

Prof. Joanna Szczepanowska
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego, PAN

Warszawa, 11.05.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Piotra Wojtyniaka

**pt. „Rola mitofuzyny 2 w uszkodzeniu i regeneracji komórek w modelach ischemii i
reperfuzji mózgu” wykonanej pod kierunkiem: promotora - prof. dr hab. Barbary
Zablockiej oraz promotora pomocniczego - dr Marii Kawalec**

Mitochondria to organelle wielofunkcyjne odgrywające istotną rolę w procesach metabolicznych. Wymagania energetyczne nieustannie ulegają zmianie w różnych przestrzeniach komórki, co ma wpływ na nieustanną modyfikację sieci mitochondrialnej. Mitochondria to organelle dynamiczne, podlegają ciągłym procesom fuzji i fragmentacji. Fuzja mitochondriów pozwala na wymianę metabolitów i białek powstających w macierzy mitochondrialnej oraz równomierną dystrybucję tych związków w całej sieci mitochondrialnej. Proces fuzji daje także możliwość wymiany mtDNA pomiędzy mitochondriami, co przeciwdziała akumulacji zmutowanych genów mitochondrialnych. Ponadto fuzja daje możliwość naprawy sieci mitochondrialnej: wykazano, że integracja prawidłowo funkcjonujących mitochondriów do uszkodzonej sieci, umożliwia odzyskanie prawidłowych funkcji mitochondriów. Natomiast fragmentacja mitochondriów niezbędna jest do ich dystrybucji w komórce, pozwala na równomierną ich segregację do dwóch potomnych komórek podczas podziału komórkowego oraz do tego by mogła zajść mitofagia. Dynamika mitochondriów to także utrzymanie funkcjonalnej puli mitochondriów w komórce, dzięki koordynacji procesów biogenezy mitochondriów i mitofagii. Dlatego też dynamika mitochondriów odgrywa kluczową rolę w kontroli i koordynacji funkcjonowania mitochondriów. Zaburzenia dynamiki mitochondriów są jednymi z pierwszych oznak stresu mitochondrialnego i obserwowane są w wielu chorobach neurodegeneracyjnych. Dlatego bardzo istotne są badania procesów dynamicznych

mitochondriów w komórkach nerwowych, ze względu na wysokie zapotrzebowanie energetyczne tego typu komórek oraz ze względu na to, że są one bardzo wrażliwe na stres.

Autor pracy doktorskiej skupił się na badaniu kilku procesów odnośnie dynamiki mitochondriów takich jak: fuzja i fragmentacja sieci mitochondrialnej, biogeneza mitochondriów oraz mitofagia. Szczególnie jednak skupiono się na badaniu roli Mitofuzyny 2 (jednego z białek zaangażowanych w fuzję mitochondriów), w hodowli pierwotnej neuronów. Badania przeprowadzono w dwóch modelach: przejściowego niedokrwienia mózgu suwaka mongolskiego (model *in vivo*) oraz przejściowego niedoboru tlenu i glukozy w komórkach pierwotnych neuronów kory mózgu szczura (model *in vitro*). W wyniku niedokrwiennego udaru mózgu dochodzi do nasilonego stresu mitochondrialnego prowadzącego do nieodwracalnego uszkodzenia mitochondriów i w konsekwencji do śmierci komórki, natomiast w wyniku przejściowego niedokrwienia mitochondria adaptują się do zmienionych warunków. Podkreślam, że tematyka obu publikacji pracy, koncepcja badań, metodologia to odzwierciedlenie ekspertyzy Promotora pracy Prof. Barbary Zabłockiej, która od lat prowadzi tak istotne badania, związane z niedokrwieniem mózgu.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oparta na dwóch publikacjach, które ukazały się w 2022 roku:

1. Kawalec M, **Wojtyniak P**, Bielska E, Lewczuk A, Boratyńska-Jasińska A, Beręsewicz-Haller M, Frontczak-Baniewicz M, Gewartowska M, Zabłocka B. **Mitochondrial dynamics, elimination and biogenesis during post-ischemic recovery in ischemia-resistant and ischemia-vulnerable gerbil hippocampal regions** *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2023 Mar;1869(3):166633. doi: 0.1016/j.bbadis.2022.166633 (IF 6,633)
2. **Wojtyniak P**, Boratynska-Jasinska A, Serwach K, Gruszczynska-Biegala J, Zablocka B, Jaworski J, Kawalec M. **Mitofusin 2 Integrates Mitochondrial Network Remodelling, Mitophagy and Renewal of Respiratory Chain Proteins in Neurons after Oxygen and Glucose Deprivation** *Mol Neurobiol.* 2022 Oct;59(10):6502-6518. doi: 10.1007/s12035-022-02981-6 (IF 5,686)

Wymienione artykuły naukowe zostały opublikowane w renomowanych, międzynarodowych czasopismach indeksowanych w bazie JCR; czasopisma te charakteryzują się bardzo wysokim współczynnikiem wpływu Impact Factor (IF), który łącznie dla tych prac wynosi 12,319. Obie publikacje,

są pracami zespołowymi. Publikacja numer 2, która stanowi trzon tej rozprawy to publikacja 7 autorska, w której doktorant dzieli pierwsze współautorstw z jeszcze jedną osobą. Pierwsza publikacja to praca 9 autorska, w której też jest dwóch pierwszych autorów, doktorant i promotor pomocniczy tej rozprawy.

W załączonych oświadczeniach współautorów, brak jest przybliżonego ilościowego (procentowego szacunku) udziału Doktoranta i trudno ocenić jego wkład w powstanie tych publikacji. Jednakże, po bardzo wnikliwej analizie i dodatkowych informacjach uzyskanych bezpośrednio od Doktoranta (udział, stosowane metody oraz analiza wyników) mogłam ocenić Jego zaangażowanie w wykonywanych badaniach. Doktorant:

1. zakładał i prowadził hodowlę pierwotnej linii komórkowej
2. wykonywał ocenę poziomu białek (metoda Western Blot), pomiary potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej i test LDH
3. przygotowywał konstrukty lentiwirusowe
4. prowadził wyciszenie białka Mfn2 w hodowlach komórkowych
5. analizował dane, pochodzące zarówno z w/w metod biochemicznych jak i obrazów pochodzących z mikroskopii świetlnej i elektronowej.
6. Był zaangażowany w przygotowaniu manuskryptu (analiza statystyczna, przygotowanie wykresów, opisanie rozdziału „Materiał i Metody”)

Badania prowadzono i wykonano w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki: grantu kierowanego przez dr Marię Kawalec oraz i grantu POWER. Oba artykuły są wartościowymi opracowaniami, tworzą oryginalny, dobrze zaprojektowany cykl badań wskazujący na niezwykłą użyteczność zastosowanych w dysertacji modeli doświadczalnych *in vivo* (mózg) i *iv vitro* (hodowla pierwotna-neurony).

Ocena układu rozprawy doktorskiej (autoreferatu)

Układ przedłożonej rozprawy doktorskiej jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań. Recenzowana rozprawa doktorska składa się z następujących rozdziałów: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, innowacyjność rozprawy, wstęp, cel pracy, materiał i metody, podsumowanie najważniejszych wyników, dyskusja, podsumowanie, literatura, wskaźnik oddziaływania (spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej), załączone publikacje, oświadczenia (autora rozprawy doktorskiej oraz współautorów).

W rozdziale „**Streszczenie**” Autor przedstawił ogólny cel pracy doktorskiej i najważniejsze osiągnięcia naukowe opublikowane w obu manuskryptach. Mam jednak pewne uwagi:

Autor konkluduje, że „Mfn2 jest jednym z białek koniecznych do prawidłowej odpowiedzi neuronów na przejściowy bodziec niedokrwiennie-reperfuzyjny, umożliwiającej ich przeżycie, poprzez regulowanie zależności pomiędzy eliminacją mitochondriów i ich biogenezą.”. Oczywiście, tak jest jednym z białek koniecznych do prawidłowej odpowiedzi, ale wydaje mi się, że do odpowiedzi mitochondriów na zadany stres, a nie neuronów. Ponadto, stwierdzenie, że „Mfn2 jest jednym z białek koniecznych...”, wydaje się to oczywiste, bo Mitofuzyna 2 jako białko odpowiedzialne za fuzję zewnętrzną błony mitochondrialnej uczestniczy w procesie fuzji czyli w przebudowie sieci mitochondrialnej, a bez przebudowy sieci mitochondrialnej nie zajdzie proces mitofagii jak i biogenezy mitochondriów, zarówno w komórce nerwowej jak i w każdym typie komórki. Poza tym brak tego białka jest letalny. Dlatego warto może byłoby uściślić, że „mitofuzyna 2 jest białkiem zaangażowanym/biorącym udział w 3 współzależnych procesy.... w modelu takim a takim”.

Innowacyjność rozprawy, zawarta jest w trzech punktach.

W kolejnym rozdziale „**Wstęp**” Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę badań w oparciu o najnowszą literaturę, omawia stan wiedzy w zakresie badawczym istotnym dla Jego pracy. Znowu w tym rozdziale znajduję wiele nieścisłości językowych, popularnonaukowych określeń i ogólnikowych sformułowań. Możliwe, że niektóre niedoskonałości stylistyczne biorą się z tego, że autor chciał w jednym zdaniu zawrzeć wiele informacji, a czasami po prostu wynika to z bezpośredniego niedoskonałego tłumaczenia z języka angielskiego.

Co do nieprawidłowo użytych sformułowań to np.:

1. „Fuzja umożliwia szybką wymianę fragmentów błon mitochondrialnych”. W procesie fuzji nie zachodzi wymiana fragmentów błon tylko połączenie błon.
2. Następne zdanie „mitofagia.... reguluje homeostazę i biogenezę mitochondriów, a także kontroluje liczbę i jakość mitochondriów.” Mitofagia nie reguluje homeostazy i biogenezy mitochondriów, bo proces mitofagii i biogenezy w prawidłowo funkcjonującej komórce jest w równowadze, mitofagia też nie „kontroluje liczby mitochondriów” – bo np. nie usuwa mitochondriów dobrze funkcjonujących w komórce w przypadku gdy rośnie masa mitochondriów. Naruszenie równowagi tych procesów może następować w procesie adaptacji do zmienionych warunków.

3. „Mfn2 pośredniczy w tworzeniu połączeń pomiędzy mitochondriami a siateczką, przez co kontroluje wymianę wapnia”. Mfn 2 nie „kontroluje” wymiany jonów wapnia tylko połączenia, dzięki którym możliwa jest szybka wymiana jonów wapnia (a nie wapnia).
4. „Ponadto założono, że zależności między dynamiką, eliminacją i biogenezą mitochondriów mogą być kluczowe dla zachowania homeostazy mitochondriów, a tym samym przeżycia neuronów w warunkach stresu niedokrwienno-reperfuzyjnego.” Jest oczywiste, że te 3 dynamiczne procesy: fuzja i fragmentacja sieci mitochondrialnej, mitofagia i biogeneza są kluczowe (a nie „mogą być kluczowe”) dla prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Są to procesy dynamiczne, a proporcje ich działania (aktywacji czy inhibicji) ulegają zmianom w każdej komórce, w warunkach stresowych.

Aby osiągnąć zamierzony **cel pracy** „Poznanie roli MFN2 w odpowiedzi neuronów na bodziec ischemiczno-reperfuzyjny ze szczególnym uwzględnieniem procesów odpowiadających za dynamikę sieci, zawartość i jakość mitochondriów” autor podjął się wykonania dwóch zadań badawczych realizowanych przy zastosowaniu następujących modeli badawczych: tkanek - model *in vivo*, oraz komórek – model *in vitro*.

W rozdziale **Material i Metody** poprawnie opisano, w sposób syntetyczny, użyte metody, z zaznaczeniem, że szerszy opis można znaleźć w publikacjach, które są załączone. Dążąc do osiągnięcia postawionych celów autorzy publikacji wykorzystali szereg nowoczesnych narzędzi badawczych oraz metod.

Ale w opisie metod w autoreferacie też napotykam na wiele nieprecyzyjnych sformułowań np. „...do badania przebiegu zmian w obecności białek odpowiedzialnych za dynamikę sieci mitochondrialnej...” (powinno być przebiegu zmian poziomu białek) czy „Biogenezę badano na podstawie zmian obecność czynników transkrypcyjnych” (chyba na podstawie oceny poziomu czynników transkrypcyjnych).

Kolejny rozdział to „**Podsumowanie najważniejszych wyników**”. Sposób prezentacji uzyskanych przez Doktoranta wyników uważam za dostateczny.

W pierwszej pracy (*BBA- Mol Basis Dis. 2022*) badano dynamikę sieci mitochondrialnej, proces mitofagii oraz biogenezy w różnych sektorach hipokampa suwaka mongolskiego. Do badań wybrano takie rejony hipokampa, które charakteryzowały się różną przeżywalnością po bodźcu ischemiczno- reperfuzyjnym. Z

przeprowadzonych badań wynika, że w wybranych rejonach hipokampa (w modelu *in vivo*) po przejściowym niedokrwieniu nastąpiła zmiana poziomu białek zaangażowanych w dynamikę sieci mitochondrialnej oraz aktywacja procesów mitofagii i biogenezy. Autorzy sugerują, że kooperacja tych procesów (ja bym powiedziała, że adaptacja mitochondriów badana na poziomie zmian morfologii sieci mitochondrialnej, mitofagii i biogenezy mitochondriów) pozwoliła na przetrwanie neuronów po przejściowym epizodzie niedokrwienia. Wydaje mi się, że publikacja ta to tylko wstęp do właściwych badań związanych z tematem pracy doktorskiej, (a przypominam, że tematem jest „rola Mitofuzyny 2...”), ponieważ w pracy tej jedynie oceniono poziom Mitofuzyny 2 w modelu *in vivo*.

Praca druga (*Mol Neurobiol.* 2022) stanowi trzon tej rozprawy doktorskiej. W pracy tej badano rolę Mitofuzyny 2 w modelowaniu sieci mitochondrialnej, procesu mitofagii i biogenezy w pierwotnej hodowli neuronów korowych szczura (model *in vitro*). Komórki te były poddane 1 godzinnemu pozbawieniu ich do dostępu do tlenu oraz glukozy, a następnie przywrócono im dostęp do tlenu i glukozy (warunki normoksji). Badania prowadzono po 3 i 24 godzinach po reoksygenacji, a kontrolą były komórki, które od początku prowadzonej hodowli były utrzymywane w warunkach normoksji. Aby zbadać jaką rolę odgrywa Mitofuzyna 2 w badanych warunkach, czy jest zaangażowana w adaptację mitochondriów w neuronach, w odpowiednim czasie przed zadaniem stresem przeprowadzono wyciszenie tego białka z zastosowaniem dwóch konstruktów. Po przeprowadzeniu wnikliwych i wymagających (precyzyjnych, czasochłonnych) badań stwierdzono, że Mitofuzyna2 odgrywa znaczącą rolę w neuronach w warunkach po reoksygenacji. Jest zaangażowana zarówno w proces mitofagii jak i proces biogenezy mitochondriów czyli reorganizację/adaptację mitochondriów w warunkach stresowych. Komórki, w których „wyciszono” Mfn2 wraz z niedotlenieniem i brakiem glukozy, umierały. Autorzy konkludują, że Mitofuzyna2 jest jednym z istotnych elementów biorących udział w reorganizacji mitochondriów w komórkach nerwowych po epizodzie niedokrwinnym, i że Mfn2 jest białkiem kluczowym dla przeżycia neuronów.

Uważam, że przedstawiona (w tym rozdziale) przez Doktoranta prezentacja osiągniętych wyników pozwala na poznanie całościowego rozwiązania postawionego problemu badawczego powstałego w wyniku pracy wszystkich współautorów publikacji, ale trudno jest ocenić realne zaangażowanie Doktoranta w tej zespołowej pracy.

Dyskusja w miarę dostatecznie zredagowana, ale mało spójna tematycznie, miejscami chaotyczna i nie ułatwia czytelnikowi śledzenia argumentów Autora. Oczywiście czytelnik, domyśla się bez większych problemów co Autor chciał powiedzieć, ale w pracy naukowej można spodziewać większej precyzji opisu. Panuje bałagan tematyczny, dużo dyskutuje się o mitofagii w neuroprotekcji i biogenezie, potem następuje przeskok do roli koaktywatora PGC-1 alfa i poświęca się temu dużą część dyskusji. Tak rozległe dywagacje o działaniu PGC-1 alfa, wybijają czytelnika z tematu, który powinien być rozważany. Dopiero w przedostatnim akapicie pojawia się sugestia, że „...PGC-1 alfa jest kluczowym regulatorem aktywności Mfn2”. Odnosi się wrażenie, że niektóre wątki są wyrwane i przeniesione z dyskusji zamieszczonej w publikacjach i stąd takie niedoskonałości w konstrukcji tekstu. Należy podkreślić, że dyskusja przedstawiona w publikacji w wersji angielskiej jest doskonała.

W rozdziale **Podsumowanie** Doktorant opisał najważniejsze osiągnięcia badawcze w pięciu punktach i wyciągnął wniosek, że „Mfn2 jest białkiem koniecznym do prawidłowej odpowiedzi neuronów na przejściowy bodziec niedokrwienny, umożliwiając ich przeżycie poprzez regulowanie zależności pomiędzy eliminacją mitochondriów, a ich biogenezą”. Chciałabym prosić o wyjaśnienie terminu „prawidłowa odpowiedź neuronów na bodziec”, co to oznacza i jaka jest „nieprawidłowa odpowiedź neuronów”.

Literatura, to zbiór 110 pozycji zamieszczonych w autoreferacie.

Oświadczenia zostały załączone od wszystkich 12 współautorów publikacji, bez procentowego zaangażowania w projekty (o czym pisałam na początku recenzji).

OCENA KOŃCOWA ROZPRAWY

Przedstawione prace do doktoratu świadczą o dążeniu do rozwiązania konkretnego problemu badawczego, związanego z rolą mitochondriów w neuronach po przebytych epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym oraz po przejściowym niedoborze tlenu i glukozy. Druga praca to kwintesencja badań odnośnie roli mitofuzyny 2 w procesach dynamicznych mitochondriów czyli dynamiki sieci mitochondrialnej, mitofagi i biogenezy w stresie spowodowanym niedoborem tlenu i glukozy w neuronach i zgodna z tytułem pracy doktorskiej. Opis przedłożonych do doktoratu publikacji jest dostateczny, chociaż miejscami mało precyzyjny, co wynika być może z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego (co czasami ma odzwierciedlenie w nieco udziwnionych stylistycznie sformułowaniach z zastosowaniem zbyt dużych skrótów myślowych) co już napisałam powyżej. Te niedociągnięcia nie umniejszają jednak mojej

pozytywnej oceny przedstawionych osiągnięć naukowych. W ocenie recenzenta zarysowane przez doktoranta cele pracy zostały osiągnięte.

W trakcie obrony poproszę doktoranta o wyjaśnienie następujących kwestii:

1. Dlaczego komórki, które były poddane 1 godzinnemu stresowi nie stanowiły kontroli dla komórek po reoksygenacji. W komórkach po 1 h niedotlenienia i pozbawienia glukozy, zbadano jedynie poziom potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a interesujące byłoby porównać jak zmieniają się inne parametry mitochondrialne.
2. W jaki sposób analizowano obrazy pochodzące z mikroskopii elektronowej, czy do oceny kształtu i wielkości służyły obrazy 3D, czy tylko dowolne przekroje komórki.
3. Dlaczego nie analizowano morfologii komórki po stresie, po reoksygenacji czy wyciszeniu Mfn2? Taki obraz komórki stanowiłby podstawę do analizy np. masy mitochondriów w komórce czy lokalizacji sieci mitochondrialnej w komórce badanej.

Uważam, że badania zawarte w tych dwóch manuskryptach są nowatorskie. Należy zaznaczyć, że publikacje wchodzące w skład rozprawy podlegały już wnikliwemu procesowi merytorycznej recenzji przez niezależnych recenzentów, ekspertów z dziedziny i docenili oni wartość merytoryczną prezentowanych wyników. W związku z powyższym, w mojej recenzji skoncentrowałam się szczególnie na ogólnej ocenie badań przeprowadzonych przez mgr Piotra Wojtyniaka oraz na ocenie strony formalnej rozprawy doktorskiej (autoreferatu).

PODSUMOWANIE

Rozprawa doktorska Pana magistra Piotra Wojtyniaka w pełni realizuje założone cele pracy/badań, a uzyskane wyniki mają szeroki zakres, są wartościowe i wnoszą istotny wkład w poznanie roli Mitofuzyny 2 w proces adaptacji mitochondriów do warunków stresu niedokrwienno-reperfuzyjnego w komórkach nerwowych. Zapewne, prace przedstawione do rozprawy doktorskiej, w tak istotnym temacie jakim jest udar mózgu, znajdują uznanie w międzynarodowym środowisku naukowym.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz 1789). W związku z powyższym, przedkładam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN o dopuszczenie Pana mgr. Piotra

Wojtyniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego wszczętego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Prof. Joanna Szczepanowska

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel. centrala (48 22) 589 20 00, sekretariat (48 22) 589 24 91, fax (48 22) 822 53 42
e-mail: dyrekcja@nencki.gov.pl, <http://www.nencki.gov.pl>



instytut biologii doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Wojtyniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego wszczętego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Prof. Joanna Szczepanowska

Joanna Szczepanowska

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, tel. centrala (48 22) 589 20 00, sekretariat (48 22) 589 24 91, fax (48 22) 822 53 42
e-mail: dyrekcja@nencki.gov.pl, <http://www.nencki.gov.pl>