



Institut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału
Prof. dr hab. n. med. Agata Adamczyk
Kierownik

tel.: 48 22 60 86 572
e-mail: aadamczyk@imdik.pan.pl

Prof. dr hab. n. med. Agata Adamczyk
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN
Zakład Komórkowej Transdukcji Sygnału
tel.: 48 22 60 86 572
e-mail: aadamczyk@imdik.pan.pl

Warszawa, 14.01.2025

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Jana Witolda Węstawskiego

**pt: „Poszukiwanie kinezyn kluczowych dla patologicznego rozwoju neuronu
w modelu stwardnienia guzowatego”**

**wykonanej w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
pod kierunkiem Prof. dr hab. Jacka Jaworskiego**

Stwardnienie guzowate (ang. Tuberous Sclerosis Complex, TSC) to rzadka, genetycznie uwarunkowana choroba, w której mutacje w genach TSC1 lub TSC2 prowadzą do nieprawidłowej aktywacji kinazy serynowo-treoninowej mTOR (ang. mammalian target of rapamycin). W warunkach fizjologicznych mTOR pełni kluczową rolę w prawidłowym rozwoju mózgu, regulując procesy takie jak synteza białek, formowanie synaps, rozwój dendrytów i aksonów oraz neuroplastyczność. Jednak nadmierna aktywacja mTOR prowadzi do niekontrolowanego wzrostu komórek nerwowych, powiększenia ich ciał oraz nadmiernego rozrostu drzewa dendrytycznego. Takie zmiany strukturalne powodują zaburzenia w rozwoju mózgu, które mogą objawiać się makrocefalią (megalocefalią). Mimo rosnącej wiedzy na temat szlaku mTOR, molekularne mechanizmy odpowiedzialne za patologiczne zmiany w morfologii neuronów pozostają w dużej mierze niewyjaśnione. Recenzowana praca podejmuje ważną próbę zgłębienia i wyjaśnienia tych mechanizmów. Wyniki badań nie tylko przybliżają nas do zrozumienia patofizjologii TSC, ale mogą również rzucić nowe światło na mechanizmy innych chorób mózgu związanych z deregulacją mTOR.

Głównym celem pracy było zbadanie, czy którekolwiek z białek motorycznych - kinezyn odgrywa istotną rolę w procesie nadmiernego wzrostu neuronów w modelu TSC. Doktorant skupił się na analizie potencjalnych interakcji pomiędzy kinezynami a szlakami sygnalizacyjnymi zależnymi od kinazy mTOR. To istotny krok w pogłębieniu wiedzy o patogenezie TSC; zrozumienie roli kinezyn w nadmiernym wzroście neuronów zależnym od mTOR może przyczynić się do określenia mechanizmów leżących u podstaw zaburzeń morfologii neuronów w tym schorzeniu. Autor pracy słusznie założył, że jeśli któraś z kinezyn okaże się kluczowa w nadmiernym wzroście neuronów, może

stać się potencjalnym celem dla nowych terapii, które mogłyby zahamować niepożądane procesy i złagodzić objawy TSC.

Opracowanie cechuje się sprawdzoną i tradycyjną strukturą. Liczy 220 stron i zostało zgodnie z przyjętymi standardami podzielone na główne rozdziały: Wstęp, Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski oraz Bibliografia. Każdy z rozdziałów zawiera konsekwentnie ponumerowane podrozdziały, co znacząco ułatwia orientację w treści. Dodatkowo w pracy umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim, a także spis filmów. Z rozdziału ósmego – *Publikacje Doktoranta* – wynika, że doktorant jest współautorem czterech prac opublikowanych w renomowanych czasopismach z „listy filadelfijskiej”, co świadczy o wysokim poziomie merytorycznym pracy oraz aktywności naukowej kandydata.

Wstęp pracy ściśle związany z jej tematem, został starannie i przejrzyście zorganizowany, co sprawia, że istota podjętych badań jest zrozumiała nie tylko dla wąskiego grona specjalistów z dziedziny, lecz również dla szerszego kręgu odbiorców. W części poświęconej charakterystyce komórki nerwowej autor przedstawia zwięzłe, lecz rzeczowe omówienie cytoszkieletu neuronalnego, uwzględniając kluczowe elementy, takie jak neurofilamenty, mikrofilamenty, mikrotubule oraz białka z rodziny MAP, które regulują ich strukturę i stabilność. Ta sekcja została wzbogacona o rycinę ilustrującą zależność dynamiki mikrotubul od GDP i GTP, podkreślając mechanizm dynamicznej niestabilności mikrotubul. Mechanizm ten ma fundamentalne znaczenie dla licznych procesów komórkowych, takich jak podział komórkowy, transport wewnątrzkomórkowy czy organizacja cytoszkieletu, które z kolei odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej struktury oraz rozwoju neuronu. Autor konsekwentnie rozwija te zagadnienia w kolejnych rozdziałach, płynnie przechodząc do ich szczegółowego omówienia. Skupia się m.in. na opisie rzęsek komórek nerwowych, których prawidłowe funkcjonowanie zależy od stanu cytoszkieletu, a które pełnią funkcje sensoryczne i regulatorowe, wspierając działanie układu nerwowego, regulując migrację oraz różnicowanie neuronów w trakcie rozwoju organizmu; ich dysfunkcja może natomiast prowadzić do rozwoju niektórych postaci padaczki czy autyzmu. *Transport wewnątrzkomórkowy w neuronie* to niezwykle interesujący podrozdział, który stanowi doskonałe wprowadzenie do kolejnej, obszernej sekcji poświęconej kinezytom. W tej części doktorant, z uwzględnieniem najnowszej i starannie dobranej literatury, w fascynujący sposób charakteryzuje białka będące głównym przedmiotem jego badań w recenzowanej rozprawie. Rozdział ten przedstawia szczegółowy podział oraz budowę kinezyn, ich kluczową rolę w transporcie aksonalnym i dendrytycznym, a także niekanoniczne funkcje tych białek. W zakończeniu uwaga skupiona jest na analizie wzajemnych zależności między kinezynami a wybranymi ścieżkami sygnałowymi. Całość wzbogacono starannie przygotowanymi rycinami oraz tabelą, która zawiera charakterystykę rodziny kinezyn w genomie człowieka. Ten podrozdział mógłby z powodzeniem posłużyć jako solidna baza do opracowania pracy pogłądowej, do czego gorąco zachęcam kandydata. Zgodnie z tematyką recenzowanej rozprawy, kolejny rozdział to charakterystyka procesów komórkowych regulowanych przez kinazę mTOR oraz analiza dostępnej literatury dotyczącej zależności między mTOR a kinezynami w kontekście funkcjonowania komórek nerwowych. Ta część pracy skutecznie przekonuje czytelnika o konieczności i celowości podjętych badań, jasno wskazując na istotne luki w dotychczasowej wiedzy nad molekularnymi mechanizmami stwardnienia guzowatego. Autor precyzyjnie

wskazuje na obszary (zależności pomiędzy aktywnością kinazy mTOR a funkcjonowaniem białek z rodziny kinezyn), które nie zostały jeszcze dostatecznie zbadane, co nie tylko uzasadnia podjęcie badań, ale także podkreśla ich potencjalny wkład w rozwój dziedziny. Taki sposób uzasadnienia badań świadczy o wysokiej świadomości naukowej autora i jego umiejętności wyciągania wniosków na podstawie dostępnych danych.

Dlatego drobne uchybienia redakcyjne we wstępie, takie jak np. niefortunne sformułowanie na stronie 47, gdzie autor pisze o: „...penetracji mikrotubul do korteksu korowego w komórkach pozbawionych TSC2...”, a także sporadyczne literówki nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną tego rozdziału. Chciałabym też zwrócić uwagę doktoranta na poprawność nazewnictwa enzymu PARP1 – poprawna nazwa to polimeraza poli(ADP-rybozy)-1, a nie, jak podano na stronie 39, poli-[ADP-rybozo] polimeraza, czy też rozwijanie stosowanych skrótów, przykładem jest użycie skrótu PIP3, który pojawia się po raz pierwszy na stronie 34, podczas gdy jego pełne rozwinięcie – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan – podano dopiero na stronie 49. Skróty te nie zostały również uwzględnione w spisie zastosowanych skrótów. Ogólnie jednak ta część pracy świadczy o dużej staranności autora w jej przygotowaniu, a także o dbałości o jej merytoryczną spójność i estetykę redakcyjną. Na uwagę zasługuje klarowność języka oraz logiczna struktura tekstu, co znacząco ułatwia czytelnikowi śledzenie i zrozumienie przedstawianych treści.

Rozdział *Materiały i Metody* został przygotowany z niezwykłą skrupulatnością i rzetelnością, co świadczy o wysokim poziomie naukowym autora. Szczegółowy opis zastosowanych procedur jasno wskazuje, że eksperymenty przeprowadzono przy użyciu nowoczesnych technik badawczych. Autor wykazał się zaawansowanymi umiejętnościami w zakresie hodowli komórek bakteryjnych, pierwotnych neuronów szczurzych oraz ssaczych linii komórkowych. Prowadził transfekcje neuronów z wykorzystaniem liposomów, elektroporacji, a także transdukcje komórek ssaczych za pomocą wektorów lentiwirusowych. W badaniach zastosowano szeroki wachlarz metod biologii molekularnej, immunocytochemię, mikroskopię fluorescencyjną i konfokalną, a także zaawansowane techniki obrazowania przyżyciowego. Taka różnorodność metodologiczna podkreśla wszechstronność i kompetencje autora w zakresie współczesnych technik badawczych.

W celu identyfikacji kinezyn istotnych dla patologicznego rozwoju neuronów wywołanego hiperaktywacją ścieżki sygnałowej mTOR, zastosowano standardowy w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej model embrionalnych hodowli neuronalnych szczura, wzbogaconych o neurony hipokampalne. Wykazano, że nadprodukcja aktywnej formy kinazy 3-fosfatydyloinozytoli (PI3K) wpływa na morfologię rozwijających się neuronów, powodując wzrost powierzchni ciała komórki oraz liczby zakończeń dendrytycznych. Ponieważ kanoniczna ścieżka aktywacji kompleksu I kinazy mTOR (mTORC1) zależna jest właśnie od PI3K wyniki te mogą sugerować zaangażowanie kinazy mTOR, nie wykluczają jednak udziału innych szlaków sygnalizacyjnych, niezależnych od mTOR, pozostających pod kontrolą PI3K.

Opis zawarty w tym rozdziale, choć bardzo wartościowy, ma charakter szczegółowego przedstawienia procedury eksperymentalnej. W związku z tym bardziej odpowiednim miejscem dla tej treści mogłaby być sekcja dotycząca metodyki. Wyniki badań mających na celu identyfikację kinezyny zaangażowanej w regulację morfologii neuronów zależną od PI3K zostały zaprezentowane w sposób klarowny, z osobnymi wykresami dla każdej

badanej kinezy. Jednak oznaczenie grupy PI3K jako „kontrola-2” (ktrl-2) na rycinach 4.3.1–4.3.37 oraz 4.4 może utrudniać analizę, zwłaszcza że oś Y opisano jako „zmiany liczby zakończeń dendrytycznych lub powierzchni ciała komórki względem ktrl-1”. Dla większej przejrzystości wystarczyłoby opisać oś Y jako „zmiana liczby zakończeń dendrytycznych lub powierzchni ciała komórki” i pozostawić grupę PI3K bez dodatkowych oznaczeń. Niemniej jednak zastosowany sposób prezentacji wyników jest poprawny i nie wpływa negatywnie na ocenę pracy.

Na podstawie pierwszego badania przesiewowego wybrano 9 kinezyn do dalszej analizy, których krótką charakterystykę przedstawiono w Tabeli 4.1. Autor trafnie zauważył, że efekt zastosowania shRNA skierowanych przeciwko kinezynom, skutkujący zmianą fenotypu komórek wywołanego transfekcją PI3K, może wynikać nie tylko z zahamowania ścieżki zależnej od PI3K, ale również z zaburzenia kluczowych funkcji pełnionych przez same kinezy. Kolejne badania, konsekwentnie i logicznie zaplanowane w komórkach z podstawową aktywnością PI3K, umożliwiły wykluczenie z dalszej analizy tych kinezyn, które mogą wpływać na morfologię komórek w sposób niezależny od aktywności PI3K.

Wybór białek KIF3A, KIF3C i KIF21B do dalszych badań, oparty na analizie rozmiarów ciała komórki przedstawionych na Ryc. 4.9B, budzi pewne wątpliwości i wymaga szczegółowego uzasadnienia. Z przedstawionych wyników wynika bowiem, że wyciszenie białka KIF2C, które nie zostało wytypowane do dalszych badań, wywołuje niemal identyczny efekt jak KIF3C, które zostało uwzględnione w kolejnych etapach pracy. Co więcej, KIF2C zdaje się mieć silniejsze działanie niż KIF3A, mimo że to KIF3A zostało wybrane do dalszych eksperymentów. Czy w tym kontekście przeprowadzono wystarczającą liczbę eksperymentów, aby wytypować wszystkie kinezy potencjalnie zaangażowane w modyfikacje morfologii neuronów zależne od mTOR? Warto również doprecyzować, ile dokładnie eksperymentów przeprowadzono – czy była to próbka równa $N = 3$, czy większa, przedział $n = 50–120$ jak opisano w legendzie dla Ryc. 4.9B? Zbyt mała liczba badań mogła bowiem prowadzić do błędu II rodzaju, czyli niepowodzenia w wykryciu istniejącego efektu, co skutkowałoby fałszywie negatywnym wynikiem statystycznym.

Podobne zastrzeżenia dotyczą decyzji o pominięciu KIF26B w dalszych badaniach, uzasadnionej ograniczoną wiedzą na temat roli tego białka w układzie nerwowym. Takie podejście może jednak ograniczać potencjał badawczy projektu. Analiza mniej poznanego białka, jakim jest KIF26B, mogłaby otworzyć nowe perspektywy naukowe i przyczynić się do odkrycia nieznanych dotąd mechanizmów. Wykluczenie tego białka stanowi zatem pewne ograniczenie i potencjalną stratę dla możliwości pełnego wykorzystania wyników tej pracy.

Również w przypadku analizy ekspresji kinezyn w neuronach transdukowanych wektorem lentiwirusowym pULTRA-shTSC2 (Rycina 4.11.), wątpliwości budzi liczba przeprowadzonych powtórzeń. Czy doktorant wykonał analizę mocy statystycznej (ang. power analysis), np. przy użyciu narzędzia G*Power lub innego, aby określić minimalną liczbę powtórzeń niezbędną do osiągnięcia istotności statystycznej i zminimalizowania ryzyka błędu II rodzaju? Istnieje ryzyko, że $N=3$ może być niewystarczające (należy pamiętać, że powtórzenia techniczne nie są równoznaczne z biologicznymi). Wyniki zaprezentowane na Ryc. 4.11.A (dla KIF3A) sugerują, że zwiększenie liczby powtórzeń mogłoby poprawić istotność statystyczną. Czy w przypadku KIF3C (Ryc. 4.11.B) eksperyment również

przeprowadzono w trzech powtórzeniach w komórkach z wyciszoną ekspresją *Tsc2*? Na rycinie widoczne są jedynie dwa punkty pomiarowe.

W dalszej części pracy podjęto próbę powiązania zaobserwowanej zmiany fenotypu komórkowego z funkcjami znanych kinezyn oraz zbadania, czy funkcje te ulegają zakłóceniom w modelu z wyciszoną ekspresją genu *Tsc2*. Konsekwentnie przeprowadzono szczegółowe badania kluczowych funkcji kinezyn, co stanowi mocną stronę pracy. Doktorant wykazał się znakomitym opanowaniem warsztatu badawczego, co znajduje odzwierciedlenie w precyzyjnie zaplanowanych i starannie opisanych eksperymentach. Szczegółowość przedstawionych metod badawczych świadczy o dużej świadomości metodologicznej oraz wysokiej jakości podejścia analitycznego. Jednak, do niektórych wyników badań doktorant odnosi się z nieco przesadnym entuzjazmem, co może wpływać na ich interpretację. Eksperymenty z wykorzystaniem neuronów hipokampalnych w ósmym dniu hodowli nie wykazały wpływu obniżonej ekspresji *Tsc1/Tsc2* na powierzchnię ciała komórki (Ryc. 4.16. B), co jest zresztą zgodne z wynikami prezentowanymi na Ryc. 4.9. B., gdzie również nie zaznaczono znamienności w przypadku porównania Ktrl-2 (shTSC2) do Ktrl-1 (pSUPER), doktorant zaś pisze: *„Zgodnie z oczekiwaniami, zastosowanie shRNA przeciwko Tsc2 jak i Tsc1, skutkowało zwiększeniem powierzchni ciała komórki względem kontroli transfekowanej pSUPER, choć zmiany te okazały się nie istotne statystycznie”*.

W celu rozszerzenia badań na komórki nieneuronalne wybrano linię unieśmiertelnionych szczurzych fibroblastów Rat2. Analiza tempa podziałów komórkowych oraz powierzchni komórek w badanych liniach dostarczyła interesujących obserwacji. Wyniki wskazują, że komórki linii pLKO-shKIF3A charakteryzują się zauważalnie wolniejszym tempem wzrostu w porównaniu z liniami kontrolnymi, co sugeruje, że wyciszenie genu KIF3A może wpływać na dynamikę proliferacji. Z kolei komórki linii shTSC2-shKIF3C dzielą się w tempie zbliżonym do linii kontrolnych, jednak ich rozmiary są istotnie mniejsze, co może świadczyć o wpływie tych genów na regulację wzrostu komórkowego. Tego rodzaju różnice w morfologii i podziale komórek podkreślają specyficzną rolę wyciszanych genów w kontrolowaniu procesów związanych zarówno z proliferacją, jak i utrzymaniem odpowiedniej wielkości komórek.

Transport lizosomów, kierowany m.in. przez kinezyne przemieszczające te organella po mikrotubulach, pozostaje w ścisłym związku z autofagią i aktywnością kinazy mTOR. Procesy te wspólnie uczestniczą w regulacji homeostazy komórkowej, wpływając na degradację makrocząsteczek, adaptację metaboliczną oraz reakcję komórki na stres. W związku z tym autor pracy słusznie podjął się analizy zmian w ruchu pęcherzyków zawierających LAMP1-GFP w uzyskanych liniach Rat2. Jednakże wyniki eksperymentów wykazały, że wyciszenie genów dla wybranych kinezyn (*Kif3a*, *Kif3c*) nie powodowało istotnych zmian w dynamice transportu lizosomów. Mimo precyzyjnego przedstawienia danych na rycinach, dodanie krótkiego podsumowania oraz wyraźnej konkluzji wynikającej z opisanych analiz znacznie ułatwiłoby odbiór tej części wyników i pomogłoby w lepszym zrozumieniu kontekstu badanego problemu.

Dyskusja pracy stanowi szczegółowe i wnikliwe podsumowanie uzyskanych wyników badań. Autor z dużą dozą krytycyzmu analizuje swoje osiągnięcia, co świadczy o jego dojrzałości naukowej i rzetelnym podejściu badawczym. Warto podkreślić, że omawia wyniki w odniesieniu do najnowszej literatury, co nadaje pracy

kontekst i podkreśla jej miejsce w szerszym dyskursie naukowym. Autor wykazuje również świadomość, że przeprowadzone badania, choć niezwykle obiecujące, wymagają dalszych prac, by w pełni zrozumieć potencjalną rolę kinezyn w zależnym od mTOR wzroście neuronów. Rozdział ten wieńczy podsumowanie, które jest nie tylko klarowne, ale również przemyślane. Jednak ta część Dyskusji dotyczy głównie podsumowania uzyskanych wyników badań i mogłaby znacząco wzbogacić rozdział *Wyniki*, gdzie brakuje całościowego ujęcia zgromadzonych danych i ich interpretacji.

Rozdział *Podsumowanie i Wnioski* stanowi próbę odpowiedzi na główny cel pracy, którym było zbadanie, czy któraś z kinezyn odgrywa istotną rolę w nadmiernym wzroście neuronu w modelu stwardnienia guzowatego. Autor w tej części w sposób skrupulatny podsumowuje wyniki swoich badań, przedstawiając kluczowe dane w sposób logiczny i dobrze uporządkowany. Szczególnie warto docenić precyzyjne zestawienie uzyskanych rezultatów oraz ich zgodność z postawionymi celami szczegółowymi. Jednakże w tym rozdziale brakuje wyraźnie sformułowanego ostatecznego wniosku, który pomógłby odbiorcy lepiej zrozumieć znaczenie uzyskanych wyników w kontekście badanego problemu. Warto byłoby również dodać refleksję na temat potencjalnych implikacji praktycznych uzyskanych wyników oraz wskazanie konkretnych kierunków dalszych badań, które mogłyby rozwijać badania nad rolą kinezyn w patologii TSC.

Podsumowując, pomimo przedstawionych uwag i sugestii, nie sposób zaprzeczyć, że tematyka rozprawy, dotycząca identyfikacji kinezyn kluczowych dla patologicznego rozwoju neuronów w modelu stwardnienia guzowatego, jest w pełni uzasadniona oraz stanowi istotny wkład w rozwiązanie ważnego problemu naukowego. Podjęcie badań nad rolą białek motorycznych, takich jak kinezyny, w kontekście zaburzeń związanych z zespołem stwardnienia guzowatego, wpisuje się w aktualne wyzwania badawcze współczesnej neurobiologii. Co więcej, praca ta otwiera nowe perspektywy w zrozumieniu mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za patologię, dostarczając jednocześnie wartościowych danych naukowych, które mogą przyczynić się do postępu w tej dziedzinie. Szczególną uwagę należy zwrócić na umiejętność kandydata w zakresie projektowania i prowadzenia badań naukowych przy zastosowaniu nowych technik badawczych. Wyniki przedstawione w pracy mogą stanowić solidną podstawę do dalszych badań nad mechanizmami patologicznymi związanymi z TSC, a także potencjalnie przyczynić się do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Tym samym recenzowana rozprawa stanowi dowód nie tylko na szeroką wiedzę kandydata w zakresie nauk biologicznych, ale również na jego zdolność do samodzielnego prowadzenia badań naukowych na wysokim poziomie.

Stwierdzam, wobec tego, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego o dopuszczenie mgr Jana Witolda Węśławskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



UNIwersYTET KAZIMIERZA WIELKIEGO
W BYDGOSZCZY

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

Katedra Biochemii i Biologii Komórki
ul. Ks. Józefa Poniatowskiego 12, 85-671 Bydgoszcz



Bydgoszcz, 1 luty 2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Jana Witolda Węśławskiego p.t. **„Poszukiwanie kinezyn kluczowych dla patologicznego rozwoju neuronu w modelu stwardnienia guzowatego”**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Jana Witolda Węśławskiego została przygotowana pod naukową opieką prof. dr. hab. Jacka Jaworskiego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej. Rozprawa ma klasyczną postać liczącej 220 stron monografii opatrzonej tytułem: „Poszukiwanie kinezyn kluczowych dla patologicznego rozwoju neuronu w modelu stwardnienia guzowatego”. W związku z tak sformułowanym tytułem nasuwa się pewna refleksja. Choć zgadzam się z Autorem, że badania naukowe są ciągłym poszukiwaniem i znużającym odkrywaniem tajemnic natury, to po lekturze rozprawy muszę stwierdzić, że jej Autor osiągnął ważny etap w owych poszukiwaniach i dzięki swej dociekliwości odkrył, które z licznych motorów molekularnych należących do rodziny kinezyn uczestniczą w procesach istotnych dla patologicznego rozwoju neuronu w modelu stwardnienia guzowatego.

Stwardnienie guzowate (TSC od ang. Tuberos Sclerosis Complex) jest genetyczną, wielonarządową chorobą objawiającą się w okresie niemowlęcym stanami padaczkowymi, a w późniejszym okresie rozwojem nienowotworowych guzów m.in. w obrębie skóry, narządu wzroku, serca i układu nerwowego. Rozwój guzów w mózgu prowadzi do upośledzenia umysłowego i zaburzeń osobowości. U podstaw rozwoju TSC leżą mutacje w genach *Tsc1* i *Tsc2* kodujących białka hamujące aktywność kinazy mTOR, a konsekwencją tego jest nadmierna aktywacja kinazy mTOR. Związkiem silnie hamującym mTOR jest rapamycyna i jej pochodne. Jednakże kinaza mTOR jest zaangażowana w procesy wzrostu i dojrzewania wszystkich ssaczych komórek, w związku z czym stosowanie tych związków jako leków daje silne efekty uboczne.

Badania rozwijane przez zespół pracujący pod kierownictwem prof. Jacka Jaworskiego wskazują, że w patologii komórek nerwowych nadmierny wzrost jest stymulowany przez mTOR, a dużą rolę w tym procesie odgrywa wewnątrzkomórkowy transport z udziałem motorów molekularnych poruszających się wzdłuż mikrotubul. Wcześniejsze wyniki wykazały powiązania pomiędzy transportem z udziałem dyneiny i ścieżką sygnałową mTOR, natomiast udział kinezyń do tej pory nie był poddany analizie. Uzupełnienia tej luki poznawczej podjął się Pan mgr Jan Węślawski, który jako główny cel rozprawy postawił sprawdzenie czy któryś z motorów molekularnych należących do rodziny kinezyń w istotny sposób uczestniczy w mechanizmie nadmiernego wzrostu neuronu stymulowanego przez ścieżkę sygnałową mTOR. By zrealizować to naukowe wyzwanie Doktorant sformułował dwa cele szczegółowe:

- (1) identyfikacja kinezyń istotnych dla patologii TSC;
- (2) poznanie mechanizmu łączącego zidentyfikowane kinezyń z patologią TSC.

Tak postawione cele pracy są bardzo dobrze osadzone w aktualnej wiedzy i w naturalny sposób wpisują się w kierunki badań nad TSC. W rozdziale 2 Doktorant zwięźle przedstawił teoretyczne założenia rozprawy i konieczność jej podjęcia. Jednym z argumentów uzasadniającym podjęcie tego tematu było stwierdzenie, że badania zmierzające do zrozumienia procesów towarzyszących nadmiernej aktywacji kinazy mTOR w komórkach nerwowych są konieczne dla opracowania nowych form terapii.

We 'Wstępie' Doktorant dokonał obszernego wprowadzenia do podjętego problemu badawczego, który zilustrował dziewięcioma rycinami w większości zaczerpniętymi z literatury. Ze względu na przedmiot badań, Autor opisał budowę i rozwój neuronu. Sporo uwagi poświęcił składnikom cytoszkieletu komórki nerwowej, szczególny nacisk kładąc na mikrotubule i ich funkcje w pierwotnej rzęsce. Zgodnie z tematyką pracy, znaczną część 'Wstępu' zajmuje opis kinezyń, ich budowy, klasyfikacji, roli w transporcie wewnątrzkomórkowym i regulacji przez różne ścieżki sygnałowe. Kolejna część 'Wstępu' to opis struktury i funkcji kinazy mTOR oraz jej roli w patologii TSC. W ostatnim podrozdziale Autor odniósł się do aktualnej wiedzy na temat wzajemnej regulacji mTOR i kinezyń w transporcie wewnątrzkomórkowym różnych komórek oraz w różnych stanach patologicznych. Zawarte w tym rozdziale informacje są do tego stopnia szczegółowe, że przydałoby się więcej schematów podsumowujących opisane procesy. Przykładem jest podrozdział 1.3.5 opisujący zawiłą regulację kinazy mTOR. Poprzez dodanie autorskiego schematu Doktorant wykazałby się umiejętnością dokonywania syntezy skomplikowanych procesów komórkowych. Przy okazji chciałabym zwrócić Doktorantowi uwagę na fakt, że we 'Wstępie' pominął odnośniki do rysunków zawartych w tej części rozprawy, zatem są one dość luźno powiązane z treścią tego rozdziału. Natomiast informacje podane we 'Wstępie' są poparte licznymi odnośnikami

do literatury, zarówno tej najnowszej, jak i starszych opracowań. Tym samym Pan Węśławski udowodnił, że posiada szeroką, specjalistyczną wiedzę w obszarze prowadzonych badań.

Z obowiązku recenzenta chciałabym wskazać na pewne nieścisłości jakie dostrzegłam w opisie cytoszkieletu. Na stronie 15 Autor krótko opisał filamenty pośrednie i mikrofilamenty. Informacje na temat filamentów pośrednich zostały poparte odnośnikiem do rozdziału w książce z roku 1999 (Kirkpatrick & Brady, 1999). Proszę Doktoranta o wyjaśnienie jak przez ostatnie lata rozwinęła się wiedza na temat budowy i różnorodności filamentów pośrednich, a w szczególności neurofilamentów. Omawiając strukturę mikrofilamentów Autor podał, że „Proces wydłużania włókien zachodzi znacznie wydajniej na końcu ostrym, w tym czasie koniec kolczasty często ulega degradacji”. W zdaniu tym nastąpiła zapewne pomyłka, gdyż to koniec kolczasty, zwany też końcem ‘+’, jest szybko rosnący. Ponadto niefortunnie użyte zostało słowo „degradacja”, które sugeruje hydrolizę łańcucha polipeptydowego, co nie jest bezpośrednią przyczyną skracania filamentu aktynowego. Dynamika filamentu polega bowiem na różnicach w kinetyce asocjacji i dysocjacji podjednostek globularnej aktyny na obu końcach. Odlączone podjednostki nie ulegają natychmiastowej degradacji i mogą ponownie zostać włączone do filamentu. Dodatkową nieścisłością jest stwierdzenie, że „Kontrolowane wydłużanie i skracanie włókien aktynowych jest podstawą ameboidalnego ruchu...”. Nie do końca mogę się z tym zgodzić, gdyż za ruch ameboidalny zachodzący na drodze wysuwania pseudopodiów (ang. blebs) jest głównie odpowiedzialna aktywność kurczliwa korteksu aktynowego, a dynamiczna polimeryzacja rozgałęzionej sieci filamentów napędza ruch typu mezenchymalnego. Pomimo pewnych nieścisłości jakie pojawiły się w tekście rozprawy, ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta oceniam bardzo pozytywnie.

Materiałem użytym w początkowych badaniach były szczurze, embrionalne komórki neuronalne wzbogacone o neurony hipokampalne. Poszukując kinezyn uczestniczących w nadmiernym rozroście ciała komórki, Autor przeprowadził badania przesiewowe na dwóch liniach komórkowych. Pierwsza linia została stransformowana plazmidem zawierającym DNA kodujące konstytutywnie aktywną podjednostkę katalityczną kinazy PI3, silnego aktywatora ścieżki mTOR. Drugim typem komórek były szczurze neurony, w których zwiększenie aktywacji mTOR uzyskano poprzez wyciszenie *Tsc1/Tsc2* metodą interferencji RNA. Jest to model TSC rutynowo stosowany w Laboratorium Neurobiologii Molekularnej.

W efekcie dwuetapowych badań przesiewowych, do których użyto dostępną bibliotekę shRNA przeciwko mRNA większości ciężkich łańcuchów kinezyn, wyłonione zostały cztery kinezy (KIF3A, KIF3C, KIF21B oraz KIF26B). Ich wyciszenie miało największy wpływ na zatrzymanie nadmiernego wzrostu neuronu spowodowanego aktywacją mTOR w modelu TSC. Należy podkreślić, że osiągnięcie pierwszego celu rozprawy było możliwe dzięki żmudnym

analizom eksperymentalnym i statystycznym, metodycznej optymalizacji warunków hodowli i świetnie zaplanowanym doświadczeniom kontrolnym. Analizy zostały udokumentowane licznymi ilustracjami, na których zostały zebrane wyniki wszystkich przeprowadzonych doświadczeń.

Na podstawie uzyskanych wyników oraz zawartych w literaturze informacji, analizy funkcjonalne Doktorant ograniczył do trzech typów kinezyn (KIF3A, KIF3C, KIF21B) należących do rodzin kinezyny-2 i kinezyny-4. Przeprowadzenie różnorodnych badań funkcjonalnych wymagało dostosowania modelu komórkowego oraz metody transfekcji. Na przykład, zwiększenie wydajności transfekcji shRNA, pozwalające na przeprowadzenie analiz metodami biochemicznymi, wiązało się ze zmianą metody z transfekcji Lipofektaminą na transfekcję wektorem lentiwirusowym, a analiza dynamiki wzrostu mikrotubul wiązała się z wykorzystaniem komórek świeżo wyizolowanych z mózgow szczurzych embrionów, które transfekowano metodą elektroporacji. Podjęcie tych decyzji wymagało zarówno dogłębnej wiedzy na temat procesów zachodzących na różnych etapach rozwoju neuronów, jak też wiedzy dotyczącej dostępnych metod, ich zalet i ograniczeń. Należy również podkreślić, że w tekście rozprawy Autor precyzyjnie uzasadnia jakimi przesłankami się kierował w podejmowaniu decyzji co do dalszych eksperymentów. Świadczy to o Jego umiejętności świadomego i samodzielnego prowadzenia badań.

Przyżyciowe obrazowanie komórek w połączeniu ze specjalistycznym oprogramowaniem pozwoliło na przeprowadzenie analiz funkcji motorycznych kinezyn oraz ich roli w wydłużaniu mikrotubul. Stosując te zaawansowane techniki Doktorant otrzymał piękne obrazy komórek, w których dzięki fluorescencyjnie znakowanym białkom zaobserwował poruszające się obiekty, co udokumentował na dołączonym materiale video. Niestety, pomimo dobrze przemyślanym warunkom doświadczenia, otrzymane wyniki nie były konkluzywne. Pomimo tego, że w przypadku komórek z wyciszoną ekspresją *Tsc2* stwierdzona została zwiększona średnia prędkość i droga przebyta przez KIF21B, to wyniki nie wykazały istotnej statystycznie różnicy w stosunku do komórek kontrolnych. Podobnie jak w doświadczeniu testującym udział KIF21B na dynamikę mikrotubul, w którym wyciszenie tej kinezyny nie przyniosło oczekiwanych rezultatów.

Celem prześledzenia wpływu kinezyn KIF3A i KIF3C na rozwój pierwotnych rzęsek w neuronach hipokampalnych z wyciszoną ekspresją *Tsc1* i *Tsc2*, Doktorant wygenerował trójwymiarowe modele komórek znakowanych przeciwciałem przeciw cyklazie adenylanowej 3, która jest neuronalnym markerem rzęsek. Dokonując obrotu zdjęć uzyskanych w mikroskopie konfokalnym, Pan Węśławski uwidoczniał rzęski skierowane w różne strony. Załączone projekcje pozwalają nam z jednej strony podziwiać wyraźnie widoczne rzęski o

różnej długości sterzące na powierzchni komórki, a z drugiej umiejętności Autora tych modeli. Dokładne analizy prowadzone były jednak na obrazach dwuwymiarowych. W tych eksperymentach Autorowi udało się wykazać, że obniżenie ekspresji zarówno KIF3A, jak i KIF3C powodowało wydłużenie rzęski, co było dodatkowo wzmacniane przez jednoczesne wyciszenie *Tsc1* w przypadku KIF3A i *Tsc2* dla KIF3C. Doświadczenie zostało przeprowadzone również na świeżo wyizolowanych neuronach korowych, w których wyciszenie genów uzyskano jeszcze przed zróżnicowaniem. W tym przypadku zwiększenie średniej długości rzęski na skutek wyciszenia *Tsc2* było odwracane przez wyciszenie KIF3A i KIF3C, ale ze względu na duży rozrzut wartości, różnice nie były istotne statystycznie.

Ponieważ wiadomo, że rzęski są regulowane przez autofagię, Autor zamierzał przeprowadzić analizy rozwoju rzęsek w warunkach głodzenia, ale eksperyment się nie powiódł ponieważ komórki nerwowe wchodziły w apoptozę. Między innymi z tego względu ostatni etap badań Doktorant zdecydował się przeprowadzić na szczurzych fibroblastach, w których najpierw wyciszył *Tsc2*, a następnie *Kif3A* i *Kif3C*. W tej linii komórkowej Autor rozprawy zaobserwował wpływ wyciszenia *Tsc2* na liczbę komórek posiadających rzęskę oraz wykazał udział KIF3A i KIF3C w rozwoju rzęski. Natomiast analiza ruchu pęcherzyków lizosomalnych nie wykazała udziału w tym procesie ani TSC2 ani KIF3A/C.

Badania przeprowadzone przez Doktoranta zostały przez mnie omówione w wielkim skrócie. Zrealizowany przez Niego projekt był ogromnym wyzwaniem, zarówno ze względu na wrażliwy i zmienny materiał jakimi są neurony, jak również na subtelność zmian zachodzących na skutek wyciszenia genów *Tsc1/2* i wybranych kinezyn. Chociaż dobór linii komórkowych i warunków doświadczeń były bardzo dobrze przemyślane, to wiele z otrzymanych wyników było niekonkluzywnych. W tym miejscu warto jednak zauważyć, że szeroko zaplanowane i konsekwentnie przeprowadzone analizy to kolejny dowód na to, iż pomimo niełatwego zadania, Pan Węślawski wykazał się umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Możliwe powody niepowodzeń w uzyskaniu istotnych różnic zostały bardzo dokładnie przeanalizowane w rozdziale Dyskusja. Tym samym Autor rozprawy wykazał się kolejną ważną umiejętnością, tym razem była to zdolność do krytycznej oceny warunków doświadczenia i przewidywania problemów jakie mogą wynikać z ingerencji wywołanej wyciszaniem genów i warunkami hodowli. Jako jeden z powodów niedużych różnic pomiędzy wariantami badanymi a kontrolą oraz dużego rozrzutu wyników Doktorant wskazał nierównomierny poziom wyciszenia genów poprzez transfekcję komórek shRNA. Nasuwa się zatem pytanie, czy w tej sytuacji lepszym rozwiązaniem nie byłby knockout genów *Tsc1/2* i wybranych kinezyn np. metodą CRISPR/Cas?

W rozdziale Dyskusja Pan Węśławski skonfrontował swoje wyniki z danymi dostępnymi w literaturze, czym ponownie udowodnił zdolność do krytycznej analizy danych doświadczalnych. W tym rozdziale zabrakło mi jednak dyskusji otrzymanych wyników w świetle ich znaczenia dla nowych form terapii TSC. Oczekiwałam takich rozważań, gdyż w rozdziale „Cel pracy” ten wątek się pojawia jako uzasadnienie podjęcia badań nad rolą kinezyn w TSC. Proszę zatem Autora rozprawy o wyrażenie opinii, czy zaobserwowane obniżenie nadmiernego wzrostu komórek i rozwoju rzęsek w komórkowych modelach TSC może być w jakiś sposób przydatne w badaniach nad sposobami leczenia TSC.

Podsumowując moją ocenę, z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że:

- 1) **rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta**, czego dowodzą ciekawie napisany wstęp, określenie celu badań na tle zastanej wiedzy oraz dyskusja wyników w kontekście danych literaturowych.
- 2) wybór aktualnej tematyki badawczej, jej powiązanie z trudną w leczeniu chorobą, opracowanie modeli komórkowych TSC oraz zastosowanie szerokiego wachlarza nowoczesnych metod eksperymentalnych **stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**.
- 3) treść rozprawy, w której podejmowane decyzje zostały precyzyjnie uzasadnione, a otrzymane wyniki bogato udokumentowane, **wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej** przez Doktoranta.

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr. Jana Węśławskiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr. Jana Węśławskiego **do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora**.



prof. dr hab. Joanna Moraczewska

dr hab. Paweł Niewiadomski
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytet Warszawski
ul. Banacha 2c pok. 03.34
02-097 Warszawa

Warszawa, 19.02.2025 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Jana Węśławskiego p.t.
„Poszukiwanie kinezyn kluczowych dla patologicznego rozwoju neuronu w modelu stwardnienia guzowatego”

Z przyjemnością podjąłem się recenzowania pracy doktorskiej mgr Jana Węśławskiego dotyczącej roli wybranych kinezyn w patologicznym wzroście komórek nerwowych związanych ze stwardnieniem guzowatym. Stwardnienie guzowate (TSC) to rzadka, genetyczna choroba, która powoduje powstawanie łagodnych guzów w różnych narządach, takich jak mózg, skóra, nerki, serce i płuca. Objawy mogą być różne, od łagodnych zmian skórnych po poważne problemy neurologiczne, takie jak padaczka i niepełnosprawność intelektualna. TSC jest de facto nieuleczalne, a interwencje farmakologiczne bądź chirurgiczne sprowadzają się do łagodzenia objawów. Co więcej, stosowana w leczeniu rapamycyna ma wiele skutków ubocznych, co ogranicza jej zastosowanie. Zatem tematyka, której zbadanie podjął się doktorant ma nie tylko znaczenie czysto naukowe, ale również znaczny potencjał zastosowania klinicznego.

Ponieważ jednym z głównych objawów TSC na poziomie komórkowym jest nienaturalny rozrost drzewka dendrytycznego w neuronach, mgr Węśławski postawił hipotezę, że w patologii tej choroby biorą udział kinezy, motory molekularne niezbędne dla transportu białek i organelli wzdłuż wypustek nerwowych. W swojej pracy Doktorant sprawdził tę hipotezę przy użyciu modelu komórkowego TSC oraz przeanalizował możliwe mechanizmy molekularne odpowiedzialne za udział wybranych kinezyn w patologii TSC.

Praca ma typowy układ charakterystyczny dla rozpraw doktorskich. We „Wstępie” Doktorant podsumowuje obecny stan wiedzy na temat neuronów, ze szczególnym naciskiem na transport wewnątrzkomórkowy, kinezyn oraz kinazy mTOR, ze szczególnym uwzględnieniem jej roli w stwardnieniu guzowatym. Rozdział ten napisany jest przejrzysto i uzupełniony o estetycznie wykonane ilustracje.

Następnie Doktorant przedstawia „Cele pracy”. Założeniem rozprawy jest zbadanie czy któraś z kinezyn pełni kluczową rolę w komórkowych objawach charakterystycznych dla modelu stwardnienia rozsianego. Celem drugiej części pracy jest scharakteryzowanie molekularnych mechanizmów tej roli.

W „Materiałach i Metodach” Doktorant bardzo szczegółowo opisuje wykorzystane metody. Rozdział napisany jest bardzo rzetelnie i umożliwiłby powtórzenie przedstawionych badań nawet osobie z niewielkim doświadczeniem. W związku z tym recenzowana praca doktorska będzie stanowić cenne źródło informacji dla osób rozpoczynających pracę z modelem komórkowym używanym przez Doktoranta. W niektórych rozdziałach wręcz wydaje mi się, że opisy są nieco zbyt szczegółowe, jak na przykład opis metody izolacji DNA lub trawienia enzymami restrykcyjnymi, które prawdopodobnie można było pominąć.

W części „Wyniki” Doktorant opisuje badania wykonane w ramach pracy doktorskiej. W pierwszej kolejności analizuje wpływ utraty funkcji panelu kinezyn na patologiczny rozrost komórek nerwowych wywołany nadaktywną sygnalizacją mTOR uzyskaną przy użyciu katalitycznej podjednostki kinazy PI3K. Na podstawie tego pierwszorzędowego badania, Doktorant dokonał selekcji najbardziej

obiecujących kinezyn do badania drugorzędowego, w którym do aktywacji ścieżki mTOR wykorzystuje utratę funkcji TSC2, co stanowi model molekularnie zbliżony do patologii stwardnienia guzowatego. Na podstawie tych badań, Doktorant zauważył, że cztery z wybranych kinezyn: KIF3A, KIF3C, KIF21B oraz KIF26B mogą być zaangażowane w patologiczny rozrost neuronów wywołany utratą funkcji TSC2, przy czym do dalszych badań wybrał pierwsze trzy z tych kinezyn, kierując się doniesieniami literaturowymi.

W drugiej części „Wyników”, mgr Węśławski podejmuje się systematycznego badania potencjalnego mechanizmu działania badanych kinezyn w modelu stwardnienia guzowatego. Bada ich mobilność w komórkach z wyciszoną aktywnością TSC2, ich wpływ na dynamikę mikrotubul, na rozwój rzęsek, a także w modelu nieneuronalnym na tempo podziałów komórkowych, wzrostu rzęsek oraz transportu lizosomów.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant umieszcza swoje wyniki w kontekście obecnego stanu wiedzy na temat badanych białek, stosowanych metod, oraz patologii TSC. Następnie w „Podsumowaniu i Wnioskach” przedstawia najważniejsze tezy swojej pracy.

Pytania i uwagi:

1. We wstępie, Doktorant umieszcza funkcję kinezyn w transporcie wewnątrzrzęskowym w kategorii niekanonicznych funkcji tych białek. Wydaje się, że jest to jednak rola kanoniczna związana z motoryczną funkcją kinezyn.
2. Większość badań wykonanych przez Doktoranta opiera się na utracie funkcji przy użyciu shRNA. Jednak do każdej z kinezyn stosuje on mieszaninę trzech sekwencji shRNA. O ile skuteczność wyciszenia Doktorant bada przy pomocy metody qPCR, o tyle specyficzność efektu jest o wiele trudniejsza do sprawdzenia. Czy Doktorant sprawdził efekty pojedynczych sekwencji shRNA i próbował korelować siłę wpływu na badane fenotypy z siłą wyciszenia badanego genu? Alternatywą byłoby przeprowadzenie doświadczenia typu „rescue” przy pomocy nadekspresji badanego białka.
3. W nawiązaniu do poprzedniego punktu, Doktorant stosuje jako kontrolę plazmid bez sekwencji shRNA, podczas gdy bardziej prawidłowym byłoby zastosowanie kontroli w postaci plazmidu z sekwencją typu non-targeting control, czyli nie skierowaną przeciwko jakemukolwiek genowi szczurzemu.
4. Ryzyko efektów niespecyficznych shRNA doktorant sam zauważa w badaniach przedstawionych na ryc. 4.7, gdzie nawet pod nieobecność aktywacji ścieżki mTOR, utrata funkcji wielu kinezyn powoduje spadek złożoności drzewka dendrytycznego. Jednak efekt ten jest bardziej lub mniej nasilony i osiąga nawet do 40% wartości kontrolnej. Jeżeli rzekomo „losowe” efekty niespecyficzne osiągają takie nasilenie, to tym bardziej należałoby przetestować pojedyncze shRNA skierowane przeciwko temu samemu genowi, żeby wyselekcjonować sekwencje najmniej podatne na efekty niespecyficzne, a jednocześnie dające silne wyciszenie badanego genu.
5. Również efektowi niespecyficznemu Doktorant przypisuje śmiertelność komórek przy wyciszeniu TSC1. Tu również należałoby przetestować różne sekwencje shRNA żeby zapewnić silny efekt wyciszenia bez niespecyficznej toksyczności.
6. Czy Doktorant rozważał użycie w swoich badaniach metodologii CRISPR/Cas9 jako alternatywy do shRNA? Mutacje genów przy użyciu CRISPR/Cas9 są najczęściej obciążone mniejszym ryzykiem efektów niespecyficznych.
7. W badaniach skuteczności wyciszenia genów metodą qPCR Doktorant stosuje zaledwie po trzy próbki na grupę. Jest to moim zdaniem zbyt mało i prowadzi do wielu wyników „na granicy znamienności statystycznej”. Te wątpliwości można by łatwo rozwiązać stosując większą liczbę próbek. W tego typu badaniach rutynowo stosuje się po 5-6 próbek na grupę.

8. Czym podyktowany był pomysł analizy wpływu badanych kinezyn na funkcję rzęsek w modelu TSC? Czy wiadomo coś na temat wpływu rzęsek pierwotnych na patologię TSC? Czy doktorant rozważył alternatywne metody zaburzenia rozwoju rzęsek, jak np. wyciszenie genów IFT?
9. Jak można w praktyce zastosować wyniki badań przedstawione w pracy? Czy są dostępne sposoby zaburzenia funkcji specyficznych kinezyn u człowieka, które mogłyby być zastosowane w terapii TSC? Czy poza kinezynami można zaproponować inne rodziny białek, które mogą być odpowiedzialne za zaobserwowane fenotypy na poziomie komórkowym, a które mogłyby stanowić dodatkowe cele terapeutyczne?

Powyższe uwagi jedynie nieznacznie wpływają jednak na moją pozytywną ocenę przedstawionej pracy. Doktorant stosuje nowoczesne i różnorodne metody, aby zbadać funkcję kinezyn w patologii TSC. Na szczególną pochwałę zasługuje rygor, z którym mgr Węśławski podchodzi do analizy danych. Nie ulega pokusie wyciągania zbyt daleko posuniętych wniosków, jeżeli wyniki badań nie są jednoznaczne. Posługuje się właściwymi metodami analizy statystycznej i w większości badań stosuje bardzo duże próby, gwarantujące statystyczny rygor. Jeżeli jego badania napotykały na przeszkody metodologiczne, to proponuje alternatywne kierunki badań, które pomogłyby w weryfikacji jego hipotez. Praca potwierdza, że Doktorant posiada ogólną wiedzę teoretyczną i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. **Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczenie mgr Jana Węśławskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.**



Paweł Niewiadomski