



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Umultowska 89
61-614 Poznań

Poznań, 29.10.2018 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Pauliny Mozolewskiej pt.:

Zmiany w mitochondriach ludzkich komórek niosących mutację w genie *IT15*
Changes in mitochondria of human cells carrying the mutation in the *IT15* gene

Praca doktorska mgr Pauliny Mozolewskiej powstała w Katedrze Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, uznanego badacza molekularnych mechanizmów chorób genetycznych. Drugim promotorem ocenianej pracy doktorskiej jest prof. dr hab. Mariusz Więckowski z Pracowni Bioenergetyki i Błon Biologicznych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, który z powodzeniem specjalizuje się w badaniu biologii i fizjologii mitochondriów. Promotorem pomocniczym pracy jest dr Sylwia Barańska.

Przedmiotem badań ujętych w rozprawie doktorskiej mgr Pauliny Mozolewskiej są zmiany w ilości mtDNA i zmiany funkcjonalne w mitochondriach ludzkich komórek, głównie fibroblastów skóry, niosących mutację w genie *IT15*, kodującym huntingtynę. Choroba Huntingtona jest najczęściej występującym dziedzicznym zaburzeniem neurodegeneracyjnym, wywołanym zwiększoną liczbą powtórzeń trójki nukleotydowej (CAG) w pierwszym egzonie genu *IT15*. Liczba powtórzeń trójki CAG stanowi czynnik diagnostyczny i podstawę prognozowania postępu choroby. Agregacja nieprawidłowego białka huntingtyny jest prawdopodobnie główną przyczyną postępującej degeneracji komórek nerwowych w mózgu, co prowadzi do nasilających się zaburzeń funkcji psychicznych, poznawczych i fizycznych. Celem rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Mozolewskiej było określenie potencjalnych dysfunkcji mitochondrialnych w tkankach peryferycznych, tj. komórkach krwi (głównie leukocytach) oraz fibroblastach, u pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Huntingtona oraz korelacja otrzymanych wyników ze stopniem zaawansowania choroby. Grupę kontrolną stanowili ludzie zdrowi, bez obciążenia rodzinnego chorobą Huntingtona, odpowiednio dobrani pod względem płci i wieku.

Formalny opis rozprawy

Głównym elementem ocenianej rozprawy doktorskiej jest spójny tematycznie zbiór trzech wieloautorskich publikacji. Dwie z tych prac mają 4 współautorów, jedna – 13. We wszystkich tych publikacjach Doktorantka zajmuje pierwszą pozycję. Prace zostały opublikowane w dobrych, recenzowanych periodykach międzynarodowych znajdujących się na liście *Journal Citation Research*. Są to następujące prace:

1. Jędrak P, Sowa N, Barańska S, Węgrzyn G (2017) Characterization of conditions and determination of practical tips for mtDNA level estimation in various human cells. *Acta Biochimica Polonica*, 64, 699-704, IF 1,239, 15 pkt. MNiSW
2. Jędrak P, Krygier M, Tonska K, Drozd M, Kaliszewska M, Bartnik E, Sołtan W, Sitek EJ, Stanisławska-Sachadyn A, Limon J, Sławek J, Węgrzyn G, Barańska S (2017) *Metabolic Brain Disease*, 32, 1237-1247, IF 2,441, 25 pkt. MNiSW
3. Jędrak P, Mozolewski P, Węgrzyn G, Więckowski M (2018) Mitochondrial alternations accompanied by oxidative stress conditions in skin fibroblasts of Huntington's disease patients. *Metabolic Brain Disease*, doi: 10.1007/s11011-018-0308-1, IF 2,441, 25 pkt. MNiSW



Praca doktorska zaczyna się spisem treści po czym zamieszczone jest 6,5 stronicowe streszczenie, napisane zgodnie z wymogami w języku angielskim i polskim. Po trzech publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zamieszczono oświadczenia współautorów tych publikacji. W przypadku publikacji nr 2 przedstawiono oświadczenia 5 spośród 12 współautorów, co spełnia wymogi formalne.

Uwagi:

W przypadku publikacji nr 2 nie załączono materiałów uzupełniających (*Supplementary materials*), na które składają się 4 tabele.

Merytoryczna ocena rozprawy

Rozprawę rozpoczyna Streszczenie, które zwięźle ale bardzo umiejętnie wprowadza czytelnika w podstawowe zagadnienia dotyczące etiologii i rozwoju choroby Huntingtona oraz potencjalnej roli zaburzeń mitochondrialnych w tym schorzeniu neurodegeneracyjnym. Autorka uzasadnia podjęcie badań dysfunkcji mitochondriów w tkankach peryferycznych, przedstawia cele rozprawy doktorskiej a następnie krótko opisuje wyniki badań zawarte w trzech publikacjach stanowiących rdzeń rozprawy. Przygotowane przez Doktorantkę podsumowania i dyskusja uzyskanych wyników są bardzo pomocne przy analizie opisanych w publikacjach, wykonanych przez nią badań.

Zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami dotyczącymi wkładu poszczególnych autorów oraz samej Doktorantki, we wszystkich trzech publikacjach mgr P. Mozolewska była głównym eksperymentatorem, brała udział w analizie statystycznej wyników, ich interpretacji oraz przygotowaniu manuskryptu. W przypadku publikacji nr 1 i 3, badania prowadzone były w ramach dwóch projektów NCN, z których jednym (Preludium) kierowała Doktorantka. Zatem indywidualny wkład mgr P. Mozolewskiej w powstaniu publikacji stanowiących rozprawę doktorską nie budzi wątpliwości. Rozprawę tę można więc uznać za samodzielną i wyodrębnioną częścią spójnej tematycznie pracy zbiorowej.

Pierwszym celem badawczym ocenianej rozprawy doktorskiej, opisanym w publikacjach nr 1 i 2, było zbadanie poziomu mtDNA w krwi oraz fibroblastach u pacjentów na różnych etapach choroby Huntingtona oraz zbadanie korelacji otrzymanych wyników ze stopniem zaawansowania choroby.

Publikacja nr 1

Doktorantka oznaczała poziom mtDNA w krwi pełnej, jak i samych leukocytach, 5 zdrowych wolontariuszy a także brała udział w oznaczeniach poziomu mtDNA w liniach komórkowych fibroblastów, 6 liniach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Huntingtona oraz 6 liniach od osób zdrowych. Doktorantka porównała poziom mtDNA w próbkach krwi przechowanych w różnych warunkach, różnice między krwią pełną i leukocytami oraz różnice w poziomie mtDNA w fibroblastach osób zdrowych i chorych. W ten sposób opracowała optymalny protokół eksperymentalny, który posłużył w dalszych badaniach prowadzonych już tylko na leukocytach i/lub fibroblastach. W ramach tej pracy wyniki przedstawiono na 3 rycinach i w 2 tabelach. Tabela nr 2 zawiera praktyczne rady dotyczące użycia krwi i linii komórkowych jako materiału do oznaczania poziomu mtDNA. Co ciekawe, w przypadku badań poziomu mtDNA w fibroblastach Doktorantka wykazała możliwość utraty fenotypu chorobowego w fibroblastach z późniejszych pasażów komórkowych.

Uwagi i spostrzeżenia do przedyskutowania:

- Brakuje mi w tej publikacji lub w skrótowym opisie rozprawy doktorskiej wytłumaczenia dlaczego do badań wybrano leukocyty a nie na przykład płytki krwi. Czy można spodziewać się różnic w

poziomie mtDNA wśród różnych rodzajów leukocytów, także w odniesieniu do pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Huntingtona.

- Dlaczego na Rycinie 2 nie umieszczono omawianych w tekście wyników otrzymanych dla próbek krwi przechowywanych przez 3 dni w temperaturze -20°C ?

Publikacja nr 2

W kolejnej publikacji opisano wyniki badań poziomu mtDNA w leukocytach i fibroblastach pacjentów na różnych etapach choroby Huntingtona. Analizie poddano leukocyty pozyskane od 84 pacjentów, w tym 62 pacjentów z objawami choroby i 22 pacjentów bez objawów, oraz leukocyty pozyskane od 62 zdrowych osób. Badania przeprowadzono także na liniach komórkowych fibroblastów pochodzących od 10 pacjentów z objawami choroby oraz 9 zdrowych osób. Oświadczenia 5 współautorów (spośród 12) i Doktorantki wskazują, że w części doświadczalnej tej publikacji wkład mgr P. Mozolewskiej polegał na izolacji DNA całkowitego fibroblastów i udziale w izolacji DNA całkowitego z próbek krwi oraz przeprowadzeniu doświadczeń z zastosowaniem techniki ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Publikacja zawiera 4 tabele i 5 rycin oraz dodatkowe 4 tabele umieszczone w materiałach uzupełniających, które nie dołączono do rozprawy.

W pracy pokazano, że przeciwnie do leukocytów, we fibroblastach pochodzących od osób chorych poziom mtDNA jest obniżony w stosunku do komórek pochodzących od osób zdrowych. Nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy poziomem mtDNA we krwi z wieloma czynnikami jak wiek, poziom zaawansowania choroby, wzrost, waga, parametry środowiskowe jak palenie papierosów czy spożywanie alkoholu. Trzeba podkreślić i docenić, że badania opisane w tej pracy obejmują największą jak dotąd populację pacjentów chorych na chorobę Huntingtona. Pokazują, że oznaczana liczba kopi mtDNA u chorych zależy od liczby przebadanych osób oraz typu komórek, z których izoluje się DNA.

Uwagi i spostrzeżenia do przedyskutowania:

- Proszę o przedyskutowanie w czasie publicznej obrony czy, biorąc pod uwagę wyniki badań opisane w tej pracy oraz dane literaturowe wskazujące na wiele różnych czynników wpływających na poziom mtDNA, jest to dobry parametr do porównywania w kontekście choroby Huntingtona?
- W pracy wykazano zwiększony poziom mtDNA w leukocytach kobiet z chorobą Huntingtona w stosunku do chorych mężczyzn. Czy podobną różnicę związaną z płcią pacjentów można znaleźć w przypadku fibroblastów (uwzględniając znacznie mniejszą liczbę n).

Publikacja nr 3

W kolejnej publikacji stanowiącej rozprawę doktorską porównano czynniki związane z funkcjonowaniem mitochondriów w liniach komórkowych fibroblastów pozyskanych od 8 chorych, u których genetycznie potwierdzono mutację genu *IT15* oraz od 7 osób zdrowych. Doktorantka oznaczała poziom ATP, ogólną aktywność metaboliczną mitochondriów, mitochondrialny potencjał błonowy, poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w cytoplazmie i mitochondriach, poziom białek systemu fosforylacji oksydacyjnej oraz białek systemu antyoksydacyjnego. Brała także udział w badaniach cyklu komórkowego. Otrzymane wyniki przedstawiono na 7 rycinach.

Doktorantka wykazała, że fibroblasty pacjentów charakteryzowały się obniżonym poziomem ATP, zwłaszcza gdy były hodowane bez glukozy a ich głównym substratem energetycznym była galaktoza. Fibroblasty pacjentów, mimo niezmienionego mitochondrialnego potencjału błonowego, podobnego poziomu kompleksów systemu fosforylacji oksydacyjnej i markera ilości mitochondriów, wykazywały mniejszą aktywność metaboliczną mitochondriów. Towarzyszył temu nieznaczny wzrost poziomu RFT w mitochondriach oraz zwiększenie poziomu białek antyoksydacyjnych, mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej 2 i reduktazy glutationowej co wskazywało na obecność niewielkiego stresu oksydacyjnego w fibroblastach

pochodzących od pacjentów. Analiza korelacji zbadanych parametrów mitochondrialnych obserwowanych we fibroblastach ze stopniem zaawansowania choroby (obejmującym objawy psychiczne, ruchowe i ogólne funkcjonowanie pacjentów) ujawniła, że zmiany profilu czynników mitochondrialnych są najbardziej widoczne we wczesnych etapach choroby, zwłaszcza gdy brano pod uwagę stan psychiczny. Trzeba podkreślić, że jest to pierwsza tego typu kompleksowa analiza obejmująca parametry mitochondrialne badane w komórkach tkanek peryferycznych. Oto kilka uwag i spostrzeżeń do przedyskutowania:

- Obserwowane w pracy zmiany nie są duże ani specyficzne dla badanej jednostki chorobowej. Proszę o przedyskutowanie tej kwestii w kontekście poszukiwania biomarkerów choroby.
- W żadnej publikacji nie podano czy pożywka DMEM stosowana do hodowli fibroblastów zawierała 5 mM glukozę (trzeba się tego domyślać) jako główne paliwo energetyczne, i czy także zawierała pirogronian i/lub glutaminę (są przecież różne pożywki DMEM). Informacja ta jest ważna dla zinterpretowania obniżenia poziomu ATP i aktywności metabolicznej mitochondriów obserwowanego we fibroblastach pochodzących od pacjentów. W których procesach metabolicznych komórki produkują ATP, gdy paliwem energetycznym w pożywce jest galaktoza?
- Jakiej zmiany w mitochondrialnym potencjale błonowym można oczekiwać przy zmniejszonej produkcji ATP przez mitochondria? W publikacji opisując wyniki (w punkcie: *Mitochondrial metabolic activity*) autorzy piszą o „OXPHOS malfunctioning”. Proszę wyjaśnić skąd ten wniosek. Czy zaburzenia mogą występować na innych etapach oddychania komórkowego?
- Rycina 7 w publikacji obejmuje dane z grupy kontrolnej a Tabela 1 sugeruje, że analiz nie wykonano dla tej grupy („NA – not applicable”). Proszę o wyjaśnienie.
- W publikacji nr 2, poziom mtDNA we fibroblastach pozyskanych od pacjentów był obniżony. W publikacji nr 3, we fibroblastach pacjentów nie obserwowano zmian w ilości mitochondriów na co wskazuje podobny poziom białek markerowych biogenezy mitochondriów (TOM 20 i oksydazy cytochromu c). Czy obserwacje z obu publikacji są zbieżne?

Podsumowanie

Wcześniejsze komentarze i pytania, które stanowią element dyskusji naukowej, nie mają wpływu na moją wysoką ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Wyniki doświadczeń ujęte w pracach tworzących spójny tematycznie zbiór trzech publikacji stanowią ważne osiągnięcie naukowe, istotne dla zrozumienia etiologii i rozwoju choroby Huntingtona, a w przyszłości dla jej diagnostyki i leczenia. Badania rozszerzają naszą wiedzę na temat mało poznanych w przypadku tego schorzenia neurodegeneracyjnego dysfunkcji mitochondrialnych w tkankach peryferycznych. Biorąc pod uwagę merytoryczną i innowacyjną wartość pracy, jej potencjalne znaczenie aplikacyjne, pracowitość i różnorodność doświadczeń i analiz, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr Pauliny Mozolewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na dużą wartość rozprawy, wnioskuje o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz