



prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Biologii
Zakład Ekspresji Genów
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl
tel. 61 829 5959

Poznań, 27. 02. 2023

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Jesion pt. „Wpływ poziomu białka CYP46A1 w mózgu mysiego modelu Ki150 w kontekście roli metabolizmu cholesterolu w patogenezie ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3

Oceniana praca została wykonana w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Macieja Figla. Promotorem pomocniczym rozprawy mgr Eweliny Jesion jest dr inż. Magdalena Surdyka. Praca została napisana po polsku i ma formę manuskryptu. Tematem rozprawy jest badanie udziału metabolizmu cholesterolu w patogenezie ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, w skrócie SCA3, i potencjalne terapie tej nieuleczalnej dotąd choroby związane z regulacją metabolizmu cholesterolu w mózgu chorych. Temat ten jest bardzo ambitny i oryginalny, co stanowi podstawowe wymaganie stawiane przed pracą doktorską. Podjęte przez Doktorantkę zadania badawcze dobrze wpisują się w problematykę naukową od wielu lat prowadzoną w laboratorium kierowanym przez dr hab. Macieja Figla.

Magister Ewelina Jesion, przed omówieniem wyników wykonanych przez siebie eksperymentów, przedstawiła w swojej pracy doktorskiej interesujący przegląd literaturowy, stanowiący wstęp ocenianej rozprawy. Rozdział ten został przygotowany na podstawie najnowszej literatury naukowej i doskonale wprowadza czytelnika w tematykę pracy, dostarczając jednocześnie cennych informacji wykorzystanych przez



Autorkę później w rozdziale zatytułowanym Dyskusja i perspektywy. Wstęp jest napisany jasno i zrozumiale, w niektórych jedynie miejscach przydałoby się trochę więcej informacji i zrozumienia dla czytelnika, który niekoniecznie musi wiedzieć, co to jest „postępująca oftalmoplagia zewnętrzna” czy „uogólniona arefleksja”, nie wspominając o „kacheksji”. Przydałoby się kilka słów wyjaśnienia dla nie lekarzy. To są jednak drobne szczegóły, bo bardzo szybko można w Internecie rozszyfrować chociażby najbardziej skomplikowane terminy medyczne. Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że omawiany przegląd literaturowy czytałem z dużym zainteresowaniem i wiele się z niego dowiedziałem. Dodam także, że ta część rozprawy jest zilustrowana trafnie dobranymi schematami, które ułatwiają jej czytanie. Jedynym elementem, którego zabrakło mi we Wstępie to informacje o budowie mózdzku - takie podstawowe informacje ułatwiłyby mi analizę zamieszczonych w pracy zdjęć mikroskopowych.

W następnym rozdziale ocenianej rozprawie mgr Ewelina Jesion sprecyzowała główny cel swoich badań. Doktorantka napisała, że swoją pracę doktorską traktuje jako weryfikację pewnej hipotezy naukowej, która zakładała, że dysfunkcja 24-hydroksylazy cholesterolu CYP46A1 jest powiązana funkcjonalnie z wystąpieniem objawów SCA3. Hipoteza taka została wysunięta na podstawie wcześniejszych obserwacji łączących poziom enzymu CYP46A1 z patomechanizmem innych chorób neurodegeneracyjnych. Ponieważ w SCA3 najbardziej zdegenerowanymi neuronami są komórki Purkiniego w mózdzku, to właśnie tę część mózgu zaplanowano przebadać. Z uwagi na ekspresję genu CYP46A1w komórkach Purkiniego, które są najbardziej zdegenerowanymi komórkami w mózdzku osób chorych na SCA3, to właśnie te neurony wybrano jako cel manipulacji genetycznych. W badaniach wykorzystano myszy typu WT oraz Ki150/150, które są zmodyfikowanym zwierzęcym modelem choroby SCA3. U myszy tych nie tylko, że ekspresji ulega wprowadzony do ich genomu ludzki gen ATX3 o od



140 do 163 powtórzeń CAG, to jeszcze zmutowane w ten sposób są oba allele tego genu.

Rozdział zatytułowany Materiały i metody został przygotowany starannie. Jedynym mankamentem jest, moim zdaniem, dość zdawkowe opisanie myszy Ki150/150. Można te informacje znaleźć w tekście, ale brakuje ich dokładniejszego opisu w Materiałach i metodach, do której to części najczęściej zaglądamy szukając danych o użytym w badaniach materiale biologicznym. Dużym dla mnie utrudnieniem przy analizie opisanych w pracy wyników był również brak szczegółowego opisu zastosowanych wektorów wirusowych. Przedstawione informacje pozwoliły co prawda na zrozumienie wykonanych doświadczeń, ale zabrakło mi szczegółów budowy użytych wektorów.

Rozdział poświęcony uzyskanym przez Doktorantkę wynikom rozpoczyna omówienie kilku doświadczeń, których wyniki miały odpowiedzieć na pytanie o wydajność transdukcji komórek mózdzku w wyniku wstrzyknięcia w różne jego obszary dwóch wektorów wirusowych: AAVrh10 i AAV-PHP.eB, które zawierały gen kodujący GFP. Obserwacja akumulacji GFP w komórkach mózdzku pozwoliła stwierdzić, że najlepszym sposobem transdukcji komórek Purkiniego jest iniekcja wektora AAV-PHP.eb do jąder głębokich mózdzku. Badania te umożliwiły wybór odpowiedniego serotypu wirusa, miejsca jego iniekcji w obrębie mózdzku, a także zaproponowanie odpowiedniej liczby cząstek wirusowych potrzebnych do uzyskania transdukcji komórek. W następnym kroku mgr Ewelina Jesion postanowiła obniżyć poziom hydroksylazy 24-hydroksylaza cholesterolu CYP46A1 w komórkach Purkiniego za pomocą interferencji RNA, przy wykorzystaniu spiniki wyciszającej zawierającej krótkie sekwencje genu *CYP46A1*. Jako kontrolę zastosowano spinikę zawierającą przypadkową sekwencję wyciszającą. Założono, że obniżenie ekspresji CYP46A1 w mózdzku myszy typu dzikiego spowoduje pojawienie się objawów choroby SCA3. Chociaż w eksperymentach zastosowano wirusa, który wywoływał transdukcję neuronów Purkiniego, nie zaobserwowano żadnych negatywnych



efektów obniżenia poziomu 24-hydrolazy cholesterolu w mózdku myszy typu dzikiego. Podobnie nie zaobserwowano istotnego pogłębienia się objawów chorobowych w przypadku obniżenia poziomu CYP46A1 w mózdku myszy reprezentujących myszy model choroby SCA3. To zaskakujący wynik w świetle obserwacji wskazującej na obniżenie poziomu tego enzymu u pacjentów cierpiących na różne choroby neurodegeneracyjne. Na obronie chciałbym dowiedzieć się, czy wykonano lub zaplanowano wykonanie eksperymentów zwiększających poziom 24-hydroksylazy cholesterolu w mózdku? Bardzo ciekawe byłoby porównanie zachowania zwierząt o zmniejszonym i zwiększonym poziomie CYP46A1. W ocenianej pracy Doktorantka przebadła również wpływ wprowadzenia do mózdku wektora wirusowego, który, jak pokazały eksperymenty, nie dostawał się do komórek Purkiniego tylko powodował transdukcje innych typów komórek mózgu. Jaki był sens wykonania tych eksperymentów? Chciałbym również odnieść się do zaprezentowanych zdjęć pokazujących ekspresję GFP. Niektóre z nich (np. rys. 13 na stronie 62) są niezwykle wyraźne, z łatwo dostrzegalnymi obszarami mózdku, inne zdjęcia są dużo trudniejsze do interpretacji, zwłaszcza, że nie we wszystkich przypadkach zastosowano detekcję histochemiczną lokalizującą określone części mózdku. Z czego wynikają te różnice w jakości zdjęć?

Magister Ewelina Jesion wykazała również eksperymentalnie, że poziom CYP46A1 badany metodą barwienia immunofluorescencyjnego jest obniżony w mózdku myszy Ki150 w stosunku do myszy typu dzikiego. Poziom tego obniżenia określono na 35%, ale nie jest jasne ile komórek analizowano. W podpisie pod rysunkiem napisano, że analizowano $n=3$, co, jak rozumiem, dotyczy liczby myszy. Nie znalazłem jednak informacji o liczbie analizowanych komórek, na podstawie których wyliczono spadek poziomu 24-hydroksylazy cholesterolu. Autorka rozprawy przedstawiła również dowody wskazujące na obniżenie poziomu CYP46A1 po iniekcji odpowiednich wektorów wirusowych zarówno do jąder głębokich mózdku, jak i po iniekcjach lobularnych. I tu również, tak jak przy badaniu poziomu 24-



hydroksylazy cholesterolu u zwierząt niepoddanych iniekcji, nie wyjaśniono dokładnie, w jaki sposób dokonano oceny intensywności fluorescencji w badaniach poziomu CYP46A1 przy użyciu specyficznych przeciwciał. Czy nie lepiej byłoby zastosować w tych doświadczeniach metodę ELISA? Dla iniekcji wirusa AAV-PHP.eB do warstwy jąder głębokich wykonano także ocenę wyciszenia ekspresji genu *CYP46A1* na poziomie RNA. Wykonana analiza RT-qPCR wykazała, że mRNA *CYP46A1* jest co prawda na niższym poziomie w mózdku zwierząt, którym wstrzyknięto wektor wirusowy ze spinką wyciszającą ekspresję genu *CYP46A1*, ale różnica między tymi myszami, a myszami iniekowanymi wektorem kontrolnym nie była istotna statystycznie. Muszę w tym miejsc zwrócić uwagę, że o ile na rysunku ta nieistotność statystyczna została wyraźnie zaznaczona, to w tekście (str. 84) mgr Ewelina Jesion pisze o istotnej statystycznie różnicy poziomu mRNA 24-hydroksylazy cholesterolu w mózdkach badanych zwierząt. Na podstawie zaproponowanych wyników Doktorantka zaproponowała, że selektywne obniżenie poziomu CYP46A1 w komórkach Purkinjego może być celem działań terapeutycznych w SCA3 i innych chorobach neurodegeneracyjnych. Ta interesująca koncepcja, wymaga jednak jeszcze wielu dodatkowych eksperymentów kontrolnych, których wyniki wzmocniłyby pomysł Autorki rozprawy.

Wszystkie otrzymane wyniki zostały bardzo rzeczowo przedyskutowane w obszernym rozdziale zatytułowanym Dyskusja i perspektywy. Po jego przeczytaniu nie mam wątpliwości, że mgr Ewelina Jesion bardzo dobrze zna literaturę dotyczącą SCA3, a także artykuły naukowe opisujące eksperymentalne podejścia do leczenia tej choroby. W tej części rozprawy Doktorantka przedstawiła również perspektywy badań nad patogenezą ataksji mózdkowo-rdzeniowej typu 3 oraz nad nowymi strategiami terapeutycznymi. Ostatnim rozdziałem, poprzedzającym spis wykorzystanej literatury, jest zgrabnie napisany rozdział zatytułowany Wnioski, w którym Autorka pracy podsumowała wszystkie uzyskane przez siebie wyniki i określiła plan przyszłych badań nad interesującym ją tematem.



Uwagi krytyczne i pytania dotyczące ocenianej rozprawy nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Eweliny Jesion. W rozprawie przedstawiono interesujące i oryginalne wyniki naukowe. Zostały one właściwie zinterpretowane i krytycznie skonfrontowane z informacjami pochodzącymi z artykułami, które zostały już opublikowane przez innych autorów. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej IChB PAN nr 128/2022/Internet z dnia 24 października 2022 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Eweliny Jesion do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Signed by /
Podpisano przez:

Artur Michał
Jarmołowski

Date / Data:
2023-02-28 10:39

prof. .. dr hab. Artur Jarmołowski