INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19
faks: 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327 NIP 777-00-02-062
http://www.ibch.poznan.pl

Poznań, 03.02.2025

prof. dr hab. Marta Olejniczak,
Zakład Inżynierii Genomowej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Latoszek zatytułowanej „Characteristics of generated human iPSC-derived models of Huntington's disease, identification of calcium signaling dysregulation and dendritic spine dysfunction"

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Eweliny Latoszek została wykonana w Laboratorium Neurodegeneracji, w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Czeredys, pełniącej funkcję promotora pracy. Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej wpisują się w tematykę badawczą zespołu i dotyczą choroby Huntingtona (HD), rzadkiej dziedzicznej choroby neurodegeneracyjnej wywoływanej ekspansją powtórzeń CAG w eksonie 1 genu *HTT*. Powstające zmutowane białko HTT, zawierające wydłużony ciąg glutamin (poliQ) ma tendencję do agregacji, przez co traci swoje fizjologiczne funkcje i prawdopodobnie nabywa nowe (toksyczne) właściwości. W efekcie dochodzi do postępującej degeneracji neuronów, obejmującej głównie średnie neurony kolczaste w prążkowiu (MSNs). Jedną z wczesnych nieprawidłowości obserwowanych w przebiegu HD jest zaburzenie sygnalizacji wapniowej. Niejasne jest jednak powiązanie pomiędzy zaburzoną sygnalizacją wapniową oraz degeneracją neuronów. Pomimo wielu lat badań nad patogenezą HD i jej potencjalną terapią jest to wciąż choroba nieuleczalna. Postępujący i neurorozwojowy charakter choroby jak również fakt, iż dotyka ona głównie MSNs sprawia wiele trudności we właściwym modelowaniu HD. W związku z tym ogólnym celem badań mgr Eweliny Latoszek było wygenerowanie nowych modeli choroby Huntingtona oraz analiza wybranych elementów patofizjologii HD. Projekt jest dobrze uzasadniony, a znaczenie podjętych badań nie budzi wątpliwości.

Mgr Ewelina Latoszek zdefiniowała sześć celów szczegółowych swojej pracy doktorskiej:

1. Zbadanie roli białka SIP w agregacji zmutowanej huntingtyny w komórkowym modelu HD.
2. Uzyskanie i scharakteryzowanie linii indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs) pochodzących z ludzkich fibroblastów od pacjentów z młodzieńczą i dorosłą formą HD oraz osób kontrolnych.
3. Uzyskanie i scharakteryzowanie linii neuronalnych komórek progenitorowych (NPC) i średnich neuronów kolczastych (MSN) pochodzących z ludzkich komórek iPS od pacjentów z młodzieńczą i dorosłą formą HD oraz osób kontrolnych.
4. Badanie patofizjologii HD przy użyciu wygenerowanych modeli komórkowych 2D i ludzkich organoidów prążkowia (hSO) z uwzględnieniem możliwego wpływu zaburzonych szlaków sygnałowych wapnia.
5. Badanie genów zaangażowanych w patofizjologię HD w MSN pochodzących z hiPSC z dorosłą i młodzieńczą formą HD za pomocą RNA-seq i RT-qPCR.
6. Uzyskanie i scharakteryzowanie hSO pochodzących z hiPSCs z dorosłą i młodzieńczą formą HD oraz odpowiednich osób kontrolnych.

Cele są jasne i bardzo ambitne, biorąc pod uwagę czas i wysiłek potrzebny do stworzenia nowych modeli badawczych. Jedyna uwaga dotyczy braku spójności pomiędzy tytułem pracy a badaniem roli białka SIP w modelu HEK293T (cel nr 1).

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim. Ma ona klasyczną strukturę i zawiera następujące rozdziały: Streszczenie, Wstęp (31 stron), Materiały (11 stron), Metody (14 stron), Cele, Wyniki (63 strony), Dyskusję (31 stron), Wnioski, Ograniczenia badań i kierunki badań oraz imponującą Bibliografię, obejmującą 396 pozycji literaturowych. Rozprawa zawiera również listę powszechnie używanych skrótów i listę publikacji powstałych przy współautorstwie mgr Eweliny Latoszek.

We Wstępie Autorka w sposób bardzo ciekawy opisuje historię badań nad chorobą Huntingtona, jej molekularne podstawy, ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń ścieżek sygnalizacji wapniowej i degradacji białek. Regionem mózgu najbardziej dotkniętym patogenezą w HD jest prążkowie. Autorka bardzo szczegółowo charakteryzuje zaburzenia struktury prążkowia w kontekście neurorozwojowego charakteru choroby. Kolejna część Wstępu dotyczy charakterystyki ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek

macierzystych, metod ich różnicowania do MSNs oraz wykorzystania NPCs, MSNs i organoidów mózgowych do modelowania HD. Większość cytowanych prac ukazała się w ostatnich latach, co świadczy o dużej aktualności podejmowanej tematyki badawczej. Bardzo pozytywnie oceniam również umieszczenie na końcu Wstępu rozdziału Wyzwania i ograniczenia wraz z tabelą porównującą właściwości neuronalnych modeli HD uzyskanych z komórek iPS oraz organoidów mózgowych. Podsumowując, stwierdzam że Wstęp jest bardzo ciekawą i wartościową częścią rozprawy doktorskiej, świadczącą o tym, że **mgr Ewelina Latoszek posiada wiedzę teoretyczną niezbędną do prowadzenia badań eksperymentalnych**. Jest to cenne źródło informacji, które wraz z elementami zawartymi w Dyskusji może stanowić część publikacji przeglądowej.

Kolejną częścią ocenianej rozprawy jest 25 stronicowy opis Materiałów i Metod wykorzystanych przez Doktorantkę w swojej pracy. Jest on przygotowany w sposób staranny i szczegółowy, pozwalający na odtworzenie eksperymentów i wyjaśniający wątpliwości powstałe podczas czytania opisu wyników.

W pierwszej części Rezultatów Autorka zbadała wpływ nadekspresji SIP (Siah-1 interacting protein) na poziom białka HTT oraz agregację zmutowanej huntingtyny w komórkach HEK293T. Projekt ten był kontynuacją wcześniejszych badań zespołu przeprowadzonych na mysim modelu HD. Autorka wykazała, że SIP bierze udział w zależnej od proteasomów degradacji N-końcowych fragmentów huntingtyny. Zwiększona ubikwitynylacja i degradacja dotyczyła zarówno prawidłowej (25Q) jak i zmutowanej (72Q) formy HTT. Uzyskane wyniki są wartościowe i zostały opublikowane w czasopiśmie Cell Biosc., a mgr Ewelina Latoszek jest pierwszą autorką tej pracy. Moje wątpliwości budzą jedynie analizy agregacji HTT. **W jaki sposób odróżniano agregaty HTT od sygnału z niezagregowanego białka? W jaki sposób dokonywano pomiaru wielkości i ilości agregatów? Ile komórek było branych pod uwagę (co oznacza n na rysunku 5.1 oraz 5.5?).**

W dalszej części Wyników Autorka przedstawiła metodę generowania linii komórkowych iPS z fibroblastów pobranych od pacjentów z dorosłą i młodzieńczą formą HD oraz osób zdrowych (kontroli). Linie te zostały szczegółowo scharakteryzowane pod kątem morfologii, ekspresji markerów pluripotencji, markerów trzech listków zarodkowych, długości ciągu CAG, poprawności kariotypu i stabilności powtórzeń tandemowych (STR). Wygenerowane linie iPSCs posłużyły następnie do wyprowadzenia modeli neuronalnych HD

(NPCs oraz MSNs). [redacted]

W ostatniej części rozprawy doktorskiej mgr Ewelina Latoszek opisała tworzenie i charakterystykę organoidów prążkowia z komórek iPS HD i linii kontrolnych. Aby lepiej zrozumieć zmiany zachodzące na wczesnym etapie rozwoju prążkowia, uzyskane hSOs zbadała w czasie, analizując kilka wybranych genów, charakterystycznych dla danego etapu rozwoju. [redacted] Wyniki badań uzyskane z wykorzystaniem wszystkich modeli HD zostały podsumowane w odrębnym rozdziale (5.5.0) i wnikliwie przedyskutowane w części Dyskusja. Autorka odnosi się w nim do najważniejszych osiągnięć pracy jak również do wyników niespójnych, dyskutując je w świetle literatury naukowej. Co więcej, rozprawa zawiera również rozdział poświęcony ograniczeniom i perspektywom dalszych badań. Ta część rozprawy doktorskiej świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i jej ogromnej wiedzy w zakresie prowadzonych badań.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Latoszek jest dziełem kompletnym, przygotowanym z dużą starannością i **prezentującym zarówno ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie** jak i wartościowe wyniki badań eksperymentalnych. Cele badań były ambitne i zostały w większości zrealizowane. Doktorantka udowodniła, że dysponuje bogatym warsztatem biologii molekularnej i potrafi właściwie zaplanować, wykonać i przeanalizować wyniki eksperymentów naukowych. Większość badań mgr Ewelina Latoszek wykonywała samodzielnie i jedynie w nielicznych przypadkach wskazywała na udział członków zespołu (np. analizy RNAseq). W związku z powyższym **rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**. Jednym z najważniejszych osiągnięć pracy jest wygenerowanie unikatowych modeli choroby Huntingtona oraz linii kontrolnych i ich szczegółowa charakterystyka. Wymagało to od Doktorantki ogromnego nakładu pracy i zaangażowania. Dzięki wnikliwej analizie tych modeli, mgr Ewelina Latoszek potwierdziła, że są one odpowiednie do badania patogenezy HD na różnych jej etapach. Dodatkowo, wykorzystując model komórkowy HEK293T z nadekspresją N-końcowego fragmentu huntingtyny, Autorka wykazała kluczową rolę SIP w regulacji tworzenia agregatów HTT. Bez wątpienia, **rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego** i poszerza naszą wiedzę na temat patogenezy HD. Część wyników zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej została już opublikowana w postaci czterech artykułów naukowych w czasopismach Stem Cell Res. (2022, 2023), Cell Biosci. (2022) oraz Front Cell Dev Biol (2021). W trzech z nich mgr Ewelina Latoszek jest pierwszą autorką (raz drugą), co potwierdza jej wiodący wkład w te badania. Praca zawiera nieliczne błędy językowe i edytorskie. Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam listę drobnych uwag:

- Str.14 – „poziomy większości genów", „obniżony poziom genów" – brak precyzji (poziom ekspresji genów)
- Str. 15 – „The range of the first HD symptoms is from 2 to 87 years old"- niepoprawne językowo
- Str.19 – "The authors also suggest that abnormal ….that may influence…" – niepotrzebne "that"
- Str. 26 – "ectoderm, mesoderm and ectoderm" – pomyłka (endoderm)
- Str. 27 – "The different times of neuronal induction, differentiation and patterning, and finally maturation that can take up to 3 – 4 months to get mature 2D MSNs cultures (38, 39, 116) (Fig. 1.3)." – niejasny przekaz

- Str.31 - [redacted]
- Str. 62 – „diluted in sterile were" ?
- Str. 65 – błędna numeracja rozdziału 3.6.6
- Str. 73 - wątpliwości co znaczy „n" na rysunku 5.1c,d?
- Str. 74 - Fig. 5.2 niekompletny opis prążków na WB
- Fig 5.1, 5.3 - brak wykresu dla 25Q
- Str. 82 - Zbyt mała czcionka, nieczytelny rysunek 5.7C-H
- W podpisie pod rysunkiem 5.7 i 5.8 błędny odnośnik do ref 101 i 102
- brak prążka od normalnego allelu na ryc. 5.7 E
- str. 135 – "SIP can reduce proteins" – brak precyzji
- Str. 137 Opis ryciny 6.1 powinien jasno wskazywać, że jest to hipoteza badawcza, ponieważ w niniejszej pracy nie badano wpływu SIP na agregację HTT w MSNs (lub na rys. powinno być zaznaczone, że dot. to kom. HEK293T_ex1HTT a nie MSNs)
- Str. 138 – „generowanie linii ludzkich fibroblastów" – ten rozdział tego nie dotyczy,
- Str. 148 – poliQ zamiast polyQ

Wniosek końcowy

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Eweliny Latoszek spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2024 r. poz. 1571, z późn. zm.) i wnioskuję do Komisji Doktorskiej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie o dopuszczenie mgr Eweliny Latoszek do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Z uwagi na dużą wartość uzyskanych modeli HD dla środowiska naukowego oraz chęć docenienia nakładu pracy włożonej w realizację ambitnych celów niniejszej rozprawy doktorskiej, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Marta Olejniczak