

Prof. dr hab. Joanna H. Sliwowska
Pracownia Neurobiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 71c
60-625 Poznań

Poznań, 6.09.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Żanety Kalinowskiej-Pośki
wykonanej pod opieką promotora prof. dr hab. Macieja Figla
oraz promotora pomocniczego dr inż. Magdaleny Surdyki
w Zakładzie Neurobiologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN**

Tematyka badawcza rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr inż. Żanety Kalinowskiej-Pośki zatytułowana „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*” dotyczy chorób poliglutminowych (poliQ) zaliczanych do grupy rzadkich chorób genetycznych. Schorzenia te najczęściej pojawiają się u pacjentów w wieku średnim, a w miarę upływu czasu towarzyszące im objawy znacznie pogarszają jakość ich życia, często prowadząc do wielu wykluczeń społecznych. Ponadto w/w choroby są na dzień dzisiejszy postępujące i śmiertelne, gdyż nie ma na rynku skutecznych terapii. Ze względu na poznanie ich etiologii istnieją potencjalne możliwości zastosowania terapii genowych. Stąd też niniejsza rozprawa doktorska skupia się wokół poszukiwania obiecujących terapeutyków. Przedstawiane badania prowadzone były na mysim modelu w/w chorób i mają charakter przedkliniczny.

Tematykę uważam za niezwykle istotną zarówno w kontekście zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie tych chorób genetycznych, jak również ze względu na potencjalne znaczenie terapeutyczne i możliwości poprawy życia pacjentów.

Układ rozprawy doktorskiej

Praca posiada układ charakterystyczny dla rozprawy doktorskiej, tj. zawiera: spis treści (2 ½ str.), wykaz publikacji (3/4 str.), streszczenie w języku polskim (1 ¾ str.), streszczenie w języku angielskim (1 ½ str.), obszerne wprowadzenie (21 str.), cele pracy (½ str.), materiały i metody (11 ½ str.), wyniki (30 str.), dyskusja (9 str.), wnioski (¾ str.), bogatą bibliografię (16 str.), spis skrótów (1 ½ str.), załączniki w postaci tabeli (5 str.), spis tabel i rysunków (2 ½ str.).

Praca doktorska napisana została językiem naukowym na 127 stronach i zawiera dużą liczbę schematów, rycin i tabel, co ułatwia zrozumienie treści tekstu.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Praca rozpoczyna się obszernym **wprowadzeniem**, w którym Autorka charakteryzuje choroby poliglutaminowe i opisuje ich genetyczną etiologię. Doktorantka w szczególności koncentruje się na chorobie Huntingtona (HD) oraz ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3). Omawia kliniczne objawy tych schorzeń, które manifestują się w obszarach: poznawczym, motorycznym i psychiatrycznym. Następnie opisuje ich genetyczne podłoże oraz białka sprawcze. Z kolei przechodzi do opisanie terapii genowych możliwych do stosowania w chorobach poliglutaminowych omawiając kolejno terapię genu opartą na oligonukleotydach antysensownych (ASO) oraz terapię opartą na RNAi. W dalszej części wprowadzania Pani mgr inż. Kalinowska-Pośka omawia strategię celowania w powtórzenie CAG. Następną część stanowią opisy badań klinicznych w chorobach poliglutaminowych. Wprowadzenie kończy przedstawieniem modeli zwierzęcych chorób poliQ, tj. charakterystyką zwierząt biallelicznych modelu HD Hu^{128/21Q} oraz modelu SCA3 Ki^{150Q/21Q}. Ta część rozprawy doktorskiej została napisana w interesujący sposób świadczący o dobrej znajomości tematu oraz literatury. Mam jednak kilka uwag i pytań do tej części:

1. Str. 19. „Istnieją przypuszczenia, że selektywna degeneracja populacji GABAergicznych (MSN) może być rezultatem ekcytotoksyczności spowodowanej przez receptor N-metylo-D-asparaginowy (NMDA).” Czy Doktorantka może przybliżyć na czym dokładnie polega ten mechanizm ?
2. Str. 24. Autorka wspomina o stanie zapalnym towarzyszącym chorobie SCA3. Czy w swoich badaniach Doktorantka oceniała ten parament ? Alternatywnie, czy są tego rodzaju dane dostępne są w literaturze ?
3. Rozdział pt. „Badania kliniczne w chorobach poliglutaminowych” w porównaniu z poprzedzającymi częściami pracy napisany jest chaotycznie. Brakuje łączników pomiędzy omawianiem wyników poszczególnych badań. Jest on tak naprawdę napisany jako jeden akapit.

Alternatywą dla tekstu mogłaby być tabela z przedstawianiem poszczególnych badań klinicznych w jednej kolumnie i wypunktowaniem najważniejszych wyników oraz wniosków płynących z tych badań w drugiej kolumnie.

4. Na str. 30 Autorka napisała: „W przypadku chorób poliglutaminowych używane są zarówno komórkowe, zwierzęce, jak i inne modele chorobowe.” Jakie „inne modele chorobowe” ma Doktorantka na myśli ? Ponadto wkraść się w tym zdaniu błąd literowy zamiast: chorób poliglutaminowych jest napisane „chorób poliglumanowych”.
5. Str. 31 „Zwyrodnienie jąder jest jednym z objawów choroby Huntingtona.....”. W tym zadaniu brakuje nazwy jąder. Powinno być: jąder podstawy.
6. Str.31 Autorka napisała, że stosowany pracy model myszy HD charakteryzuje się mniejszą masą mózgu niż myszy kontrolne w 12 miesiącu życia. Jak duży jest ten ubytek masy ?

Następna część rozprawy doktorskiej to pięć **celów pracy**, które są jasno określone i dotyczą przedklinicznej charakterystyki terapeutyków w modelach zwierzęcych HD i SCA3. Należało jednak w tym miejscu doprecyzować, że badania dotyczą myszy. Ponadto warto postawić hipotezę lub hipotezy badawcze. Stąd też prośba do Doktorantki o sformułowanie takiej hipotezy/hipotez badawczych.

Kolejną część stanowią **materiały i metody**, które w wielu aspektach są szczegółowo opisane. Pomocne jest również zawarcie informacji w licznych tabelach. Natomiast niektóre dane moim zdaniem są zbyt szczegółowe, np. podanie producenta butli z mieszaniną tlenu medycznego, strzykawkę insulinowych, czy mat grzewczych dla zwierząt. Z kolei brakuje informacji dotyczącej płci myszy oraz liczby zwierząt użytych w czasie wszystkich eksperymentów wchodzących w skład rozprawy. Nie ma także istotnej informacji dotyczącej paszy dla zwierząt, tj. skąd ona pochodziła. Na str. 47 napisano: „Zwierzętom zapewniono nieograniczony dostęp do wody i pokarmu odpowiedniego dla myszy (*ad libitum*)”. Słowo „nieograniczony” jest niepotrzebnej. *Ad libitum* oznacza bez ograniczeń, nieograniczony.

Na stronie 52 przy opisie iniekcji retro-ortbitalnej oraz operacji stereotaktycznej napisano, że zwierzęta poddano anestezji wziewnej, ale nie dodano nazwy anestetyków. Informacja o podaniu izofluoranu znajduje się dopiero na str. 54. W podrozdziale dotyczącym oceny fenotypu zwierząt wypisano nazwy czterech testów, ale ich nie opisano. Czy Doktorantka może pokrótce opisać na czym polegał każdy z nich ?

Ponadto na str. 54 napisano, że „W przypadku ostrego i postępującego pogorszenia się stanu myszy, eksperyment zakończono przed czasem”. Ile razy miało to miejsce i jakie parametry brano pod uwagę przy ocenie stanu zdrowia zwierząt ?

Nie ma także informacji, dlaczego pobierano serce, śledzionę i jądra. Brak szczegółowych informacji dotyczących perfuzji, np. czasu jej trwania, szybkości przepływu PFA.

Przy opisie badań immunohistochemicznych (str. 59) brakuje informacji dotyczących kontroli. Czy przeprowadzono badania kontrolne? Jeśli tak to na czym one polegały? Brak także informacji dotyczących stężeń przeciwciał drugorzędowych.

Przy opisie statystyki (str. 60) napisano „Każdy eksperyment został powtórzony co najmniej trzykrotnie”, natomiast nie ma informacji liczbie „n” jeśli chodzi o zwierzęta.

Z kolei Autorka przechodzi do opisu **wyników**, których jest bardzo dużo, co wskazuje na ogromny wkład pracy Doktorantki. Przedstawione one zostały w formie rysunków obrazujących schematy eksperymentów, zdjęć mikroskopowych i wykresów. W większości ryciny są czytelne z wyjątkami opisanymi poniżej. Do tej części mam również kilka pytań:

1. Rysunek 5 C przedstawiający zdjęcia mikroskopowe, które są bardzo małe i słabo czytelne. W legendzie brak opisu skali, która jest różna dla rysunku A i C.
2. Str. 65, Rysunek 65 – gwizdki są małe i odległe od słupków. Opis Rysunku 6: N=2, 3 lub 4. W jakim przypadku N=2?
3. Str. 67 Sygnał fluoroscencyjny w mysim modelu Hu^{128Q/21Q} jest dużo silniejszy niż w przypadku Ki^{150Q/21Q}. Jaka może być tego przyczyna?
4. Str. 68 Dlaczego w przypadku analizy poziomu ekspresji mRNA HTT wykonano ją we wzgórzu i mózdzku, a nie w pniu mózgu, strukturze, która jest bardzo wrażliwa w HD?
5. Str. 68 Dlaczego analizę ekspresji mRNA wykonano na 5 obszarach mózgu, a białka na 6?
6. Str. 69 Przedstawione zostały wyniki. Moim zdaniem warto opisać jedynie te istotne statystycznie.
7. Str. 69 i dalej w pracy warto wyrazić „wartości p” z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku, a nie czterech.
8. Str. 70 Rysunek 10 – proponuję nie zaznaczać na tym rysunku w postaci wartości p, które wskazują na brak istotności statystycznej. Ewentualnie może przedstawić wartości bliskie p=0.05 jako trend. Ponadto w legendzie brak opisu wartości p dla **
9. Str. 71 Rysunek 11 W legendzie brak opisu dla * i **** gwiazdek
10. Str. 72 Rysunki 12 C-F są bardzo słabo czytelne ze względu na małą czcionkę. Dodatkowo mam pytanie jak technicznie dokonywano analizy ilościowej agregatów?
11. Str. 73 Napisano, że „myszy które otrzymały iniekcje reagentem A4(P10A), wykazały statystycznie istotnie mniejszy przyrost masy ciała niż grupa Scrambled. Z czego to mogło wynikać? Czy zaobserwowano u tych myszy zmiany w poborze paszy lub aktywności fizycznej?

Jeśli zmiany dotyczyły spadku masy ciała to może warto w przyszłości zobaczyć co dzieje się na poziomie trzustki u tych zwierząt. Dodatkowo można dokonać analizy metabolicznej i określić w surowicy krwi poziom insuliny, glukozy i glukagonu.

12. Str. 73 Napisano: „ U myszy Hu^{128Q/21Q} zaobserwowano istotne statystycznie zmiany w masie serca i jąder”. Jak Doktorantka mogłaby zinterpretować te wyniki ? Czy organy analizowano w stosunku do masy ciała zwierząt ?
13. Str. 73 „Badanie to przeprowadzono dzień przed iniekcją myszy i wykazano pomijalny wyniki (średni wynik <1).....” Czy Autorka może uściślić co oznacza termin „pomijalny wynik” ?
14. Str. 74, rysunek 13 A Zaznaczono na nim zmiany masy ciała, ale czy były one istotne statystycznie ? W legendzie do tego rysunku brak opisu dla * i **.
15. Str. 75 Napisano „Obniżenie ALT było statystycznie istotne po iniekcji A4(P10A) i A4(P10, 11A)” Natomiast na Rys. 14 B brak oznaczeń wskazujących na tą istotność statystyczną. W legendzie brak opisu dla **.
16. Str. 76-77. Dlaczego w przeprowadzonych analizach ekspresji mRNA nie brano pod uwagę istotnej dla SCA3 struktury, jaką jest pień mózgu ?
17. Str. 76 -78 W przypadku SCA3 zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji mRNA *ATXN3* i spadek poziomu białka *ATXN3* w identycznych strukturach mózgu (tj. wzgórzu, mózdzku, korze mózgu i prążkowie). Jak Doktorantka może zinterpretować te wyniki ?
18. Wynik Western Blot pod wykresami 16A i 16B są bardzo mało i słabo czytelne.
19. Dlaczego przedstawiono wyniki UŚREDNIONYCH zmian poziomu białka *ATXN3* na rys. 17 ?
O czym one informują czytelnika ?
20. Str. 80. W opisie do legendy rys. 18 brak symbolu **.
21. Na str. 81 napisano, że u myszy po iniekcji A4(P10A) zaobserwowano niewielki spadek masy mózgu o 4%. Czy przy analizie masy mózgu brano pod uwagę masy ciała zwierząt ?
22. Str. 85 Na jakiej podstawie dokonano wyboru dawek do iniekcji domózgowych do prążkowie?
23. Str. 88, rys. 24. W legendzie brak opisu dla * i ***przedstawionych na wykresie.
24. Str. 89 Opisano spadki patologicznego białka w korze mózgowej, wzgórzu i mózdzku, ale wszystkie były nieistotne statystycznie (p=0,73; p=0,22; p=0,11).
25. Str. 90-91, rys. 26 Brak opisu *i ** w legendzie.

Wskazanie powyższych uchybień ma na celu pomoc Doktorantce i zwrócenie uwagi na istotne szczegóły dotyczące opisu badań i ich przedstawiania na rycinach. Pomimo wymieniony powyżej uwag uważam, że pod względem merytorycznym otrzymane wyniki są one bardzo wartościowe. Ponadto doceniam dużą ilość pracy, którą włożyła Doktorantka w przeprowadzenie

skomplikowanych i czasochłonnych eksperymentów, analizę wyników oraz przygotowanie rycin oraz tabel. Powyższe uwagi nie umniejszają jakości otrzymanych wyników, a jedynie uczulają na skrupulatną ich prezentację.

Kolejną część stanowi rozdział zatytułowany **Dyskusja i perspektywy**. Być może lepszy tytuł to po prostu Dyskusja, której częścią mogą być przyszłe kierunki badań i ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne. W tej części na 9 stronach Doktorantka podsumowuje właściwie najważniejsze wyniki swoich badań. Na pierwszych stronach Autorka przedstawia argumenty przemawiające za potrzebą prowadzenia badań przedklinicznych z zastosowaniem przedstawionych w rozprawie metod w celu poszukiwania skutecznych terapeutyków w chorobach poliQ. Następnie poczynając od str. 93 przechodzi do omówienia najważniejszych wyników i ich interpretacji. Autorka podkreśla, że transdukcja i sygnał eGFP były stabilne w czasie zarówno krótkotrwałej ekspozycji (3 tygodnie), jak i długotrwałe (po 15 tygodniach). Do tej części mam również kilka pytań:

1. W związku z wysokim wyznakowaniem Cy3 w mysim mózgu po zastosowaniu reagentów biwalentnych podawanych do prążkowania i braku silnego sygnału, który był opisany w innej publikacji (Alterman i in., 2019) nasuwa się pytanie podawane dawki. Czy były one takie same w przypadku tej rozprawy doktorskiej i badań Altermana ?
2. Przy określaniu parametrów krwi (str. 95) z uwagi na obserwowane zmiany w masie ciała zwierząt w przyszłości warto przeprowadzić analizy dotyczące stężeń glukozy, insuliny i glukagonu, które mogły by rzucić światło na ewentualne nieprawidłowości metaboliczne. Można również w przyszłości zaplanować zbadanie w mózgu neuropetydów zaangażowanych w regulację funkcji metabolicznych.
3. Przy analizie masy mózgów zwierząt (str. 96) warto wziąć pod uwagę masę ciała i przedstawić dane jako stosunek masa mózgu do masa ciała.
4. Na str. 96 napisano, że „model myszy HD otrzymał wyższą dawkę terapeutyczną niż myszy SCA3, dla mózgów o podobnej masie” . Czy planuje się prowadzenie dalszych badań z wyższą dawką dla myszy SCA3 ?
5. Przy interpretacji wyników dla mRNA genu *ATXN3* (str. 96) napisano, że „Sam poziom ekspresji mRNA różnił się znacznie między osobnikami”. Czy ten wynik nie wskazuje na potrzebę powtórzenia tego eksperymentu ? To może również przyczynić do jak napisała Doktorantka „małego stopnia korelacji z wynikami uzyskanymi w badaniu poziomów białek HTT i *ATXN3*”.
6. W kontekście podkreślonych w tej części perspektyw badań ma pytanie: Jak Doktorantka widzi możliwość ich kontynuacji ? W jakim kierunku powinny być prowadzone dalsze eksperymenty?

Kolejną część tekstu stanowią **wnioski**, które przedstawione są syntetycznie w 6 punktach.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Doktorantka stwierdziła, że:

1. Reagenty AAV-PHB.eB_shRNA dostarczone poprzez iniekcje reto-orbitalne przechodzą przez barierę krew-mózg i osiągają bardzo dobrą biodystrybucję w mózgu już po 3 tygodniach od ich podania. Ponadto ten wysoki poziom transdukcji tkanek mózgowych utrzymał się do 15 tygodni, kiedy to zakończono eksperyment.
2. Iniekcje lokalne z zastosowaniem cząsteczek biwalentnych także wykazywały transdukcję tkanek w mózgu po podaniu do prążkowiec i do układu komór.
3. Wybrane reagenty w formie AAV-PHB.eB_shRNA i cząsteczki biwalentne z RNA obniżają poziom białek poliQ w wielu regionach mózgu oraz poziom ich agregatów.
4. Reagenty AAV-PHB.eB_shRNA są bezpieczne nie powodując transdukcji do tkanek obwodowych i nie wpływając na parametry biochemiczne.
5. Największy potencjał reagentów występował w mysim modelu HD.

Bibliografia jest bardzo obszerna i znajduje się na 16 stronach. Zawiera zarówno starsze, jak i najnowsze pozycje literaturowe i wskazuje na znajomość bardzo dobrej tematyki.

Uwagi stylistyczne

1. Str. 13 „Jednak wciąż brakuje skutecznej terapii na choroby neurodegeneracyjne” lepiej to zadanie będzie brzmiało „Jednak wciąż brakuje skutecznej terapii do leczenia chorób neurodegeneracyjnych”.
2. Litery „i” „w” na końcu linijek tekstu można przenieść na początek kolejnych linii (wierszy). Kursor postawiony za literą, którą chcemy przenieść do następnej linii + kombinacja Ctr+Shif+Spacja dajesz szybki efekt przeniesienia tekstu.
3. Str. 17 „Zjawisko antycypacji polega na, że objawy chorób genetycznych w rodzinie pojawiają się wcześniej i w coraz większym nasileniu”. W tym zdaniu brakuje słowa „tym” po „na”
4. Str.71 „Największą odnotowano liczbę agregatów w obszarze pnia mózgu, prążkowiec i mózdzku” . Niewłaściwy szyk zdania. Powinno być: „Największą liczbę agregatów odnotowano w obszarze pnia mózgu, prążkowiec i mózdzku” .
5. Str. 93 Powinno być: ten sam podział struktur (a nie ten same podział struktur)
6. Str. 98 przy cytacjach literaturowych Kotkowska-Zimmer i Niewiadomska-Cynicka brak dat
7. Str. 100 „Największy potencjał reagentów zaobserwowano na mysim modelu choroby Huntingtona” Powinno być „w mysim modelu...”
8. Str. 110 W ostatniej pozycji literaturowej nie potrzebny jest skrót (b.d.)

9. Str.113 W pierwszej pozycji literaturowej na tej stronie tytuł pracy napisany jest dużymi literami.
10. Str. 118 Spis skrótów – niektóre pozycje napisane są mniejszą czcionką.
11. Str. 120 W ostatnim wierszu tabeli są nazwy angielskie „very low”. Ponadto w tej tabeli nastąpiły w czasie druku przesunięcia wyrazowe, np. pierwszy wiersz.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska wnosi nową wiedzę do dyscypliny nauki biologiczne. Uzyskane wyniki są bardzo wartościowe i obiecujące, a zaprezentowane badania przedkliniczne mogą być w przyszłości wykorzystane w terapiach choroby Huntingtona oraz ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Żanety Kalinowskiej-Pośki zatytułowana „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*” 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 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Żanety Kalinowskiej-Pośki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



prof. dr hab. Joanna H. Śliwowska