



prof. dr hab. Artur Jarmołowski  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Instytut Biologii Molek i Biotechnologii  
Zakład Ekspresji Genów  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań  
e-mail: [artjarmo@amu.edu.pl](mailto:artjarmo@amu.edu.pl)  
tel. 61 529 5959

Poznań, 19. 07. 2021

**Ocena pracy doktorskiej mgr Kaliny Katarzyny Wiatr pt. „Poszukiwanie nowych mechanizmów neurodegeneracji w czasie rozwoju ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 w mysim modelu knock-in SCA3 Ki91”**

**Ocena formalna**

Ekspertyzy, na podstawie których została przygotowana oceniana rozprawa doktorska zostały wykonane w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Macieja Figla – promotora przedłożonej pracy doktorskiej. Rozprawa została przygotowana na podstawie dwóch artykułów naukowych opublikowanych w *Molecular Neurobiology* i *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Są to czasopisma o ustalonej renomie, publikujące recenzowane prace opisujące wartościowe wyniki naukowe. Magister Kalina Wiatr jest pierwszym autorem obu artykułów wchodzących w skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Z dołączonych do pracy oświadczeń Doktorantki i promotora rozprawy wynika, że mgr Kalina Wiatr miała znaczący udział nie tylko w projektowaniu i wykonaniu opisanych w obu artykułach doświadczeń, ale również w interpretacji uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu obu manuskryptów do druku. Opublikowane prace stanowiące najważniejszą część rozprawy są spójne tematycznie i w pełni odpowiadają jej tytułowi.

Do artykułów naukowych wchodzących w skład ocenianej rozprawy mgr Kalina Wiatr dołączyła rozdział zatytułowany Wprowadzenie, w którym omówiła aktualny stan wiedzy na temat molekularnych podstaw ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (w skrócie SCA3), a także porównała modele zwierzęce stosowane w badaniach nad patogenezą tej choroby. Ten interesujący przegląd został oparty na najnowszej literaturze naukowej. Doktorantka umiejętnie dobrała omawiane artykuły naukowe, dyskutując różne hipotezy dotyczące przyczyn obumierania neuronów w SCA3. Z kolei przy omawianiu zwierzęcych modeli tej choroby, dobrze wypunktowała zalety mysich modeli typu knock-in, w tym modelu który wykorzystywała w swojej pracy doktorskiej.

Po tym interesującym wprowadzeniu w tematykę rozprawy mgr Kalina Wiatr przedstawiła cele swojej pracy. Głównym celem podjętych badań było poznanie mechanizmów prowadzących do rozwoju ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Ten główny cel został



podzielony na pięć precyzyjnie określonych zadań badawczych, które Autorka nazwała szczegółowymi celami pracy doktorskiej. Zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe zostały jasno sprecyzowane, a wyniki przedstawione w dwóch artykułach stanowiących podstawę ocenianej rozprawy powstały w trakcie realizacji zaplanowanych zadań badawczych.

Do pracy dołączono także zwięzłe omówienie obu artykułów wchodzących w skład rozprawy, uzupełnione o interpretację zawartych w nich wyników w świetle danych uzyskanych i opublikowanych przez innych autorów. Omówienie artykułów kończy rozdział Podsumowanie i perspektywy, w którym mgr Kalina Wiatr przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej. Mówiąc bardzo ogólnie, najważniejszymi osiągnięciami Doktorantki jest charakterystyka mysiego modelu SCA3 Ki91 zarówno pod względem molekularnym, jak i również behawioralnym, a także zaproponowanie oryginalnego modelu patomechanizmu SCA3 opartego o defekt transportu pęcherzyków i mitochondriów w aksonach. Chciałbym zwrócić również uwagę, że przedstawione w pracy wyniki pozwoliły na wytyczenie nowych kierunków badań molekularnych przyczyn ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, co najlepiej świadczy o randze uzyskanych wyników oraz o ich znaczeniu dla przyszłych badań nad molekularnymi podstawami procesów neurodegeneracyjnych.

Do części poprzedzającej artykuły naukowe dodano także obszerną literaturę naukową, na podstawie której Doktorantka przygotowała zaprezentowane omówienie wyników zawartych w opublikowanych pracach stanowiących podstawę pracy doktorskiej mgr Kaliny Wiatr. Do przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej dołączona także streszczenie przygotowane w języku polskim i angielskim, oba zbyt długie i przegadane.

Stwierdzam, że rozprawa przygotowana przez mgr Kalinę Wiatr spełnia formalnie wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim. Do rozprawy dołączono oświadczenia, w którym promotor rozprawy, a jednocześnie autor korespondencyjny wykorzystanych przez Doktorantkę artykułów naukowych, dokładnie opisuje udział Doktorantki w przygotowaniu manuskryptów. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że wkład Doktorantki w przygotowaniu obu prac do druku był znaczący i w pełni uzasadnione jest, aby mgr Kalina Wiatr doktoryzowała się na podstawie tych dwóch artykułów. Obie opublikowane prace ukazały się w znanych czasopismach, których redakcje akceptują prace na podstawie recenzji przygotowanych przez pracujących w podobnym temacie naukowców. Zarówno temat rozprawy, jak i jej cele mają charakter nowatorski, co również jest ważnym wymogiem stawianym przed rozprawami doktorskimi.

### Ocena merytoryczna

1. Wiatr K, Piasecki P, Marczak Ł, Wojciechowski P, Kurkowiak M, Płoski R, Rydzanicz M, Handschuh L, Jungverdorben J, Brüstle O, Figlerowicz M, Figiel M. (2019). **Altered Levels of Proteins and Phosphoproteins, in the Absence of Early Causative Transcriptional Changes, Shape the Molecular Pathogenesis in the Brain of Young Presymptomatic Ki91 SCA3/MJD Mouse.** *Mol Neurobiol.* 56(12): 8168-8202.

Pierwsza praca, która wchodzi w skład ocenianej rozprawy dotyczy charakterystyki zmian obserwowanych na poziomie molekularnym u myszy modelu SCA3 Ki91, ale



monitorowanych na etapie przed pojawieniem się pierwszych symptomów choroby. Przed przystąpieniem do właściwych eksperymentów mgr Kalina Wiatr przygotowała grupę 18 homozygotycznych myszy Ki91 oraz grupę 18 myszy kontrolnych bez zmodyfikowanego genu *Atxn3*. Obie kohorty pochodziły z krzyżowanych ze sobą osobników heterozygotycznych SCA3 Ki91. Korzystając z tych dwóch grup zwierząt, Doktorantka wykonała następnie szereg testów behawioralnych, w których badała parametry motoryczne oraz koordynację ruchową myszy kontrolnych i badanych. Wykazała, że dwumiesięczne zwierzęta Ki91 nie wykazują jeszcze żadnych objawów choroby, zarówno ich waga, jak i zachowanie nie odbiega od zwierząt kontrolnych. Jednak w mózdku i korze mózgowej dwumiesięcznych zwierząt Ki91 zaobserwowano już procesy, które świadczą o rozpoczęciu procesów patologicznych, np. zauważono agregaty ataksyny 3, ale tylko w niewielkiej jeszcze liczbie jąder komórkowych. Wykonane analizy transkryptomyczne nie wykazały jednak u myszy dwumiesięcznych istotnych zmian między mózdkiem i korą pierwotną myszy kontrolnych i Ki91. Zmiany takie zaobserwowano dopiero u myszy 10- i 14-miesięcznych. Co więcej, część takich samych zmian potwierdzono w neuronach zróżnicowanych z komórek pobranych od pacjentów chorujących na ataksję rdzeniowo-mózdkową typu 3. Postanowiono jednak sprawdzić, czy u zwierząt 2-miesięcznych widoczne będą jakieś zmiany na poziomie białka. Zastosowano do tego spektrometrię mas, którą wykorzystano do globalnych analiz proteomów tych samych co poprzednio rejonów mózgu. Doktorantka zbadała nie tylko jakie i ile białek znajduje się w mózdku i korze mózgowej, ale również przeanalizowała ich fosforylację. Analizy te dały listę 93 białek zmienionych w mózdku i 133 w korze mózgowej, natomiast różnice w fosforylacji zidentyfikowano w grupie 83 białek w mózdku i 335 białek w korze mózgowej. Większość ze zidentyfikowanych zmian fosfoproteomu polegała na obniżonej fosforylacji białek w Ki91 w porównaniu do myszy z grupy kontrolnej. Magister Kalina Wiatr zidentyfikowała kinazę PAK1, jako enzym o obniżonym stopniu ufosforylowania zarówno w mózdku, jak i w korze mózgowej. Ciekawe, że miejsce fosforylacji jest różne, Ser 223 w przypadku mózdku i Ser 174 w korze mózgowej. O ile w pracy wyczytałem, że fosforylacja Ser 223 jest wprowadzana przez kinazę CSNK2Ai, która oddziałuje z ataksyną 3, to nie znalazłem żadnej informacji na temat roli fosforylacji Ser 174. Czy znana jest kinaza wprowadzająca tę modyfikację? Na podstawie informacji o kinazie PAK1 oraz zmianach aktywności enzymów związanych z PAK1 mgr Kalina Wiatr zasugerowała, że PAK1 i ścieżki sygnałowe, w których działa ta kinaza mogą być funkcjonalnie powiązane z patogenezą SCA3. Co ciekawe, Doktorantka obserwowała zmieniony poziom fosforylacji w mózgu zwierząt Ki91 również w przypadku innych kinaz, wiele z nich ma dobrze opisane funkcje związane z rozwojem i działaniem komórek nerwowych. Część z nich, co wiemy z literatury, oddziałuje z ataksyną 3, co jeszcze bardziej uprawdopodobnia hipotezę o roli kinaz i fosforylacji w rozwoju ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Dla wybranych białek porównano ich poziom w mózdku i korze mózgowej zwierząt kontrolnych i myszy Ki91. Globalne dane proteomiczne poddano wnikliwej analizie bioinformatycznej i na jej podstawie wyodrębniono 3 grupy procesów, w które zaangażowane są białka o zmienionym poziomie w mózgu zwierząt Ki91. Były to białka należące do: (1) czynników zaangażowanych w naprawę DNA oraz modulujących



poziom białek w komórce, (2) czynników związanych z organelami i innymi strukturami w neuronie, takimi jak pęcherzyki, cytoszkielet, aksony i dendryty, (3) czynników powiązane z zaburzonymi funkcjami neuronu, w tym metabolizmem energetycznym i transportem pęcherzyków. Co ciekawe, niektóre z tych białek zostały wcześniej opisane jako partnerzy ataksyny 3. Uzyskane wyniki wskazały na apoptozę i mitofagię jako na dwa procesy, których zaburzenie indukuje degenerację neuronów obserwowaną w SCA3. Na szczególne podkreślenie zasługuje bionformatyczna analiza otrzymanych danych proteomicznych. Wykorzystano wiele różnych narzędzi, które pozwoliły zidentyfikować nowe grupy białek o zmienionym w mózgu myszy Ki91 poziomie lub stopniem fosforylacji. Były to białka związane z inicjacją translacji, białka mitochondrialne, białka tworzące cytoszkielet, pęcherzyki transportowe, a także zaangażowane w transport aksonalny. Czy dla któregoś ze zidentyfikowanych białek wykonano dodatkowe badania, które by eksperymentalnie potwierdziły zaangażowanie danego szlaku w procesie obumierania neuronów?

2. Wiatr K, Marczak L, Pérot JB, Brouillet E, Flament F, Figiel M. **Broad Influence of Mutant Ataxin-3 on the Proteome of the Adult Brain, Young Neurons, and Axons Reveals Central Molecular Processes and Biomarkers in SCA3/MJD Using Knock-In Mouse Model.** (2021) *Front Mol Neurosci.* 14: 658339.

Druga praca, która weszła w skład rozprawy mgr Kaliny Wiatr dotyczy analizy zmian proteomu, ale już na późniejszych etapach choroby. Wykorzystując tę samą grupę myszy Ki91 i kontrolnych wykonano testy behawioralne, a na podstawie uzyskanych wyników wyodrębniono 3 fazy choroby: (1) spowolnienie przyrostu masy ciała (myszy w wieku 4-10 miesięcy), (2) wczesna faza symptomatyczna (myszy w wieku 12-14 miesięcy) oraz (3) późna faza symptomatyczna (myszy w wieku 16-18 miesięcy) charakteryzująca się wyraźnymi zaburzeniami koordynacji ruchowej, siły mięśni i stanami lękowymi. Badania anatomiczne pokazały, że u myszy 18-miesięcznych występuje atrofia wielu rejonów mózgu, w tym również struktur bogatych w aksony, jak na przykład ciała modzelowatego. U zwierząt Ki91 obserwuje się również dużo większe i liczniejsze agregaty ataksyny 3 w komórkach nerwowych, duża jej część była ubikwitynowana. Podobnie jak w poprzednio omawianej pracy, Doktorantka wykonała analizy proteomiczne mózdzku oraz kory mózgowej, ale tym razem w wielu różnych punktach czasowych: od 4 do 18 miesięcy. Białka o zmienionym poziomie u myszy Ki91 w wieku 4-14 miesięcy tworzyły 5 grup funkcjonalnych: (1) transport pęcherzyków i endocytoza, (2) transmisja synaptyczna, (3) cytoszkielet i transport mikrotubularny, (4) metabolizm energetyczny, (5) modulacja poziomu białek. U zwierząt starszych, ponad 10-miesięcznych, zaobserwowano, że zmienione w stosunku do kontroli białka związane są z: lizosomami, fagosomami, proteasomami, pęcherzykami synaptycznymi i synapsami. Były one zaangażowane w degradację, apoptozę, działanie synaps, metabolizm energetyczny, formowanie cytoszkieletu i transport wzdłuż aksonu. Myszy w wieku 18 miesięcy, zostały podzielone na 3 grupy, ze względu na wyraźne symptomy choroby: fenotyp łagodny, umiarkowany i ciężki. Na podstawie uzyskanych wyników mgr Kalina Wiatr zaproponowała, że degeneracja aksonów, a później również ciał komórek nerwowych, obserwowana w ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, może być indukowana zaburzeniami



w transporcie pęcherzyków synaptycznych, mitochondriów i lizosomów wzdłuż aksonów. Według tej ciekawej hipotezy, dysfunkcja aksonów jest ważnym elementem patogenezy SCA3.

Doktorantka postanowiła sprawdzić tę hipotezę wykonując podobne do poprzednich analizy proteomiczne, ale przeprowadzone osobno w aksonach oraz we frakcji somatodendrytycznej. Wyniki tej analizy wskazały, że sporo białek maszynierii translacyjnej akumuluje się w aksonach Ki91, i to zarówno w neuronach kory, jak i neuronach mózdkowych. Z kolei poziom białek związanych z cytoszkieletem, transportem i mitochondriami był obniżony w aksonach myszy Ki91 w porównaniu do frakcji somatodendrytycznej i kontroli. Uzyskane wyniki jasno wskazują na obniżenie w neuronach myszy Ki91 poziomu niektórych białek mitochondrialnych. To sugeruje możliwość pojawienia się w tych komórkach deficytu energetycznego. Doktorantka wykazała eksperymentalnie, że to prawda, wykonując pomiar tempa glikolizy oraz efektywności fosforylacji oksydacyjnej badanej poprzez zużycie tlenu. Magister Kalina Wiatr przypuszcza, że taka sytuacja spowodowana jest złym transportem mitochondriów w neuronie. Zgadza się, że jest to bardzo prawdopodobne, chociaż należało by to udowodnić obserwując ruch mitochondriów wzdłuż aksonów. Co więcej, powinno się też zbadać, moim zdaniem, funkcjonowanie mitochondriów wyizolowanych z neuronów kontrolnych i Ki91. Takie badania odpowiedziałyby na pytanie, które z etapów oddychania są zaburzone, a także pozwoliłyby monitorować powstawanie reaktywnych form tlenu, które mogą być również sygnałem procesów degeneracyjnych. Te moje sugestie nie podważają wartości oryginalnej obserwacji wskazującej na zaburzenia w fosforylacji oksydacyjnej w neuronach SCA3, a jedynie sugerują kierunek dalszych badań prowadzonych w laboratorium dr hab. Macieja Figla. Magister Kalina Wiatr zaobserwowała także podwyższony poziom ufosforylowanych neurofilamentów w neuronach mózdku myszy Ki91, co również może wskazywać na uszkodzenie aksonów i wadliwy transport aksonalny, w tym również transport mitochondriów. W neuronach mózdkowych Ki91, zarówno w ciele komórki nerwowej, jak i w aksonie, akumulują się również pęcherzyki, w skład których wchodzi białko RAB7. Również i ta obserwacja wskazuje na rolę transportu wewnątrzkomórkowego w patogenezy SCA3.

Na podstawie wszystkich wykonanych przez siebie eksperymentów mgr Kalina Wiatr zaproponowała, że degenerację neuronów w ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 wywołują niedobory produkcji energii przez mitochondria, zaburzenia homeostazy białek oraz transportu aksonalnego pęcherzyków i mitochondriów. To bardzo interesująca hipoteza, jednak wymaga dokładniejszych badań, aby ją potwierdzić eksperymentalnie.

### **Wnioski końcowe**

Dwa artykuły naukowe, które wchodzi w skład ocenianej rozprawy zawierają nowe i ważne dla nauki wyniki. Zostały opublikowane w znanych czasopismach naukowych, które publikują prace naukowe na podstawie opinii zewnętrznych recenzentów. Udział mgr Kaliny Wiatr w przygotowaniu obu publikacji jest znaczący i został poświadczony przez autora korespondencyjnego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę pozwoliły na zaproponowanie modelu patogenezy ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, w którym zwróciła ona uwagę na



zaburzenia transportu pęcherzyków i mitochondriów wewnątrz komórki nerwowej, głównie wzdłuż aksonu, oraz obniżenie wydajności fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach. Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Proszę Radę Naukową Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Kaliny Wiatr do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Artur Jarmołowski



**UNIwersYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU**

---

**Wydział Biologii**

**Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii**

---

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań  
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293  
tel. +48 61 829 59 50  
[ibmib@amu.edu.pl](mailto:ibmib@amu.edu.pl)

---