

prof. dr hab. Katarzyna Ropka-Molik
Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt
Instytut Zootechniki PIB
Sarego 2, 31-047 Kraków

Kraków, 14.07.2026

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr Hossein Khodadadi

w formie zbioru publikacji pod tytułem:

**„Analiza mechanizmu molekularnego akumulacji ubikwitynowanych białek
spowodowanej obniżeniem ekspresji Nfe2l1 w neuronalnie zróżnicowanych komórkach
P19”**

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Genetyki i
Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu podjęty 20 maja 2026.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Rozprawa została przygotowana w języku angielskim w formie cyklu trzech publikacji naukowych, uzupełnionych syntetycznym omówieniem celu badań, uzyskanych wyników oraz dyskusją. Łączny dorobek stanowiący podstawę rozprawy obejmuje trzy artykuły opublikowane w czasopismach naukowych o łącznej punktacji 352 pkt. MNiSW oraz sumarycznym IF wynoszącym 9,6. Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich prac wchodzących w skład rozprawy, co wskazuje na jego znaczący udział zarówno w planowaniu badań, jak i opracowaniu wyników. Warto podkreślić, że rozprawa powstała w ramach projektu finansowanego ze źródeł zewnętrznych (projekt Narodowego Centrum Nauki Preludium BIS2; 2020/39/O/NZ5/02467), co dodatkowo podkreśla istotność i aktualność podjętej tematyki.

Rozprawa doktorska Pana mgr Hossein Khodadadi przygotowana została w układzie typowym dla rozpraw doktorskich i obejmuje część wprowadzającą, hipotezy badawcze i cele pracy, skrótowy opis materiału i metod, wyniki badań, dyskusję oraz podsumowanie i perspektywy dalszych badań. Z formalnego punktu widzenia przedstawiona do oceny dysertacja nie budzi zastrzeżeń i spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom. Pewien niedosyt budzi natomiast sposób przedstawienia końcowych rezultatów badań. W rozprawie zabrakło wyodrębnionego rozdziału zawierającego syntetyczne, jednoznacznie sformułowane wnioski końcowe, odnoszące się bezpośrednio do postawionych hipotez badawczych oraz celów pracy. Autor w rozdziale „Conclusion and Future Perspectives” koncentruje się przede wszystkim na podsumowaniu poszczególnych publikacji oraz wskazaniu perspektyw dalszych

badan, jednak czytelnik nie otrzymuje klasycznego zestawienia najważniejszych osiągnięć naukowych wynikających z przeprowadzonych analiz. W mojej ocenie zamieszczenie kilku jasno sformułowanych wniosków końcowych podniosłoby wartość rozprawy, ułatwiając ocenę stopnia realizacji założonych celów badawczych oraz znaczenia uzyskanych wyników dla rozwoju wiedzy w zakresie biologii molekularnej procesów neurodegeneracyjnych.

Jako uwagę ogólną należy wskazać brak pełnej konsekwencji w stosowaniu nomenklatury genów i białek w tekście całej rozprawy. W wielu miejscach, nazwy genów i odpowiadających im białek stosowane są zamiennie, bez zachowania obowiązujących zasad zapisu. W przypadku genów mysich nazwy powinny być zapisywane kursywą, z wielką literą rozpoczynającą nazwę (np. *Nfe2l1*, *Map2*, *Sod1*), natomiast symbole białek powinny być podawane bez kursywy i wielkimi literami (NFE2L1, MAP2, SOD1). W rozprawie zasada ta nie jest konsekwentnie przestrzegana i może prowadzić do nieporozumień interpretacyjnych. Dostrzegalne są również nieścisłości terminologiczne. W streszczeniu pracy, Autor odnosi się do „neuron-specific knockout or knockdown (KD) of the *Nfe2l1* gene”, podczas gdy przedstawione badania eksperymentalne opierają się wyłącznie na czasowym wyciszeniu ekspresji genu z wykorzystaniem siRNA, a nie na modelu knockout. W różnych częściach pracy pojawiają się odmienne sposoby zapisu inhibitora proteasomu (MG132 oraz Mg132), co również wskazuje na brak jednolitości nomenklatury. W tekście rozprawy występują również drobne uchybienia językowe i stylistyczne.

Z uwagi na powierzona mi rolę recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kwestię spójności poszczególnych publikacji wchodzących w skład dysertacji w kontekście tytułu rozprawy. Tytuł dysertacji wskazuje na bardzo konkretny problem naukowy, jakim jest analiza mechanizmu molekularnego prowadzącego do akumulacji ubikwitynowanych białek w następstwie obniżenia ekspresji *Nfe2l1* w neuronalnie zróżnicowanych komórkach P19. Taki tytuł sugeruje, że zasadniczym celem rozprawy jest szczegółowe wyjaśnienie określonego mechanizmu biologicznego. W mojej ocenie publikacje stanowiące podstawę rozprawy są powiązane wspólną tematyką obejmującą rolę czynnika NFE2L1, proces różnicowania neuronalnego komórek P19, proteostazę oraz odpowiedź na stres proteotoksyczny, jednak stopień ich bezpośredniego związku z głównym problemem badawczym jest zróżnicowany. Pierwsza publikacja ma przede wszystkim charakter metodyczny i koncentruje się na opracowaniu modelu eksperymentalnego umożliwiającego wyciszenie ekspresji genów podczas neurogenezy. Trzecia publikacja stanowi natomiast wartościowy przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego funkcji NFE2L1 w chorobach neurodegeneracyjnych, jednak jej zakres tematyczny wykracza poza zasadniczy problem badawczy sformułowany w tytule rozprawy.

W konsekwencji jedynie druga publikacja stanowi bezpośrednią realizację głównego celu badawczego i dostarcza wyników eksperymentalnych odnoszących się do mechanizmów związanych z akumulacją ubikwitynowanych białek po wyciszeniu *Nfe2l1*. Powoduje to, że rozprawa ma charakter bardziej wielowątkowego opracowania skupionego wokół biologicznej roli *Nfe2l1* niż zwartego cyklu publikacji prowadzących krok po kroku do wyjaśnienia jednego, ściśle określonego mechanizmu molekularnego.

Ocena merytoryczna rozprawy

Oryginalność tematyki i cel badań

Przedłożona do recenzji rozprawa dotyczy bardzo aktualnej i istotnej problematyki związanej z utrzymaniem proteostazy neuronalnej oraz rolą czynnika transkrypcyjnego NFE2L1 w regulacji odpowiedzi komórkowej na stres proteotoksyczny. Zaburzenia mechanizmów kontroli jakości białek stanowią jeden z kluczowych elementów patogenezы chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Parkinsona, dlatego badania ukierunkowane na poznanie molekularnych podstaw tych procesów mają istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalnie aplikacyjne w przyszłości.

Wstęp został opracowany prawidłowo i świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu. Autor w sposób logiczny przedstawił znaczenie proteostazy w funkcjonowaniu neuronów, rolę układu ubikwityna–proteasom oraz znaczenie NFE2L1 w regulacji odpowiedzi komórkowej na stres. Szczególnie wartościowe jest połączenie zagadnień dotyczących proteasomu, autofagii oraz ferroptozy w kontekście neurodegeneracji. Doktorant trafnie przedstawił aktualny stan wiedzy dotyczący molekularnych mechanizmów prowadzących do akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych białek w neuronach oraz ich znaczenia w patogenezы chorób neurodegeneracyjnych, zwłaszcza choroby Parkinsona. Doktorant trafnie wskazuje istniejące braki w dostępnych danych literaturowych dotyczące roli Nfe2l1 w procesach różnicowania neuronalnego oraz odpowiedzi komórek na stres proteotoksyczny, uzasadniając tym samym podjęcie przedstawionej tematyki badawczej.

Hipotezy badawcze oraz cele pracy zostały sformułowane poprawnie i korespondują z przedstawioną problematyką badawczą. Na pozytywną ocenę zasługuje ich uporządkowanie zgodnie ze strukturą rozprawy i podział na trzy części odpowiadające publikacjom stanowiącym podstawę dysertacji. Taki układ ułatwia śledzenie toku rozumowania Autora oraz pozwala na jednoznaczne powiązanie postawionych hipotez z realizowanymi zadaniami badawczymi. Przedstawione cele są jasne, logiczne i wzajemnie się uzupełniają. Pewne zastrzeżenia budzi jednak sposób sformułowania części hipotez, zwłaszcza w odniesieniu do pierwszej publikacji. Niektóre z nich mają charakter bardziej metodologiczny niż naukowy i dotyczą przede wszystkim przydatności zastosowanego modelu eksperymentalnego oraz skuteczności opracowanej procedury badawczej. W konsekwencji nie zawsze spełniają klasyczne kryteria hipotezy naukowej, która powinna odnosić się do przewidywanych zależności biologicznych i podlegać jednoznacznej weryfikacji eksperymentalnej.

Dodatkowo część hipotez przedstawionych dla Publikacji 3, będącej pracą przeglądową, ma charakter bardzo ogólny i została sformułowana w sposób przypominający tezy wynikające z aktualnego stanu wiedzy, a nie pytania badawcze wymagające weryfikacji. Z tego względu ich wartość w kontekście rozprawy doktorskiej jest bardziej porządkująca niż poznawcza.

Metodyka badań oraz wyniki

Metodyka badań oraz wyniki zostały przedstawione zgodnie z układem trzech publikacji stanowiących podstawę rozprawy. Autor przyjął logiczny układ narracji, rozpoczynając od przedstawienia modelu eksperymentalnego umożliwiającego wyciszenie ekspresji genów podczas różnicowania neuronalnego komórek P19, następnie prezentując wyniki badań funkcjonalnych dotyczących roli Nfe2l1 w utrzymaniu proteostazy neuronalnej,

a kończąc pracą przeglądową podsumowującą aktualny stan wiedzy na temat znaczenia czynnika NFE2L1 w chorobach neurodegeneracyjnych.

Pierwsza publikacja, opublikowana w czasopiśmie *MethodsX* (Khodadadi i Taniguchi, 2025), przedstawia procedurę różnicowania komórek P19 oraz wyciszania ekspresji genów z wykorzystaniem siRNA. Niewątpliwie stanowi ona wartościowe zaplecze metodyczne dla dalszych badań i jej obecność w cyklu publikacji można uznać za uzasadnioną. Należy jednak podkreślić, że praca ta ma charakter przede wszystkim techniczny i nie dostarcza bezpośrednich danych pozwalających na wyjaśnienie mechanizmu molekularnego akumulacji ubikwitynowanych białek. W konsekwencji jej wkład w realizację głównego celu rozprawy ma charakter pośredni. Dodatkowo zwraca uwagę brak spójności w zakresie stosowanych genów referencyjnych wykorzystywanych w analizach RT-qPCR. W publikacji *MethodsX* zastosowano gen β -actin, natomiast w pracy opublikowanej w *Scientific Reports* (Khodadadi i in., 2025a), czyli drugiej publikacji autorstwa Doktoranta, jako kontrolę endogenną wykorzystano *GAPDH*. Autor nie przedstawił uzasadnienia tej zmiany ani wyników walidacji stabilności ekspresji zastosowanych genów referencyjnych. Ma to istotne znaczenie, ponieważ zarówno gen β -actin, związany z przebudową cytoszkieletu podczas różnicowania neuronalnego, jak i *GAPDH*, którego ekspresja może ulegać zmianom w warunkach stresu komórkowego, nie zawsze są uznawane za optymalne geny referencyjne.

Kluczową część rozprawy stanowi druga publikacja, w której analizowano skutki wyciszenia *Nfe2l1* w neuronalnie zróżnicowanych komórkach P19 poddanych działaniu inhibitora proteasomu MG132. W pracy wykorzystano szereg metod molekularnych, w tym analizę ekspresji genów metodą RT-qPCR, oznaczenia poziomu białek metodą Western blot, immunocytochemię oraz sekwencjonowanie transkryptomu RNA-seq. Za szczególnie interesujący aspekt pracy uważam połączenie wyników analiz proteostazy z oceną zmian transkryptomicznych zachodzących w neuronalnie zróżnicowanych komórkach P19. Analiza RNA-seq wykazała, że inhibicja proteasomu prowadzi do aktywacji szlaków związanych z chorobą Parkinsona oraz innymi procesami neurodegeneracyjnymi, natomiast wyciszenie *Nfe2l1* skutkowało obniżeniem ekspresji genów *Atf6*, *Camk2d* i *Sod1*, pełniących istotną rolę w odpowiedzi na stres komórkowy, homeostazie wapniowej i ochronie antyoksydacyjnej. Nowatorskim elementem badań jest również wskazanie zależności pomiędzy aktywnością *Nfe2l1* a ekspresją lncRNA *Neat1*, co może sugerować udział tego czynnika transkrypcyjnego w regulacji procesów wykraczających poza klasyczną kontrolę funkcjonowania układu ubikwityna - proteasom.

Uzyskane wyniki wskazują na zwiększoną akumulację ubikwitynowanych białek, zmiany ekspresji markerów neuronalnych oraz zaburzenia ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres komórkowy. Praca ta najpełniej odpowiada problemowi badawczemu sformułowanemu w tytule rozprawy, jednak pewne aspekty metodyczne i statystyczne wymagają doprecyzowania.

Przed wszystkim bardziej klarownego wyjaśnienia wymaga, co stanowiło jednostkę eksperymentalną w poszczególnych analizach. Autor deklaruje wykonywanie co najmniej trzech niezależnych eksperymentów, jednak w części rycin przedstawiających wyniki analiz (np. Western blot czy immunocytochemii) pojawiają się oznaczenia $n = 2$ lub $n = 3$. Nie wyjaśniono jednoznacznie, czy wartości te odnoszą się do niezależnych doświadczeń biologicznych, pasażów komórkowych, transfekcji czy szalek hodowlanych. Utrudnia to ocenę

mocy statystycznej przeprowadzonych analiz oraz interpretację uzyskanych wyników. Dobrym podejściem byłoby zamieszczenie schematu eksperymentalnego przedstawiającego przebieg doświadczenia, zastosowane warianty badawcze oraz liczbę powtórzeń biologicznych i technicznych, co znacząco zwiększyłoby przejrzystość części metodycznej.

Wątpliwości budzi również sposób analizy statystycznej. Badania przeprowadzono w układzie obejmującym dwa czynniki eksperymentalne: obecność lub brak wyciszenia *Nfe2l1* oraz obecność lub brak MG132. Jest to klasyczny układ czynnikowy, w którym biologicznie najistotniejsze wydaje się określenie, czy odpowiedź komórek na MG132 zależy od statusu ekspresji *Nfe2l1*. Tymczasem przedstawiony opis metod statystycznych ogranicza się do testu t-Studenta oraz jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. W pracy zabrakło analizy interakcji pomiędzy badanymi czynnikami, która mogłaby dostarczyć bardziej bezpośrednich informacji dotyczących zależności pomiędzy aktywnością *Nfe2l1* a odpowiedzią komórek na stres proteotoksyczny. Pewne wątpliwości budzi również sposób prezentacji części wyników ekspresji genów. Z opisu metod nie wynika jednoznacznie, w jaki sposób przeprowadzono normalizację danych RT-qPCR, co utrudnia ocenę poprawności porównań pomiędzy grupami eksperymentalnymi. Z przedstawionych wyników m.in. na rycinach 7 i 8 oraz w części materiałów uzupełniających można wnioskować, że wartości ekspresji zostały znormalizowane oddzielnie względem odpowiednich kontroli DMSO w każdej z analizowanych grup, co skutkuje przypisaniem wartości referencyjnej fold change FC=1 dla obu wariantów kontrolnych niezależnie. W takim układzie porównanie odpowiedzi komórek siNC i siNfe2l1 po traktowaniu MG132 ((siNC + MG132) vs (siNC + DMSO) oraz (siNfe2l1 + MG132) vs (siNfe2l1 + DMSO)) nie odnosi się bezpośrednio do poziomów ekspresji pomiędzy grupami, lecz do zmian względnych wyliczanych względem dwóch różnych punktów odniesienia. Opis metod nie pozwala jednoznacznie ocenić, czy problem ten został uwzględniony na etapie analizy statystycznej. W związku z tym zasadne wydaje się doprecyzowanie sposobu normalizacji danych oraz wskazanie, czy analizy statystyczne wykonywano na wartościach pierwotnych (np. ΔCt), czy też na danych przeliczonych do postaci fold change.

Dodatkowo niektóre parametry analizy obrazów, takie jak zastosowane w analizie immunofluorescencji określenie „corrected intensity”, nie zostały zdefiniowane wystarczająco precyzyjnie. W prezentacji wyników opisy figur powinny zostać uzupełnione o informacje dotyczące nazw oprogramowań lub narzędzi wykorzystanych do przygotowania przedstawionych grafik. W Tabelach 1 i 2, nie podano numerów akcesyjnych badanych genów, wersji sekwencji lub genomu na podstawie, których projektowano startery oraz informacji dotyczących możliwych wariantów splicingowych i ich analizy zastosowanymi amplikonami. Dodatkowo w tekście rozprawy nie odniesiono się do Tabeli 2.

Trzecia publikacja (Khodadadi i in., 2025b) ma charakter przeglądowy i stanowi wartościowe podsumowanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego funkcji NFE2L1 w procesach neurodegeneracyjnych. Poszerza ona kontekst biologiczny prowadzonych badań i należy ją postrzegać przede wszystkim jako wartościowe uzupełnienie części teoretycznej i dyskusyjnej, a nie równorzędny element eksperymentalnego rozwiązania problemu badawczego.

Dyskusja oraz Wnioski

Dyskusja wyników została przygotowana poprawnie i w większości przypadków odnosi uzyskane rezultaty do aktualnego stanu wiedzy. Autor umiejętnie zestawia własne obserwacje z wynikami innych zespołów badawczych, podkreślając znaczenie czynnika transkrypcyjnego Nfe2l1 w utrzymaniu homeostazy proteostatycznej. Cennym elementem dyskusji jest przedstawianie roli czynnika transkrypcyjnego Nfe2l1 jako jednego z kluczowych regulatorów odpowiedzi komórkowej na zaburzenia funkcjonowania proteasomu komórek nerwowych. Autor wielokrotnie wskazuje na potencjalny udział badanego białka w procesach związanych z neurodegeneracją i jego rolę w takich chorobach jak choroba Pariksona, Alzheimer, Huntingtona oraz stwardnieniu zanikowym bocznym. Na uznanie zasługuje także krytyczne podejście do części uzyskanych wyników oraz wskazanie możliwych przyczyn rozbieżności pomiędzy obserwacjami własnymi a doniesieniami literaturowymi. Dyskusja zachowuje logiczną strukturę i jest prowadzona w sposób spójny, co ułatwia śledzenie toku rozumowania Autora. W wielu miejscach przedstawiona interpretacja wykracza poza prosty opis wyników i świadczy o znajomości tematu oraz umiejętności formułowania biologicznie uzasadnionych hipotez.

W rozdziale Dyskusja, Doktorant wielokrotnie podkreśla potencjalne znaczenie Nfe2l1 jako celu terapeutycznego w chorobach neurodegeneracyjnych. W pracy zabrakło jednak szerszej dyskusji dotyczącej możliwych konsekwencji ogólnoustrojowych wynikających z modulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego NFE2L1. W mojej opinii, biorąc pod uwagę udział Nfe2l1 w regulacji licznych procesów komórkowych oraz ekspresję w różnych tkankach, bardziej szczegółowe omówienie potencjalnych korzyści i ograniczeń takiego podejścia terapeutycznego zwiększyłoby wartość interpretacyjną pracy. Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem modelu *in vitro* opartego na neuronalnie zróżnicowanych komórkach P19. Doktorant wspomina o ograniczeniach zastosowanego modelu, jednak zasadne byłoby szersze odniesienie się do możliwości translacji uzyskanych wyników do warunków *in vivo*. Szczególnie interesujące byłoby omówienie potencjalnych różnic wynikających ze złożoności środowiska tkanki nerwowej oraz obecności dodatkowych mechanizmów regulacyjnych funkcjonujących na poziomie organizmu.

W części poświęconej analizie RNA-seq wartościowym uzupełnieniem dyskusji byłoby bardziej szczegółowe przedstawienie kryteriów wyboru genów poddanych dalszej walidacji eksperymentalnej. Pozwoliłoby to lepiej ocenić biologiczne znaczenie wytypowanych kandydatów oraz prześledzić logikę prowadzącą do wyboru konkretnych markerów do dalszych analiz. Ponadto interesującym rozwinięciem przedstawionych badań byłaby bezpośrednia ocena aktywności proteasomu po wyciszeniu NFE2L1. W obecnej pracy funkcjonowanie układu ubikwityna - proteasom analizowano przede wszystkim pośrednio poprzez ocenę akumulacji ubikwitynowanych białek. Uzupełnienie tych obserwacji o pomiary aktywności proteasomalnej mogłoby dostarczyć dodatkowych argumentów wspierających proponowany mechanizm działania NFE2L1.

Rozprawę zamyka rozdział „Conclusions and Future Perspectives”, w którym Doktorant syntetycznie podsumowuje najważniejsze wyniki uzyskane w ramach poszczególnych publikacji oraz wskazuje potencjalne kierunki dalszych badań. Pewien niedosyt budzi jednak brak wyodrębnionego zestawu jednoznacznie sformułowanych wniosków naukowych odnoszących się bezpośrednio do postawionych hipotez i celów badawczych. W efekcie

czytelnik samodzielnie musi dokonać syntezy najważniejszych osiągnięć rozprawy oraz ocenić stopień realizacji założonych celów. W mojej ocenie zamieszczenie kilku zwięzłych, jasno sformułowanych wniosków końcowych podniosłoby wartość opracowania i ułatwiło identyfikację najistotniejszych rezultatów badań.

Jednocześnie należy podkreślić, że przedstawione podsumowanie prawidłowo odzwierciedla uzyskane wyniki i wskazuje najważniejsze kierunki dalszych badań. Szczególnie wartościowe jest zwrócenie uwagi na potrzebę dalszej weryfikacji funkcji Nfe2l1 w modelach *in vivo* oraz pogłębienia analiz dotyczących molekularnych mechanizmów odpowiedzi komórek nerwowych na zaburzenia proteostazy. Przedstawione perspektywy badawcze wynikają bezpośrednio z uzyskanych rezultatów i świadczą o dobrej orientacji Autora w aktualnych kierunkach rozwoju tej dziedziny.

Wniosek końcowy

Uzyskane wyniki poszerzają aktualny stan wiedzy na temat biologicznej roli Nfe2l1 w komórkach nerwowych i stanowią wartościową podstawę do dalszych badań nad znaczeniem tego czynnika transkrypcyjnego w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, wpisująca się w obszar dziedziny nauk rolniczych, dyscyplinę zootechniki i rybactwo, spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz.1668 ze zm.) i wnoszę o dopuszczenie **mgr Hossein Khodadadi** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Katarzyna Ropka-Molik