



Dr hab. Róża Kucharczyk  
Pracownia Bioenergetyki  
i Mechanizmów Chorób Mitochondrialnych

Warszawa 16.02.2023

## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr **Katarzyny Anny Chabros**

pt. „**Patogenność mutacji w genie *GDAP1***”, wykonanej pod kierunkiem naukowym Pana prof. dr hab. n. med. Andrzeja Kocharńskiego i Pani promotora pomocniczej dr hab. n. med. Dagmary Kabzińskiej w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego (IMDiK) PAN w Warszawie.

Celem pracy była charakterystyka „tła genetycznego” towarzyszącego głównym patogennym wariantom sekwencji genu *GDAP1* u pacjentów będących pod opieką Zespołu Chorób Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN, identyfikacja zaburzeń molekularnych i komórkowych wywołanych przez mutacje genu *GDAP1* w modelu *in vitro* choroby CMT-GDAP1 opartego na komórkach ludzkich HeLa oraz SH-SY5Y, a także ocena patogenności wariantów sekwencji genu *GDAP1*.

CMT to neurodegeneracyjna choroba rzadka, jednak występująca ze znaczną częstością szacowaną na 1/7000-1/5000 urodzeń. Jak większość chorób neurodegeneracyjnych mechanizm jej nie jest znany i jest to choroba nieuleczalna. Problem podjęty przez Doktorantkę jest bardzo ważny ale też ciekawy poznawczo, bo bez wątplenia podłoża chorób neurodegeneracyjnych są szerokie i długo nie będziemy potrafili ich zrozumieć. Dodatkowo choroby neurodegeneracyjne stanowią duże obciążenie dla pacjentów, ich rodzin oraz społeczeństwa.

### Ocena merytoryczna

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej opiera się przede wszystkim na ocenie wyników uzyskanych przez Doktorantkę oraz sposobu ich prezentacji i interpretacji w świetle dostępnych danych literaturowych. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska (licząca 139 stron) ma postać monografii o układzie typowym dla opracowań przygotowywanych na podstawie badań eksperymentalnych z podziałem na odpowiednie rozdziały: Wstęp (15 stron), Cel Pracy, Materiały i Metody (21 stron), Wyniki (45 stron), Dyskusja (17 stron), Wnioski, Suplement (6 stron), 5 tabel, i Spis piśmiennictwa - 118 pozycji. Rozprawę poprzedzają: i) informacje na temat finansowania badań oraz publikacji Doktorantki; ii) spis treści; iii) wykaz stosowanych w pracy skrótów; vi) streszczenie napisane w języku polskim oraz angielskim, zawierające cel pracy, zrealizowane zadania badawcze i wnioski. Rozprawa zawiera 30 rycin (3 ryciny w rozdziale „Wstęp”, 1 w rozdziale „Materiały i Metody”, 26 rycin w rozdziale „Wyniki”) oraz 10 tabel (1 w rozdziale „Wstęp”, 8 w rozdziale „Materiały i Metody” i 1 w rozdziale „Wyniki”).

**Wstęp** obejmuje 15 stron i wprowadza czytelnika w zagadnienie, którego dotyczy rozprawa doktorska wraz z uzasadnieniem potrzeby jego podjęcia. W oparciu o stosowną względem tematyki literaturę, Doktorantka scharakteryzowała polineuropatie, opisała typy chorób kręgu Charcot-Marie-Tooth i stan badań mających na celu opracowanie terapii. Bardziej szczegółowo opisane zostały choroby CMT spowodowane mutacjami w genie *GDAP1* oraz wiedza na temat funkcji tego białka. Bardzo pomocnym podsumowaniem informacji w pierwszym rozdziale wstępu byłaby tabela, która zebrałaby typy chorób CMT, różnice fenotypowe - jeśli są - czy cechy które doprowadziły do ich rozróżnienia i podłoża genetyczne - jakie mutacje w jakich genach są podłożem danego typu CMT. Na stronie 23 - zabrakło informacji jaka jest funkcja genu / produktu białkowego *JPH1*.

Badania prowadzone przez Panią mgr Katarzynę Chabros skupiły się na patogenezie choroby CMT spowodowanej mutacjami w genie *GDAP1*, w szczególności identyfikacji wariantów w innych genach u pacjentów oraz identyfikacji zaburzeń w komórce na skutek sześciu wariantów genu *GDAP1* na modelach komórkowych. Cel ten uważam za ważny poznawczo, gdyż zrozumienie mechanizmów choroby na poziomie molekularnym jest podstawową wiedzą pozwalającą na opracowanie skutecznej terapii w przyszłości. Praca ma na celu rozwiązanie istotnego problemu naukowego, co stanowi istotne wymaganie stawiane kandydatom do stopnia doktora.

Rozdział **Materiały** obejmuje szczegółowe informacje dotyczące pacjentów wraz z historią rodzinną, zastosowanych linii komórkowych, szczepów bakterii, opisy konstrukcji plazmidów, które powstały podczas realizacji pracy i stanowiły materiał niezbędny do realizacji zaplanowanych zadań badawczych. Znalazły się tu również informacje dotyczące użytych starterów, podłoży do hodowli bakterii oraz linii komórkowych a także wykaz przeciwciał. W rozdziale **Metody** zawarty został opis metod zastosowanych do realizacji zadań badawczych stanowiących podstawę niniejszej rozprawy, obejmujących obok rutynowych metod biologii molekularnej w pracy z bakteriami i liniami komórkowymi, opis technik mikroskopii elektronowej, sekwencjonowania, analizy informatycznej sekwencji i podejścia zastosowanego do opracowania skali genotypowej i fenotypowej CMT-GDAP1. Poszczególne metody zostały opisane z uwzględnieniem wielu istotnych szczegółów dotyczących stężeń użytych komponentów czy też zastosowanych warunków. Warsztat metodyczny Doktorantki jest typowy dla pracy eksperymentalnej na modelach komórkowych.

Część doświadczalna pracy została przez Doktorantkę przedstawiona w rozdziale **Wyniki**, gdzie omówione zostały poszczególne doświadczenia, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej. W rozdziale tym Doktorantka opisała kolejne etapy realizowanych badań dzieląc rozdział Wyniki na 12 podrozdziałów. Rezultaty eksperymentów zostały zaprezentowane na 26 starannie przygotowanych i dobrze opisanych rycinach. Każdy z rozdziałów został poprzedzony krótkim wprowadzeniem uzasadniającym celowość podejmowanych działań. Większość podrozdziałów zawiera krótką konkluzję, nawiązującą jednocześnie do kolejnego etapu badań, co daje odczucie dobrze zaplanowanego i logicznego ciągu badań. Wyniki zawierają analizę wariantów sekwencji genomu pacjentów i ich korelacji z fenotypami pacjentów. Następnie na modelach komórkowych dla sześciu wybranych wariantów genu *GDAP1* Doktorantka zbadała morfologię komórek, mitochondriów i Aparatu Golgiego, poziomu białka GDAP1 oraz zmiany w modyfikacjach i lokalizacji białka Aparatu Golgiego TGN46. W ostatniej części pracy, na dwóch liniach komórkowych, doktorantka zbadała poziom wybranych białek mitochondrialnych, w szczególności tych związanych z apoptozą, ich wzajemny stosunek, poziom cytochromu c we frakcji cytozolowej i mitochondrialnej oraz kaspazy 3 i wreszcie przeżywalność linii komórkowych wyrażających warianty GDAP1. Analiza ostatecznie pozwoliła stwierdzić, że niektóre warianty GDAP1 wpływają w sposób istotny statystycznie na żywotność komórek, ale ten fenotyp nie koreluje ze zmianami w poziomie czy wzajemnym stosunku markerów apoptozy.

Uzyskane wyniki zostały podsumowane i skonfrontowane z aktualnymi danymi literaturowymi w rozdziale **Dyskusja**. Cytowana w pracy bibliografia jest bardzo obszerna i obejmuje w większości prace z ostatnich kilkunastu lat. Choć zakres zaprezentowanych w pracy wyników nie jest szeroki, dyskusja jest obszerna i w moim odczuciu odnosi się drobiazgowo do wielu zagadnień, będących aktualnie tematem dyskusji w środowisku badaczy badających chorobę CMT. Dyskusja pokazuje doskonałą znajomość tematyki badawczej przez Doktorantkę. Doktorantka wykazuje się również umiejętnością krytycznego podejścia do własnych wyników, wskazując niekiedy ich niejednoznaczność, co uważam za przejaw dojrzałości naukowej. Uwaga jaką chciałabym zaznaczyć odnośnie tej części rozprawy to brak w dyskusji odwołania się do Tabeli 1 ze Wstępu, gdzie ujęte są warianty w genach towarzyszące głównym mutacjom CMT, jakie już były opisane w literaturze. Właściwie wszystkie z nich znajdują się na liście w Tabeli S5, a zatem w grupie badanych pacjentów, dodatkowo są zidentyfikowane nowe geny. Warto byłoby takie porównanie zamieścić w pracy. Dyskusję kończy krótkie podsumowanie prezentujące najważniejsze wyniki przedstawione w rozprawie. W odrębnym rozdziale Doktorantka ujęła wnioski ze swoich eksperymentów, z którymi się zasadniczo zgadzam, ale uważam, że mogłyby znaleźć się na tej liście jeden dodatkowy wniosek, a mianowicie zaobserwowana korelacja pomiędzy zmianami w morfologii komórek a zmianami w poziomie GDAP1 i BCL2 oraz dojrzewaniem TGN46.

Uzupełnienie pracy stanowi suplement w którym w postaci pięciu tabel zaprezentowano listy genów, w których zidentyfikowano warianty dzieląc je według tego jakiej mutacji *GDAP1* towarzyszyły.

Rozprawa doktorska napisana jest jasno i poprawnie pod względem językowym z dbałością o stosowanie odpowiedniej terminologii naukowej. Znalazły się w niej jedynie pojedyncze drobne niedociągnięcia edytorskie, np.: strona 33 Tabela 2 i Rycina 4 - brak korelacji nazewnictwa pacjentów z rodziny 1 i rodziny 2; strona 49 - 2M - skrót nie wyjaśniony; strona 54 - nowe warianty określono jako „geny CMT”, co jest mylące gdyż z automatu czytelnik myśli o wcześniej wspomnianych we wstępie w Tabeli 1 genach, w których mutacje przypisano do różnych form CMT. Tymczasem Autorka ma tu na myśli nowe zidentyfikowane w wyniku jej pracy warianty, które zakwalifikowała do genów CMT; czy wreszcie strona 62 - drobny błąd stylistyczny, który utrudnia zrozumienie zdania „Obniżenie poziomu GDAP1 nadal można było obserwować, chociaż niższe 48 godzin po transfekcji.”

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka kwestii, względem których prosiłabym Doktorantkę o odniesienie się podczas obrony:

1. Częstość występowania CMT to 1/7000 - 1/5000 urodzeń. Zastanawiam się nad grupą pacjentów - 14 to wydaje się niewielu, ale biorąc pod uwagę, że to pacjenci cierpiący na jeden typ CMT - GDAP1 zależny to taka liczba może być znacząca. Jaka jest częstość występowania CMT-GDAP1, ilu szacuje się pacjentów w Polsce, Europie i na świecie?
2. U żadnego z pacjentów nie było wariantu Gly327Asp. Dlaczego ten wariant został włączony do badań? Brak informacji (albo mi ona umknęła) i/lub referencji, z której wynikałoby na jakiej podstawie ten wariant został włączony do badań.
3. Czy określenie „geny CMT” nie jest przedwczesnym wnioskiem? Może to być tło genetyczne zaostrzające przebieg choroby, ale nie warianty, które ją wywołują, tak jak nazwa „geny CMT” sugeruje. Pytanie wiąże się z wcześniejszą uwagą do dyskusji, gdzie zabrakło porównania jakie geny już były wcześniej znalezione u pacjentów CMT, jako towarzyszące. Moja analiza pokazała, że prawie wszystkie geny z Tabeli 1 są obecne w Tabeli S5, ale jest spora liczba nowych genów w grupie badanych pacjentów.
4. Mam uwagę do Ryciny 9. Nie widoczne są różnice, które Autorka opisuje, warto byłoby dodać strzałki i powiększenia określonych fragmentów zdjęć, by czytelnik mógł sam te różnice zobaczyć - szczególnie na panelu D, na którym autorka opisuje wygląd Aparatu Golgiego.
5. Strona 68, Rycina 13 - prosiłabym o objaśnienie form TGN46 podczas obrony, gdyż zdjęcie żelu i opis wielkości poszczególnych prążków nie pokrywa się z tekstem gdzie forma dojrzała ma ponad 110 kDa a tymczasem wydaje się z opisu jej obecności w poszczególnych liniach wyrażających warianty GDAP1, że mowa jest o formie migrującej pomiędzy 70 a 100 kDa. Jakie formy migrujące w okolicach 55 kDa rozpoznaje to przeciwciało?
6. Ryciny od 11 wzwyż - czy użyto kontrolę ilości nałożonego białka? Na żadnej rycinie pokazującej poziomy białek na żelu nie zostały pokazane kontrolne bloty z kontrolą nałożenia - białkiem typu „house-keeping” – z wyjątkiem Rycina 23, gdzie pokazano barwienie ponceau, które nie jest najlepszym sposobem na normalizację ilości białek.
7. Bardzo wiele markerów apoptozy i cech komórek zostało zbadanych. Wydaje się brak pomiędzy nimi jakichkolwiek korelacji. Tabela zbiorcza podsumowująca wyniki byłaby tu pożądana - łatwiej byłoby takiej korelacji szukać lub ją wykluczyć.
8. W tabeli S5 są geny *MT-RYR1*, *MT-RYR2*, *MT-TM*, *MT-TL1*. Czy to pomyłka? Nie ma takich genów w mtDNA u człowieka.
9. Strona 101: Fragment tekstu: „W przeciwieństwie do Rodziny 9, w Rodzinie 8, pacjentka charakteryzująca się najcięższym fenotypem, oprócz złożonej mutacji heterozygotycznej w genie *GDAP1* c.715C>T, p.Leu239Phe/c.664G>A, p.Glu222Lys posiada dodatkowo pięć wariantów sekwencji w genach (*DST*, *IGHMBP2*, *SPG11*, *PRX*, i *PRNP*) zaangażowanych w patogenezę CMT. Jeden z nich jest określany, jako łagodny, trzy, jako prawdopodobnie łagodne i jeden wariant o nieokreślonej patogenności.” Podobnie w przypadku „(*DCTN1*, *SACS*, *CTDP1*, *SBF1*, *ARHGEF10*, *FBXO38*), z których trzy są prawdopodobnie łagodne, dwa o nieokreślonej patogenności, a jeden w przypadku którego w bazach danych opisana jest niezgodność statusu patogenności wariantu”. Pytanie to tego fragmentu tekstu: Na jakiej podstawie określono charakter tych wariantów - proszę o uzupełnienie tej informacji?
10. Mam wrażenie, że modele komórkowe ze względu na ich neoplastyczne pochodzenie nie są właściwe - dają sprzeczne wyniki i mogą się one mieć nijak do normalnych komórek. Czy były prowadzone jakiegokolwiek badania na komórkach pacjentów CMT-GDAP1 i są opublikowane ich wyniki?
11. Wydaje mi się, że w przypadku dysfunkcji białka GDAP1, jako podłoża CMT, podstawą jest poznanie funkcji biologicznej tego białka. Rozumiem, że celem pracy było poszukiwanie markerów choroby, ale czy nie myślała pani o zbadaniu bioenergetyki mitochondriów, wiedząc, że GDAP1 jest białkiem mitochondrialnym, struktura sieci jest zmieniona w różnych wariantach tego białka a warianty w *MT-ATP6* są powiązane z CMT. To mogłoby dać ideę na temat funkcji białka GDAP1.
12. Czy przyczyną CMT są mutacje w mtDNA lub czy fenotyp CMT związany z mutacjami w określonych genach jądrowych jest zależny od wariantów mtDNA? Czy znane są przypadki, kiedy u chorych występują zmiany w jądrowym i mitochondrialnym DNA?

Podsumowując, problem badawczy jakim zajmowała się Doktorantka jest bardzo ważny dla społeczeństwa ale też ze względów czysto poznawczych. Wyniki badań stanowiące podstawę przedłożonej przez Doktorantkę rozprawy, stanowią istotny wkład w budowanie wiedzy na temat patogenezę chorób CMT-GDAP1. Moja ocena rozprawy doktorskiej, z którą miałam przyjemność się zapoznać jest zdecydowanie pozytywna.

## WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam wysoko. Pani mgr Katarzyna Anna Chabros wykazała się dużą wiedzą z zakresu tematyki prowadzonych badań, umiejętnością planowania i wykonywania doświadczeń oraz formułowania wniosków i ich dyskusji, co jest niezbędne u dojrzałych naukowo badaczy.

Rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 3 ust. Ustawy z dnia 4 marca 2003 r, o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami. Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Anny Chabros do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Róża Kucharczyk,  
*Kierownik pracowni*