

Prof. dr hab. Urszula Wojda
Kierownik Pracowni Badań Przedklinicznych
o Podwyższonym Standardzie, Centrum Neurobiologii,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
tel: (4822) 5892578; email: u.wojda@nencki.gov.pl

Warszawa, 12.03.2023 r.

Recenzja

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**”

wykonanej w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN

Promotor: dr hab. Maciej Figiel, prof. ICHB PAN

Promotor pomocniczy: dr Magdalena Surdyka

Choroby neurodegeneracyjne to grupa wolno postępujących schorzeń ośrodkowego układu nerwowego, takich jak m.in. choroba Alzheimerera, choroba Parkinsona, czy tzw. choroby polyQ. Schorzenia polyQ charakteryzują się ekspansją powtórzeń CAG w kodujących sekwencjach niektórych genów, co skutkuje wydłużonymi fragmentami poliglutaminowymi w kodowanych przez nie białkach oraz ich zaburzoną proteostazą i agregacją. Do grupy tych chorób zalicza się m.in. chorobę Huntingtona i ataksje rdzeniowo-mózdkowe, z których jedna, stanowiąca przedmiot badań opisanych w dysertacji, jest warunkowana ekspansją CAG w genie ataksyny 3 (ATX3). Ze względu na złożoną etiologię, choroby neurodegeneracyjne stanowią wciąż nierozwiązany problem medyczny i społeczny. Brak skutecznych metod leczenia związany jest z niejasnymi przyczynami i mechanizmami molekularnymi tych patologii, a także niedostatkami adekwatnych modeli zwierzęcych. Jedyną nadzieję na pokonanie tych zagrożeń dają badania naukowe zmierzające do wyjaśnienia patomechanizmów chorób neurodegeneracyjnych z zastosowaniem udoskonalonych modeli zwierzęcych tych chorób, jak też do opracowania nowych strategii terapeutycznych. W ten nurt wpisuje się tematyka badań przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Jesion.

Celem tej pracy była weryfikacja hipotezy, że jednym z istotnych czynników patomechanizmu ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (ang. *spinocerebellar ataxia type 3*; SCA3) są zaburzenia metabolizmu cholesterolu związane z obniżoną aktywnością hydroksylazy cholesterolu (CYP46A1), enzymu z rodziny cytochromu P450, odpowiedzialnego za syntezę 24S-hydroksycholesterolu (24-OHC), czyli głównej formy cholesterolu, w jakiej jest on wydalany z mózgu z przekroczeniem bariery krew-mózg. Ze względu na specyficzną ekspresję genu kodującego CYP46A1 w komórkach Purkiniego mózdku, które ulegają silnej degeneracji w SCA3, praca zakładała zbadanie możliwości i behawioralnych efektów fenotypowych obniżenia poziomu białka CYP46A1 wybiórczo w komórkach Purkiniego mózdku. Metodyka pracy powstała w oparciu o uprzednie doświadczenia i osiągnięcia zespołu prof. Macieja Figla w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej ICHB PAN w zakresie rozwoju takich narzędzi biologii molekularnej jak wektory wirusowe typu AAV oraz charakterystyki transgenicznych modeli SCA3 Ki91 i

Ki150. W niniejszej pracy doktorskiej zbadano i potwierdzono możliwość wybiórczej transdukcji neuronów Purkiniego mózdzku z zastosowaniem wektorów wirusowych typu AAV zawierających shRNA genu *CYP46A1* i uzyskania obniżenia poziomu białka CYP46A1 w mózdzku myszy dzikich oraz w mysim modelu SCA3 Ki150. Zbadano także w testach behawioralnych fenotypowe skutki obniżenia poziomu białka CYP46A1 w mózdzku myszy dzikich oraz myszy transgenicznych Ki150.

Upřednio prowadzono już badania efektów obniżenia lub podwyższenia poziomu białka CYP46A1 za pomocą iniekcji wektorów wirusowych zawierających odpowiednie shRNA w różne rejony mózgu myszy dzikich oraz w mysich modelach chorób neurodegeneracyjnych, przede wszystkim typu Alzheimerowskiego, ale także w innym modelu SCA3. Badania te są jednak nieliczne i nie dały dotychczas jasnej odpowiedzi na główne pytania niniejszej dysertacji. Opisane w tej dysertacji podejście metodyczne i uzyskane wyniki można zatem uznać za nowatorskie, dostarczające wielu cennych nowych danych i stanowiące znaczący wkład na drodze do opracowania nowych terapii genowych SCA3 i innych chorób neurodegeneracyjnych.

Za jedno z najważniejszych osiągnięć tej pracy uważam opracowanie metody specyficznej i efektywnej transdukcji komórek Purkiniego mózdzku w wyniku stereotaktycznych iniekcji wektora o serotypie AAV-PHP.eB bezpośrednio do jąder głębokich mózdzku, w pobliże zakończeń aksonalnych komórek Purkiniego, wykorzystując zdolność wektorów AAV-PHP.eB do transportu retrogradowego w tych komórkach. Opracowanie takiej metodologii otwiera nowe możliwości dla terapii genowej SCA3 o bardzo wysokim poziomie neuronalnej selektywności. Ponadto należy docenić, że efekty obniżenia białka CYP46A1 w mózdzku myszy oceniano poprzez przeprowadzenie odpowiednich testów behawioralnych, takich jak czułe testy prętów statycznych (Static Rod test), test Rotarod i testy punktowe fenotypu ataksji. Bardzo ciekawe są wyniki wskazujące, że wbrew oczekiwaniom, selektywne obniżenie poziomu białka CYP46A1 w komórkach Purkiniego mózdzku nie skutkuje powstaniem fenotypu SCA3 u myszy typu dzikiego, ani też pogłębieniem fenotypu SCA3 w modelu SCA3 Ki150, lecz przeciwnie, poprawia motorykę zarówno myszy typu dzikiego, jak myszy typu SCA3 Ki150.

Opis i ocena rozprawy

Rozprawa przygotowana jest zgodnie z obowiązującymi zasadami dotyczącymi prac doktorskich. Dysertacja liczy 122 strony i ma klasyczny układ. Po spisie treści zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim, oraz *Wprowadzenie* (26 stron), w którym zawarto dobrze wyselekcjonowane informacje naukowe, podane w odpowiedniej kolejności, a także zilustrowane trzema przejrzystymi rycinami.

W rozdziale „Wprowadzenie” Autorka najpierw opisała metabolizm cholesterolu w mózgu oraz zaburzenia metabolizmu cholesterolu w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym dane wskazujące na obniżenie poziomu CYP46A1 w tkankach mózdzku pacjentów z SCA3. Następnie opisano podłoże genetyczne i objawy kliniczne SCA3, strukturę i funkcje ataksyny 3 w normie oraz neuropatologiczne skutki mutacji w postaci ekspansji CAG tego białka. Dalej dokonano przeglądu ogólnych strategii terapii genowych, a także strategii rozwijanych specyficznie dla terapii SCA3, w tym z zastosowaniem wektorów AAV o różnych serotypach. Wprowadzenie kończy przegląd mysich modeli SCA3 i omówienie przesłanek do wyboru modelu homozygotycznych myszy SCA3 Ki150/150 do badań. Następnie zamieszczono krótki opis ogólnego celu pracy i celów szczegółowych. Wstęp dobrze uzasadnia podjęte badania, a cele badań przedstawiono przejrzysto.

Opis materiałów i metod (17 stron) jest zwięzły, a zarazem dostatecznie szczegółowy, aby umożliwić powtórzenie eksperymentów. Warsztat metodologiczny pracy obejmuje szeroką gamę różnorodnych technik biologii molekularnej i neurobiologii, takich jak iniekcje stereotaktyczne w ściśle określone struktury mózgu myszy, uzyskanie i analiza lizatów tkanek mózgu metodą immunoblottingu, analiza skrawków mózgu metodą immunohistochemii, mikroskopia konfokalna, genotypowanie i testy behawioralne zwierząt. Dobór metod i narzędzi badawczych jest odpowiedni dla realizacji celu projektu.

Główną część rozprawy stanowi opis wyników przedstawiony na 38 stronach i 26 rycinach. Pragnę podkreślić precyzyjne zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczeń, a także ich dokumentację w postaci zdjęć mikroskopowych, obrazów immunoblotów oraz wykresów. Ocena poziomu białka CYP46A1 dwoma metodami (immunoblotting i immunohistochemia) oraz ocena zmian motoryki zwierząt z zastosowaniem kilku różnych testów behawioralnych pozwoliły na uzyskanie rzetelnych danych.

Rozdział „Dyskusja i perspektywy” zajmuje 10 stron, po czym znajdujemy podsumowanie w formie wniosków końcowych. Dyskusja uzyskanych danych dowodzi, że doktorantka potrafi nie tylko zastosować odpowiednie techniki do wykonania badań, ale także zinterpretować wyniki, porównać z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi przez innych badaczy oraz sformułować na tej podstawie nowe hipotezy i cele dalszych badań.

Spis bibliografii (w kolejności alfabetycznej) jest niezwykle obszerny i zajmuje aż 25 stron. Publikacje zostały właściwie wyselekcjonowane, w tym uwzględniono prace z ostatnich pięciu lat. Na końcu zamieszczono wykaz stosowanych skrótów.

Proporcja poszczególnych części pracy jest odpowiednia. Rozprawa ma przejrzystą konstrukcję i w syntetyczny sposób dostarcza wszystkich informacji pozwalających na ocenę oryginalności i istotności rozwiązanego problemu naukowego, ogólnej wiedzy doktoranta w uprawianej dziedzinie naukowej i umiejętności prowadzenia badań naukowych. Praca napisana jest w sposób zwięzły, przejrzysty i ciekawy.

Uwagi d.t. zawartości merytorycznej i konstrukcji pracy:

1. We Wprowadzeniu pomocny byłoby schemat stadiów transdukcji komórek wektorami AAV zawierającymi shRNA i interferencji RNA, a w opisie materiałów schematy stosowanych wektorów wirusowych AAV.
2. W opisie metod brakuje informacji, jak wykonywano iniekcje retro-orbitalne.
3. W opisie metod brakuje też informacji, jaka była płeć badanych zwierząt doświadczalnych.
4. Badania prowadzono u zwierząt jednej płci. Czy istnieją jakieś przesłanki aby przypuszczać, że wyniki prowadzonych badań, zwłaszcza testów behawioralnych, byłyby podobne u samców i samic?
5. Str. 24, Wprowadzenie. Stwierdzenie „*Do celowania w patogenezę SCA3 stosuje się dwa główne rodzaje strategii terapeutycznych opartych na oligonukleotydach, są to antysensowne oligonukleotydy (ASO) oraz interferencje RNA (RNAi)*” budzi pewne wątpliwości. W istocie, strategię oparte na RNAi można rozpatrywać jako podgrupę zastosowań ASO (praca przeglądowa „*Antisense oligonucleotides for Alzheimer's disease therapy: from the mRNA to miRNA paradigm*” EBioMedicine 2021, doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103691). Trudno też zgodzić się ze stwierdzeniem, że na podstawie miRNA „*zaprojektowano sztuczne RNAi takie jak miRNA, siRNA czy shRNA*”. To zbyt daleko idący skrót myślowy. Mimiki miRNA czy antagomiRy projektowane są w oparciu o sekwencje docelowe dla miRNA w 3' UTR mRNA,

podczas gdy siRNA czy shRNA projektowane są najczęściej przy założeniu, że sekwencje docelowe dla nich znajdują się w rejonach kodujących mRNA.

6. Czemu w badaniach, których wyniki przedstawiono na Rysunku 24. białko CYP46A1 znormalizowano stosując jako białko referencyjne Laminę β , a w pozostałych analizach typu immunoblotting stosowano GAPDH? Należy też zauważyć, że metoda immunoblottingu jest metodą półilościową, nie ilościową.
7. Jednym z wymienianych przez Autorkę atutów wektorów AAV-PHP.eB jest ich zdolność do przekraczania bariery krew-mózg. Jednak w wyniku podań systemowych, to jest iniekcji retro-orbitalnych AAV-PHP.eB-eGFP, transdukcji uległo wiele struktur mózgu. Na podstawie lektury *Dyskusji* nie jest jasne, czy w świetle pozostałych wyników pracy doktorskiej, w porównaniu do bezpośrednich iniekcji do mózdzku, podania systemowe tego wektora uważać można za mało obiecującą strategię terapii genowej SCA3, zagrożoną licznymi efektami ubocznymi?.
8. W *Dyskusji* przedstawiono wyniki innych prac wskazujące na odmienne efekty obniżenia poziomu CYP46A1 w różnych strukturach mózgu. Skutki obniżenia poziomu CYP46A1 w tych samych strukturach i komórkach mózgu, takich jak komórki Purkiniego mózdzku, mogą także być odmienne w zależności od typu neurodegeneracji i jej stadium oraz rodzaju aktywowanych procesów kompensacyjnych czy zmian systemowych w organizmie, takich jak np. hipercholesterolemia czy zespół metaboliczny. Dlatego należałoby może nieco ostrożniej sformułować wniosek nr 5: „Selektywne obniżenie CYP46A1 w komórkach Purkiniego może być celem terapeutycznym w SCA3 i w innych chorobach (powinno być: chorobach) neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniem przemian cholesterolu w mózdzku w PC”. CYP46A1 jako potencjalny cel terapeutyczny w SCA3 i innych chorobach neurodegeneracyjnych wymaga wielu dalszych weryfikacji.
9. Kontynuując temat złożoności skutków obniżenia CYP46A1 dla procesów neurodegeneracji warto zauważyć, że obniżenie poziomu CYP46A1 w hipokampie we wczesnych stadiach choroby Alzheimera może mieć kluczowe znaczenie także w dezintegracji tratw lipidowych w błonach neuronów, gdzie zachodzi proces amyloidogennej proteolizy APP.
10. Rozdział „Wnioski” w punkcie 8 dysertacji w istocie stanowi podsumowanie wyników i wnioski, taki właśnie tytuł byłby bardziej adekwatny.
11. Przydatne byłoby zamieszczenie na końcu spisu bibliografii listy artykułów ze współautorstwem doktorantki, które mają związek z dysertacją.
12. Spis skrótów zawiera skróty w języku angielskim, zatem przydatne byłoby zamieszczenie pełnych nazw i terminów w języku angielskim, nie tylko w języku polskim (np. SCA, spinocerebellar ataxia).

Uwagi edycyjne i językowe.

Uwagi krytyczne dotyczące edycji i błędów językowych pracy zamieszczam na końcu recenzji, jako mniej istotne w porównaniu z aspektami merytorycznymi.

Stwierdzam, że praca przygotowana jest na ogół starannie, autorka posługuje się poprawnym, naukowym językiem. Z obowiązku recenzenta muszę jednak wskazać następujące uchybienia.

1. Materiały i Metody: metoda to Western blotting lub immunoblotting, nie „Western blot”.
2. Termin „barwienia immunofluorescencyjne” można zastąpić bardziej uniwersalną nazwą „metody immunohistochemiczne”.

3. Innym częstym błędem w rozprawach doktorskich jest termin „izolacja DNA, izolacja RNA” – zamiast „izolowanie DNA, RNA (proces).
4. Brakuje informacji, czy Rysunek 2 we Wprowadzeniu jest opracowaniem własnym, czy może pochodzi z innego źródła. Opis tego Rysunku sprawia wrażenie niedokładnego tłumaczenia automatycznego typu Google translator („fioletowe okrągłe struktury” to inaczej kółka?). Usterki występują także w opisie Rysunku 10.
5. Częste są błędy interpunkcyjne: zdania złożone podrzędnie bądź współrzędnie powinny być rozdzielone przecinkami.

Podsumowanie

Mimo kilku uwag krytycznych, których celem jest głównie zachęta do dalszej dyskusji, wysoko oceniam przedstawioną do oceny dysertację. Ambitne cele pracy zrealizowano poprzez szeroko zakrojone, rzetelnie i konsekwentnie poprowadzone badania, które doprowadziły do sformułowania ważnych konkluzji. Uzyskane wyniki mają w większości nowatorski, oryginalny charakter. Dysertacja cechuje się dobrą organizacją obszernego materiału, a także sprawnością przedstawienia i omówienia wyników i ich dyskusji w świetle istniejącej literatury. Lektura dysertacji nie pozostawia wątpliwości, że mgr Ewelina Jesion osiągnęła dużą sprawność eksperymentalną oraz zdobyła rozległą wiedzę i umiejętność krytycznej analizy danych, co zapewnia Jej swobodę w podejmowaniu wymagających wyzwań naukowych i umożliwia prowadzenie samodzielnych badań.

Podsumowując stwierdzam, że 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.



Prof. dr hab. Urszula Wojda