



prof. dr hab. Krzysztof Sobczak
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 13 lutego 2023

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

Niniejszą recenzję wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Naukową Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Piotra Piaseckiego została wykonana w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod opieką merytoryczną prof. IChB, dr hab. Macieja Figla, pełniącego funkcję promotora w przewodzie doktorskim. Temat pracy doktorskiej wpisuje się w obszar badań prowadzonych od wielu lat z dużym sukcesem przez zespół pana promotora, związanych z poznawaniem patomechanizmów kilku chorób wywołanych nietypowymi mutacjami jakimi są ekspansje powtórzeń trójnukleotydowych CAG (CAG^{exp}), a zwłaszcza choroby Huntingtona i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3). SCA3 jest autosomalną, dominującą, progresywną chorobą neurodegeneracyjną spowodowaną mutacją w genie *ATXN3* prowadzącą do powstania zmutowanej ataksyny-3 (ATXN3), zawierającej długie trakty poliglutaminowe (poliQ) kodowane przez powtórzenia CAG.

Szczególnymi obiektami badań Doktoranta były modele zwierzęce SCA3 typu knock-in eksprymujące ludzki gen *ATXN3* z różną długością powtórzeń CAG. U pacjentów z SCA3 obserwuje się nasilenie fenotypu chorobowego a zarazem obniżenie wieku pojawienia się pierwszych zmian klinicznych wraz ze wzrostem wielkości ekspansji CAG^{exp}, dlatego zasadnym było postawienie sobie za cel badań porównanie zmian behawioralnych i molekularnych u myszy zawierających około 90 (Ki91) i 150 powtórzeń CAG (Ki150). Ponadto niewiele wiadomo o zmianach molekularnych zachodzących u nosicieli mutacji w genie *ATXN3* przed pojawieniem się pierwszych objawów choroby. Ten problem stał się kolejnym pytaniem, na które próbował odpowiedzieć mgr Piasecki. Wreszcie w ostatniej części pracy zaadresowano pytanie dotyczące białek tworzących kompleksy ze zmutowaną i prawidłową ataksyną-3.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Pierwszą stanowi relatywnie krótkie, liczące 20 stron, choć treściwe wprowadzenie omawiające istniejący stan wiedzy w zakresie tematyki projektu. Doktorant opisuje podstawy genetyczne i molekularne SCA3, modele zwierzęce tej choroby oraz opracowywane podejścia terapeutyczne. Część ta napisana jest w sposób kompetentny i informatywny, a zarazem wystarczający dla zrozumienia podstaw planowania i wykonania badań opisanych w niniejszej pracy.

Drugą część stanowi bardzo konkretnie nakreślony cel badań, podzielony również na zadania szczegółowe. Trzecim, najobszerniejszym elementem rozprawy jest drobiazgowy opis zasadniczej części pracy, rozpoczynający się przedstawieniem metodyki badawczej, a kończący opisaniem i przedyskutowaniem uzyskanych wyników. Jest to tradycyjny układ rozprawy, który pozwala na logiczne wprowadzenie poszczególnych treści i prawidłową narrację.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na nie do końca trafne sformułowanie, które znalazło się w tytule, celu pracy i wielu innych miejscach rozprawy, jakim jest określenie „zmiany transkrypcyjne w mózgu”. Zmiany na poziomie transkrypcji nie były badane w ocenianej pracy. Badania polegały na określeniu zmian w poziomie i jakości cząsteczek mRNA w skali cało-transkryptomowej lub dla indywidualnych mRNA. Prawidłowo jest to sformułowane w tytule w języku angielskim. Różnice w poziomie mRNA mogą przecież wynikać nie tylko z różnic w efektywności transkrypcji, ale również różnic w dojrzewaniu, transporcie, stabilności mRNA i wielu innych procesów.

Celem pierwszej części badań było określenie wpływu wieku zwierząt knock-in eksprymujących zmutowany gen *ATXN3* oraz długości traktu CUG^{exp} na zmiany ilościowe, w tym na poziomie cało-transkryptomowym. Uzyskane wyniki pokazały, że u młodych, bezobjawowych myszy Ki91 brak jest istotnych różnic ilościowych, z wyjątkiem tych, które są skutkiem dryfu genetycznego, z kolei w mózdzku i korze mózgowej osobników starszych, które manifestują charakterystyczne objawy chorobowe, wiele genów ulega różnicowej ekspresji, w tym geny będące markerami oligodendrocytów. Niemniej zmiany były niewielkie. W dalszej części mgr Piasecki sprawdzał czy te same zmiany można zaobserwować w komórkach neuronalnych zróżnicowanych z linii komórek iPSC pochodzących od pacjentów SCA3. Faktycznie dla genu *PLP1* i *PSAT1* wykazano podobne zmiany jakie obserwowano w objawowych myszach, ale trudno się zgodzić z wnioskiem mówiącym o podobnych zmianach dla genów *OLIG1*, *OLIG2*. Nie jest dla mnie jasne dlaczego zostały porównane między sobą pojedyncze próbki, dlaczego akurat komórki Ctr1 porównano z komórkami Pacjenta1 itd. W tej części pracy zabrakło mi również uzasadnienia dlaczego przeprowadzono analizę porównawczą na poziomie zmian jakościowych RNA, w tym alternatywnego splicingu. Ponadto przedstawione na Ryc. 6 i 7 niektóre zmiany wynikają prawdopodobnie z alternatywnej poliadenylacji, a nie są skutkiem zmian splicingowych, jak zostało napisane.

W nowo wyprowadzonym mysim modelu Ki150 Doktorant stwierdził upośledzenie aktywności lokomotorycznych już u młodych zwierząt (1-miesięcznych) z wyraźnym nasileniem u 8-miesięcznych myszy. W badaniach zastosował bogaty wachlarz testów behawioralnych oceniających chód, koordynację ruchową i utrzymywanie równowagi myszy. Badania immunohistochemiczne pokazały, że w wielu obszarach mózgu myszy Ki150 występują agregaty zmutowanej ataksyny-3, z największym zagęszczeniem na mm² w hipokampie, choć może to wprost wynikać z większej liczebności komórek przypadającej na powierzchnię analizowanego obrazu dla tego obszaru mózgu. Nie do końca jestem przekonany do stwierdzenia, że średnia gęstość inkluzji jest największa w hipokampie. Nie znam dokładnego protokołu pomiaru, ale wydaje się, że intensywność sygnału fluorescencyjnego mówi o ilości zagregowanej ataksyny-3, a nie o jej upakowaniu, czego wymiarem jest gęstość. Badania opisane w rozdziałach 4.3.4 i 4.3.5 są raczej opisowe i wnioski z nich wywodzone nie powinny być tak jednoznaczne, bez ukazania wymiaru ilościowego. Tak też w podsumowaniu pisze Doktorant, choć wcześniej mówi o wyraźnie większym sygnale z poszczególnych immunobarwień. Ta część badań

wymaga kolejnych eksperymentów.

Oprócz stworzenia i charakterystyki samego modelu Ki150, co jest bardzo istotnym elementem ocenianej pracy, najciekawsze wyniki dotyczą badań proteomicznych zmierzających do określenia prawdopodobnych kompleksów białkowych tworzonych z udziałem ataksyny-3 w komórkach mózgu tego właśnie modelu SCA3 w porównaniu do prawidłowego modelu kontrolnego (Ki21). Zgodnie z oczekiwaniem zmutowana ATXN3 lokalizuje głównie we frakcji bardzo dużych kompleksów białkowych ≥ 600 kDa, chociaż zaskakującym jest brak istotności statystycznej dla tej obserwacji poczynionej „na oko”. Może to być wynikiem małej liczby prób. Z kolei prawidłowa ataksyna-3 została zidentyfikowana preferencyjnie we frakcji 101-78 kDa. Badając dwie frakcje – 282-192 kDa i 115-89 kDa – Doktorant stwierdził występowanie w nich różnic ilościowych dla wielu białek, w tym dla niektórych różnice były zasadnicze. Trochę niefortunne jest określenie „Białka deregulowane we frakcjach” w tytule tabel przedstawiających te właśnie wyniki. Dalsze badania doprowadziły do zidentyfikowania białek, które powszechniej występują w immunoprecypitatach zmutowanej lub prawidłowej ataksyny-3. Wśród nich znajdowały się białka mitochondrialne i białka związane z translacją, które powszechniej, a czasami wyłącznie współczyszczają się z prawidłową postacią ATXN3. Moim zdaniem ten cykl badań jest najważniejszym osiągnięciem ocenianej pracy.

Finalne badania pokazały z kolei, że w komórkach fibroblastycznych pochodzących od pacjentów ze SCA3 traktowanych inhibitorami proteasomu poziom prawidłowej i zmutowanej ataksyny-3 ulegał znacznemu obniżeniu. Wyniki te są obiecującym początkiem kolejnego projektu. Są bowiem ciekawą obserwacją, która wymaga szeregu dalszych eksperymentów zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu działania tych związków niskocząsteczkowych w kontekście biologii białek ATXN3. Niemniej ciekawym jest to, co Doktorant myśli na ten temat. Jakie potencjalne mechanizmy działania można rozpatrywać, chociaż jedynie w zakresie rozważań czysto teoretycznych. Chciałbym zatem poprosić Doktoranta o puszczenie wodzy fantazji w rozważaniu efektów pierwszorzędowych i efektów pośrednich dalszego rzędu. Zwłaszcza ciekawym jest efekt dawki, gdzie przy niższym stężeniu niektórych testowanych związków widoczny jest wzrost zarówno zmutowanej jak i prawidłowej postaci ATXN3, a w stężeniach wyższych wyraźny spadek ilości tych białek. Obserwacja ta, choć wywodzona przeze mnie wprost z pokazanych w pracy wyników, nie jest zgodna z tym co zostało napisane w podsumowaniu: „zastosowanie bortezomibu, karfilzomibu i VLX170 w stężeniu 1 nM i 10nM spowodowało znaczące obniżenie poziomu zmutowanej i prawidłowej ATXN3”. Może były prowadzone jeszcze inne, nie pokazane w pracy eksperymenty, które taki wynik ukazywały? Ponadto w dyskusji Doktorant pisze, że „Taki efekt działania inhibitorów oraz zebrane wyniki mogą wskazywać, że jednym z podstawowych mechanizmów patologicznych SCA3 jest dysfunkcja usuwania proteasomu przez proteofagię”. Czy taka konkluzja znaczy, że testowane inhibitory działają inaczej w komórkach prawidłowych bez mutacji w genie ATXN3?

Tak jak zdecydowanie doceniam wkład pracy włożony przez Doktoranta w wykonanie tak wielu i tak różnych metodycznie i wieloetapowych eksperymentów, to muszę stwierdzić, że tekst pracy wymaga wielu poprawek w zakresie zarówno czytelności jak i prawidłowości językowej. Znajdują się w nim dziesiątki/setki literówek i niepoprawnych form gramatycznych. Przy pierwszym czytaniu tekst momentami był bardzo trudny do zrozumienia. Przytoczę jedynie kilka nieco dziwnych lub nieprawidłowych sformułowań:

- Czy pisząc o białkach z „kolistą formę strukturalną” Autor miał na myśli białka globularne?
- Gdzie indziej jest napisane, że „tworzeniu inkluzji fibrylnych poliQ jest etap inkluzji o formie kolistej” – pewnie lepiej globularnej niż kolistej, ale całe zdanie wymaga korekty.
- Na str. 21 jest napisane „może wywołać tworzenie szlaku komórkowego służącego do konsolidacji agregatów proteotoksycznych” – tu już trudno zaproponować konkretną zmianę.
- „fenotyp podobny do ludzkich pacjentów z SCA3” – jak wyżej.
- „myszy wykazują progresywny fenotyp neurologiczny charakteryzujący się nadpobudliwością, zmniejszonym lękiem, upośledzonym uczeniem się motorycznym, krótszymi czasami w teście Rotarod...” Te sformułowania są trudne do zrozumienia, na przykład czym są czasy w teście rotarod. Oczywiście można się domyślać, ale dlaczego takie sformułowanie w tym zestawieniu?
- Zdanie „Strategie wyciszania ATXN3 obejmują transfekcję konstruktów RNAi specyficznych dla alleli i niespecyficznych ...” wymaga wyjaśnienia czym jest RNAi i specyficznych dla alleli, ale innego zdania „przy użyciu konstruktów z pominięciem eksonu ukierunkowanych na ekson 9 lub 10” już całkowicie nie rozumiem.
- Cel „Zbadanie możliwych zmian w mózgu na poziomie transkrypcyjnym” Raczej powinno być napisane badanie zmian ilościowych i jakościowych transkryptomu w mózgu..., o czym pisałem już wcześniej. Sama transkrypcja w pracy nie była badana. W związku z tym można mówić jedynie o poziomie RNA lub różnicy poziomów RNA pomiędzy badanymi próbami. Ta uwaga dotyczy całej pracy.
- Nie wiem czym się różni Tabela 4 i 5 – mają ten sam tytuł. Można się jedynie domyślać.
- W pracy pojawiły się liczne skróty myślowe i określenia żargonowe, np. „zmiany poziomu tych genów”, „w korze mózgowej wykryto 4 geny”, „określić fenotyp transkrypcyjny”, „Izolacja mRNA i qPCR ujawniły zmiany w genach”, „naszym celem było dalsze wzmocnienie fenotypu”, „poliQ-ekspandowanej ATXN3 (Ki150) i nieekspandowanej ATXN3 w wieku 2 miesięcy w homozygotycznym zmutowaniu”
- Gdzie indziej jest dziwne zdanie brzmiące „Mysi model SCA3 typu knock-in przejawiający mocno wyrażony fenotypie nie był dostępny do badań”.
- Nazwy genów często są zapisywane normalną czcionką, a powinny być zapisane kursywą. W innym miejscu jest napisane o zmienionych białkach (str. 62), a białka zapisano kursywą.
- Czym jest „Liczba powtórzeń CAG najwyższego allelu w miotach” przedstawiona na Ryc. 11? W B z kolei jest napisane „między modelami mysimi Ki91 i Ki150”, ale na rycinie nie zostały wyraźnie wskazane elektroforegramy dla obu modeli. Opis tej ryciny powinien być bardziej wyczerpujący. Ponadto w kilku innych rycinach zastosowano rozmiar czcionki uniemożliwiający odczytanie z nich ważnych, często kluczowych informacji.

Zawartość ocenianej pracy doktorskiej została już w większości opublikowana w marcu 2023 roku w dobrym, specjalistycznym czasopiśmie z obszaru neurobiologii, jakim jest *Frontiers in Molecular Neurosci.* (IF₂₀₂₂, 6,261; doi.org/10.3389/fnmol.2023.1122308). Mgr Piasecki jest pierwszym autorem tej pracy. Większa część dysertacji została więc już wnikliwie oceniona przez ekspertów z obszaru

tematycznego projektu doktorskiego, chociaż jak rozumiem składając rozprawę manuskrypt był ciągle na etapie oceny recenzenckiej.

Z dogłębnej analizy wszystkich elementów rozprawy doktorskiej jasno wynika, że mgr Piotr Piasecki w sposób dogłębny przestudiował zagadnienia dotyczące: patomechanizmu chorób neurodegeneracyjnych wywołanych ekspansją trójek nukleotydowych CAG, modeli zwierzęcych głównie jednej z tych chorób – SCA3 – oraz podejść terapeutycznych tej choroby. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele badawcze, Doktorant zaplanował logiczny ciąg poszczególnych etapów badań. Pokazał, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać z rozmaitych narzędzi badawczych, interpretując w sposób właściwy uzyskane wyniki (drobne uwagi znajdują się powyżej). Dyskusja obserwacji eksperymentalnych przeprowadzona została w kompleksowy, a zarazem w większości wyważony sposób. Praca doktorska jest solidna i odpowiada na kilka bardzo ważnych pytań biologicznych, ale również uzyskane wyniki wychodzą naprzeciw oczekiwaniom środowiska naukowego wynikającego z niewielkiej liczby dobrze scharakteryzowanych modeli do badań przedklinicznych chorób poliglutaminowych. Stworzony model myszy SCA3 będzie z pewnością wykorzystywany w dalszych badaniach zmierzających do zrozumienia molekularnych podstaw SCA3 oraz testowaniu nowych strategii terapeutycznych. Wskazane powyżej uchybienia, zwłaszcza te językowe, i wątpliwości interpretacyjne nie wpływają w istotny sposób na moją wysoką ocenę niniejszej rozprawy.

Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Piotra Piaseckiego spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami) 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 a 2022 r.). Zapoznając się z rozprawą odczuwałem ogromną satysfakcję zetknięcia się z kompleksowo prowadzonymi badaniami, które doprowadziły do sformułowania kilku wniosków istotnych z poznawczego punktu widzenia. Mgr Piasecki wykazał się więc wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodnił, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Uzyskał istotne wyniki, poprawnie je opisał i wyciągnął zazwyczaj uprawnione wnioski. Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Piotra Piaseckiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Krzysztof Sobczak