

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

Choroby neurodegeneracyjne są jednym z poważniejszych współczesnych problemów nie tylko medycznych ale też społecznych. Szacuje się, że są one czwartą co do częstości przyczyną zgonów na świecie, a ponieważ ich przebieg jest zwykle długotrwały i wyniszczający, powodujący głęboką niepełnosprawność chorych, powodują one wieloletnie wyłączenie z aktywnego życia społecznego nie tylko samych pacjentów ale też członków ich rodzin lub opiekunów. Z drugiej strony, choroby te są jak dotychczas nieuleczalne, co jeszcze pogłębia problemy z nimi związane. W związku z tym, zrozumienie mechanizmów tych chorób jest niezwykle istotne nie tylko z czysto poznawczego punktu widzenia ale także z tego powodu, że stanowi to podstawę poszukiwań różnych opcji terapeutycznych. Badania takich podstawowych mechanizmów nie leżą wszakże w gestii lekarzy-klinicystów ale raczej biologów i chemików, zajmujących się procesami biochemicznymi, genetycznymi, molekularnymi czy fizjologicznymi zachodzącymi w komórce, gdyż jedynie oni dysponują odpowiednim warsztatem metodycznym umożliwiającym poznanie na poziomie molekularnym szczegółowych patomechanizmów różnych chorób.

W tym świetle, zrozumienie molekularnych mechanizmów neurodegeneracyjnych chorób o podłożu genetycznym ma szczególne znaczenie, gdyż

mają one – w przeciwieństwie do chorób wieloczynnikowych – ściśle określoną pierwotną przyczynę w postaci mutacji w danym genie. Sprawia to, że stanowią one doskonałe modele w badaniach molekularnych tej dużej grupy chorób.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr wpisuje się znakomicie w ten trend badawczy. Obiektem zainteresowań Doktorantki była ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (w skrócie: SCA3), jedna z neurodegeneracyjnych chorób jednogenowych, dziedziczona w sposób autosomalny dominujący, spowodowana mutacjami w genie *ATXN3*, kodującym ataksynę-3, enzym będący proteazą cysteinową wykazującą aktywność deubikwitynazy. Zwiększona liczba powtórzeń CAG w sekwencji eksonu 10 tego genu skutkuje nieprawidłowym fałdowaniem kodowanego przez niego białka i jego wytrącanie się w postaci agregatów. To z kolei jest pierwotną przyczyną rozlicznych zmian w komórkach, włącznie z dysfunkcją i obumieraniem neuronów. Jak się jednak okazuje, między innymi na podstawie wyników badań zamieszczonych w tej pracy doktorskiej, tworzenie agregatów zmienionej formy ataksyny-3 jest tylko przysłowiowym „czubkiem góry lodowej” w zakresie patologicznych zmian zachodzących w komórkach. Poznanie szczegółów molekularnych tych zmian jest kluczowe w zrozumieniu patomechanizmu choroby, co otworzyć może nowe możliwości w poszukiwaniu skutecznych metod terapeutycznych, a co niestety do tej pory było nieefektywne. Takie cele poznawcze okazują się szczególnie ważne w świetle ostatnich badań nad innymi dziedzicznymi chorobami monogenowymi, gdzie okazuje się, iż wtóre zmiany w ekspresji dziesiątek a nawet setek genów powodują tak wielkie zmiany w funkcjonowaniu komórek, że nawet usunięcie pierwotnej przyczyny choroby (w postaci akumulowanych nieprawidłowych makrocząsteczek) nie pozwala na całkowite przywrócenie prawidłowości w budowie różnych struktur i zachodzenia różnych procesów komórkowych. Wszystkie te aspekty są znakomicie opisane we wstępnej części rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr, a także przedyskutowane w ramach omówienia wyników na tle dotychczasowej literatury, co

potwierdza Jej głęboką wiedzę teoretyczną, spełniając tym samym jedno z ustawowych wymagań stawianych kandydatom do stopnia doktora. Mając na względzie wielką istotność wyników badań Doktorantki, chciałbym poprosić Ją o przedyskutowanie (podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej) uzyskanych przez Nią wyników w jeszcze szerszym świetle i próbę ich porównania do wyników innych badań, wskazujących na globalne zmiany w regulacji ekspresji genów także w przypadku innych chorób jednogennych (nie tylko chorób z grupy „poli(Q)”).

Jak wynika z powyższego opisu, który zawiera już jednocześnie ocenę teoretycznego przygotowania Doktorantki, podjęty przez Nią problem badawczy należy uznać za bardzo ważny naukowo. W szczególności, głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr było określenie patomechanizmów SCA3 w niedawno skonstruowanym modelu zwierzęcym tej choroby, mianowicie mysiej linii nazwanej Ki91. Myszy te stanowią tzw. model „knock-in”, gdzie wprowadzone zostały nadmiarowe powtórzenia sekwencji CAG w genie kodującym ataksynę-3, w układzie naturalnym, tzn. pod kontrolą naturalnego promotora. Model taki znacznie lepiej odzwierciedla ludzką postać SCA3 niż poprzednio używane modele, w których ekspresja zmutowanego genu zachodzi na bardzo wysokim poziomie, powodując co prawda szybkie pojawienie się ciężkich objawów chorobowych u zwierząt, jednak odbiegając przez to od naturalnego przebiegu choroby obserwowanego u ludzi. Tak postawiony cel pracy uważam za bardzo trafny, a zaplanowane badania za bardzo ambitne wyzwanie naukowe. Takiemu wyzwaniu Doktorantka mogła sprostać jedynie mając stworzone znakomite warunki do przeprowadzenia badań, w postaci opieki naukowej ze strony promotora o dużych ambicjach naukowych i wybitnych osiągnięciach na polu badań w podobnej tematyce oraz bardzo dobrze wyposażonego laboratorium. Oba te warunki zostały spełnione, co zresztą Pani mgr inż. Kalina Katarzyna Wiatr znakomicie wykorzystała. Promotor Jej rozprawy doktorskiej, Pan dr hab. Maciej Figiel, prof. IChB PAN, wielokrotnie udowadniał, że ma bardzo ambitne naukowe pomysły, które potrafi znakomicie

realizować, czego dowodem są liczne i stojące na bardzo wysokim poziomie Jego publikacje naukowe, szczególnie w tematyce mechanizmów chorób poliglutaminowych. Jednostka naukowa, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, to renomowany ośrodek stwarzający znakomite warunki pracy. Jeśli dodać do tego tradycje laboratorium, w którym wykonywana była praca doktorska Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr, a którym wcześniej kierował światowej renomy naukowiec, Pan prof. dr hab. Włodzimierz Krzyżosiak, można było oczekiwać, że badania przyniosą niezwykle ciekawe i doniosłe rezultaty. Po lekturze ocenianej rozprawy doktorskiej muszę przyznać, że te oczekiwania zostały całkowicie spełnione, czym Doktorantka zasłużyła na słowa wielkiego uznania.

Głównym elementem rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr są dwie publikacje, które ukazały się w renomowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych: *Molecular Neurobiology* oraz *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Tym samym, rozprawa ta spełnia ustawowe, formalne kryteria prac doktorskich. Nie powinna jednakże czytelnika mylić liczba artykułów składających się na tę rozprawę. Te dwie prace zawierają opis tak kompleksowych badań, z takim ogromem wyników, że materiał ten mógłby być z powodzeniem opublikowany w postaci kilku niezależnych artykułów. Docenić w tym miejscu należy oparcie się pokusie dzielenia wyników prac na drobne części, publikowane niezależnie, czyli „strategii” potocznie zwanej „syndromem salami”. Opublikowanie rezultatów w postaci obszernych, kompleksowych prac, pozwala na znacznie lepsze przedstawienie całości problemu i wskazanie faktycznych osiągnięć naukowych.

Niezwykle silną stroną pracy doktorskiej Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr jest wykorzystanie bardzo szerokiego spektrum zaawansowanych technik i metod badawczych. Poczynając od badań behawioru zwierząt, przez analizy transkryptomyczne (RNA-seq) poparte doświadczeniami RT-qPCR, a także określanie poziomu białek przez Western-blotting i ich lokalizacji poprzez badania immunohistochemiczne, po zaawansowane analizy proteomiczne oraz

bioinformatyczne, a kończąc na nowoczesnych technikach neuroobrazowania. Wszystko to poparte zastosowaniem nowoczesnych modyfikacji komórek, w tym tworzeniu iPSC. Zaiste, warsztat metodyczny jaki został opanowany przez Doktorantkę jest imponujący.

Za największe osiągnięcie naukowe opisane w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr uznaję molekularną i behawioralną charakterystykę myszy Ki91, stanowiących zwierzęcy model SCA3. Konsekwencją tego było zaproponowanie patomechanizmu tej choroby, w którym szczególną rolę odgrywają zaburzenia transportu komórkowego w aksonach. Otwiera to nowe możliwości zarówno badawcze, w celu jeszcze dokładniejszego poznania molekularnych nieprawidłowości występujących w komórkach SCA3, jak i zmierzające do opracowania skutecznych terapii. Na szczególne podkreślenie zasługuje, moim zdaniem, wykrycie bardzo szerokich zmian w proteomach komórek SCA3 w porównaniu do komórek kontrolnych. Jest to wyjątkowo fascynujące odkrycie w obliczu faktu, że SCA3 jest formalnie chorobą jednogenową, jednak jak udowodniła Doktorantka, zaburzenia ekspresji dotyczą bardzo wielu genów. Te wyniki stały się podstawą do określenia specyficznych zmian zachodzących w komórkach SCA3. Niezwykle cenne było także określenie specyficznych faz choroby w modelu Ki91. Doktorantka wyróżniła 4 fazy choroby, w tym fazę pre-symptomatyczną, w której mimo braku objawów fizycznych i behawioralnych u zwierząt można było wyróżnić istotne zmiany w poziomach wielu białek zaangażowanych w tak kluczowe procesy komórkowe jak translacja, naprawa uszkodzeń DNA, neurogeneza i tworzenie struktur neuronalnych, metabolizm energetyczny oraz transport komórkowy.

Nie mam uwag dotyczących zaplanowania doświadczeń, wykonania eksperymentów oraz interpretacji ich wyników. Uważam, że Doktorantka przeprowadziła fascynujące badania i rozwiązała konkretny problem naukowy, czym wypełniła kolejny wymóg ustawy stawiany kandydatom do stopnia doktora.

Wobec braku zastrzeżeń merytorycznych, moje jedyne uwagi krytyczne dotyczą spraw redakcyjnych. Nie są one jednak na tyle poważne aby mogły obniżyć ogólną ocenę pracy doktorskiej Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr. Są to raczej wskazówki językowe, logiczne oraz formalne, które mogą pomóc w formułowaniu treści tekstów przygotowywanych przez Doktorantkę w przyszłości.


Pierwsza uwaga dotyczy tytułu rozprawy. Rozpoczęcie tytułu od słowa „Poszukiwanie” sugeruje, że przeprowadzone zostały badania w celu określenia pewnych mechanizmów, ale niekoniecznie te poszukiwania zakończyły się sukcesem. Można przecież czegoś poszukiwać ale nie znaleźć. Tymczasem badania opisane w tej rozprawie doprowadziły do poznania specyficznych mechanizmów zaangażowanych w rozwój SCA3. Użyte sformułowanie obniża zatem atrakcyjność tytułu i nie odzwierciedla w pełni wysokiej rangi uzyskanych rezultatów. Ponadto nie zgadzam się, że badane przez Panią mgr inż. Kalinę Katarzynę Wiatr mechanizmy były „nowe”, jak to zostało określone w tytule. Mechanizmy choroby SCA3 istnieją przecież tak długo jak istnieje to schorzenie, zostały natomiast przez Doktorantkę nowo odkryte. Wcześniej nie wiedzieliśmy o nich, co nie znaczy jednak, że ich nie było, zatem słowo „nowe” nie jest tutaj trafnie użyte. Zatem moim zdaniem, sformułowanie tytułu: „Mechanizmy neurodegeneracji w czasie rozwoju ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 w mysim modelu knock-in SCA3 Ki91” znacznie lepiej odpowiadałoby treści i głównym osiągnięciom pracy niż obecna jego wersja: „Poszukiwania nowych mechanizmów.....”. Według mnie, ta nowo zaproponowana wersja podkreślałaby także lepiej fakt, że zidentyfikowane zostały specyficzne mechanizmy neurodegeneracji w zwierzęcym modelu SCA3.

Chciałbym zwrócić szczególną uwagę na jeden błąd językowy, który można raczej uznać jako błąd logiczny, a który pojawia się w treści polskiego opisu zawartego w ocenianej rozprawie doktorskiej. Zaznaczę od razu, że tę uwagę zamieszczam ostatnio w przypadku prawie każdego ocenianego przeze mnie tekstu pisanego w języku polskim. Skoro jednak błąd, który opiszę poniżej, jest tak powszechny, to tym

bardziej czuję się w obowiązku zwracać na niego uwagę. Chodzi o sformułowanie „i/lub”. W języku polskim określenie to nie ma żadnego logicznego sensu, natomiast pojawia się od pewnego czasu nagminnie i to nie tylko w nieformalnych tekstach lecz także w oficjalnych publikacjach czy dokumentach. Takich nielogicznych określeń powinno się unikać szczególnie w języku naukowym, który musi cechować się precyzyjnością określeń i logiką. Należy zatem przypomnieć, że koniunkcja „i” oznacza konieczność spełnienia obu z podanych w zdaniu warunków, zaś alternatywa nierozłączna „lub” oznacza, że może być spełniony jeden warunek bądź oba. Zatem określenie „i/lub” nie ma sensu, gdyż „i” zawiera się już w „lub”. Można by co prawda użyć określenia „i/albo”, czyli połączenia koniunkcji i alternatywy rozłącznej (tzn. spełnienia jednego i tylko jednego z dwóch warunków), ale nie ma takiej potrzeby, gdyż „i/albo” oznacza dokładnie to samo co „lub”. Prawdopodobnie określenie „i/lub” wzięło się bezpośrednio z prostego, ale błędnego, tłumaczenia z języka angielskiego zwrotu „and/or”. Problem w tym, że w języku angielskim nie ma odpowiednika słowa „lub”. Słowo „and” jest odpowiednikiem „i”, zaś słowo „or” jest odpowiednikiem „albo”. Zatem aby po angielsku powiedzieć „lub” trzeba użyć określenia „and/or”, natomiast nie ma takiej konieczności w języku polskim, gdyż istnieje słowo „lub”.

Trzecia moja uwaga dotyczy oświadczeń załączonych do publikacji wieloautorskich, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr. Doktorantka jest co prawda pierwszą autorką w obu artykułach, więc jej kluczowa rola nie podlega wątpliwości, niemniej jednak istnieje ustawowy wymóg załączenia oświadczeń współautorów. O ile oświadczenie Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr jest poprawnie sformułowane i bardzo precyzyjnie opisuje Jej rolę w obu publikacjach, to należy zwrócić uwagę, iż pozostali współautorzy powinni określić ich własny, a nie doktoranta czy doktorantki, wkład w powstanie artykułów, co w tym przypadku nie jest spełnione. Niemniej jednak, ponieważ wiodący wkład Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr w omawiane artykuły jest niepodważalny, uznaję wspomnianą nieprawidłowość jako drobne uchybienie.

W podsumowaniu uważam, że Pani mgr inż. Kalina Katarzyna Wiatr wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła także, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz wyciągnięcie wniosków. Uzyskała bardzo istotne naukowo rezultaty doświadczeń, poprawnie je zinterpretowała i zaprezentowała uprawnione wnioski. Stwierdzam zatem, że spełnione zostały wymagania ustawowe dotyczące warunków jakie musi spełniać rozprawa doktorska. W związku z powyższym, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr inż. Kaliny Katarzyny Wiatr do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę niezwykle ciekawe wyniki badań oraz ich bardzo duże znaczenie naukowe, poparte imponującym zestawem zaawansowanych metod badawczych opanowanych przez Doktorantkę, zwracam się z wnioskiem o rozważenie możliwości odpowiedniego wyróżnienia tej znakomitej rozprawy doktorskiej.



prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn