wyboru tych konkretnych mutacji jako materiału porównawczego? Po drugie, nawet jeśli w przypadku wielu mukopolisacharydoz, terapie polegające na podaniu aktywnego enzymu stanowią problem, to nie powinno to mieć miejsca w przypadku hodowli fibroblastów. Tu nasuwa się kolejne pytanie, czy takie fibroblasty miałyby równie zmieniony krajobraz transkrypcyjny jak komórki chore? Po trzecie wreszcie, doktorantka wzbudziła moją ciekawość wzmianką o badaniach klinicznych z użyciem genisteiny jako środka obniżającego dostępność glikoaminoglikanów. Wzmianka ta pozostała bez ciągu dalszego, niemniej jednak nie spowodowało to zawieszenia badań i ich wyniki pojawiły się w bazie danych Europejskiej Agencji Leków, cytowanej przez doktorantkę. Poziom siarczanu heparanu w płynie mózgowo-rdzeniowym systematycznie i istotnie statystycznie rósł pod wpływem genisteiny. To niespodziewany wynik, wart chyba co najmniej krótkiego komentarza. Wszystkie te pytania nie umniejszają w najmniejszym stopniu oceny



przedstawionej mi rozprawy, którą uważam za doskonałą i wynikają raczej z wrodzonej wszystkim naukowcom ciekawości niż z potrzeby zaznaczenia słabych stron rozprawy doktorskiej.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.). Mam zatem zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie magister Lidii Gaffke do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę charakter i jakość przedstawionej mi rozprawy, wnoszę o jej wyróżnienie przez Radę.

Warszawa 22. 11. 2020