

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pana magistra Piotra 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”**

Pan magister Piotr Piasecki, w swojej pracy doktorskiej, podjął się realizacji bardzo ciekawego i ważnego naukowo tematu badawczego, zmierzając do lepszego poznania mechanizmu ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Ta choroba genetyczna, zaliczana do tak zwanych schorzeń poliglutaminowych, wywoływana jest przez mutację w genie *ATXN3*, polegającą na ekspansji trójek nukleotydowych CAG. Mutacja taka powoduje, że w ataksynie-3, produkcie zmienionego genu, występuje zwiększona liczba reszt glutaminy. Mimo iż ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 jest chorobą jednogenową, to istnieje wiele czynników modyfikujących jej przebieg, a molekularne procesy z tym związane są jeszcze niewystarczająco poznane. Stąd dalsze badania w zakresie zrozumienia molekularnych mechanizmów tej choroby są ważne nie tylko z poznawczego punktu widzenia, ale także są konieczne w celu opracowania skutecznych terapii.

Doktorant prowadził badania pod opieką naukową Pana dr hab. Macieja Figla, prof. IChB PAN w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk. Trudno byłoby wyobrazić sobie lepsze miejsce i lepszy zespół badawczy w Polsce w

celu realizacji takiego projektu. Składa się na to zarówno znakomity dorobek promotora tej pracy w zakresie badań nad chorobami poliglutaminowymi, jak też fakt stwarzania znakomitych warunków przez jednostkę badawczą.

Badania swoje Doktorant rozpoczął od analiz transkryptomicznych w mózdku znanego wcześniej modelu mysiego ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, zwanego Ki91. Prace te wykazały, że w transkryptomie chorych myszy nie widać dużych zmian występujących przed pojawieniem się fenotypowych objawów choroby. Możliwe było natomiast wykrycie ewidentnych zmian postsymptomatycznych w poziomach specyficznych transkryptów, które mogą być pomocne w zobrazowaniu kompleksowych zmian pojawiających się w komórkach chorych zwierząt.

W kolejnym etapie badań, Pan magister Piotr Piasecki wyselekcjonował myszy o zwiększonej liczbie powtórzeń trójki nukleotydów CAG w genie *ATXN3*. Ta linia zwierząt została nazwana Ki150 i stanowi model choroby o zaostrozonym fenotypie w porównaniu do Ki91. Doktorant opisał charakterystykę tego modelu, zarówno pod względem cech motorycznych zwierząt jak też zmian biochemicznych w ośrodkowym układzie nerwowym. Następnie określone zostały białka wiążące się ze zmutowaną i normalną formą ataksyny-3 w mózgach myszy. Badania te pozwoliły na lepsze poznanie molekularnego mechanizmu ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, a także na zaproponowanie potencjalnej terapii przy użyciu modulatorów funkcji proteasomu.

Przeprowadzone badania były bardzo interesujące i owocne. Doświadczenia zostały dobrze zaplanowane i przeprowadzone, a na podkreślenie zasługuje opanowanie przez Doktoranta wielu nowoczesnych metod badawczych. Interpretacja rezultatów jest poprawna a wysnuwane wnioski i proponowane hipotezy są ciekawe. Pracę doktorską Pana magistra Piotra Piaseckiego oceniam wysoko pod względem merytorycznym. Wniosła ona duży wkład w lepsze zrozumienie patomechanizmu ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Uzyskany nowy, mysi model choroby (Ki150) okazał się bardzo użyteczny w badaniach nad mechanizmami choroby oraz w

poszukiwaniach nowych leków. Niewątpliwie spełnione zostały zatem wymagania merytoryczne do uzyskania stopnia doktora.

Czytając rozprawę doktorską Pana magistra Piotra Piaseckiego nasunęły mi się następujące pytania:

1. W rozdziale 3.15 opisana jest metoda przeprowadzania analiz RNAseq. Nie zostały jednak podane pewne istotne parametry, takie jak liczba uzyskanych odczytów czy wielkość uzyskanej bazy danych. Proszę o ich przedstawienie podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.
2. Jaką metodę zastosowano w ilościowej analizie porównania efektywności ekspresji genów z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym po działaniu odwrotną transkryptazą i uzyskaniu cDNA?
3. W rozdziale 4.2.1 Doktorant stwierdził, że wykonał badania metodami RNAseq i qPCR w celu „określenia czy zmiany transkrypcyjne są bezpośrednią przyczyną patogenezы SCA3”. Moim zdaniem, w ten sposób nie jest możliwe określenie czy takie zmiany, jeśli zostaną zaobserwowane, są **bezpośrednią** przyczyną choroby, czy też są wtórnym skutkiem innych procesów albo pierwotnych zmian patogennych. Proszę o komentarz i stanowisko Doktoranta w tej sprawie.
4. Na str. 58 czytamy: „... zmiany splicingowe w 6 genach w korze mózgowej, natomiast w korze mózgowej wykryto 4 geny.” Bardzo proszę o wyjaśnienie, gdyż ten opis jest zupełnie niejasny. Autor powołuje się na Tabelę 6, ale tam z kolei jest wymienionych 7 genów o zmienionych wariantach splicingowych w mózdku oraz 4 w korze mózgowej.
5. Autor wskazuje, że wyniki pokazane na Rycinie 15 świadczą o nadmiernej aktywacji mikrogleju u myszy Ki150. Nie wykonano jednak żadnej analizy ilościowej danych przedstawionych na tej rycinie. Proszę o komentarz lub zademonstrowanie danych ilościowych.



6. W pracy zaproponowano ciekawą hipotezę, że: „indukcja proteofagii może przywrócić funkcjonalną aktywność proteasomu, poprzez odnawianie w komórce, a ponieważ zmutowana ATXN3 jest związana z protasomem, można spodziewać się obniżenia poziomu samego zmutowanego białka”. Tłumaczyłoby to mechanizm działania bortezomibu w doświadczeniach opisanych w tej pracy. Mam w związku z tym pytanie do Doktoranta, czy uważa, że w takim razie zastosowanie jakiegoś stymulatora autofagii mogłoby przynieść podobne efekty jak użycie inhibitora proteasomu?

Oceniając stronę redakcyjną pracy, mam z kolei kilka uwag, ale też pytań:

1. W bardzo wielu polskich tekstach spotyka się obecnie duży błąd logiczny, który jest także obecny w ocenianej rozprawie (str. 15 i 27). Jest to sformułowanie „i/lub”. W języku polskim określenie to nie ma żadnego logicznego sensu. Koniunkcja „i” oznacza konieczność spełnienia obu z podanych w zdaniu warunków, zaś alternatywa nierozłączna „lub” oznacza, że może być spełniony jeden warunek bądź oba. Zatem określenie „i/lub” nie ma sensu, gdyż „i” zawiera się już w „lub”. Można by co prawda użyć określenia „i/albo”, czyli połączenia koniunkcji i alternatywy rozłącznej (tzn. spełnienia jednego i tylko jednego z dwóch warunków), ale nie ma takiej potrzeby, gdyż „i/albo” oznacza dokładnie to samo co „lub”. Prawdopodobnie określenie „i/lub” wzięło się bezpośrednio z prostego, ale błędnego, tłumaczenia z języka angielskiego zwrotu „and/or”. Jednak w języku angielskim nie ma odpowiednika słowa „lub”. Słowo „and” jest odpowiednikiem „i”, zaś słowo „or” jest odpowiednikiem „albo”. Zatem aby po angielsku powiedzieć „lub” trzeba użyć określenia „and/or”, natomiast nie ma takiej konieczności w języku polskim, gdyż istnieje słowo „lub”.

2. Na str. 17 Doktorant pisze: „Struktura krystalograficzna domeny...”. Krystalografia to metoda badań związków chemicznych, natomiast struktura kryształu, to struktura krystaliczna (nie krystalograficzna). Tak samo jak mówimy o sytuacji epidemicznej, a nie epidemiologicznej.
3. W pracy powtarzają się numery niektórych rozdziałów. Na przykład rozdziały oznaczone jako 1.4.1, 1.4.2. i 1.4.3. występują odpowiednio na stronach 17 i 21, 19 i 22, 20 i 22, natomiast rozdziały z każdej takiej pary mają inne tytuły.
4. Należy pamiętać, że ekspresji ulegają geny, a nie białka (np. str. 22, 23).
5. Na str. 23 Doktorant pisze: „... kluczowe białka autofagii (...) są znacznie zwiększone...”. Byłoby to fascynujące odkrycie, jednak nigdzie nie znalazłem poparcia takiego twierdzenia, ani w literaturze (w tym w cytowanej pracy „Sittler et al. 2018”), ani nie byłem w stanie zaobserwować tego we własnych doświadczeniach dotyczących autofagii. Nigdzie bowiem nie było widać aby cząsteczki białek związanych z autofagią powiększały się w pewnych warunkach. Oczywiście pozwoliłem sobie zażartować, jednak zwracam uwagę na konieczność używania precyzyjnych sformułowań w tekstach naukowych oraz unikanie żargonu, aby nie zostać źle zrozumianym. Rzecz jasna chodzi o zwiększanie się poziomów odpowiednich białek, a nie o zwiększanie białek jako takich, ale z przytoczonego cytatu zupełnie to nie wynika.
6. Co Autor miał na myśli pisząc „ekspandowany” o zmienionej formie białka ATXN3 (str. 28)? Termin „ekspandowane” używany jest w pracach z zakresu technologii żywności i żywienia i oznacza produkty (najczęściej ziarna), które dzięki obróbce termicznej i ciśnieniowej powiększają swoją bazową objętość. Rozumiem, że w tym przypadku Doktorantowi nie chodziło o zwiększenie objętości białka pod wpływem

- obróbki termicznej i ciśnieniowej? Termin ten Autor zastosował również w legendzie do Ryciny 12 (str. 67).
7. Skrót SARA nie jest wyjaśniony (str. 29).
 8. Dlaczego w Tabeli 1, Tabeli 7 i Tabeli 8 stosowany jest język angielski a nie polski?
 9. Dlaczego w Tabeli 4 używane są angielskie nazwy (w tytułach kolumn) oraz angielski (a nie polski) zapis wartości ułamków dziesiętnych (z kropką po wartości liczby całkowitej a nie z przecinkiem)?
 10. Czym różni się Tabela 4 od Tabeli 5? Legendy i układ obu tabel są identyczne. Dlaczego zatem zaprezentowane dane nie zostały ujęte w jednej tabeli?
 11. Co oznacza „zapalenie mysiego modelu SCA3 Ki150” (str. 70, tytuł rozdziału 4.3.4)?
 12. Na Rycinie 19 nazwy białek są zupełnie nieczytelne. Podobnie jak wszystkie użyte napisy na panelach B, D i F na Rycinie 20. Przy tak małej czcionce analiza przedstawionych wyników badań jest zupełnie niemożliwa.
 13. W całej rozprawie występuje wiele błędów literowych i niepoprawnych sformułowań (niewłaściwe odmiany, tryby, czasy itp.). Odnosi się wrażenie jakby praca pisana była w pośpiechu i nie skorygowana od strony redakcyjnej przed wydrukowaniem. Nie wpływa to co prawda na wartość merytoryczną zamieszczonych w niej wyników i wniosków, niemniej nieco psuje efekt całości. Zachęcam zatem Doktoranta do przywiązywania w przyszłości większej wagi do poprawnego redagowania prac naukowych, tak aby czytelnicy (w tym recenzenci) nie mieli wątpliwości co do zaprezentowanego tekstu oraz mogli bez problemu analizować zobrazowane wyniki badań.

W podsumowaniu uważam, że Pan mgr Piotr Piasecki przedstawił bardzo ciekawą pracę naukową. Wykazał się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych badań oraz umiejętnościami prowadzenia prac naukowych i rozwiązywania problemów naukowych. Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późniejszymi zmianami), ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 ze późniejszymi zmianami) oraz w uchwale Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk nr 128/2022 z dnia 24 października 2022 r. (uchwała określająca sposób postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii o dopuszczenie Pana magistra Piotra Piaseckiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn