

prof. dr hab. Jacek Jaworski
Pracownia Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Warszawa, 21 grudnia 2023 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej, pt.
„Identyfikacja komórkowych i molekularnych zaburzeń wczesnego rozwoju mózgu w
chorobie Huntingtona”.**

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedmiotem rozprawy pani mgr inż. Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej było poszukiwanie molekularnych przejawów wczesnych zmian patologicznych w chorobie Huntingtona oraz innych wybranych chorobach poliglutaminowych. W tym celu posłużyła się metodami omicznymi i bioinformatycznymi analizy ekspresji genów oraz białek. Stworzyła również bardzo nowoczesny ludzki model 3D wczesnej choroby Huntingtona. W efekcie uzyskała liczne dane wskazujące, iż szczególnie wczesne warianty chorób polyQ mają bardzo silną komponentę neurorozwojową. Jest to bardzo istotny wniosek, wspierający postulat, niezbyt popularny wśród badaczy chorób neurodegeneracyjnych, iż przyczyn tej choroby należy poszukiwać w procesach trwających czasem nawet dekady przed pojawieniem się objawów klinicznych. Jednocześnie sugeruje to, iż w przypadku części tych chorób, a na pewno choroby Huntingtona, strategie terapeutyczne mogą dotyczyć zupełnie innych procesów niż te, w które obecnie są celowane. Dlatego w mojej ocenie przedmiot rozprawy i otrzymane wyniki są bardzo oryginalne, i poszerzają obecną wiedzę, stwarzając nowe kierunki dla praktycznego podejścia do terapii HD. Jednocześnie dostarczają nowego modelu badawczego bardziej zbliżonego do mózgu pacjenta, który już teraz pozwolił Doktorantce zaproponować nowe biomarkery procesu chorobowego w HD. Jest to dodatkowy wymiar tej pracy, który czyni ją jeszcze ciekawszą i stwarza możliwości translacyjnego wykorzystania uzyskanych wyników.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa ma dość nietypową strukturę, gdyż jest połączeniem załączonych prac opublikowanych i opisu wyników niepublikowanych. Pragnę jednak podkreślić, że w mojej ocenie nie stanowi to istotnego problemu, gdyż części niepublikowane spełniają wszelkie warunki prac doktorskich pod względem szczegółowości opisu materiałów i metod oraz uzyskanych wyników. Rozprawa składa się z 91 stron tekstu oraz załączników - dwóch artykułów opublikowanych w międzynarodowych czasopismach oraz oświadczeń autorki oraz autorów korespondencyjnych o wkładzie Doktorantki w powstałe publikacje. Rozprawę rozpoczyna spis treści oraz wykaz publikacji doktorantki (1 strona, 3 pozycje, w tym jedna w *Nat. Commun.* nie wchodząca w skład rozprawy). Następnie umieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim (w sumie 6 stron) oraz wykaz stosowanych skrótów (2 strony). Następnym rozdziałem jest syntetyczne wprowadzenie liczące 17 stron. Po nim następuje około 1 stronicowe omówienie celów rozprawy, po czym opisane są wyniki (47 stron).

Rozdział ten składa się z krótkiego wstępu oraz syntetycznego omówienia wyników opisanych w załączonych opublikowanych artykułach (Podrozdział 3.1, w sumie 13 stron) oraz omówienia wyników niepublikowanych. W tym ostatnim przypadku zamieszczono także obszerny opis wykorzystanych materiałów i metod, przez co ta część *de facto* przypomina swoją strukturą manuskrypt przygotowany do druku. Pracę zamykają Podsumowanie i perspektywy (ok. 2 i pół strony) oraz obszerna Bibliografia. Załączone opublikowane manuskrypty to praca eksperymentalna Świtońska i wsp. (*Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019) oraz Świtońska-Kurkowska i wsp. (*Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021). Z załączonych oświadczeń autorów korespondencyjnych jasno wynika, że pani mgr inż. Świtońska-Kurkowska miała wiodącą rolę w formułowaniu hipotez, planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów oraz analiz bioinformatycznych, jak i przygotowaniu manuskryptów. W ramach moich formalnych obowiązków recenzenta zauważam, że oprócz opublikowanej sekcji wyników, nadesłana praca zawiera 11 rycin i 2 tabele.

Ocena merytoryczna

Wstęp ocenianej rozprawy jest bardzo syntetyczny. Jednak omówione w nim zostały wszystkie zagadnienia konieczne dla zrozumienia tematyki i celów rozprawy. Pierwsza część Wstępu jest poświęcona chorobie Huntingtona, w tym epidemiologii i molekularnym aspektom jej rozwoju. Druga część Wstępu jest szczególnie ciekawa i poświęcona zagadnieniu rzadko branemu pod uwagę, jakim jest związek choroby Huntingtona, będącej schorzeniem neurodegeneracyjnym osób dorosłych, z rozwojem mózgu. Jest to istotna część, gdyż pokazuje pełną świadomość Doktorantki do czego mogą służyć stosowane przez nią modele badawcze i pozwala jej wykazać adekwatność stawianych pytań badawczych. Ostatnią część Wstępu stanowi omówienie zaburzeń neurorozwojowych w innych chorobach poliglutaminowych, co jest istotne w kontekście drugiej z załączonych publikacji. Uważam, iż jest to bardzo dobrze napisana część pracy doktorskiej i moja drobna uwaga dotycząca Wstępu jest taka, że warto było zilustrować go kilkoma schematami (np. pokazującym etapy rozwoju ludzkiego mózgu) czy tabelami zestawiającymi różne modele badawcze, ich charakterystykę i dokonane z ich wykorzystaniem kluczowe odkrycia. Ułatwiłoby to lekturę Wstępu porządkując kluczowe informacje.

Cele rozprawy. Jako główny cel pracy mgr Karolina Świtońska-Kurkowska postawiła sobie „zdefiniowane wczesnych zaburzeń neurorozwojowych, molekularnych i komórkowych, prowadzących do rozwoju młodzieńczej postaci choroby Huntingtona”. Aby osiągnąć cel główny Doktorantka wyznaczyła sobie cztery cele szczegółowe. Realizacja dwóch pierwszych, tzn.

- (i) identyfikacji procesów molekularnych, poprzedzających rozwój mózgu, wpływających potencjalnie na neurorozwój,
- (ii) identyfikacji, przy użyciu analizy dostępnych danych, wspólnego molekularnego mianownika zaburzeń neurorozwojowych w chorobach polyQ,

została opisana w załączonych do rozprawy publikacjach. Z kolei, wyniki niepublikowane dotyczą prac badawczych mających na celu realizację celów 3 i 4:

- (iii) opracowanie ludzkiego modelu *in vitro* choroby Huntingtona umożliwiającego analizę tych regionów mózgu, które są szczególnie dotknięte w tej neuropatologii,
- (iv) identyfikację na poziomie molekularnym i komórkowym, przy użyciu opracowanego modelu, zmian neurorozwojowych towarzyszących młodzieńczej formie choroby Huntingtona.

W mojej ocenie zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe zostały określone trafnie, i w sposób umożliwiający uzyskanie konkluzyjnych wyników badań przy zastosowaniu właściwych modeli badawczych.

Materiały, Metody oraz Wyniki. Ponieważ w przedstawionej mi do ocenie pracy wymienione rozdziały nie stanowią odrębnych części a raczej są elementami poszczególnych podrozdziałów (manuskryptów) poniżej skupię się na omówieniu poszczególnych podprojektów, co wydaje się bardziej uzasadnione logicznie. Przy czym prace opublikowane omawiam dość skrótowo, poświęcając więcej uwagi wynikom dotychczas niepublikowanym.

Publikacja 1. Świtońska i wsp., 2019

W niniejszej pracy Doktorantka wykorzystując wyniki sekwencjonowania nowej generacji oraz spektrometrię mas porównywała transkryptom i proteom komórek iPSC pochodzących od pacjentów z młodzieńczą formą choroby Huntingtona z komórkami kontrolnymi. Celem było wykrycie różnic występujących pomiędzy tymi liniami, które mogłyby prowadzić do zmian neurorozwojowych w trakcie różnicowania. Tu chciałbym zwrócić uwagę, iż sformułowanie, że „*pierwszym zadaniem było odkrycie wczesnych transkryptomicznych zmian neurorozwojowych*” (str. 36), nie jest najszcześliwsze i odzwierciedlające rzeczywisty cel badań. iPSC są komórkami pluripotentnymi zatem nie można mówić u nich ani o rozwoju ani tym bardziej o neurorozwoju, ze względu na to, iż pozostają one w stanie niezróżnicowanym. Niemniej poszukiwanie różnic już na tym etapie jest ciekawym pomysłem, gdyż mogą one predeterminować pewne ścieżki rozwojowe po rozpoczęciu różnicowania komórek zdrowych i niosących badaną mutację. Doktorantka porównywała 4 główne zbiory danych. W pierwszym transkryptomy wszystkich linii HD i kontrolnych. W drugim linii 71Q i linii kontrolnej. Trzeci zbiór stanowiły dane z linii HD o dużej liczbie powtórzeń 109Q i kontroli. W końcu w bardzo ciekawym porównaniu 4, Doktorantka zestawiała uzyskane przez siebie dane ze zbiorami danych dla komórek bardziej zróżnicowanych w kierunku neuronów od innych badaczy. W każdym z tych porównań, udało się ustalić częściową sieć powiązań dla RNA ulegających różnicowej ekspresji. Co ciekawe i ważne, w części przypadków, np. genów zaangażowanych w apoptozę regulowanych przez p53 uzyskane dane mogą tłumaczyć fenotypy związane z rozwojem choroby Huntingtona (np. nadmiarową produkcję komórek progenitorowych). Natomiast porównanie wyników pozyskanych z komórek iPSC i tych bardziej zróżnicowanych w kierunku neuronów pozwoliły wskazać, iż istotnie, co najmniej 16 genów miało podobnie zmienioną ekspresję, co wskazuje, że zmiany w takich procesach

jak aktywacja ścieżki sygnałowej TGF β czy gospodarka wapniowa mogą wyprzedzać w przypadku rozwoju choroby Huntingtona okres powstawania komórek nerwowych. To bardzo ciekawe dane, wskazujące, iż istotnie choroba Huntingtona może mieć silną komponentę rozwojową. Natomiast nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniem na stronie 40, że zmiany zachodzące w komórkach niezróżnicowanych odzwierciedlają zmiany przed stadium rozwoju embrionalnego. Rozwój embrionalny rozpoczyna się wraz z zapłodnieniem, w efekcie powstają najpierw komórki totipotencjne (mniej zróżnicowane niż pluripotencjalne), następnie w miarę rozwoju zmieniające się w pluripotencjalne itd. Zatem zmiany, które Doktorantka analizowała dotyczyły okresu przed wytworzeniem pierwszych neuralnych komórek macierzystych a nie okresu przed embriogenezą. Niemniej pierwszą z włączonych prac uważam za bardzo wartościową a uzyskane wyniki za rzucające nowe światło na chorobę Huntingtona. Szkoda, iż nie pokuszono się o funkcjonalne wykazanie, iż procesy zaburzone już w iPSC istotnie wpływają na trajektorię rozwojową komórek neuralnych. Choć jest to zadanie na pewno przekraczające możliwości jednej osoby wykonującej prace doktorską.

Praca nr 2. Świtońska-Kurkowska i wsp., 2021

Druga z załączonych prac ma charakter czysto bioinformatyczny i jest rozszerzeniem analiz rozpoczętych w pracy nr 1. W pracy tej Doktorantka porównała dostępne dane „omiczne” z różnych modeli chorób polyQ. Miało to na celu wyodrębnienie potencjalnie wspólnych mechanizmów molekularnych odpowiadających za neurorozwojową komponentę tych chorób. Oprócz HD (formy młodzieńczej i typowej), do analiz Doktorantka włączyła wyniki uzyskane dla chorób takich jak SCA1, 2, 6, 7 i 17 oraz DRPLA i SBMA. Jedną z podstawowych różnic pomiędzy młodzieńczą i typową chorobą Huntingtona było zaburzenie ekspresji regulatorów transkrypcji, w tym TBX15 i HOXB6, odgrywających istotną rolę w morfogenezie. W przypadku porównania różnych chorób polyQ wytypowano kilka podobieństw pomiędzy poszczególnymi schorzeniami, polegających na zmianach ekspresji genów odpowiedzialnych za neurotransmisję i plastyczność synaptyczną czy aktywność mikrogleju. Natomiast analiza porównawcza transkryptomu i proteomu wskazała na wspólne różnice w poziomie białek odpowiedzialnych za dojrzewanie neuronów. Podobne procesy były zaburzone w zbiorach danych pochodzących z modeli zwierzęcych chorób polyQ. Podsumowując praca nr 2 jest bardzo ciekawą próbą wykorzystania istniejących danych do poszukiwania nowych mechanizmów o charakterze neurorozwojowym w przypadku chorób neurodegeneracyjnych. Jednocześnie udowadnia ona biegłość Doktorantki w posługiwaniu się narzędziami bioinformatycznymi oraz szerokie umiejętności zadawania ciekawych i nieoczywistych pytań.

Dane niepublikowane.

Ostatnią część eksperymentalną niniejszej rozprawy stanowią dane niepublikowane, których celem było opracowanie nowego, bardzo zaawansowanego technicznie modelu 3D choroby Huntingtona i jego wstępna charakterystyka. W efekcie Doktorantka uzyskała fuzyjne organoidy mózgowe z komórek JOHD (lub mieszanych) wykazujące szereg różnic rozwojowych w porównaniu do organoidów kontrolnych (np. wielkość, ekspresja markerów

poszczególnych typów populacji komórek neuronalnych i nieneuronalnych czy poziom białka TTR). Szczególnie interesujący okazał się dla Doktorantki wzrost poziomu białka TTR. Jest to białko produkowane przez komórki nabłonkowe spłotu naczyniowego (których większą liczbę również stwierdzono w badanych organoidach JOHD) mające dość plejotropowe funkcje, od transportu tyroksyny i retinolu po wspieranie żywotności i rozwoju neuronów. Co ciekawe, podwyższony poziom TTR Doktorantka stwierdziła również w osoczu myszy będących modelem HD, co mogłoby sugerować, iż TTR może być cennym biomarkerem progresu HD. W tym kontekście szkoda, iż Doktorantka nie pokusiła się o analizę czasową zmian poziomu TTR, zarówno w organoidach, jak i w osoczu myszy. Czy rzeczywiście jego poziom odzwierciedla postępy choroby? Bo chyba biomarkerem samej choroby jest liczba powtórzeń polyQ, zatem przydatny byłby biomarker progresu zmian patologicznych umożliwiający, m.in. ocenę potencjalnych terapii. Podsumowując, rozdział opisujący dane dotychczas niepublikowane zrobił na mnie największe wrażenie. Hodowla organoidów, w tym tak złożonych w sposób powtarzalny i pozwalający na opis zmian patologicznych wykracza daleko poza standardową tematykę prac doktorskich i wymaga ogromnej sumienności i poświęcenia pracy laboratoryjnej. Również analiza materiałów i metod pozwala zapoznać się, z jak złożonym wyzwaniem miała do czynienia w trakcie swojej pracy Doktorantka. Jednak oprócz podziwu lektura tej części i zrodziła we mnie kilka pytań i komentarzy.

1/ Nie było dla mnie jasne czy tylko organoidy fuzyjne miały większe rozmiary czy też organoidy tylko dorsal lub ventral też miały większy rozmiar. Czy istotnie wynikało to z większej liczby neurprogenitorów w efekcie braku ich eliminacji, jak sugerowała praca nr 1?

2/ Różnica między organoidami 21Q i 33Q jest większa niż między 71 czy 77Q (Rys. 3), co sugeruje, że dopiero przy 109 powtórzeniach Q zarysowuje się różnica względem kontroli 21Q. Skąd zatem wiadomo, iż nie są to przypadkowe różnice klonalne a nie wpływ liczby powtórzeń? Skąd jeszcze może wynikać różnica pomiędzy 21Q i 33Q? Na tym samym rysunku podane są dane statystyczne. Jednak nie można się zorientować, które konkretne grupy się od siebie różniły, bo do testu ANOVA nie dołączono testu posthoc.

3/ Na rysunkach 4 i 5 widać ewidentne różnice w stosunku ekspresji TBR1, DLX2, itd. dorsal/ventral pomiędzy organoidami kontrolnymi i JOHD. Jednak w sumie w opisie wyników, jak i w reszcie pracy Doktorantka w ogóle się do nich nie odnosi. Jest to jeden z przykładów, dlaczego wskazana byłaby pogłębiona dyskusja wyników niepublikowanych.

4/ Na rysunku 7 przedstawiono wyniki analizy ekspresji licznych genów. Znowu wygląda na to, iż różnice między liniami kontrolnymi są większe niż pomiędzy np. kontrolą i pacjentem (np. LIMK2). Podobnie jak w przypadku pytania nr 2 powyżej, chciałbym się dowiedzieć, jak Doktorantka tłumaczy tę różnicę.

5/ W badaniach na zwierzętach użyto bardzo ograniczonej liczby zwierząt eksperymentalnych (np. 3), co w moim odczuciu ograniczyło możliwość uzyskania istotnych statystycznie wyników (Rysunek 11). Dlaczego?

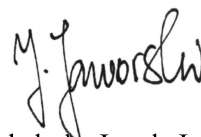
6/ W Tabeli 1 przedstawiono sekwencje oligonukleotydów użytych w reakcjach RT-qPCR. Jakiego jest ich źródło, na jakiej podstawie zostały zaprojektowane, czy były weryfikowane wcześniej w opublikowanych publikacjach? Jeśli nie, to jak zweryfikowano ich prawidłowe zaprojektowanie i powstawanie pojedynczego produktu, co jest kluczowe przy zastosowanej metodzie detekcji?

Podsumowanie i perspektywy. Ze względu na nietypowy układ, rozprawę zamyka nie dyskusja, ale krótkie podsumowanie wyników i płynących z nich wniosków, jak również przedstawienie dalszych perspektyw badawczych. Przy czym to ostatnie jest bardzo krótkie i raczej dość generyczne. W mojej ocenie mogłoby być nieco bardziej konkretne, np. wskazując najbardziej palące kwestie i potencjalne sposoby ich osiągnięcia. Podobnie dyskusja wyników niepublikowanych mogłaby być bardziej dogłębna. Nie mam natomiast zastrzeżeń do dyskusji w załączonych manuskryptach.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny 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 Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie ze względu na to, iż przeprowadzone badania dostarczyły ważnych wyników o wysokiej jakości naukowej, z których część została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz, iż wykorzystano bardzo zaawansowane modele badawcze stanowiące wyzwanie nawet w czołowych laboratoriach na świecie, wnoszę do Rady Instytutu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej.

A handwritten signature in black ink, reading "J. Jaworski".

Prof. dr hab. Jacek Jaworski

Jacek
Ryszard
Jaworski

Elektronicznie
podpisany przez Jacek
Ryszard Jaworski
Data: 2023.12.21
11:20:57 +01'00'