



Dr hab. Małgorzata Borowiak, prof. UAM

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PANI MGR INŻ. KAROLINY ŚWITOŃAKIEJ-KURKOWSKIEJ

ZATYTUŁOWANEJ:

„Identyfikacja komórkowych i molekularnych zaburzeń wczesnego rozwoju mózgu w chorobie Huntingtona”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej została wykonana pod przewodnictwem Pana prof. dr hab. Macieja Figła, prof. IChB PAN w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii w Poznaniu.

Pani mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska uzyskała w styczniu 2016r tytułu inżyniera biotechnologii oraz w czerwcu 2017r tytuł magistra diagnostyki medycznej na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Kandydatka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora, odbyła studia doktoranckie w Instytucie Chemii Bioorganicznej, PAN w latach 2017-2022, a obecnie jest zatrudniona na stanowisku „Research developer” w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej.

Formalny opis rozprawy

Oceniana rozprawa obejmuje opublikowane wyniki zawarte w dwóch artykułach naukowych, eksperymentalny i praca przeglądowa oraz wyniki jeszcze nieopublikowane, zatytułowane „Fuzyjne organoidy mózgowie odzwierciedlające populacje komórkowe rozwijającego się przodomózgowia, prezentują wczesne zaburzenia neurorozwojowe młodzieńczej postaci HD”. Tekst jest spisany w języku polskim i rozpoczyna się obszernym streszczeniem w tym języku, a także odpowiadającym mu podsumowaniem w języku angielskim. Następny rozdział stanowi Wprowadzenie, który sprawnie przybliży wprowadza czytelnika do tematu badawczego rozprawy. Mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska, po przedstawieniu celów pracy, prezentuje uzyskane wyniki, zwięźle opisuje materiały i metody zastosowane w ramach badań i analiz. Następnie prowadzi dyskusję na ich temat, a także przedstawia podsumowanie, perspektywy oraz bibliografię związaną z badaniem o tytule:



„Identyfikacja komórkowych i molekularnych zaburzeń wczesnego rozwoju mózgu w chorobie Huntingtona.”

Ostatnią część rozprawy stanowią dwa artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie *Frontiers in Cellular Neuroscience* (2019) oraz *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2021). W obu tych publikacjach mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska jest pierwszy autorem, a załączone oświadczenia potwierdzają jej wiodący udział w przeprowadzeniu badań opisanych we wspomnianych artykułach naukowych.

Warto podkreślić, że mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska została oznaczona Brązowym Krzyżem Zasługi za działalność naukowo-badawczą w zakresie testów na SARS-CoV2 w ramach Wirusowej Grupy Wsparcia IChB PAN. Ponadto, Pani Karolina brała aktywny udział w pięciu konferencjach, w tym wygłosiła prezentacje ustną.

Merytoryczna ocena rozprawy

Rozdział „Wstęp” stanowi solidne wprowadzenie czytelnika w tematykę przeprowadzonych badań. Doktorantka wykazała się w nim głęboką znajomością literatury związanej z przedmiotem badań, jednocześnie umiejętnie unikając nadmiernego rozbudowania tego fragmentu. Autorka zdołała skutecznie skondensować istotne informacje, co przyczynia się do klarowności prezentowanych treści. Warto zauważyć, że liczący 15 stron wstęp jest starannie zredagowany, a tekst napisany jest poprawnie, nie zawiera istotnych błędów językowych. Rzeczą, której mi brakowało to są ryciny, stanowiące graficzne prezentacje tematu.

Głównym celem pracy było opisanie wczesnych zmian komórkowych i molekularnych w rozwijającym się układzie nerwowym potencjalnie prowadzących do rozwoju młodzieńczej postaci choroby Huntingtona. Uważam, że cel ten został osiągnięty w celu zadawalającym.

Wyniki: Prace badawcze zostały skonstruowane w oparciu o kilka modeli badawczych: komórki iPSC pochodzących od dwóch pacjentów z młodzieńczą formą HD oraz osób zdrowych, analizy *in silico*, fuzyjnych organoidów wyprowadzonych od komórek pacjentów i kontrolnych i zwierzęcy model HD.

Choroby neurodegeneracyjne obejmują szereg jednostek chorobowych czy zaburzeń neurologicznych, których wspólnym mianownikiem jest utarta neuronów w centralnym lub obwodowym układzie nerwowym, co prowadzi do zaburzeń szlaków komunikacji w mózgu i upośledzenia kongnitywno-behawioralnego oraz motoryki, w porównaniu do grupy kontrolnej. Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za rozwój choroby nie są dobrze scharakteryzowane co przekłada się na brak skutecznego leczenia. W swojej pracy, Doktorantka skupiła się na chorobach polyQ, wynikających z długich ciągów powtórzeń poliglutaminowych dotkniętych chorobą genach w przypadku HD w HTT.

Związek między chorobą Huntingtona a defektami w rozwoju neuronalnym jest dobrze ugruntowany. Gen HTT, ulega ekspresji przez cały okres rozwoju neuronalnego i odgrywa ważną rolę w neurogeniezie (prolifracji komórek pnia neuronów, migracji i różnicowaniu neuronów. Patogeniczne rozszerzenia powtórzenia CAG w genie HTT powodują kumulowanie się białka huntingtyna w agregatach, które zakłócają normalne funkcje komórkowe. Ponadto delecja genu *htt* jest śmiertelna u myszy na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego. Zrozumienie mechanizmów, w których patogeniczne agregaty HTT zakłócają normalny rozwój neuronalny, jest kluczowe dla opracowania nowych strategii terapeutycznych w chorobie Huntingtona.

Pani mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska skupiła się na wcześniejszej i zwykle cięższej formie HD i pozyskała linie iPSC od dwóch takich pacjentów celem identyfikacji zmian transkryptomycznych i proteomicznych w oparciu o bezstronne analizy wysokoprzepustowe. Geny/białka różnicujące zostały następnie porównane z opublikowanymi przez inne zespoły listami zmienionych cząsteczek w iPSC pochodzących od osób z późną formą HD i również komórkach macierzystych neuronalnych (NSC) czy neuronach. Doktorantka poszukiwała genów zmienionych we wszystkich komórkach mając na celu postawienie hipotez dotyczących uniwersalnych patomechanizmów HD. Myślę, że jest to trudne zadanie, ponieważ patomechanizmy mogą być specyficzne dla różnych typów komórek czy form choroby. W związku z tym mam pytanie *czy zostały podjęte próby eksperymentalne, żeby zawęzić te analizy do danego typu komórek lub etapy rozwoju neuronalnego? Czy Doktorantka różnicowała linie 71Q i 109Q do komórek neuronalnych? Jedna z ścieżek zmieniona we komórkach iPSC z JOHD była ścieżka p53. Zmiany te były obserwowane na poziomie mRNA i białka. Czy zaobserwowano biologiczne konsekwencje zmienione ścieżki p53 np. różnice w charakterystyce wzrostu linii iPSC?*

W drugiej części pracy, zostały przedstawione nieopublikowane jeszcze wyniki. Opis tej części wzbogacony jest rysunkami wprowadzającym w szczegóły eksperymentalne- co pozytywnie wpływa na czytelność przekazu. Pani mg inż. Karolina Świtońska-Kurkowska wykorzystwała w tej części pracy dwa zaawansowane modele: *in vitro*, ludzki model HD oparty na różnicowaniu 3 linii iPSC pochodzących od osób z JOHD i stworzeniu fuzyjnych organoidów mózgowych oraz model *in vivo*, transgenicznego myszy z HD. Wyprowadzenie organoidów mózgowych nie jest prostym zadaniem, jest czasochłonne, wieloetapowe i wymaga zaawansowanej wiedzy i umiejętności pracy z komórkami iPSC. Pani Karolina sprawie udało się uzyskać organoidy po 60-dniowym procesem różnicowania, które zostało dobrze scharakteryzowane na poziomie mRNA i białek, pod względem obecności pożądaných markerów specyficznych dla różnych etapów neurorozwoju. Następnie doktorantka w oparciu o ogólnodostępne dane sekwencjonowanie RNA na poziomie pojedynczej komórki wyselekcjonowała markery poszczególnych struktur mózgowy i sprawdziła ich poziom ekspresji mRNA i syntezy białka w organoidach kontrolnych i pochodzących od pacjentów JOHD. Jeden z genów o zmienionej ekspresji był TTR, który już ulega specyficznej ekspresji w komórkach nabłonka spotu naczyniowego oraz i ulega hyperaktywaniu w mysim modelu HD. W związku z powyższym Doktorantka skupiła swoje dalsze analizy na TTR. Dla mnie ciekawa wstępną obserwacją były zmiany w ekspresji genów związanych z

cytoszkieletem (który jest mniej łączony z HD) czy stresem oksydacyjnym. Czy Doktorantka mogłaby ze szczegółami uzasadnić wybór TTR do dalszych badań, a nie np. ATOX1 czy SMARCA4? Ponadto, dlaczego do dalszych badań wykorzystano mozaikowe organoidy fuzyjne jako model HD? Tych informacji zabrakło w rozprawie. Czy została przebadana ekspresja TTR i innych zidentyfikowanych kandydatów w tkankach, głównie mózgu, myszy?

Podsumowanie i perspektywy zawiera bardzo zwięźle omówienie uzyskanych najważniejszych obserwacji i wyników oraz dość ogólny. Brakowało mi szerszej dyskusji, porównanie ciekawych wyników uzyskanych w tej pracy w kontekście wyników innych zespołów, prób wyjaśnienia mechanizmów molekularnych w przebadanych komórkach HD, czy wskazania ogólnych czy specyficznych ograniczeń przeprowadzonych badań, różne są nieodłączną częścią wszystkich naszych badań.

Podjęta tematyka jest niezmiernie ważna, a wybrane modele oraz szczegóły eksperymentalne są różnorodne, technologicznie zaawansowane i odpowiednio dobrane, co pozwala osiągnąć istotne i ciekawe wyniki. Byłoby niezmiernie ważne, moim zdaniem, aby badani a te kontynuować i empirycznie przetestować potencjalne mechanizmy molekularne, wykorzystując te dwa zaawansowane, komplementarne systemy, ludzki *in vitro* i myszy *in vivo*. Cała praca została napisana sprawnie i z dużym zainteresowaniem ją przeczytałam.

Uwagi edytorskie, np.:

- Jakość niektórych zdjęć immunobarwień fluorescencyjnych pozwala w pełni ocenić wyników
- Brak skali na wielu zdjęciach mikroskopowych

Moja ogólna ocena przeprowadzonych badań i całej rozprawy doktorskiej jest bardzo pozytywna. Eksperymenty zostały zasadniczo poprawnie zaplanowane, wykorzystano więcej niż 1 linię iPSC kontrolne i od pacjentów, uzyskane wyniki zostały adekwatnie zanalizowane. Doktorantka z łatwością zinterpretowała rezultaty swoich badań. Jednakże, szkoda, że nie zawarła szerszej analizy swoich wyników w odniesieniu do prac innych zespołów. Podsumowując, rozprawę doktorską mgr inż. Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej **oceniam pozytywnie**. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

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 56/2023/Internet z



dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Dr hab. Małgorzata Borowiak