



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, 11. 03. 2023

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Piotra Tomasza Piaseckiego pt.
„Charakterystyka mysich modeli SCA3/MJD Ki91 i Ki150 ze szczególnym
uwzględnieniem patogenezy w tkance, interakcji zmutowanej ataksyny 3 i
zmian transkrypcyjnych w mózgu”.**

Oceniana rozprawa powstała w Zakładzie Neurologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Macieja Figla, który jest promotorem dysertacji przygotowanej przez mgr Piotra Piaseckiego. Praca ma klasyczny układ i jest obszernym manuskrytem napisanym w języku polskim. Tematem przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej jest patomechanizm ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3). Celem badań było nie tylko poznanie molekularnych przyczyn choroby, ale również zaproponowanie nowych podejść terapeutycznych przydatnych podczas leczenia pacjentów chorych na SCA3. Temat pracy doktorskiej mgr Piotra Piaseckiego jest oryginalny i nowatorski, a zatem spełnia niezbędny, podstawowy warunek stawiany przed każdą rozprawą doktorską.

Pracę rozpoczynają dwa obszernie streszczenia napisane w języku polskim i angielskim. Tuż za streszczeniami znajduje się niezwykle ciekawy przegląd literaturowy, stanowiący doskonały wstęp do właściwej analizy opisanych w dalszych częściach pracy wyników. Rozdział ten został podzielony przez Autora na cztery części. W pierwszej Doktorant opisał SCA3, przedstawiając objawy tej nieuleczalnej choroby oraz dostępne informacje o patogenezie tego schorzenia. Druga część została poświęcona charakterystyce ataksyny 3 (ATXN3) oraz mutacjom w genie kodującym to białko, które odpowiadają za pojawienie się objawów SCA3. Trzeci podrozdział Wstępu dotyczy modeli zwierzęcych ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu



3, a w ostatniej, czwartej części Autor skupił się na omówieniu terapii eksperymentalnych, które próbuje się wykorzystać do leczenia SCA3. Cały ten obszerny rozdział rozprawy mgr Piotra Piaseckiego został oparty na doskonale wyselekcjonowanych artykułach naukowych, i to zarówno klasycznych prac dotyczących SCA3, jak i również pozycji najnowszych. Nie mam wątpliwości, że Doktorant zapoznał się z wynikami, które zostały opublikowane przez innych naukowców, dobrze je zinterpretował i ciekawie przedstawił w omawianej części doktoratu.

Cel podjętych badań został precyzyjnie i jasno określony w rozdziale zatytułowanym Cel pracy. Dowiadujemy się z niego, że głównym zadaniem badawczym, które postawił przed sobą Doktorant, było zbadanie patogenezы ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, przy wykorzystaniu nowego mysiego modelu choroby o zaostrozonym fenotypie. Warto w tym miejscu podkreślić, że ten nowy model zwierzęcy został zaprojektowany i przygotowany przez Autora pracy. Zakreślone w manuskrypcie cele zostały w pełni zrealizowane, o czym przekonałem się studiując pozostałe części rozprawy

Następnym obszernym rozdziałem ocenianej rozprawy jest fragment, w którym Doktorant opisał używane odczynniki, a także przedstawił stosowane w trakcie prac nad doktoratem metody badawcze. Rozdział ten został przygotowany bardzo starannie i nie znajduje w nim większych uchybień. Wszystkie metodyczne wątpliwości, które nasunęły mi się podczas analizy zamieszczonych w pracy wyników, zostały wyjaśnione po przeczytaniu odpowiedniego fragmentu Materiałów i metod.

Rozdział Wyniki rozpoczyna się opisem analiz transkryptomicznych mózdku i kory mózgowej wyizolowanych z mózgow myszy modelu Ki91, w fazie pre- i symptomatycznej. Nie zaobserwowano istotnych zmian transkrypcyjnych u myszy Ki91 przed pojawieniem się symptomów choroby. Podobnie nie zaobserwowano zmian w profilach splicingowych w mózgu zwierząt ze zmutowaną wersją ludzkiego genu *ATXN3*, w porównaniu do myszy kontrolnych. Natomiast u zwierząt starszych, u których obserwowalne były już objawy choroby, zaobserwowano wzrost poziomu mRNA markerów oligodendrocytów, *Olig1* i *Olig2*, i to zarówno w korze pierwotnej, jak i mózdku. Wyraźnie obniżył się natomiast poziom ekspresji genów, których produkty związane są z mielinacją. Brak było jednocześnie zmian ekspresji genów stanowiących markery neuronalne, takich jak *Npy*, *Sst* czy *Reln*. Doktorant sprawdził także ekspresje wybranych genów metodą RT-qPCR w kulturze neuronalnej pochodzącej od pacjentów cierpiących na SCA3. Sądzę, że można było zastosować w tym przypadku lepszą metodę badawczą - myślę tutaj o analizie



transkryptomocnej. Choć nie mam wątpliwości, że część zmian zaobserwowanych w hodowlach komórkowych pochodzących od pacjentów i u myszy Ki91 jest podobna, to uważam że lepszym porównaniem byłyby dane pochodzące z analiz wysokoprzepustowych. Pomimo, że mgr Piotr Piasecki nie zaobserwował istotnych zmian w ekspresji genów w mózdku i korze mózgowej myszy modelu Ki91 przed pojawieniem się objawów schorzenia, preparaty mikroskopowe mózgu badanych zwierząt pokazały wyraźną zmianę lokalizacji zmutowanego białka ATXN3 w stosunku do białka niezmutowanego – białko zmutowane akumulowało się w jądrze komórkowym, gdzie tworzyło liczne mikroagregaty.

Magister Piotr Piasecki postanowił przygotować nowy myszy model ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, w których można by obserwować zmiany fenotypowe związane z chorobą jeszcze przed pojawieniem się symptomów SCA3. Dzięki zastosowaniu specjalnemu doborowi par rodzicielskich, czyli selekcji zwierząt, które miały zwiększoną liczbę powtórzeń CAG w genie *ATXN3*, otrzymano nowy myszy model SCA3, nazwany przez Autora Ki150. Sprawdzono, że myszy te zawierają w korze mózgowej zmutowaną ataksynę 3 ze zwiększoną w stosunku do białka typu dzikiego liczbą reszt glutaminowych. Magister Piotr Piasecki sprawdził zachowanie się myszy modelu Ki150, a także zbadał tkankową, komórkową oraz subkomórkową lokalizację zmutowanego białka ATXN3 w mózgu tych zwierząt. Doktorant stwierdził, że zmiany w zachowaniu zwierząt są możliwe do zaobserwowania już u zwierząt jednomiesięcznych. Co więcej, jądrowe inkluzje charakterystyczne dla SCA3 są większe, gęstsze oraz pojawiają się wcześniej u myszy Ki150 niż u myszy Ki91. Wszystkie doświadczenia, których wyniki omówiłem do tej pory zostały zaplanowane i wykonane starannie, a ich dokumentacja nie wzbudziła moich wątpliwości. Mam jedynie drobne zastrzeżenia do podpisów pod rysunkami. Są one dość lakoniczne i nie zawierają wszystkich potrzebnych do ich interpretacji informacji. Dobrym przykładem jest ryc. 14 i 15, w podpisach których brakuje opisu rysunku D (ryc. 14) lub nawet A, B i C (ryc. 15). Takich przypadków jest manuskrypcie co najmniej kilka. Wykorzystując metody chromatograficzne mgr Piotr Piasecki stwierdził, że ataksyna 3 tworzy duże kompleksy. Dlatego postanowił zidentyfikować białka, które z ATXN3 oddziałują, i to zarówno z ataksyną prawidłową, jak i zmutowaną. W tym celu wykonał analizę białek występujących w poszczególnych frakcjach/kompleksach zawierających ataksynę, przy wykorzystaniu spektrometrii mas. Doktorant wytrącił również, stosując odpowiednie przeciwciała (koimmunoprecypitacja), ataksynę wraz z oddziałującymi z nią białkami, które następnie zidentyfikował przy pomocy spektrometrii mas. Poszukiwano takich białek, których oddziaływanie z ataksyną 3



znacząco się różni pomiędzy białkiem pochodzącym od zwierząt Ki21 i myszami z nowego modelu SCA3 – Ki150. Co ciekawe, interaktory, które nie oddziaływały lub słabo oddziaływały ze zmutowanym białkiem ATXN3 można było przyporządkować do białek związanych z translacją oraz do grupy białek związanych z mitochondriami i ich transportem w neuronach. Ciekawą grupę białek, które zidentyfikował Doktorant jako interaktory zarówno prawidłowej, jak i zmutowanej ataksyny, stanowiły podjednostki proteasomu. Moim zdaniem to bardzo interesujący kierunek badawczy i powinien być kontynuowany. Przedstawione dane można bowiem traktować jedynie jako wyniki wstępne, które muszą być potwierdzone i lepiej udokumentowane, np. przez badania mikroskopowe typu FLIM-FRET, albo jeszcze lepiej PLA (ang. *proximal ligation assay*). Ostatnim eksperymentem przedstawionym w rozdziale zatytułowanym Wyniki jest próba wykorzystania znanych związków, inhibitorów proteasomu, do zmniejszenia poziomu zmutowanej ataksyny u chorych na SCA3. Doświadczenie to polegało na dodaniu specyficznych inhibitorów do hodowli komórkowej fibroblastów pochodzących od pacjentów chorujących na SCA3. Magister Piotr Piasecki wykazał, że niskocząsteczkowe związki wiążące się specyficznie do podjednostek α i β wpływają na obniżenie akumulacji ataksyny 3. Autor rozprawy zasugerował, że mogłaby to być nowa strategia terapeutyczna w leczeniu ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Mam kilka pytań związanych z tą częścią pracy. W trakcie obrony chciałbym dowiedzieć się ile różnych linii fibroblastów użyto w tym doświadczeniu, a przede wszystkim od ilu pacjentów pochodziły? Czy wiadomo już coś na temat skuteczności badanych związków w osłabianiu lub nawet eliminacji objawów choroby u myszy Ki150? Czy wykonano, albo planuje się wykonać takie eksperymenty.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały przez Doktoranta skonfrontowane z danymi uzyskanymi przez innych naukowców. Dyskusja jest dobrze i jasno napisana i świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury naukowej dotyczącej SCA3. Ostatnim rozdziałem ocenianej dysertacji jest krótki rozdział zatytułowany Wnioski, w którym Doktorant podsumowuje wszystkie uzyskane wyniki.

Przedstawione w recenzji pracy doktorskiej mgr Piotra Piaseckiego uwagi krytyczne nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej rozprawy. W dysertacji przedstawiono interesujące i w pełni oryginalne wyniki naukowe. Zostały one właściwie zinterpretowane i krytycznie skonfrontowane z informacjami pochodzącymi z artykułami opublikowanymi 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 w Poznaniu o dopuszczenie mgr Piotra Tomasza Piaseckiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

prof. dr hab. Artur Jarmołowski