

Marta B Wiśniewska
Laboratorium Neurobiologii Molekularnej
Centrum Nowych Technologii UW
ul. Banacha 2C
02-097 Warsaw, Poland
E.mail: m.wisniewska@cent.uw.edu.pl

Warszawa, 05/05/2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PIOTRA WOJTNYIAKA

Przedstawiona mi do oceny rozprawa opisuje badania przeprowadzone przez mgr. Piotra Wojtyniaka w Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego pod kierunkiem prof. Barbary Zabłockiej. Celem pracy było opisanie dynamiki i regeneracji mitochondriów w neuronach hipokampa po niedotlenieniu i reperfuzji oraz poznanie roli mitochondrialnego białka mitofuzyny 2 w regulacji tych procesów. Rola mitochondriów w chorobach mózgu jest gorącym tematem, a więc badania Doktoranta wpisały się w najnowsze trendy badawcze. Wyniki pracy zostały opublikowane w bieżącym roku w cenionych czasopismach: BBA – Molecular Basis of Disease i Molecular Neurobiology, w których Doktorant jest jednym z dwóch równorzędnych wiodących autorów. Udział Doktoranta w tych pracach został określony w oświadczeniach i ta część badań została w rozprawie opisana.

Rozprawa ma formę dwóch publikacji opatrzonej rozszerzonym komentarzem (17 stron), na który składają się Wstęp i Cel Pracy, Materiały i Metody, Podsumowanie

Wyników oraz Dyskusja z Podsumowaniem i Wnioskiem. Czytałam ją z przyjemnością i zainteresowaniem, bo jest napisana bardzo dobrze zarówno pod względem językowym, jak i merytorycznym, logicznym i doboru treści. We Wstępie, który naturalnie doprowadził do postawionej hipotezy, Autor syntetycznie i zgrabnie opisał najważniejsze kwestie ściśle związane z przeprowadzonymi badaniami: wrażliwość neuronów hipokampa na niedokrwienie, rolę mitochondriów w śmierci komórek, dynamikę sieci mitochondrialnej, autofagię i biogenezę mitochondriów oraz funkcję i rolę mitofuzyny 2. Bardzo podobały mi się Materiały i Metody, które nie omawiały technicznych kwestii (te zostały bardzo szczegółowo opisane w opublikowanych pracach) tylko przedstawiały zastosowane modele i podejście badawcze. W Dyskusji omówiono znaczenie badań podkreślając jak uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski rozwijają wiedzę na temat mechanizmów naturalnej neuroprotekcji. Między innymi Doktorant zwrócił uwagę na niejednoznaczne wyniki poprzednich prac innych autorów, w których badano związki izolowanych procesów mitochondrialnych z neuroprotekcją i neurodegeneracją. Tutaj badania Doktoranta wskazują na większą sensowność badania równowagi pomiędzy różnymi procesami. Na końcu zamieszczona została Bibliografia ze stu dziesięcioma pozycjami. Większość (ok. 70%) zacytowanych prac pochodzi z ostatnich 15 lat. Autor nie wahał się sięgać do starszych źródłowych prac, co jest pozytywne, natomiast pewnym mankamentem jest mała liczba prac z lat 2019-2023.

Streszczenie zamieszczone na początku kontrastuje z bardzo dobrze napisaną pozostałą częścią rozprawy. Przede wszystkim cel i hipoteza nie są klarownie sformułowane. Autor formułuje problem badawczy jako niedostatek wiedzy o *roli dynamiki mitochondriów w stresie niedokrwienno – reperfuzyjnym*, po czym stawia hipotezę *o roli mitofuzyny 2 w regulacji mitochondrialnych procesów w warunkach stresu*. Obie kwestie były przez Autora badane, ale jasne to stało się dla mnie dopiero po przeczytaniu Wstępu. Nie mogłam też zrozumieć, co Autor ma na myśli pisząc o roli i regulacji *zależności* pomiędzy procesami zachodzącymi w mitochondriach. Może lepsze by było określenie *wzajemna równowaga* zamiast *zależność*. Ponadto w kilku miejscach pojawiły się niezgrabności językowe [„przyrastała zawartość mitofuzyny”, „ubytek mitofuzyny (...) obecny w neuronach”]. Zabrakło więc na tych niecałych dwóch stronach tekstu pracy redakcyjnej. Te krytyczne uwagi nie zmieniają jednak mojej wysokiej oceny całej rozprawy. Do zawartości merytorycznej pracy odnoszę się poniżej.

W pierwszej części badań Doktorant wybrał dobrze scharakteryzowany model stresu niedokrwiennie – reperfuzyjnego *in vivo* w hipokampie u suwaka mongolskiego. Model ten jest bardzo ciekawy, ponieważ neurony z różnych regionów hipokampa wykazują różną wrażliwość na stres niedokrwiennie – reperfuzyjny, dzięki czemu można przeprowadzić eleganckie badania endogennych mechanizmów neuroprotekcyjnych, czego wzorowym przykładem jest recenzowana tutaj rozprawa. Doktorant pokazał, że we wrażliwych neuronach pola CA1 w krótkim czasie po reperfuzji dochodzi do uszkodzenia mitochondriów, wzrostu ich fragmentacji i w końcu rozległej autofagii. W polu CA2-3 i zakręcie zębatym, gdzie neurony są stosunkowo odporne na stres niedokrwienia – reperfuzji, nasilają się zarówno podziały, jak i fuzje, a ta zwiększona dynamika sprzyja usuwaniu uszkodzonych fragmentów błon mitochondrialnych i selektywnej mitofagii. To jest ważna obserwacja, ponieważ pokazuje, że sam wzrost podziałów mitochondriów może być korzystny lub nie, a zależy to od całości zmian w procesach mitochondrialnych. Doktorant wyciągnął więc ciekawy wniosek, że zasadnicze znaczenie dla neuroprotekcji w stresie niedokrwiennie – reperfuzyjnym ma kompleksowa regulacja dynamiki, usuwania i biogenezy mitochondriów. Stwierdził także, że na poziomie molekularnym neurony pola CA2-3 i zakrętu zębatego po stresie różni od neuronów pola CA1 wzrost poziomu białek zaangażowanych w fuzję, m.in. mitofuzyny 2, i na tej podstawie postawił hipotezę, że mitofuzyna 2 jest regulatorem równowagi procesów mitochondrialnych.

W drugiej części Doktorant badał powyższą hipotezę wykorzystując pierwotne hodowle neuronów korowych szczura poddane przejściowej deprivacji tlenu i glukozy, która jest modelem epizodu niedokrwiennego. Model ten nie całkiem odtworzył skutki stresu niedokrwiennie – reperfuzyjnym *in vivo*, ponieważ, jak zauważył sam Doktorant, poza mitofizyną poziom innych białek mitochondrialnych zmienił się tylko przejściowo, a poziom mitofizyny obniżył się a nie wzrósł, co było niespójnie z obserwacjami *in vivo* w hipokampie (niezmieniony poziom w neuronach wrażliwych i spadek w neuronach odpornych). Poza tym neurony nie degenerowały. Czy ta odporność neuronów mogła wynikać z ich młodego wieku (w porównaniu do neuronów u dorosłego osobnika)? Ciekawa jestem, czy Doktorant rozważał wykorzystanie lub próbował wykorzystać hodowle neuronów hipokampalnych, i czy *in vitro* neurony te cechuje różna odporność na stres niedotlenienia podobnie jak to jest *in vivo*. Mimo wspomnianych problemów

modelu *in vitro* Doktorant potrafił ten model dobrze wykorzystać obniżając poziom mitofizyny poprzez wyciszenie ekspresji genu *Mtf2* metodą shRNA. W tych warunkach zaobserwował zwiększoną śmiertelność komórek oraz zmiany w dynamice i morfologii mitochondriów przypominające zmiany *in vivo* w neuronach wrażliwych na stres niedokrwienny. Tym samym wykazał, że mitofuzyna 2 jest niezbędnym regulatorem przebudowy sieci mitochondrialnej w warunkach stresu niedostępności tlenu i glukozy. Ponadto odkrył, że mitofuzyna odgrywa rolę integratora przebudowy, eliminacji i biogenezy mitochondriów.

Podsumowując, pracę Pana Piotra Wojtyniaka oceniam bardzo wysoko, będąc przekonaną, że wniosła ona oryginalny i ważny wkład w badania nad neuroprotekcją. Doktorant przeprowadził ciekawe badania, przedstawił solidne wyniki i skonkludował pracę w sposób przekonujący. Świetnie poradził sobie z zadaniem opisu badań w krótkiej formie. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim i stawiam wniosek do Rady Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego w Warszawie o dopuszczenie Pana Piotra Wojtyniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Pracę wyróżnia logika i konsekwencja w wyborze modeli badawczych i zaplanowaniu badań oraz umiejętność szerokiego koncepcyjnego spojrzenia na badany problem. Zastosowanie dwóch różnych, ale uzupełniających się modeli badawczych pozwoliło na wyciągnięcie mocnych wniosków, wykraczających poza poziom korelacji. Zwrócenie uwagi na wieloprocusowość zjawisk w sieci mitochondrialnej pozwoliło zauważyć, że zmiany poziomu mitofuzyny 2 wpływają na równoległe procesy w mitochondriach, i zaproponować koncepcję integracji przebudowy, eliminacji i biogenezy mitochondriów przez białko regulatorowe. To z kolei otwiera nowe kierunki badań, a wysoka jakość badań została potwierdzona publikacjami w bardzo dobrych czasopismach.