



Gdańsk, 5 listopada 2018

Prof. dr hab. med. Włodzimierz Meissner
Dziekan Wydziału Biologii
Uniwersytetu Gdańskiego

Recenzja pracy doktorskiej mgr Pauliny Mozolewskiej pt. „Zmiany w mitochondriach ludzkich komórek niosących mutacje w genie *IT15*”.

Głównym problemem którego dotyczy rozprawa doktorska jest poszukiwanie mechanizmów zaangażowanych w patogenezę jednego z poważniejszych i względnie często pojawiających się genetycznie uwarunkowanych schorzeń neurodegeneracyjnych jakim jest choroba Huntingtona.

Przyczyną choroby Huntingtona jest nadmierna ekspresja trójki nukleotydowej CAG w genie *IT15* kodującym huntingtynę. Białko to jest obecne w całym organizmie, ale w największym stężeniu występuje w mózgu. Nie jest do końca poznana jego funkcja, ale wiadomo, że w cytoplazmie bierze udział w transporcie komórkowym i endocytozie, a w jądrze komórkowym reguluje transkrypcję. Białko to jest też istotne w embriogenezie i uczestniczy w procesie apoptozy. Mutacja powoduje zwolnioną degradację proteasomalną przyczyniając się do gromadzenia agregatów huntingtyny w komórce. Nie jest jasne czy obserwowane zaburzenia są konsekwencją utraty funkcji huntingtyny czy szkodliwy jest jej nadmiar w komórce, jednak w ich wyniku dochodzi do upośledzenia funkcji i żywotności komórek nerwowych. Dysfunkcja układu nerwowego jest głównym problemem u pacjentów z chorobą Huntingtona, jednak u chorych tych rozwijają się także różne formy miopatii czy kardiomiopatii. Uważano dotychczas, że zaburzenia te są wtórną konsekwencją dysfunkcji komórek układu nerwowego. W ostatnich latach pojawiły się dane w tym również z Zakładu Biochemii GUMed sugerujące, że pierwotne zaburzenia funkcji w chorobie Huntingtona mogą dotyczyć nie tylko komórek układu nerwowego, lecz również mięśni szkieletowych czy serca. Sugestia, że zaburzenia funkcji mitochondriów mogą być istotne w patogenezie choroby Huntingtona pojawiły ze względu na wiele podobieństw z chorobami o udowodnionej patogenezie mitochondrialnej. Dotychczas jednak nie zbadano tego problemu dokładnie. W związku z powyższym głównym celem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej było zbadanie funkcji mitochondriów w komórkach krwi i fibroblastach pozyskanych od pacjentów z chorobą Huntingtona.

Pierwszym etapem przeprowadzonych badań było zbadanie poziomu mitochondrialnego DNA w komórkach krwi i fibroblastach, który oznaczano z zastosowaniem real-time qPCR. W toku prowadzonych badań wykazano na wstępie konieczność optymalizacji metody, gdyż



dotychczasowe procedury nie pozwalały na uzyskanie spójnych wyników. Opis optymalizacji tej procedury stał się podstawą pierwszej publikacji włączonej do doktoratu.

W kolejnym etapie wykorzystano opracowaną metodykę do analizy próbek krwi i fibroblastów uzyskanych od pacjentów z chorobą Huntingtona i osób zdrowych. Badania te wykazały wzrost relatywnej zawartości mtDNA w komórkach krwi u pacjentów w porównaniu do osób zdrowych. W fibroblastach natomiast wykazano odwrotną tendencję. Nie wykazano korelacji tych zmian z parametrami klinicznymi. Wyniki tych badań zawarte zostały w drugiej publikacji włączonej do doktoratu.

W ostatnim etapie badań przeprowadzono badania funkcji mitochondriów w fibroblastach pozyskanych od pacjentów. Wykazano że fibroblasty pacjentów z chorobą Huntingtona rosną wolniej od komórek pozyskanych od osób zdrowych. Nie udało się jednak powiązać tych zmian z zaburzeniami cyklu komórkowego. Stwierdzono natomiast, że u pacjentów zaburzona jest bioenergetyka komórek, co wykazano przez obniżone stężenie komórkowego ATP zarówno w warunkach obecności jak i nieobecności glukozy oraz przez obniżoną aktywność metaboliczną mierzoną testem z rezazuryną. Porównanie funkcji mitochondriów nie wykazało różnic potencjału błonowego, aktywności kompleksów mitochondrialnych czy całkowitej masy mitochondriów. Analiza poziomu reaktywnych form tlenu wykazała jednak znamienne różnicę, która dodatkowo korelowała z wyższą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych u pacjentów z chorobą Huntingtona. Kompleksowa analiza statystyczna parametrów funkcji mitochondriów z parametrami klinicznymi wykazała istotne różnice, szczególnie u pacjentów na wczesnym etapie choroby.

Wyniki te są bardzo spójne z wynikami badań prowadzonych w Katedrze Biochemii GUMed i opublikowanymi ostatnio w *Biochim Biophys Acta*. Stwierdziliśmy w naszych badaniach, że u myszy z mutacją powodującą chorobę Huntingtona rozwinęły się zaburzenia równowagi energetycznej serca, pomimo hiperfosforylacji kinazy białkowej aktywowanej AMP. Towarzyszyło temu zmniejszone zużycie glukozy i znacząca deregulacja genów biorących udział w biosyntezie puryn *de novo*, w przemianach nukleotydów adeninowych oraz w metabolizmie adenozyliny. W związku z tym zaobserwowaliśmy zwiększone poziomy katabolitów nukleotydów, takich jak inozyna, hipoksantryna, ksantyna i kwas moczowy we krwi. Te zmiany stężeń katabolitów puryn były również obecne we krwi pacjentów z chorobą Huntingtona.

Mam jedynie kilka drobnych uwag dotyczących tej pracy doktorskiej. Polska wersja streszczenia zawiera niezbyt fortunne sformułowania: „zmniejszając manifestację” (s.11, l.12), „periferyczne nieprawidłowości” (s.12, l.4), „w tkankach periferycznych (komórkach krwi oraz fibroblastach skóry)” (s.12, l.8). Wiele ciekawego dzieje się w zakresie



nowych terapii w chorobie Huntingtona, o czym warto było by nieco więcej napisać. W trzeciej publikacji w której oznaczano stężenie ATP bardzo brakuje oznaczeń ADP i AMP, czy NADH/NAD, które łatwo można by wykonać w tym samym ekstrakcie komórkowym, a pozwoliło by to znacznie lepiej spojrzeć na energetykę komórki.

Nie jestem też pewien czy przyjęty format pracy doktorskiej jest najlepszy. Bardzo brakuje zebranych w kilku podsumowujących punktach celów pracy oraz wniosków. Informacje te oczywiście są zawarte w streszczeniu. Lepiej używać terminu piśmiennictwo, a nie literatura. Ponadto uważam, że umieszczanie oświadczeń współautorów w tekście pracy nie jest właściwe. Są one niezbędne, ale w moim przekonaniu ich miejsce jest w dokumentacji związanej z przewodem doktorskim przechowywanej na Uniwersytecie. Zajmują one niemal 25% objętości pracy doktorskiej, a jedno załączone zostało nawet w trzech kopiach. Do pracy doktorskiej powinien natomiast zostać włączony suplement dostępny online dla drugiej publikacji.

Wymienione uwagi do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej bardzo wysokiej wartości naukowej oraz praktycznej. Praca stanowi bardzo znaczący wkład w badania nad mechanizmami patologicznymi w chorobie Huntingtona wynikający szczególnie z zastosowania komórek ludzkich. Badania te mogą pomóc w opracowaniu nowych biomarkerów i terapii. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawie doktorskiej.

Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Pauliny Mozolewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość zarówno dla badań podstawowych i praktycznych publikacji włączonych do doktoratu w których we wszystkich mgr Paulina Modzelewska jest pierwszym autorem, ich spójność, zastosowanie trudnych modeli eksperymentalnych z ludzkimi komórkami oraz wykonanie bardzo potrzebnego, a często pomijanego etapu szczegółowego sprawdzenia i optymalizacji metod przed podjęciem właściwych badań składam dodatkowy wniosek o wyróżnienie.

Z poważaniem

KIEROWNIK

Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

prof. dr hab. *Ryszard Tomasz Smoleński*