UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii

prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Ekspresji Genów
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań
tel.: +48 61-829-5959
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 27. 11. 2017

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha J. Szlachcica pt.:
„Nowe modele komórkowe iPSC choroby Huntingtona do zastosowań w eksperymentalnej terapii komórkowej oraz w badaniach funkcji neurorozwojowych normalnej i zmutowanej huntingtyny"

I. Ocena formalna

Rozprawa doktorska mgr Wojciecha Szlachcica powstała w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk (IChB PAN) w Poznaniu. Promotorem ocenianej pracy jest dr hab. Maciej Figiel, profesor tegoż instytutu. Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy choroby Huntigtona (HD), a mówiąc precyzyjnej nowoczesnych metod leczenia tego schorzenia, przy zastosowaniu zmodyfikowanych komórek macierzystych. Magister Wojciech Szlachcic wykorzystał w swoich badaniach dobrze scharakteryzowany i intensywnie wykorzystywany zwierzęcy model HD, transgeniczną mysz YAC128, do której genomu wprowadzono 4 kopie ludzkiego genu zmutowanej huntingtyny (*HTT*), zawierającej ciąg 128 kodonów glutaminowych. To właśnie te powtarzające się reszty aminokwasowe występujące w zmutowanym białku są przyczyną choroby Huntingtona. Chociaż od dawna znamy molekularne podłoże HD, czyli ekspansję powtórzeń CAG w genie kodującym huntingtynę, jesteśmy jeszcze bardzo daleko od zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw

wszystkich objawów obserwowanych u pacjentów cierpiący na HD i powiązaniu ich ze zmienioną budową huntingtyny. Warto również podkreślić, że pomimo podejmowanych licznych prób zastosowania najrozmaitszych terapii, choroba ta jest nieuleczalna. Piszę o tym, aby podkreślić, że tematyka wybrana przez Doktoranta i jego Promotora jest w pełni oryginalna, a zaplanowane i wykonane przez mgr Wojciecha Szlachcica doświadczenia odpowiadają na ważne pytania, zarówno o charakterze podstawowym, jak i mogą mieć w przyszłości ogromny potencjał aplikacyjny.

Wybrany przez mgr Wojciecha Szlachcica model zwierzęcy idealnie nadaje się do badań nad eksperymentalnymi metodami leczenia HD, głównie z uwagi na możliwość oceny monitorowania postępów leczenia nie tylko na poziomie molekularnym, ale także fenotypowym; zastosowana przez Autora rozprawy doktorskiej linia myszy transgenicznych pozwala stosunkowo łatwo monitorować zmiany neurologiczne, metaboliczne, motoryczne, a także behawioralne w trakcie stosowania wybranych strategii terapeutycznych. Takie badania wydają się niezbędne dla prawidłowej oceny skuteczności określonej terapii. Przedstawiona do recenzji praca opisuje podjęte przez Doktoranta próby otrzymania indukowanych komórek macierzystych (iPSC), które poddane odpowiednim manipulacjom genetycznym, których głównym celem było obniżenie ekspresji huntingtyny oraz indukcja różnicowania sią iPSC w kierunku prawidłowo działających neuronów, nadawałyby się do zastosowania w terapii komórkowej HD. Celem ocenianej rozprawy była również charakterystyka molekularna uzyskanych linii iPSC pod kątem identyfikacji i charakterystyki zaburzeń wywołanych obecnością zmutowanej huntingtyny na bardzo wczesnym etapie rozwoju organizmu, czyli w komórkach charakteryzujących się pluripotencją. Oba te cele badawcze uważam za bardzo ambitne, a uzyskane przez Doktoranta wyniki są w pełni oryginalne i bardzo ciekawe. Spełniony został zatem wymóg nowatorstwa badań zaprezentowanych jako rozprawa doktorska. Z punktu widzenia tematyki, wyboru obiektu badań oraz postawionego problemu badawczego oceniana rozprawa nie budzi żadnych zastrzeżeń. Wartość naukową pracy najlepiej obrazuje fakt, że uzyskane przez mgr Wojciecha Szlachcica wyniki zostały już opublikowane w dwóch artykułach eksperymentalnych, które ukazały się w znanych periodykach naukowych, w *Disease Models and Mechanisms* oraz *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Te dwie prace stanowią trzon ocenianej rozprawy. Dodatkowo, w pracy doktorskiej mgr Wojciecha Szlachcica znalazł

ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 55 56, fax. +48 61 829 56 36
biologia@amu.edu.pl

się jeden artykuł przeglądowy opublikowany ostatnio w *Molecular Neurobiology*. Doktorant jest pierwszym autorem w obu pracach eksperymentalnych, a drugim w artykule przeglądowym. Do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów artykułów stanowiących podstawę pracy doktorskiej mgr Wojciecha Szlachcica, z których jednoznacznie wynika, co poszczególne osoby wykonały w ramach prac nad załączonymi do rozprawy artykułami naukowymi. Z oświadczeń tych wynika, że mgr Wojciech Szlachcic był najważniejszym autorem zaprezentowanych w rozprawie wyników.

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Wojciecha Szlachcica w pełni spełnia warunki formalne stawiane rozprawom doktorskim, zarówno pod względem formy, jak i oryginalności tematu, a także poziomu naukowego przedstawionych w niej wyników.

II. Ocena merytoryczna

Pierwsza praca wchodząca w skład ocenianej rozprawy została opublikowana w 2015 roku w czasopiśmie *Disease Models and Mechanisms* (Szlachcic WJ, Switonski PM, Krzyzosiak WJ, Figlerowicz M, Figiel M. Huntington disease iPSCs show early molecular changes in intracellular signaling, the expression of oxidative stress proteins and the p53 pathway. *Disease Models and Mechanisms*. (2015) 8(9): 1047). W artykule tym opisano wyprowadzenie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) z fibroblastów pozyskanych z transgenicznych myszy modelowych YAC128, zwierzęcego modelu choroby Huntingtona. W tym celu pozyskano fibroblasty od osobników dorosłych, a następnie wprowadzono do nich cDNA pięciu czynników transkrypcyjnych (Oct4, Sox2, Klf4, Myc i Lin28). Przy integracji kasety transkrypcyjnej z genomem myszy zastosowano system wykorzystujący transpozazę piggyBac. Jedną z najważniejszych zalet zastosowanego przez Doktoranta systemu przeprogramowania komórek fibroblastów w komórki iPSC jest możliwość wycięcia transpozonu poprzez ponowną ekspozycję otrzymanych linii na działania transpozazy piggyBac. Doktorant stwierdził, że zastosowanie zmodyfikowanej wersji tego enzymy o zwiększonej aktywności znacznie polepszyło wydajność procesu pożądanego przeprogramowania genetycznego. Dodatkowo mgr Wojciech Szlachcic polepszył wydajność otrzymywania komórek iPSC stosując dwa dodatkowe czynniki wspomagające wymazywanie zapisu epigenetycznego genomu. Czynnikami tymi były: witamina C, która

wzmacnia aktywność demetylazy histonów oraz kwas walproinowego (VPA) – inhibitor deacetylaz histonów. Docelowy opisany w pracy protokół pozyskiwania iPSC z fibroblastów mysich umożliwiał otrzymanie około 7 kolonii na milion komórek. Wydajność ta była niższa niż w przypadku zastosowania fibroblastów embrionalnych, ale wystarczająco dobra do otrzymania materiału nadającego się do dalszych analiz. Warto także podkreślić, że zastosowany system był dużo bardziej wydajny niż inne testowane metody zmiany programu genetycznego fibroblastów. Po uzyskaniu linii iPSC transpozon został usunięty poprzez wprowadzenie do komórek plazmidu kodującego transpozazę hyBP i zastosowaniu odpowiedniej selekcji negatywnej. Magister Wojciech Szlachcic uzyskał około 50 linii iPSC pochodzących zarówno od myszy YAC128, jak i od myszy typu dzikiego. Do dalszych badań wybrał losowo 5 linii pochodzących z myszy YAC128 i 6 linii pochodzących z fibroblastów typu dzikiego. Doktorant dokładnie sprawdził w wyselekcjonowanych liniach ich pluripotencję, analizując ekspresję określonych genów markerowych, a także poprzez wykonanie odpowiednich testów funkcjonalnych. Wszystkie wykonane testu jednoznacznie wskazały na pluripotencjalny charakter uzyskanych komórek, w tym również na ich zdolność do różnicowania w komórki neuroektodermalne. Ta ostatnia cecha jest najważniejsza z uwagi na możliwość wykorzystania komórek iPSC do terapii komórkowej badanego schorzenia. Magister Wojciech Szlachcic zajął się następnie analizą wpływu zmutowanej huntingtyny na ekspresję genów w komórkach iPSC pochodzących od myszy YAC128, jak również z myszy typu dzikiego. Badania te wykazały, że w komórkach ze zmutowaną huntingtyną obserwuje się zmniejszoną indukcję kinaz typu ERK w odpowiedzi na aktywujący tę ścieżkę zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF). Co więcej, Doktorant zauważył także zwiększoną ekspresję genu kodującego kinazę Gsk3β oraz wzrost poziomu ufosforylowania beta-kateniny, substratu Gsk3β. Wyniki te świadczą o ogólnym obniżeniu aktywności ścieżki sygnałowej Wnt. Przeprowadzone dane pokazały również wzrost ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej SOD1, enzymu zaangażowanego w odpowiedź komórek na stres oksydacyjny. Najciekawsze jednak, że obecność zmutowanej huntingtyny powodowała również obniżenie ekspresji białka p53, które oddziałuje z huntingtyną oraz białkami omawianych ścieżek sygnałowych. Podczas analizowania tej części pracy nasunęło mi się pytanie, czy dłuższe trakty poliglutaminowe w huntingtynie wpływają na jej wiązanie się z p53? Obserwacje poczynione na mysich komórkach iPSC zostały potwierdzone

ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 55 56, fax. +48 61 829 56 36
biologia@amu.edu.pl

również na komórkach pochodzących od pacjentów cierpiących na HD. Również i w tym przypadku zaobserwowano zmiany w ekspresji białek ścieżek sygnałowych Wnt i ERK, a także wahania poziomu dysmutazy SOD1 i białka p53. Zmiany te były szczególnie widoczne w przypadku komórek pochodzących od pacjenta z dziecięcą formą HD, u którego huntingtyna zawierała ponad 100 reszt glutaminowych.

Drugi z załączonych do rozprawy artykułów ukazał się w bieżącym roku w czasopiśmie *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Szlachcic WJ, Wiatr K, Trzeciak M, Figlerowicz M, Figiel M. The generation of mouse and human Huntington disease iPS cells suitable for in vitro studies on huntigtin function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. (2017) 10: 253). Jest on w pewnym sensie kontynuacją pracy z roku 2015, którą omówiłem wcześniej. Głównym celem badań opisanych w tym nowym artykule było obniżenie ekspresji genu huntingtyny w mysich komórkach iPSC. Doktorant, wykorzystując cząsteczki shRNA, umieszczone w kontekście endogennego mikroRNA, miR30, uzyskał komórki z obniżonym poziomie huntingtyny. W badaniach zastosowano shRNA rozpoznające transkrypty pochodzące z genu *HTT* lub spinki rozpoznające rejon powtórzeń CAG. Do wprowadzonych do genomu konstruktów dołączono również odpowiednie geny markerowe ułatwiające selekcje i sortowanie zmodyfikowanych komórek. Jeden z zastosowanych wariantów shRNA, shHTT2, obniżał poziom huntingtyny w komórkach iPSC o około 85%, a po zróżnicowaniu ich do neuronalnych komórek macierzystych uzyskano wyciszenie na poziomie 60%. W przypadku komórek ludzkich pochodzących od pacjentów HD także obserwowano 50-60% obniżenie poziomu huntingtyny, przy czym paradoksalnie stopień wyciszenia był niższy wraz ze wzrostem liczby powtórzeń CAG w genie *HTT*. Czy wynik ten oznacza, że transkrypt ze zwiększoną liczbą kodonów CAG jest stabilniejszy? A może różnice dotyczą tylko stabilności zmutowanego białka? Czy dostępne są jakiekolwiek dane na ten temat? Do wyciszenia ekspresji huntingtyny zastosowano również cząsteczki RNA atakujące w transkrypcie rejon powtórzeń CAG. Niestety, nie zaobserwowano obniżenia poziomu huntingtyny po ich zastosowaniu. Co ciekawe, odnotowano taki efekt, gdy zróżnicowano badane komórki do neuronalnych komórek macierzystych (NSC), chociaż wyciszenie ekspresji poziomu huntingtyny oceniono w nich na około 40%, w porównaniu do 60% wyciszenia obserwowanego w przypadku zastosowania wariantu shHTT2. Jak mgr Wojciech Szlachcic zinterpretuje te różnice? Czy uzyskany wynik sugeruje, że rejon powtórzeń CAG jest w jakiś

ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 55 56, fax. +48 61 829 56 36
biologia@amu.edu.pl

sposób niedostępny w iPSC a w komórkach neuronalnych ta sytuacja się zmienia? A może chodzi jedynie o poziomy aktywności białek zaangażowanych w biogenezę miRNA? Czy sprawdzono poziom ich ekspresji w różnych typach badanych komórek? Podczas obrony chciałbym podyskutować na ten temat z mgr Wojciechem Szlachcicem. Wykorzystując informacje o zmianach ekspresji pewnej grupy genów w liniach mysich iPSC z ekspresją ludzkiej huntingtyny o 128 powtórzeniach, sprawdzono, czy obniżenie poziomu huntingtyny pod wpływem działania cząsteczki shRNA wpływa na przywrócenie poziomu ekspresji badanych genów do takiego poziomu, który obserwowany jest w komórkach iPSC typu dzikiego. Uzyskano dość niejednoznaczne, moim zdaniem, wyniki, niełatwe do interpretacji. Jedynie w przypadku białka p53 potwierdzono jednoznacznie, że jego ekspresja i fosforylacja w mysich iPSC, a także w komórkach NSC koreluje z poziomem zmutowanej huntingtyny. Niestety, nie zaobserwowano takiej zależności w komórkach ludzkich. Dlaczego?

Trzecia praca wchodząca w skład ocenianej rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Szlachcica to ciekawy artykuł przeglądowy z *Molecular Neurobiology* (Wiatr K, Szlachcic AJ, Trzeciak M, Figlerowicz M, Figiel M. Huntigton Disease as a Neurodevelopmental Disorder and Early Signs of the Disease in Stem Cells. (2017) *Mol. Neurobiol.* May 11). Praca ta w pierwszej części bardzo dobrze podsumowuje obecną wiedzę na temat roli prawidłowej i zmutowanej huntingtyny w procesach rozwojowych. Autorzy publikacji podkreślają niezbędność takich danych dla opracowania skutecznej terapii komórkowej, którą można by zastosować u chorych na HD. W drugiej części tego interesującego artykułu autorzy omawiają modele komórek pluripotencjalnych HD oraz zaburzenia jakie w komórkach iPSC oraz NSC wywołuje pojawienie się zmutowanej wersji huntingtyny. Warto zauważyć, że omawiany artykuł przeglądowy w naturalny sposób podkreśla znaczenie wyników otrzymanych przez mgr Wojciecha Szlachcica i przedstawionych w jego rozprawie doktorskiej.

Przedstawione w rozprawie wyniki naukowe uzyskane przez mgr Wojciecha Szlachcica są niezwykle interesujące i w pełni oryginalne. Już sam fakt ich opublikowania w dobrych czasopismach naukowych, *Disease Models and Mechanisms* i *Frontiers in Molecular Neuroscience,* świadczy o dużej wartości naukowych ocenianych wyników.

Dodam, że w obu przypadkach prace przeszły najprawdopodobniej kilka rund ostrej krytyki ze strony wymagających recenzentów, a to co trafiło do mojej oceny zostało już przez autorów kilkakrotnie gruntownie poprawione. Wszystkie opisane w rozprawie wyniki naukowe zostały bardzo wnikliwie skonfrontowane z danymi opublikowanymi wcześniej przez innych badaczy. Ta polemika z danymi uzyskanymi przez innych oparta jest na najnowszej literaturze naukowej i dobitnie wskazuje, że mgr Wojciech Szlachcic znakomicie zna literaturę naukową poświęconą eksperymentalnym metodom leczenia HD. Dobrą i gruntowną znajomość literatury naukowej dostrzegłem także podczas czytania części wstępnej rozprawy, które doskonale wprowadziło mnie w tematykę ocenianej rozprawy. Rozprawę mgr Wojciecha Szlachcica kończy krótki rozdział, w którym podsumowuje on uzyskane przez siebie wyniki oraz przedstawia interesująca perspektywę dalszych badań.

III. Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską mgr Wojciech Szlachcica oceniam bardzo wysoko. Autor przedstawił w niej oryginalne i interesujące wyniki naukowe. Oceniana praca spełnia z nawiązką wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Wojciecha Szlachcica do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wyjątkowo wysoki poziom zaprezentowanych w rozprawie wyników oraz oryginalność podjętego tematu badawczego wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Szlachcica.

A. Jarmu

prof. dr hab. Artur Jarmołowski

ul. Umultowska 89, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 55 56, fax. +48 61 829 56 36
biologia@amu.edu.pl