



Prof. dr hab. n. med. Andrzej Członkowski

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Sywii Żulińskiej pt. „Analiza ekspresji genów białek regulujących funkcję i dynamikę mitochondriów w doświadczalnych modelach choroby Alzheimera”

Choroba Alzheimera (chA) jest ciężką chorobą neurodegeneracyjną oraz najcięższą formą otępienia. Istnieją różne hipotezy wyjaśniające jej przyczyny: hipoteza kaskady amyloidowej i stresu oksydacyjnego, oraz hipoteza mitochondrialna i metaboliczna dotycząca zaburzeń przemian glukozy.

Rozprawa doktorska ma układ typowy, liczy 153 strony maszynopisu w tym 7 rycin, 14 wykresów i 1 tabelę. Zwraca uwagę staranność z jaką praca została przygotowana.

Spis treści poprzedza spis publikacji (1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2. *Mol Neurobiol*, 3. *Neurochem Res*, 4. została przesłana do *Neuromol Med* i jest w recenzji), w których przedstawiono wyniki stanowiące podstawę rozprawy oraz jej współautorów. Przedstawiono również źródła finansowania badań przez Narodowe Centrum Nauki: OPUS 5 (2013), OPUS 8 (2014) i PRELUDIUM 18 (2019). Następnie zawiera kolejno objaśnienia skrótów stosowanych w pracy, wykaz rycin, wykaz wykresów, wykaz tabel, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, wnioski, streszczenie, streszczenie w języku angielskim, innowacyjność rozprawy oraz literatura.

W obszernym wstępie przedstawiono między innymi epidemiologię i klasyfikację choroby Alzheimera. Wiele miejsca poświęcono hipotezom starającym się wyjaśnić złożony patomechanizm chA. Hipoteza metaboliczna bierze pod uwagę zaburzenia metabolizmu glukozy. ChA w zaawansowanej postaci prowadzi do zaburzeń w metabolizmie glukozy. Nieefektywne wykorzystanie glukozy, upośledzona produkcja ATP i uszkodzenia oksydacyjne mają wpływ na przebieg chA. W chA nieodłącznie z zaburzeniami metabolizmu glukozy powiązany jest nieprawidłowy metabolizm lipidów. Hipoteza metaboliczna wiąże się

z hipotezą mitochondrialną. Nowe badania wykazały, że potranslacyjna modyfikacja białek mitochondrialnych związana jest z metabolizmem może wpływać istotnie na przebieg chA. Jest chorobą wieloczynnikową a liczne mechanizmy z nią związane są niewyjaśnione. W 1984 r. zaproponowano hipotezę wyjaśniającą etiologię choroby opartą o powstawanie blaszek starczych amyloidowych charakterystycznych dla obrazu neuropatologicznego chA. Wiele miejsca poświęcono hipotezie kaskady amyloidowej zarówno uzasadniając słuszność tej hipotezy jak i zwracając uwagę na badania kliniczne oparte na hipotezie kaskady amyloidowej, które przyniosły rozczarowujące wyniki. Wiele badań wskazuje, że upośledzenie funkcji mitochondriów może być głównym patologicznym czynnikiem chorób neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem. Nie jest jasnym czy zmiany łańcucha transportu elektronów obserwowane w chA są wynikiem pierwotnej zmiany mitochondrialnej, czy konsekwencją działania białek o zmienionej konformacji.

Wiele miejsca we wstępie poświęca Doktorantka roli stresu oksydacyjnego w dysfunkcji mitochondriów. Do krytycznych czynników patologii chA związanych ze stresem oksydacyjnym i towarzyszącym procesom neurodegeneracyjnym w chA jest stan zapalny. Reakcje zapalne, aktywacja mikrogleju i astrocytów w ośrodkowym układzie nerwowym odgrywają ważną rolę w rozwoju chA. Zaburzenia mitochondrialne mogą być może wywołane zwiększonym stresem oksydacyjnym i stanem zapalnym co może prowadzić do uszkodzenia struktury i funkcji neuronów, co odgrywa istotną rolę w patogenezie chA.

Ważną częścią wstępu jest omówienie zaburzeń dynamiki mitochondriów oraz biogeneza mitochondrialna w chA. Podsumowując Doktorantka pisze: ..."dotychczasowe badania patomechanizmu chA, nadal pozostają nie w pełni wyjaśnione ..."

Celem pracy było zbadanie ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne, białka transportu elektronów, białka regulujące fuzję/podział i biogenezę mitochondriów oraz ocena poziomu wybranych białek mitochondrialnych w doświadczalnych modelach choroby Alzheimera.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. wpływ oligomerów peptydu AbetaO 1-42 (oligomerów amyloidu beta 1-42) na poziom wolnych rodników, PARP (polimeraza poliADP-rybozy), ekspresję genów kodujących białka regulujące dynamikę oraz funkcję mitochondriów w komórkach PC12 (linia komórkowa wyprowadzona z guza chromochłonno rdzenia nadnerczy szczura)

2. zbadanie wpływu A β O 1-42 i inhibitora PARP-1 na ekspresję genów białek łańcucha transportu elektronów i białek odpowiedzialnych za fuzję/podział i biogenezę mitochondriów w komórkach PC12 (linia komórkowa wyprowadzona z guza chromochłonnego)
3. zbadanie działania oligomerów beta amyloidu 1-42 na żywotność komórek, poziom wolnych rodników oraz transkrypcje genów kodujących białka mitochondrialne w komórkach neuronalnych (SH-SY5Y) (ludzka linia komórkowa *neuroblastoma* i glejowych (BV2) (linia komórkowa mikrogleju mysiego)
4. zbadanie aktywności cytochromu C oksydazy, enzymu IV kompleksu łańcucha transportu elektronów (ETC) w komórkach neuronalnych (SH-SY5Y) i glejowych (BV2) poddanych działaniu β amyloidu 1-42 oraz w mysim modelu chA
5. badanie ekspresji genów na poziomie mRNA i białek antyoksydacyjnych, regulujących funkcję oraz dynamikę i biogenezę mitochondriów w korze mózgu w mysim modelu chA
6. ocenę immunoreaktywności wybranych białek w mysim modelu chA.

Materiały i metody

Badania *in vitro* prowadzono na komórkach szczurzego guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy. Hodowle pozyskano z Zakładu Farmakologii Biocentrum Uniwersytetu we Frankfurcie nad Menem (RFN). Linia ta jest rutynowo używana w badaniach nad molekularnymi zmianami mechanizmów doprowadzających do neurodegeneracji.

Komórkowy model doświadczalny stanowiła również ludzka linia komórkowa neuroblastoma SH-SY5Y, wywodzący się z komórek cewy nerwowej. Komórki te są stosowane w doświadczeniach *in vitro* nad molekularnymi mechanizmami prowadzącymi do przeżycia lub śmierci komórek nerwowych.

Mysie komórki mikrogleju BV2 otrzymane w darze z Uniwersytetu Perugii (Włochy) unieśmiertelniono po zakażeniu rekombinowanym retrowirusem. Komórki BV2 mogą być aktywowane do uwalniania prozapalnych cytokin przez stres oksydacyjny lub czynniki zapalne.

Do badań *in vivo* wykorzystano samice myszy szczepu FVB-Tg z zaburzeniami procesu proteolizy białka prekursorowego amyloidu beta (APP) oraz zwiększonym stężeniem i akumulacją amyloidu beta w mózgu i postępującymi zaburzeniami behawioralnymi. Zwierzęta uzyskano z hodowli prowadzonej w zwierzętarni IMDiK PAN.

Warunki hodowli i traktowanie komórek PC12 i SH-SY5Y oraz BV2 właściwie dobrane do założonych celów i odpowiednio opisane.

Zawartość białka w ekstraktach komórkowych oznaczano metodą Brandforda (1976). Przeżywalność traktowanych komórek badano w oparciu o zachodzącą w aktywnych metabolicznie komórkach, reakcję przekształcenia soli tetrazolinowych (test MTT). Liczba żywych komórek w badanym materiale jest wprost proporcjonalna do intensywności zabarwienia otrzymanego roztworu.

Oceniano również aktywność enzymatyczną kompleksu IV mitochondrialnego łańcucha oddechowego w komórkach SH-SY5Y i BV2 oraz w materiale zwierzęcym. Aktywność oksydazy cytochromu C w lizacie komórkowym lub w homogenacie z kory mózgu była zmierzona według metodyki opisanej przez Spinazzi i wsp. (2012).

W pracy wykorzystano i wyczerpująco opisano metody spektrofluorymetryczne, w tym analizę poziomu wolnych rodników przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF. Metody immunochemiczne, w tym przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych oraz immunodetekcję białek metodą Western blot. Więcej miejsca poświęcono analizie poziomu ekspresji genów, w tym izolacji RNA, reakcji odwrotnej transkrypcji łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym. Przedstawiono również metody mikroskopowe – badanie apoptozy komórek *in vitro* przy użyciu barwnika Hoechst 33342 z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Na zakończenie tego rozdziału omówiono statystyczne opracowanie wyników.

Wyniki zostały wyczerpująco przedstawione, poddane odpowiednio dobranej analizie statystycznej oraz omówione z uwzględnieniem 364 pozycji aktualnego światowego piśmiennictwa.

Dyskusja rozpoczyna się pesymistycznie. „Pomimo wielu lat intensywnych badań, etiologia i patomechanizm chA nie są poznane a terapia jest nieskuteczna”. Jednak nawiązując do prowadzonych badań mgr S. Żulińska podkreśla, że poznanie dynamiki zaburzeń ekspresji badań kodujących białka mitochondrialne w warunkach toksyczności peptydów amyloidu β i może mieć znaczenie w patogenie i patomechanizmie chA. Całość DYSKUSJI bardzo dobrze świadczy o wiedzy Doktorantki.

Na zakończenie rozprawy przedstawiono: PODSUMOWANIE, WNIOSKI i INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY. Zebrano tu najważniejsze wyniki, wnioski i możliwość wykorzystania ich w przyszłości.

Wyniki świadczą o znaczeniu toksyczności oligomerów peptydów β amyloidu 1-42 w zmianach transkrypcji genów zaangażowanych w procesy antyoksydacyjne i funkcje mitochondriów w wybranych liniach komórkowych oraz w zwierzęcym modelu chA. Efekt toksyczności oligomerów amyloidu beta zależy od rodzaju komórek, na które działają i od czasu działania. Wyniki sugerujące, że zastosowanie inhibitora PARP-1 w chA może mieć istotne działanie cytoprotekcyjne.

Stwierdzono zmiany ekspresji genów w korze mózgu myszy w modelu zwierzęcym chA w procesie starzenia. Wyniki sugerują, że zaburzenia ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w obronę antyoksydacyjną mogą leżeć u podstaw kolejnych niekorzystnych zjawisk w chA.

Najważniejszymi wydają się być stwierdzenia sugerujące, że aktywacja biogenezy mitochondriów mogłaby mieć korzystne znaczenie w opracowaniu nowej strategii terapeutycznej w zaawansowanych stadiach chA. Wyniki przedstawionej rozprawy doktorskiej poszerzają i uzupełniają stan wiedzy dotyczący znaczenia peptydów oligomerów amyloidu β w modulacji transkrypcji genów i mogą być pomocne w opracowaniu nowych strategii neuroprotekcyjnych.

Fakt, że większość wyników zamieszczonych w pracy doktorskiej została już opublikowana w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu oraz kolejna jest w recenzji w czasopiśmie *Neuromol. Med.*, a Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch publikacjach, praca doktorska przynosi nowe, oryginalne informacje i świadczy o naukowej dojrzałości autora. Zamierzone cele pracy zostały osiągnięte.

Nie wnoszę żadnych merytorycznych zastrzeżeń do recenzowanej pracy. Według mojej opinii nie tylko w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym, stawianym pracom doktorskim ale zasługuje na wyróżnienie.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Sylwii Żulińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 28. 08. 2022 r.



Prof. dr hab. med. Andrzej Członkowski

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Żulińskiej

Praca doktorska ma charakter innowacyjny, przynosi nowe, oryginalne informacje, oraz wykorzystano w niej wiele pracochłonnych metod. Opublikowane wyniki uzupełniają stan naszej wiedzy o patomechanizmie choroby Alzheimera i mogą być pomocne w opracowaniu terapeutycznej w zaawansowanych stadiach tej choroby.

Fakt, że większość wyników zamieszczonych w pracy została opublikowana w trzech czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz kolejny maszynopis jest w recenzji w czasopiśmie *Neuromol Med.*, a Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch pracach, przemawia dodatkowo za wyróżnieniem pracy. Publikacje jednak miały licznych współautorów (kolejno 6,9,4, 6) i recenzentowi trudno jest ocenić jak dalece w tym gronie rola Doktorantki była wystarczająco wyróżniająca.

Warszawa, 28. 08. 2022 r.



Prof. dr hab. med. Andrzej Członkowski