

Poznań, 16 września 2024 r.

Dr hab. Katarzyna Dorota Raczyńska, prof. UAM
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Żanety Kalinowskiej-Pośka pt.: „Opracowanie przedklinicznej strategii terapeutycznej choroby Huntingtona i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 z wykorzystaniem wyciszających reagentów RNA celujących w powtórzenia CAG w transkryptach genów HTT i ATXN3”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Figla i dr inż. Magdaleny Surdyki, a zrealizowana w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

Tematyka badań koncentruje się wokół opracowania strategii terapeutycznej celującej specyficznie w zmutowany ciąg powtórzeń CAG w mRNA genów *HTT* i *SCA3*, których ekspresja prowadzi do syntezy białek HTT i ATXN3 z nadmierną ilością glutamin, będących podłożem choroby Huntingtona (HD) i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3). Doktorantka zaprojektowała szereg różnych reagentów shRNA i siRNA, bazując na opisanym wcześniej przez inną grupę badawczą IChB PAN reagenście A2, i wykorzystwała je w formacie wektorowym i biwalentnym, w krótko- i długo-terminowych analizach *in vivo*. W badaniach wykorzystwała humanizowane modele myszy HD (Hu^{128Q/21Q}) i SCA3 (Ki^{150Q/21Q}). Najpierw, w eksperymencie 3-tygodniowym, wyselekcjonowane reagenty w wektorze wirusowym AAV-PHP.eB podawała do zatoki oczodołowej myszy HD. Cząsteczki skutecznie przekraczały barierę krew-mózg docierając do różnych obszarów mózgu, głównie pnia mózgu, opuszki węchowej, mózdku i wzgórza. Po ocenie objawów niepożądanych i skuteczności działania na docelowe białko HTT, doktorantka wybrała 2 reagenty, A4(P10A) lub A4(P10,11A) do eksperymentu długoterminowego, 15-tygodniowego. W tym eksperymencie oceniła dystrybucję sygnału w różnych strukturach mózgu myszy HD i SCA3 po iniekcji, porównała poziom mRNA i białka HTT i ATXN3 oraz poziom ich agregatów. Oceniała zmiany fenotypowe zwierząt, zbadła masę ich ciała, masę niektórych organów oraz przeanalizowała wpływ iniekcji na tkanki obwodowe z użyciem testów biochemicznych. Następnie, reagent A4(P10A) oraz inną wyselekcjonowaną cząsteczkę, AG4, przetestowała w formacie biwalentnym, po iniekcji domózgowej w prążkowie i do układu komorowego mózgu. Oceniała dystrybucję sygnału oraz poziom białka HTT i ATXN3 w miejscu iniekcji i całym mózgu myszy.

Realizacja badań wymagała od autorki wykonania eksperymentów z zakresu zarówno biologii molekularnej, biochemii jak i eksperymentów *in vivo*, które bywają czasochłonne oraz wymagają specjalistycznych umiejętności. Doceniam wysiłek oraz ilość pracy, który doktorantka włożyła w uzyskanie przedstawionych w niniejszej rozprawie wyników, nie

strona 1 z 8

uzyskując przy tym wszystkich celów, które na początku założyła. Badania doktorantki niewątpliwie mają wartość naukową pod kątem optymalizacji strategii skutecznego dostarczania terapeutyków do określonych, pożądaných rejonów mózgu. Niestety, wybrane i testowane przez nią terapeutyki nie są allelo-selektywne, czyli nie wykazują potencjału w obniżaniu poziomu tylko zmutowanych białek.

Z życiorysu naukowego dowiadujemy się, że mgr inż. Żaneta Kalinowska-Pośka jest współautorką już trzech publikacji naukowych, a wyniki zawarte w niniejszej rozprawie mają być częścią nieopublikowanego jeszcze manuskryptu. Brak informacji o uczestnictwie doktorantki i prezentowaniu wyników swoich badań podczas konferencji naukowych, oraz udziale w innych wydarzeniach, np.: popularyzujących naukę.

Pod kątem formalnym układ pracy odzwierciedla typowy układ prac doktorskich. Na początku znajdujemy „Wykaz publikacji” doktorantki i „Streszczenia” pracy doktorskiej. Następnie, we „Wstępie” zapoznajemy się z charakterystyką chorób poliglutaminowych (poliQ), ze szczególnym uwzględnieniem choroby Huntingtona i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, które znajdują się w polu zainteresowania samej doktorantki. Poznajemy także strategie terapii genowych stosowanych w leczeniu chorób poliQ i modele mysie choroby HD i SCA3 wykorzystywane przez doktorantkę. Uważam, że ten rozdział mógłby być wzbogacony o więcej ilustracji, gdyż na 22 strony wstępu znajdujemy tylko jeden rysunek. W kolejnych częściach zapoznajemy się z „Celem pracy”, potem wymienione są „Materiały”, opisane „Metody” i przedstawione „Wyniki” rozprawy. Rozważania na ich temat autorka przedstawia w rozdziale „Dyskusja i perspektywy” i podsumowuje krótko w rozdziale „Wnioski”. Na końcu znajdujemy „Wykaz (niektórych) skrótów” (byłoby łatwiej, gdyby wykaz był na początku rozprawy), „Załączniki” – do których należy tylko Tabela 18 (w zasadzie nie znajduję uzasadnienia, dlaczego jest ona w formie załącznika) i „Spis tabel i rysunków” przedstawionych w odwrotnej niż sugeruje to tytuł, kolejności.

Niestety, nie wszystkie części są napisane poprawnie, np.: w części „M&M” opisywane są wyniki reakcji PCR, przy czym brak zdjęcia żelu, którego wyniki doktorantka opisuje, zarówno w „M&M” jak i w „Wynikach”, nie możemy więc tego nawet zweryfikować (str. 49 i 50, 51). Ponadto, wzmianka o analizach *in silico*, przedstawionych we wspomnianym wyżej „Załączniku”, pojawia się już w pierwszym zdaniu „Wyników”, jednak dopiero w rozdziale „Dyskusja”, 31 stron dalej, autorka informuje o zawartości i odsyła czytelnika do Tabeli 18. Podobnie, dopiero w rozdziale „Dyskusja” czytelnik dowiaduje się, dlaczego w pracy badane są także tkanki obwodowe, takie informacje powinny rozpoczynać dedykowane im rozdziały „Wyników”, byłoby to jaśniejsze dla czytelnika.

Niestety, muszę podkreślić, że cała rozprawa przygotowana jest w sposób bardzo niestaranny, nie tylko pod kątem interpunkcji, języka i stylu, ale również treści. Wszystkie pomyłki, które znalazłam, to nie tylko niedociągnięcia, ale także błędy merytoryczne, których liczba i waga w mojej ocenie dyskwalifikują niniejszą pracę dokorską. Poniżej przedstawiam najważniejsze z nich.

Do drobnych niedociągnięć można zaliczyć: liczne literówki, zwłaszcza niewłaściwe końcówki wyrazów, potknięcia stylistyczne, skróty myślowe czy „koszmary” zdaniowe, po przeczytaniu których czytelnik gubi główną myśl, typu: „W fazie wczesnej choroby Huntingtona, neurony w szlaku pośrednim nie są proporcjonalnie oraz są bardziej dotknięte niż neurony w szlaku bezpośrednim” (str. 14), „Serotyp ten powstał poprzez ewolucja kapsydu AAV9 poprzez insercją aminokwasu heptameru w sekwencji kapsydu” (str 28), „To badanie również zostało wstrzymane na 1 i 2 fazie z powodu powikłań neurologicznych u niektórych uczestników oraz badanie VIBRANT-HD (ClinicalTrials.gov ID NCT05111249) firmy Novartis doustnej terapii hipoglikemizującej, branaplam zawiesił dawkowanie ze względu na zgłoszoną neuropatię obwodową” (str. 29) itp..

Kolejne niedociągnięcia, to zdania nieprecyzyjne, czasem wręcz dziwne, typu: „Specyficzność alleli można podzielić na polimorfizm pojedynczego nukleotydu SNP (...) oraz na powtarzające się CAG (...)” (str. 26), „Choroba występuje, gdy fragment poliQ przekracza krytyczną długość glutaminy” (str. 16), „Zaobserwowano, że wiek zachorowania u pacjentów z HD posiadających allele LI lub DI najlepiej świadczy o długości ich nieprzerwanych powtórzeń CAG, a nie długość zakodowanej poliglutaminy” (str. 16). W niektórych miejscach powstają wręcz zdania lekko komiczne: „W zaawansowanych stadiach choroby pacjenci (...) doświadczają (...) zaniku twarzy i skroni” (str. 20); „Pacjenci chorzy na SCA3 po diagnozie przeżywają około 20-25 lat” (z tego wynika, że im późniejsza diagnoza tym dłuższe życie pacjenta), „Badania te zakończyły się zgodnie z planem, ale w przypadku obu leków nie udało się obniżyć poziomu Huntingtona”, czy tytuł rozdziału: „PCR mysiego modelu Hu128Q/21Q”. Są też zdania dziwnie rozpoczęte, np.: „Przez co dopamina prowadzi do wzrostu ROS...” –.

Z innych, ważniejszych błędów niniejszej pracy: brak tłumaczenia wszystkich skrótów, co niekiedy uniemożliwia zrozumienie kontekstu, np.: STR w sformułowaniu „iniekcja do STR” (np.: Tab. 4), „DUB” w zdaniu „skuteczność jego działania neuroprotektynnego zależy (...) od aktywności DUB”, bufor PB, bufor GB. Niepoprawnie tłumaczone skróty, zwłaszcza skróty białek, np.: „NES141” jako „zależnie od CRM1/eksportu” „MINK1” jako „Missahapen jak kinaza 1” czy wiele innych w Tabeli 18 (czasami lepiej nie tłumaczyć na siłę na język polski niż robić to niepoprawnie). Niekiedy tłumaczenia skrótów podane są kilka stron dalej od ich pierwszego użycia, np.: UIM. Nie wszystkie startery wymieniane w pracy znajdują się w spisie starterów w Tabeli 5, a czasami nazwy starterów podane w Tabeli 5 nie są tożsame z nazwą tych samych starterów używanych w dalszej części tekstu. Podobnie, niektóre przeciwciała wymienione w Tabeli 10 są już inaczej nazywane w części „Wyniki”; w tabeli przeciwciał znajduje się też barwnik Hoechst33342. Przy opisie qPCR brak etapu elongacji. Część wykresów nie ma tytułów a część ma, czasem nie są one wytłumaczone, jak tytuł „BS” w wykresie na Rys. 18. Brak legend pod rysunkami. Schemat działania shRNA przedstawiony na Rys. 1 nie ma w ogóle odpowiednika w tekście pracy. Opisy osi na wykresach są raz po polsku, gdzie indziej po angielsku. Nazwy genów nie zawsze są pisane poprawnie, tj. raz kursywą a raz nie. Na stronie 62 autorka podaje, że średnią intensywność fluorescencji wyrażono w jednostkach powierzchni (a.u.), po czym w kolejnym zdaniu podaje wartości w jednostce

„j.m.”, nie wyjaśnia już jednak tego skrótu. Na Rys. 5 raz funkcjonuje nazwa podwzgórze a raz śródmózgowie, domyślałam się, że dotyczą tego samego obszaru mózgu.

Istotne pomyłki znajdujemy niekiedy w treści zdań, np.: „Pacjenci z chorobami poliglutaminowymi najczęściej posiadają dwa allele danego genu” - większość genów ma dwa allele, tu raczej chodzi o to, że są one różne. „Wyizolowane DNA doprowadzono do jednakowych stężeń (25 ng)” – podana wartość to ilość a nie stężenie. „Gen Htt jest niezbędny we wczesnym rozwoju embrionalnym myszy” - pomijając brak kursywy dla nazwy genu, chodzi chyba o produkt tego genu czyli białko, nie sam gen. Nazwy chorób poliQ i odpowiadające im skróty SMBA i DRPLA podane na stronie 8, 12 oraz w wykazie skrótów nie pokrywają się, np.: skrót SMBA tłumaczony jest jako: a) rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni, b) nerwowo-mięśniowa choroba Kennedyego, c) choroba Kennedyego.

Takie błędy powinny zostać wyłapane podczas uważnego przeczytania końcowej wersji pracy i sugerują, że autorka ani promotorzy tego nie zrobili. Tak dużo błędów jest niedopuszczalnych w pracy dyplomowej rangi pracy doktorskiej.

W treści pracy, niestety znalazłam też istotne błędy merytoryczne:

1. Wybiórcze analizowanie wyników poddanych analizie statystycznej. Kwestia dotyczy niekonsekwencji doktorantki, która choć wykonuje testy statystyczne i podaje ich wyniki, czasami poddaje rozważaniu zmiany, które nie są istotne statystycznie, w innym zaś miejscu wyraźnie podkreśla, że zmiany takie nie powinny być brane pod uwagę, gdyż nie są istotne. Według mnie, takie zmiany w ogóle nie powinny być analizowane, ewentualnie można mówić o „pewnej tendencji”, które to sformułowanie pojawia się raz w niniejszej dysertacji, na stronie 98, czyli przedostatniej stronie „Dyskusji”. Dla przykładu, na Rys. 14B widzimy istotne statystycznie zmiany w poziomie AST, a nieistotne w poziomie ALT, ale doktorantka pisze: „Poziomy tych parametrów (ALT i AST) wykazywały jedynie niewielkie różnice u myszy, którym podano A4(P10A) lub A4(P10,11A), w porównaniu do grupy kontrolnej Scrambled”. Z kolei, na stronie 77, odnosząc się do wyników przedstawionych na Rys. 16, doktorantka pisze: „Obydwa reagenty spowodowały spadek zmutowanego białka ATXN3 w mózdzku o 26% po wstrzyknięciu A4(P10A) i 17% po wstrzyknięciu A4(P10,11A) (Rys. 16 A)”, przy czym, zmiany te nie są istotne statystycznie. W kolejnym zdaniu czytamy: „Nie stwierdzono statystycznie istotnych wyników w obszarach mózgu myszy $Ki^{150Q/21Q}$ ze słabym wyznakowaniem eGFP (kory mózgu, prążkowiu), tylko w hipokampie A4(P10A) spowodował 24% spadek poziomu zmutowanej ataksyny-3 (Rys. 16 B)” i tu już doktorantka analizuje tylko zmiany istotne statystycznie. Jednocześnie, w obu fragmentach mózgu widzimy istotne statystycznie zmiany poziomu białka zdrowego, ale o nich doktorantka w zasadzie milczy, wzmiankując jedynie „Nie zaobserwowano selektywnego efektu shRNA dla alleli”. Gdzie indziej, opisując wyniki przedstawione na Rys. 19B, autorka wnioskuje o wzroście i spadku masy śledziony, przy czym zmiany te są niewielkie i nieistotne. Również na stronie 89 autorka analizuje wyciszenie białka ATXN3 w różnych strukturach mózgu w zasadzie w ogóle nie zważając na wartości „p” podane w tekście. Co upoważnia doktorantkę do tak wybiórczych i niekonsekwentnych analiz i w efekcie błędnie wyciągniętych wniosków? Po co doktorantka robi analizy statystyczne, skoro potem nie mają one dla niej znaczenia?

2. Sprzeczność wniosków opisywanych w „Wynikach” i „Dyskusji”. Przykładem jest analiza wyników przedstawionych na Rys. 13B i 19B. W rozdziale „Wyniki” doktorantka zauważa i wymienia zmiany dotyczące masy narządów zwierząt modelowych po iniekcji reagentami (co prawda, nie zważając na wartości „p”, o czym mowa wyżej). Z kolei jednak w dyskusji znajdujemy informację, że „Masa narządów nie zmieniła się w grupie shRNA w porównaniu z grupą kontrolną (Rys. 13B, 19B)”. Zatem wnioski opisane w części „Wyniki” są sprzeczne z tymi, które zostały opisane w części „Dyskusja”. Podobnie sprzeczne są wnioski z wyników przedstawionych na Rys. 12, gdzie w „Wynikach” autorka słusznie nie wymienia wzgórze jako obszaru, gdzie zaobserwowała obniżony poziom agregatów po iniekcji, ale w Dyskusji już pisze: „W analizie agregatów po wstrzyknięciu A4(P10A) zaobserwowano zarówno obniżenie zintegrowanej gęstości optycznej, jak i procentowej ilości agregatów [%] białka HTT w czterech badanych strukturach (Rys. 12)” – te cztery badane struktury to pień mózgu, prądkowie, mózdzek i ... wzgórze.

3. Wysuwanie błędnych wniosków. Odnosząc się do wyników przedstawianych na Rys. 17 doktorantka pisze: „Dane ze struktur mózgu (...) pokazują obniżenie poziomu zmutowanego ATXN3 o 17% ($p = 0,1437$)” – zmiana, do której odnosi się doktorantka jest nieistotna, nie powinna być analizowana, natomiast istotna w tej analizie jest zmiana poziomu białka normalnego, ale o tym ani słowa. Co więcej, w „Dyskusji” znajdujemy informację, iż „w mysim modelu SCA3 w strukturach dobrze strandukowanych, zaobserwowano działanie reagentów tylko na zmutowaną ataksynę (Rys. 17)” co już jest nieprawdziwym wnioskiem.

4. Brak odniesienia do bardzo ważnej kwestii niniejszej pracy doktorskiej, jaką jest brak allelo-specyficzności badanych reagentów. Najbardziej uderza mnie to, że w wynikach przedstawionych w rozdziale 7.1.3, 7.2.3, 7.2.8, 7.3.3 autorka nie odnosi się zupełnie do efektu, jaki badane przez nią reagenty wywołują na zdrowe, „normalne” białko. A najczęściej efekt ten jest bardzo podobny – obserwujemy zarówno obniżony poziom zmutowanego jak i zdrowego białka. Co więcej, niekiedy wpływ na zdrowe białko jest nawet większy (np.: Rys. 10B). Pomijając to, że doktorantka ignoruje ten fakt, moim zdaniem świadczy to o tym, że wybrany reagent nie przyniósł zakładanego efektu terapeutycznego. Na stronie 28 swojego doktoratu autorka pisze, że „Aby zachować prawidłowe funkcje białka, najbezpieczniejszym rozwiązaniem jest zaprojektowanie terapii celujące tylko w zmutowany gen, nie obniżając poziomu prawidłowego genu. Leczenie opierające się na obniżeniu poziomu całkowitego białka HTT, może przyczynić się nieprawidłowego funkcjonowania organizmu”. Dodaje, że „Badania prowadzone w Instytucie Chemii Bioorganicznej m.in. przez zespół dr hab. Agnieszka Fiszer, prof. ICHB PAN oraz przez zespół prof. Coreya doprowadziły do zaprojektowania cząsteczki A2, celującej w ciąg CAG oraz utworzenia terapii alleloselektywnej (J. Hu i in., 2010; Fiszer i in. 2010)”. Również jako jeden z punktów rozdziału „Cel pracy” autorka wskazuje „Określenie parametrów przedklinicznych terapeutyków takich jak efekty uboczne, efektywność obniżania poziomu zmutowanych i normalnych białek, alleloselektywność”. Wydawałoby się więc, że celem doktorantki przy projektowaniu i analizie nowych reagentów, zmienionych nieznacznie w stosunku do A2, jest także uzyskanie efektu allelo-specyficznego. Po eksperymentach krótkoterminowych doktorantka wybrała dwie cząsteczki shRNA, A4(P10A) i A4(P10,P11), z uwagi na, jak pisze „potencjał terapeutyczny

przy obniżaniu zmutowanego białka”. Efektu tego moim zdaniem nie uzyskała i prawie nie dyskutuje na ten temat. Znajdujemy tylko gdzieś krótkie wzmianki, np.: na str. 78 przy analizie wyników przedstawionych na Rys. 16: „Nie zaobserwowano selektywnego efektu shRNA dla alleli”. Czy wobec tego doktorantka jest upoważniona do twierdzenia, że zmiany obserwowane po podaniu reagentów wynikają z obniżenia poziomu białka zmutowanego? Czy może obserwowany fenotyp wynika raczej z uwagi na fakt, że i zdrowe i chore białko jest obniżone.

5. Brak odniesienia do innej ważnej kwestii niniejszej pracy doktorskiej, jaką jest rzeczywisty wpływ badanych reagentów na docelowe białka. Jak pisze doktorantka na stronie 96 dyskusji „Wyniki uzyskane dla poziomów mRNA tylko w małym stopniu korelowały z wynikami uzyskanymi w badaniu poziomów białek HTT i ATXN3”. Niestety, niewiele więcej znajdujemy na ten temat rozważań, a to kolejny istotny aspekt podlegający ocenie w niniejszej pracy – shRNA powinny celować w mRNA ze zwiększoną ponadnormalnie ilością powtórzeń CAG i w efekcie wpływać na obniżenie poziomu zmutowanego białka. Rys. 6 przedstawia wynik eksperymentu Western blot, do oceny efektu wybranych reagentów na poziom białka HTT. W tej krótkoterminowej analizie brakuje wyników poziomu mRNA, w zasadzie więc trudno wnioskować, czy jest to bezpośredni efekt potencjalnego terapeutyku. Analizy poziomu mRNA są natomiast wykonywane w eksperymencie długoterminowym. Warto by jednak porównać uzyskane wyniki – poziomu mRNA i białka, by móc jednoznacznie wskazać, gdzie działanie shRNA przekłada się bezpośrednio na poziom białka, np. poprzez porównaniu wyników przedstawionych na Rys. 9 i 10 oraz Rys. 15 i 16. Według mojej oceny, nie zawsze jest bezpośrednia korelacja między poziomem mRNA i białka w wynikach doktorantki. Zatem trudno wnioskować o bezpośrednim efekcie reagenta. Szkoda, że doktorantka się w ogóle do tego nie odnosi.

6. W końcowym wniosku *dotyczącym wspomnianego wyżej eksperymentu* (str. 78) autorka donosi ponadto: „słabo wyznakowane regiony wykazywały duże różnice między osobnikami” w skuteczności poziomu obniżania białek oraz „Zmutowana ludzka ATXN3 zawierała około 150 glutamin jednak dokładna liczba glutamin w białku była zależna od osobnika w związku z ekspansją międzypokoleniową CAG” (co można zaobserwować na obrazach po western blot) czy w takiej sytuacji racjonalne jest wysuwanie w ogóle końcowych wniosków? Czy nie są one obciążone zbyt dużym błędem/przypadkowością? Może warto chociażby w takich przypadkach zwiększyć pulę badanych prób.

W trakcie czytania nasunęły mi się również inne kwestie, na temat których zabrakło mi w tej rozprawie informacji, mianowicie:

1. Według informacji na str. 24, „Dokładna rola agregatów ATXN3 w SCA3 pozostaje nadal w pełni niewyjaśniona w patologii tej choroby. Przyjmuje się, że powodują one stres neuronalny oraz mają negatywny wpływ na białka funkcjonalne, poprzez ich wiązanie i blokowanie”. Chciałabym się dowiedzieć, jakie białka wiąże ATXN3. W pracy podana jest jedynie informacja, że ataksyna oddziałuje z białkiem CHIP i parkiną, przy czym funkcja białka CHIP jest wyjaśniona, ale funkcja parkiny już nie.

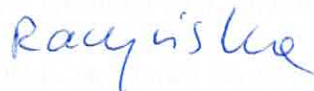
2. W tabeli 3 podano sekwencję konstruktów shRNA celujących w ciąg CAG, ale brak objaśnienia, dlaczego wprowadzono takie a nie inne zmiany w sekwencji poszczególnych z nich, w porównaniu z sekwencją konstruktów A2.
3. Na stronie 62 podano, że dawka reagenta shRNA A2 różni się od pozostałych (str. 62), ale doktorantka nie wyjaśniła, dlaczego.
4. Według wyników doktorantki przedstawionych w rozdziale 7.1.2, część shRNA wywoływała efekt obniżenia poziomu białka HTT, ale jednocześnie jako efekt uboczny obserwowano drżenie całego ciała myszy. Ciekawi mnie, jak doktorantka wytłumaczyłaby ten efekt?
5. Opis budowy cząsteczki biwalentnego siRNA podany na stronie 27 i 36 nie jest ani precyzyjny, ani klarowny, wymaga poprawy.
6. W rozdziale 6.2.5 autorka wymienia testy punktowej oceny fenotypu (np.: test krawędzi, kifoza), ale moim zdaniem powinna je także po krótko opisać, nie każdy jest biegły w tej tematyce.
7. Na Rys. 13A i 19A obserwujemy spadek masy ciała zwierząt po iniekcji obu reagentów. Czy w każdym z 4 przypadków zmiany są istotne? Bo tylko w jednym przypadku podano wartość „p” (str. 81).
8. Masa jąder po podaniu A4(P10A) malała, a po podaniu A4(P10,P11) wzrastała, jak wynika z Rys.13B. Również do tego faktu doktorantka się w ogóle nie odnosi.
9. Brak wyniku barwienia immunologicznego po analizie Western blot na Rys. 10, takie żele widać na Rys. 10 czy 16.
10. W rozdziale 7.2.9 doktorantka analizuje wpływ obu reagentów na poziom i gęstość agregatów ATXN3, ale na Rys. 18 przedstawia wyniki tylko jednego z nich – A4(P10A), brakuje danych dla A4(P10,11A).
11. Domyślałam się, bo brak w pracy precyzyjnych informacji, że analizy poziomu białka opierały się na pomiarze intensywności prążka po barwieniu immunologicznym. Nie wiadomo jednak, jaki program doktorantka do tego wykorzystwała. Ciekawi mnie to, gdyż niekiedy ocena „naoczna” pozostaje w sprzeczności z wynikiem obserwowanym na wykresie, ponadto obserwowane próby charakteryzują się bardzo dużą zmiennością między powtórzeniami biologicznymi.
12. W przypadku wyników przedstawionych na Rys. 12C-F, wydaje mi się, że korzystne byłoby przedstawienie liczby agregatów białka HTT u myszy zupełnie zdrowych – można by wówczas ocenić faktyczny wzrost liczby i gęstości agregatów w modelu chorobowym oraz porównać poziom przywrócenia fenotypu zdrowego po podaniu badanego reagenta. Mając tylko „scrambled” jako kontrolę, takich wniosków nie można wyciągnąć. Jeśli doktorantka ma takie dane, powinna je umieścić. Podobnie, na stronie 75 doktorantka pisze: „Obniżenie ALT było statystycznie istotne po iniekcji A4(P10A) i A4(P10,11A), co może wskazywać na zmniejszenie stanu zapalnego wątroby w Hu128Q/21Q” sugerując, że w modelu chorobowym myszy występuje stan zapalny wątroby. Nie dowiadujemy się jednak, skąd autorka ma takie dane. Jeśli porównała poziom obu enzymów, AST i ALS u myszy zdrowych i modelu chorobowym, to powinna przedstawić te wyniki.

13. W pracy wykonano szereg różnych eksperymentów, które opierały się zarówno na analizach z wykorzystaniem technik biologii molekularnej jak i analiz *in vivo*, obejmujących pracę z modelami zwierzęcymi. W publikacji, która ma zawierać te wyniki, doktorantka, jest pierwszym równorzędnym autorem, wraz z promotorem pomocniczym niniejszej pracy. Zastanawiam się, jaki jest dokładnie udział doktorantki w powstaniu wszystkich wyników opisywanych w niniejszej pracy.

Podsumowując, wyniki uzyskane przez Panią mgr inż. Żanetę Kalinowską-Pośką podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej niewątpliwie posiadają pewną wartość naukową i zostały otrzymane wysokim nakładem pracy doktorantki. Zgadzam się, że autorka wskazała metodę skuteczniejszego dostarczania potencjalnych terapeutyków do określonych rejonów tkanki mózgowej (trzy punkty końcowe „Wniosków”), jednak nie zgadzam się, że wybrane i testowane przez nią reagenty mają wysoki potencjał w obniżaniu poziomu zmutowanych białek (trzy kolejne punkty końcowe „Wniosków”). Zgadzam się, że zwiększenie wachlarza testowanych cząsteczek terapeutycznych o cząsteczki shRNA zawierające więcej substytucji A i G w porównaniu z cząsteczką A2 doprowadziło do wyselekcjonowania reagentów, przy których faktycznie obserwowano zmniejszoną liczbę tzw. sekwencji „off-target” i mniej skutków ubocznych u testowanych zwierząt. Niemniej, w mojej ocenie, w odróżnieniu od cząsteczki A2, cząsteczki te nie są allelo-specyficzne, wpływając zarówno na mRNA i białko zmutowane jak i zdrowe, co w zasadzie dyskwalifikuje je jako cząsteczki terapeutyczne. Nie wiadomo także, czy obserwowane zmiany w poziomie białek istotnie wynikają z bezpośredniego z działania reagenów. Brakuje mi rzeczowej dyskusji doktorantki na ten temat.

Ponadto, dysertacja jest przygotowaną w sposób bardzo niestaranny i nierzetelny, zawiera mnóstwo błędów, w tym błędów merytorycznych polegających na błędnej interpretacji lub ignorowaniu części uzyskanych wyników. Wyrażam ubolewanie, że autorka nie dołożyła więcej starań, by pracę dokorską przygotować poprawnie. Zabrakło także tak ważnej w takim momencie merytorycznej pomocy ze strony promotorów, którzy powinni wyłapać pewne istotne, wyłączone przeze mnie kwestie.

Moja opinia w sprawie rozprawy doktorskiej mgr inż. Żanety Kalinowskiej-Pośki jest negatywna. Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o niedopuszczenie mgr inż. Żanety Kalinowskiej-Pośki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Katarzyna Dorota Raczyńska