

Warszawa, 22.12.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Świtońskiej - Kurkowskiej na stopień naukowy
doktora nauk biologicznych w dyscyplinie: nauki biologiczne**

Tematem rozprawy doktorskiej jest „Identyfikacja komórkowych i molekularnych zaburzeń wczesnego rozwoju mózgu w chorobie Huntingtona”. Temat ten wpisuje się precyzyjnie w zainteresowania badawcze promotora Doktorantki Pana dr hab. Macieja Figla prof. IChB PAN, Kierownika Zakładu Neurobiologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, który od lat prowadzi badania nad mechanizmami neurodegeneracji w modelowych chorobach poliQ. Mechanizmy molekularne chorób neurodegeneracyjnych nie są do końca poznane, pomimo licznie prowadzonych badań na całym świecie, a proponowane terapie działają zwykle objawowo. Doktorantka podjęła się trudnego zadania wyjaśnienia nieznanych dotąd zmian molekularnych leżących u podstaw zaburzeń rozwojowych młodzieńczej postaci choroby Huntingtona (JOHD). W podjętych badaniach wykorzystuje najnowsze osiągnięcia technik molekularnych i obliczeniowo-bioinformatycznych, a także postęp w technologii komórek macierzystych i hodowli trójwymiarowych struktur komórkowych zwanych organoidami mózgu. Technologie te umożliwiają modelowanie schorzeń neurologicznych *in vitro*, dlatego badania Doktorantki są niezwykle ważne i odpowiadają na zapotrzebowanie społeczne.

Recenzowana rozprawa to obszerne opracowanie hybrydowe, w skład którego wchodzi dwie tematycznie związane prace (oryginalna i przeglądowa), opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JRC (Frontiers in Cellular Neuroscience (IF_{Sy}=4.95), Frontiers in Cell and Development (IF_{Sy}=6.1)) oraz napisane w języku polskim, omówienie tych prac. Ponadto rozprawa zawiera szczegółowy opis wyników jeszcze nieopublikowanych, z manuskryptu pracy oryginalnej, zatytułowanej: „Fuzyjne organoidy mózgowie odzwierciedlające populacje komórkowe rozwijającego się przodomózgowia, prezentują wczesne zaburzenia neurorozwojowe młodzieńczej postaci HD”. Konstrukcja części poprzedzającej dołączone publikacje, zawarta na 92 stronach maszynopisu, jest bardzo czytelna, choć specyficzna dla opracowania hybrydowego. „Streszczenia” w języku polskim i angielskim, w sposób typowy poprzedzają „Wprowadzenie” i jasno sformułowany „Cel pracy”, natomiast rozdział „Wyniki” nietypowo poprzedza opisy „Materiałów i Metod”, a część opisową rozprawy kończy rozdział „Podsumowanie i Perspektywy” oraz bogata „Bibliografia”. Brak rozdziału „Dyskusja” w żadnym razie nie umniejsza walorów merytorycznych pracy, ponieważ prezentowane wyniki są obszernie omawiane w kontekście dostępnej wiedzy cytowanej bibliografii, a wysuwane wnioski są celne. „Wykaz stosowanych skrótów” występuje zaraz po rozdziale „Spis treści” i znakomicie ułatwia recenzję pracy. W rozdziale „Załączniki” znajdujemy oświadczenia o wkładzie pracy Kandydatki w publikacje zawarte w rozprawie doktorskiej, jak również same publikacje. Kandydatka jest pierwszym autorem i głównym wykonawcą w tych publikacjach.

Oceniana rozprawa doktorska jest przykładem eleganckiej i logicznie skonstruowanej dysertacji. Tekst jest napisany poprawną i ładną polszczyzną, jest zrozumiały i dobrze zredagowany, dlatego czytałam go z dużą przyjemnością. Byłam pod wrażeniem jasności formułowania myśli i staranności edycyjnej całej pracy. Z obowiązku recenzenta muszę jednak zwrócić uwagę na nieliczne błędy. Drobne zastrzeżenia natury semantycznej dotyczą wymiennego stosowania słów „ilość” i „liczba” lub zbyt bezpośredniego tłumaczenia profesjonalnej nazwy angielskiej „embryoid body”, jako „ciało” zarodkowe, zamiast kula zarodkowa, a także określenie Rycin jako „Rysunki” oraz tanocytów jako „tanocyty”. Znalazły się jednak w tekście dysertacji zwroty/wyrażenia, które merytorycznie mają inne znaczenie niż zamierzone. Należą do nich:

„neuralne” komórki macierzyste, zamiast neuralne komórki macierzyste, „immunobarwienie” zamiast immunoznakowanie lub znakowanie immunofluorescencyjne oraz zastosowanie pojęcia „inżynieria tkankowa” do systemu hodowli organoidów. Będę wdzięczna za wyjaśnienie jaką rolę pełnią tanycyty w barierze krew/mózg oraz dlaczego komórki macierzyste OUN noszą nazwę neuronalne, a nie neuralne. Proszę również o wyjaśnienie roli inżynierii tkankowej w tworzeniu i hodowli organoidów.

„Wprowadzenie” przybliży temat rozprawy. To ciekawy przegląd wiedzy dotyczący patogenezы chorób neurodegeneracyjnych o podłożu poliglutaminowym (polyQ), tj. związanych z obecnością powtórzeń trójki nukleotydów CAG w określonych genach i produkcją toksycznych białek zawierających nadmiernie wydłużony ciąg poliglutamin. Przykładem takiego schorzenia jest choroba Huntingtona (HD), spowodowana mutacją w pierwszym egzonie genu **huntingtyna (HTT)**, a jej młodzieńcza postać - **Juvenile Onset Huntington's Disease (JOHD)**, charakteryzuje się szczególnie długimi ciągami powtórzeń kodonu CAG w genie *HTT*. Doktorantka analizuje patogenezę molekularną (wpływ zmutowanego genu *HTT* na regulację różnych procesów biologicznych i szlaków molekularnych zaburzonych w komórkach HD) oraz zmiany makroskopowe w mózgu, wskazując na śmierć neuronów głównie w obrębie prążkowiec i kory mózgu, ale także zaburzenia w komunikacji między tymi strukturami anatomicznymi spowodowane głównie dysfunkcją migracji interneuronów gabaergicznych. Doktorantka wskazuje również na zmiany występujące w tej chorobie w okresie wczesnego rozwoju mózgu, jednocześnie zaznaczając, że **aspekt neurorozwojowy tej patologii jest słabo poznany**, natomiast szybki postęp i dostępność nowoczesnych technik komórkowych, molekularnych i bioinformatycznych otwiera nowe możliwości badawcze. Z tych możliwości Kandydatka skorzystała w pełni proponując zastosowanie w swoich badaniach komórek ludzkich iPSC, tj. indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, które wykazują zdolność do różnicowania w dowolną komórkę organizmu, ale również samoorganizacji w trójwymiarowe struktury zwane organoidami. Proces rozwoju organoidów mózgu z ludzkich komórek iPSC odzwierciedla w hodowli *in vitro* najwcześniejsze etapy rozwoju mózgu *in vivo*, dlatego jest to niezwykle cenny, **niekontrowersyjny etycznie i jedynie dostępny *in vitro* model do badań rozwojowych mózgu człowieka.**

Nadrzędnym celem prowadzonych przez Doktorantkę badań, była identyfikacja molekularnych i komórkowych zaburzeń rozwoju mózgu w młodzieńczej postaci choroby Huntingtona (JOHD). Dlatego, stosując dostępne komercyjnie linie komórek iPSC od zdrowych dawców, kontrolne (iPSC 17/18Q i 21Q), oraz od dawców z mutacją typową dla młodzieńczej postaci HD (iPSC 71Q i 109Q) Kandydatka wygenerowała *in vitro* modele rozwojowe młodzieńczej postaci HD zarówno w warunkach hodowli 2D, jak i postaci organoidów 3D. Cele szczegółowe postawione Doktorantkę to (cytuję):

1. „Identyfikacja zaburzonych procesów neurorozwojowych w młodzieńczej postaci choroby Huntingtona, jeszcze przed etapem rozwoju mózgu, na poziomie linii komórek macierzystych iPSC. Cel ten zrealizowałam poprzez analizę wyników sekwencjonowania RNA (RNA-seq), wykonanie wysokoprzepustowej analizy proteomicznej (MS) oraz liczne analizy bioinformatyczne genów i białek wspólnie i różnicująco zmienionych w liniach komórek iPSC 71Q i 109Q, w porównaniu do linii kontrolnych.
2. Identyfikacja potencjalnych, neurorozwojowych procesów molekularnych zaburzonych w HD na wielu etapach rozwoju i w dorosłym mózgu oraz identyfikacja wspólnego mianownika neurorozwojowych chorób polyQ. Cel ten zrealizowałam dzięki

- zgromadzeniu szeregu dostępnych literaturowo danych eksperymentalnych i przeprowadzeniu licznych bioinformatycznych analiz porównawczych.
3. Stworzenie modelu umożliwiającego analizę regionów mózgu kluczowych dla neuropatologii HD. Cel ten zrealizowałam dzięki wygenerowaniu z komórek iPSC fuzyjnych organoidów mózgowych, zawierających populacje komórkowe rozwijającej się kory mózgowej oraz prążkowie.
 4. Identyfikacja fenotypów neurorozwojowych JOHD obecnych na wczesnych etapach kształtującego się mózgu. Cel ten zrealizowałam poprzez analizy transkryptomyczne (qPCR) i immunofluorescencyjne uzyskanych organoidów mózgowych, oraz walidację wybranych wyników na materiale biologicznym pochodzącym z mysiego modelu HD (Hu128Q/21Q).”

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka omawia otrzymane dane eksperymentalne w pierwszej kolejności odnosząc się do dwóch opublikowanych prac, a następnie przedstawiając wyniki nieopublikowane. Omówienie wyników rozpoczyna od prezentacji koncepcji i schematycznego przebiegu badań zawartych w całej rozprawie doktorskiej (Rycina 1), co w sposób znaczący ułatwia analizę wyników i zastosowanych metod. Dane z dwóch prac opublikowanych dotyczyły eksperymentów wysokoprzepustowych (transkryptomicznych oraz proteomicznych) przeprowadzonych na liniach komórkowych JOHD iPSC oraz kontrolnych, oraz ich analizy bioinformatycznej. Do analizy *in silico*, poza wynikami otrzymanymi z modeli komórkowych użyto danych z opracowań modeli zwierzęcych HD i innych chorób polyQ. Druga część pracy, na którą składają się wyniki nieopublikowane, to omówienie części doświadczalnej z zastosowaniem organoidów mózgu, specyficznych dla przodomózgowia części dorsalnej (grzbietowej) i ventralnej (brzuszej), a następnie połączenie ich w struktury nazwane w dysertacji „fuzyjnymi organoidami mózgowymi”. W strukturach tych przeprowadzono analizę ekspresji genów na poziomie RNA (qPCR) i białka (IF oraz WB). Dodatkowo, niektóre wyniki z części nieopublikowanej były walidowane w modelu mysim HD, Hu^{128Q/21Q}.

Nawiązując do nomenklatury związanej z organoidami mózgu: według porozumienia wiodących na świecie badaczy w tej dziedzinie (Pasca et al. Nature. 2022 Sep;609(7929):907-910.doi:10.1038/s41586-022-05219-6) przyjęto obowiązującą definicję organoidów mózgu oraz nomenklaturę, która połączone organoidy określa jako „asembloidy” (ang. assembloids). W tym przypadku stosunkowo nowa i bardzo szybko rozwijająca się dziedzina badań nad organoidami otworzyła przestrzeń, a nawet wymusza wprowadzanie polskiej nomenklatury specjalistycznej. Ciekawi mnie opinia Doktorantki na ten temat – czy rzeczywiście powinniśmy tworzyć odrębne polskie terminy, czy raczej adoptować terminy angielskie.

W pracy oryginalnej zatytułowanej **“Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling” (Świtońska et al., 2019)** opisano wczesne zmiany molekularne w liniach komórek HD iPSC pochodzących od dwóch różnych pacjentów z młodzieńczą formą choroby Huntingtona. Wielkoskalowa analiza zmian w liniach JOHD iPSC w porównaniu z liniami kontrolnymi na poziomie transkryptów i białek wyodrębniła trzy grupy genów znamienne różnie w liniach JOHD w stosunku do kontroli. Późniejsza walidacja metodą PCR w czasie rzeczywistym potwierdziła spójność deregulacji wśród 14 z 17 genów, które dotyczyły wzrostu ekspresji czynników transkrypcyjnych i histonów (np. *PIWIL2*, *HIST1H3C*, *FAM65B*, *PDGFB* linia 71Q) lub obniżenia ekspresji genów związanych głównie z apoptozą (np. *TP53*, *PHLDA3*, *TRIM22*, linia 109Q). Niezwykle cenne do wyciągnięcia właściwych

wniosków o znaczeniu funkcjonalnym obserwowanych zmian jest porównanie analizy proteomicznej i transkryptomycznej. Okazało się, że w komórkach JOHD tylko dwa białka: TP53 związane ze szlakiem apoptozy i odpowiedzią na uszkodzenia DNA oraz ZFP30 - czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za wiązanie DNA, wykazały taki sam kierunek zmian jak kodujące je geny.

Analiza bioinformatyczna *in silico*, którą Doktorantka przeprowadziła dla najistotniej deregulowanych genów w liniach JOHD, miała na celu identyfikację zaburzonych procesów biologicznych, ścieżek molekularnych w komórkach JOHD oraz sieci powiązań między tymi białkami. Deregulowane wspólne ścieżki przekazywania sygnału w badanych liniach JOHD to: wiązanie jonów metali w komórce, produkcji cytokin, aktywność aktywatora GTP-azy oraz transport jonów i regulacja odpowiedzi immunologicznych w komórce. Dwa białka PARK2 (związane z rozwojem OUN) oraz PIK3R (bezpośrednio reagujący z białkiem HTT) tworzą podobne sieci interakcji. W szczególnie cięższej postaci JOHD (109 powtórzeń poliglutamin) kluczowe okazało się białko TP53, które wykazywało największą liczbą interakcji włączając w to regulację proliferacji, procesach związanych z apoptozą, kaskadę sygnałową p53 i odpowiedź komórkową na uszkodzenia DNA. Ciekawym podejściem metodycznym w tej pracy było przeprowadzenie metaanalizy, porównującej badane linie z wynikami analiz wysokoprzepustowych komórek ESC, iPSC, NSC i neuronów: geny pokrywające się pomiędzy analizami związane są z procesami molekularnymi wpisującymi się w drogi przekazywania sygnału takie jak: TGFβ (TGFβ1) i p53 (CDKN1A, GADD45B), gospodarka wapniowa (CALCRL, ANXA2) oraz adhezja międzykomórkowa (ANK1). Otrzymane wyniki identyfikują zaburzenia związane z patologią HD w liniach HDiPSC co potwierdza założenia Doktorantki o wczesnej neurorozwojowej komponente patologii HD.

W drugiej ocenianej publikacji **“Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data”** (Świtońska-Kurkowska et al., 2021), która jest pracą przeglądową, Doktorantka porównywała szereg dostępnych danych transkryptomicznych i proteomicznych uzyskanych nie tylko w wyniku analiz modeli HD, ale również pozostałych chorób polyQ (AOHD, JOHD, SCA1, SCA2, SCA7, SCA17, DRPLA i SBMA). W poszukiwaniu wspólnego neurorozwojowego mianownika tych chorób doktorantka analizowała również modele mysie chorób polyQ. Zidentyfikowano geny i białka wspólnie deregulowanych w różnych chorobach polyQ, do których należał m.in. *Grid2ip*, gen kodujący białko synaptyczne w komórkach Purkiniego. Zidentyfikowane podczas przeprowadzonej przez Doktorantkę analizy podobieństwa tych schorzeń, to nieprawidłowości w procesach wzrostu i wydłużania aksonów, synaptogeneza, morfogeneza zarodka i tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej. Porównanie wyników proteomicznych ludzkich z mysimi wyodrębniły białka o podobnym kierunku zmian, które zaangażowane są w takie procesy jak: dojrzewanie neuronów, transport jonów i pęcherzyków, funkcjonowanie synaps oraz w procesy kataboliczne.

Porównanie dorosłej i młodzieńczej formy HD (AOHD i JOHD), doprowadziło do wyodrębnienia szeregu genów (oraz białek) deregulowanych w neuronach obu postaci tej choroby, które głównie dotyczyły procesów różnicowania interneuronów GABA-ergicznych. Tłumaczy to patogenezę HD wskazując na zaburzenia równowagi między pobudzającymi a hamującymi szlakami sygnałowymi.

Druga część dysertacji, w której zawarte są dane niepublikowane, to poszukiwania punktów terapeutycznego uchwytu dla chorych z JOHD z zastosowaniem badań *in vitro* w

strukturach 3D zwanych organoidami mózgu. To interesujące omówienie niepublikowanych wyników zostało zilustrowane 10-cioma starannie przygotowanymi rycinami opatrzonymi czytelnymi merytorycznie opisami. O wartości organoidów jako jedynie dostępnego *in vitro* modelu wczesnego rozwoju mózgu człowieka wspomniałam już na wstępie tej recenzji.

Choroba Huntingtona strukturalnie lokalizuje się w przodomózgowiu - dochodzi do zaniku głowy jądra ogoniastego (część prążkowiec), powiększenia komór bocznych i zaniku części kory mózgu, co ściśle wiąże się z lokalizacją ognisk degeneracji neuronów w tych strukturach. Co więcej, obserwuje się zaburzoną komunikację między tymi obszarami mózgu z udziałem inhibitorowych interneuronów GABA-ergicznymi. Dlatego słusznym podejściem metodycznym, który wybrała Doktorantka, było zastosowanie wcześniej analizowanych linii iPSC w celu otrzymania organoidów odzwierciedlających budowę i funkcję kory mózgu (grzbietowa część przodomózgowia - *dorsal*) oraz prążkowiec (brzuszną część przodomózgowia - *ventral*). Kolejnym krokiem było połączenie tych struktur (fuzja) i badanie ich wzajemnych interakcji. Po 60 dniach rozwoju, w organoidach fuzyjnych i organoidach ukierunkowanych grzbietowych i brzusznych (*dorsal* i *ventral*) przodomózgowia, zanalizowano morfologię struktur 3D i ekspresję wybranych genów oraz białek. Wśród nich znalazły się markery typowe dla neuronów hamujących, pobudzających, nitrenergicznych i progenitorów neuronalnych, a także nie-neuronalnych populacji komórkowych: astrocytów, oligodendrocytów i komórek splotu naczyniowego oraz tanocytów. Doktorantka wykazała ich obecność na poziomie ekspresji genów (qPCR), jak również znakowaniem immunofluorescencyjnym na poziomie białka (wybrane). Dowiodła, że w części grzbietowej organoidy fuzyjne reprezentowane są komórki typowe dla kory nowej (ekspresja TBR1 i PAX6); natomiast w części brzusznej komórki typowe dla wzgórza (wyniosłości zwojowej GE) - ekspresja GSX2, DLX2 i NKX2.1. W ten sposób potwierdzona została skuteczność otrzymania organoidów fuzyjnych oraz ich (zgodna z rozwojem) polaryzacja *dorso-ventralna*, a także obecność populacji komórkowych dotychczas nieobserwowanych w klasycznych systemach organoidowych.

Zanalizowano morfologię struktur 3D i ekspresję wybranych genów oraz białek w organoidach fuzyjnych i kontrolnych. Dane dotyczące znacząco większej powierzchni organoidów fuzyjnych z linii JOHD są zgodne z danymi transkryptomicznymi badanymi liniami, w których wykazano zmniejszoną ekspresję genów pro-apoptycznych i zwiększoną ekspresję genów typowych dla neuronalnych progenitorów. Jest to również zgodne z obserwacją morfologiczną dotyczącą większej liczby rozet neuronalnych w organoidach fuzyjnych JOHD w porównaniu z kontrolnymi i mozaikowymi. Organoidy mozaikowe otrzymano przez łączenie grzbietowych z brzuszными w układzie zdrowy/obciążony mutacją. To ciekawe podejście eksperymentalne może mieć swoją kontynuację nie tylko w kontekście badań morfologicznych i mechanistycznych, ale również może posłużyć jako model do badań nad wpływem proporcji między białkiem HTT zmutowanym i jego niezmutowanej formie na modyfikację przebiegu neuropatogenezy HD.

Spektakularny i chyba najważniejszy wynik tej pracy (o znaczeniu translacyjnym) to **identyfikacja transtyretyny (TTR) jako potencjalnego biomarkera JOHD w modelu organoidów mózgu**. Białko TTR jest markerem splotu naczyniowego, odpowiedzialnego za produkcję płynu mózgowo-rdzeniowego, a jednocześnie z badań klinicznych wiadomo, że poziom TTR w płynie mózgowo-rdzeniowym stanowi kliniczną ocenę ciężkości HD zarówno u pacjentów objawowych, jak i u osób presymptomatycznych. Wyniki Doktorantki z eksperymentów na organoidach fuzyjnych pięknie wpisują się w ten scenariusz. Wykazano podwyższoną ekspresją mRNA genu *TTR* oraz zwiększony poziom białka TTR (metodą immunofluorescencji i WB) we wszystkich

organoidach fuzyjnych JOHD, jak również w osoczu krwi myszy YAC_{128Q}. Co więcej, wykazano korelację tej ekspresji z liczbą powtórzeń trójki nukleotydów CAG i statystycznie znaczące zmniejszenie ekspresji w organoidach mozaikowych.

Bogactwo zastosowanych metod eksperymentalnych: molekularnych, bioinformatycznych komórkowych oraz umiejętność przeprowadzenia wnikliwej analizy otrzymanych wyników świadczy o dojrzałości Doktorantki jako eksperymentatora i bardzo dobrze rokuje na dalszy, szybki rozwój kariery naukowej.

Według mojej opinii wartość naukowa przedstawionej do oceny pracy jest bardzo wysoka. Doktorantka w dysertacji przedstawiła nowatorską koncepcję zastosowania organoidów fuzyjnych do oceny ciężkości i oceny choroby Huntingtona, co umożliwi personalizację oceny, szczególnie ważne w przypadku pacjentów presymptomatycznych. Doktorantka w znacznym stopniu przyczyniła się do zrozumienia choroby Huntingtona jako choroby neurorozwojowej identyfikując dotychczas niepoznane zmiany w modelach komórkowych JOHD na poziomie transkryptów, białek oraz procesów komórkowych. Recenzowana praca stanowi istotny wkład do zrozumienia patogenezy HD, ze szczególnym uwzględnieniem postaci młodzieńczej tej choroby i dodatkowo, dzięki zastosowaniu analiz porównawczych przybliżyła poznanie mechanizmów molekularnych wspólnie w różnych chorobach poliglutaminowych

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.

Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną i translacyjną zaprezentowanych badań oraz fakt, że wyniki tej pracy zostały już opublikowane w roku bieżącym w renomowanych międzynarodowych czasopismach, **składam wnioszek o wyróżnienie ocenianej dysertacji.**

DYREKTOR

Prof. dr hab. s.c. Leokadia Bużanska