

Warszawa, 15.02.2024

Dr hab. n. med. Ilona Joniec-Maciejak  
Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej  
Centrum Badań Przedklinicznych  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

---

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Barut  
pt.: „Opracowanie i walidacja nowego modelu  
transgenicznego opartego o system edycji genów CRISPR/Cas9 do  
potencjalnego wykorzystania w badaniach zależności pomiędzy układem  
noradrenergicznym i dopaminowym w kontekście choroby Parkinsona”  
wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk  
pod kierunkiem Dr hab. Grzegorza Kreinera i Dr Piotra Chmielarza**

Rozprawa doktorska mgr Justyny Barut dotyczy próby stworzenia nowego zwierzęcego modelu badawczego opartego na selektywnej, mózgowo-specyficznej, progresywnej degeneracji neuronów noradrenergicznych *Locus coeruleus* (LC) wywołanej poprzez delecję czynnika transkrypcyjnego TIF-IA. Doktorantka założyła, opierając się na wcześniejszych wynikach zespołu wskazujących na pozytywny, neuroprotektoryjny wpływ stymulacji przekaznictwa noradrenergicznego w transgenicznym, mysim modelu parkinsonizmu z selektywną delecją TIF-IA w neuronach dopaminowych (linia TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup>) oraz bazując na teorii Braaka mówiącej o sekwencyjnym rozwoju poszczególnych faz neurodegeneracji w chorobie Parkinsona (ChP), że efektem ubytku neuronów noradrenergicznych LC będzie uruchomienie kaskady zmian neurodegeneracyjnych zbliżonych do tych obserwowanych w ChP. W tym kontekście Doktorantka chciała określić wpływ postępującej degeneracji neuronów noradrenergicznych w LC na funkcjonowanie układu dopaminowego.

Cele szczegółowe pracy obejmowały:

1. Zbadanie wpływu konstytutywnej mutacji w dostępnym modelu TIF-IA<sup>DbhCre</sup>, prowadzącej do degeneracji układu noradrenergicznego, na funkcjonowanie układu dopaminowego w rejonie SN/VTA;
2. Wykorzystanie systemu edycji genów CRISPR/Cas9 *in vivo* dla stworzenia od podstaw nowego modelu myszy transgenicznych opartego o delecję TIF-IA ograniczoną do

ośrodkowego układu nerwowego (charakteryzującego się selektywną, mózgowo-specyficzną degeneracją układu noradrenergicznego w rejonie LC) i jego ogólna charakterystyka;

3. Wykorzystanie modelu dla badania wzajemnych zależności pomiędzy układem noradrenergicznym a dopaminowym, w kontekście wczesnej, przedklinicznej fazy PD, w szczególności potwierdzenie hipotezy czy neurodegeneracja LC może prowadzić do spontanicznych, negatywnych zmian w układzie dopaminowym.

Praca ma układ klasyczny, zawiera następujące części: *Streszczenie, Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i wnioski* oraz przywołane *Piśmiennictwo*. Praca liczy 190 stron, zawiera 85 rycin, 41 tabel oraz 357 pozycji aktualnego piśmiennictwa.

Doktorantka posługuje się w pracy bardzo precyzyjnym językiem naukowym, przy pomocy którego sprawnie porusza się pomiędzy złożonymi zagadnieniami z zakresu neurobiologii, patofizjologii, biologii molekularnej. Powoduje to, że pomimo obszerności tematu, pracę czyta się dobrze, podążając za poszczególnymi wątkami, które szczegółowo przedstawiają kolejne etapy pracy badawczej.

We *Wstępie* Doktorantka przedstawiła wybrane zagadnienia dotyczące patomechanizmów choroby Parkinsona, ze szczególnym uwzględnieniem molekularnego podłoża choroby. Zaprezentowała i omówiła komórkowe, farmakologiczne, genetyczne oraz oparte na podaniach  $\alpha$ -Syn modele doświadczalne ChP. Przedstawiła i scharakteryzowała system edycji genów CRISPR/Cas9 oraz omówiła zastosowanie tego systemu w modelach genetycznych ChP. Omówiła także znaczenie uszkodzenia systemu noradrenergicznego we wczesnej fazie choroby Parkinsona.

Lektura części *Materiały i metody* pozwala z uznaniem skonstatować, że Doktorantka sprawnie operuje bardzo szerokim zakresem metod badawczych, poczynając od bardzo zaawansowanych technik biologii molekularnej (m. in. projektowanie i wytwarzanie wektorów wirusowych, klonowanie molekularne, badanie ekspresji wybranych mRNA i miRNA (metoda Real-Time PCR), immunodetekcję białek metodą Western Blot oraz przy użyciu macierzy białkowej, ilościową ocenę białek metodą ELISA a także badania z zastosowaniem analiz proteomicznych), posiada umiejętność prowadzenia hodowli komórkowych, wykonywania podań stereotaktycznych do wybranych struktur OUN, szerokiego spektrum badań behawioralnych (m.in. test spontanicznej aktywności, koordynacji ruchowej rotarod, test statycznych prętów, testy w kierunku wykazania ew. fenotypu depresyjnego i lęklivości

zwierząt), poprzez techniki immunocytochemiczne, badania HPLC (oznaczanie stężeń neuroprzekaźników) oraz badania elektrofizjologiczne (m.in. badanie spontanicznej aktywności neuronów dopaminowych). Wszystkie z tych metod są bardzo szczegółowo opisane a zamieszczone opisy wzbogacone są licznymi grafikami i tabelami dopełniającymi tekst. Doktorantka przedstawiła bardzo dokładnie kolejne etapy badań, przebieg i zakres wykonywanych eksperymentów w sposób umożliwiający ich powtórzenie przez innych badaczy.

Biegłość w poruszaniu się pomiędzy tak licznymi technikami badawczymi pozwala bardzo wysoko ocenić warsztat badawczy Doktorantki i jest dużym atutem rozprawy doktorskiej.

Część *Wyniki* prezentuje się imponująco. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki są bardzo szczegółowo omówione, jak również przedstawione w formie grafik, wykresów, tabel i zdjęć, które ułatwiają śledzenie uzyskanych wyników - dzięki temu są bardzo czytelne i komunikatywne.

W części *Dyskusja* Doktorantka podsumowała otrzymane przez siebie wyniki w świetle wyników uzyskanych przez innych autorów wysuwając na tej podstawie logiczne wnioski. Ta część pracy jest bardzo dobrze opracowana, jest ważnym uzupełnieniem i uwieńczeniem pozostałych rozdziałów pracy. Doktorantka nie uciekała od trudnych kwestii- przedstawiła również napotkane w trakcie badań problemy i starała się do nich ustosunkować.

Otrzymane wyniki oraz ich dyskusja pozwoliły Doktorantce na wysunięcie trafnych wniosków (rozdział *Podsumowanie i wnioski*). W ocenie Doktorantki uzyskane wyniki wskazują, że:

1. Degeneracja układu noradrenergicznego u myszy TIF-IA<sup>DbhCre</sup> powoduje dysfunkcje w rejonie SN/VTA, powodując wzrost markerów stanu zapalnego, stresu jąderkowego oraz – być może - wczesne oznaki procesów neurodegeneracyjnych.

2. Degeneracja LC nie jest wtórnym efektem wynikającym z ubytku neuronów dopaminowych w SN/VTA (autorka wyciągnęła ten wniosek analizując model mysiego parkinsonizmu TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> w zaawansowanym stadium).

3. Nowy zaprojektowany i zwalidowany wektor LV-CRISPR-DIO pozwala na modyfikacje neuronów, które nie posiadają specyficznego promotora komórkowego i są trudne do innego typu separacji genetycznej.

4. Wektor LV-CRISPR-DIO transdukuje komórki *in vitro* i *in vivo*, a usunięcie czynnika transkrypcyjnego TIF-IA powoduje śmierć zainfekowanych komórek.

5. Nawet niewielka, selektywna degeneracja neuronów w rejonie LC powoduje wyraźne zmiany behawioralne u zwierząt, obserwowane po dłuższym okresie od wywołania neurodegeneracji.

6. Płeć ma istotne znaczenie w badaniach nad neurodegeneracją.

7. Degeneracja LC ma negatywne oddziaływanie na funkcjonowanie neuronów dopaminowych co wykazała na podstawie zmian na poziomie parametrów biochemicznych, molekularnych i elektrofizjologicznych.

8. Neurodegeneracja układu noradrenergicznego może przyczynić się do zmian w funkcjonowaniu neuronów dopaminowych i zmiany te mogą być charakterystyczne w początkowej fazie ChP.

9. Opisany nowy model może posłużyć badaniom innych efektów dysfunkcji układu noradrenergicznego związanych z zaburzeniami pamięci, snu i czuwania co otwiera nowe możliwości dla realizacji kolejnych projektów.

Pod rozwagę należy wziąć możliwość ujednoczenia wniosków nr 7 i 8 co może zapewnić bardziej spójny i zwięzły przekaz. Np. „Wykazano, że degeneracja LC ma negatywne oddziaływanie na funkcjonowanie neuronów dopaminowych, co objawia się poprzez znaczące zmiany na poziomie parametrów biochemicznych, molekularnych i elektrofizjologicznych. Te obserwacje sugerują, że neurodegeneracja układu noradrenergicznego może przyczynić się do specyficznych zmian w funkcjonowaniu neuronów dopaminowych, które mogą być charakterystyczne dla początkowej fazy ChP.”

Mam kilka bardzo drobnych uwag technicznych dotyczących formatowania tekstu pracy s.105, literówek, nielicznych błędów stylistycznych (np. „jednym z możliwości” s15, „łączny czasu trwania” s 70, „był stworzonyużywany” s 91, „pokonania tej utrudnienia” s125, „wywoływać na neurozapalenie” s.148, „skuteczność do operacji” s. 160) i interpunkcyjnych. Dodatkowo sugerowałabym stosowanie terminu „stężenie” neuroprzekaźnika np. dopaminy czy „ekspresja” mRNA lub „ekspresja” białka w miejsce „poziom”, a także „wysokosprawna/ wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa” w miejsce „wysokoprzepustowa chromatografia cieczowa” (s.78). Ponadto Doktorantka błędnie zakwalifikowała IL-10 do cytokin prozapalnych (s.84), ale już na str. 148 podaje prawidłową informację: „IL-10 jest bardzo silną cytokiną przeciwzapalną”

Te drobne uwagi nie zmieniają mojej wysokiej oceny całokształtu pracy. W tym miejscu należy dodać, że praca dotyczy bardzo skomplikowanego obszaru badań naukowych, a jednak Pani

mgr Justyna Barut, zarówno w zakresie wiedzy teoretycznej jak i technik badawczych porusza się w tym obszarze w sposób bardzo swobodny.

## **Podsumowanie**

Uważam, że Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego i niełatwego zadania polegającego na zbadaniu i ocenie długotrwałego wpływu degeneracji noradrenergicznej na funkcjonowanie układu dopaminowego. Realizacja tego założenia była trudna przede wszystkim z powodu braku odpowiednich modeli zwierzęcych. W pierwszej fazie realizacji swojego projektu Doktorantka, wykorzystując model zwierzęcy (myszy transgeniczne stworzone w oparciu o system Cre/loxP, z delecją czynnika transkrypcyjnego TIF-IA odpowiedzialnego za sterowanie aktywnością polimerazy I, pod kontrolą promotora DBH), wykazała, że postępująca neurodegeneracja układu noradrenergicznego może u dorosłych myszy wywołać negatywne zmiany w funkcjonowaniu układu dopaminowego (wzrost ekspresji markerów mikro- i astrogleju, cytokin prozapalnych, markerów stresu oksydacyjnego w rejonie SN/VTA). Zastosowany model doświadczalny nie był jednak w pełni adekwatny, z uwagi na jednoczesną degenerację obwodowego układu sympatycznego. W związku z tym, celem Doktorantki stało się stworzenie modelu, w którym mutacja wywoływana przez delecję TIF-IA zachowywałaby progresywny charakter, była wywoływana u dorosłych osobników, a jednocześnie była selektywnie ukierunkowana jedynie na komórki LC. Do tego celu Doktorantka zastosowała po raz pierwszy system edycji genów CRISPR/Cas9, co stanowi o nowatorstwie projektu. Konstruktor ten, po raz pierwszy zastosowany w ramach jej pracy, umożliwił selektywną delecję TIF-IA w rejonie LC, otwierając nowe możliwości badawcze.

Przeprowadzone badanie dostarcza istotnych informacji na temat potencjalnych mechanizmów neurodegeneracji powiązanych z chorobą Parkinsona, skupiając się na roli degeneracji układu noradrenergicznego i jej wpływie na rejon SN/VTA. W szczególności zwraca uwagę na niezależną degenerację *Locus coeruleus* i wynikające z niej kompleksowe zmiany w mózgu, sugerujące złożone interakcje międzysystemowe. Jednakże, choć te odkrycia rzucają światło na potencjalną rolę LC we wczesnej patogenezie choroby Parkinsona, istotne jest podkreślenie, że badanie to nie ujawniło bezpośrednich dysfunkcji przekazywania dopaminowego w postaci biochemicznych zmian związanych z typowym spadkiem stężenia dopaminy.

Ta obserwacja podkreśla konieczność dalszych badań w celu dokładniejszego zrozumienia zależności między obserwowanymi procesami neurodegeneracyjnymi a klasycznymi markerami choroby Parkinsona. W tym kontekście, istotne będzie zastosowanie zintegrowanych strategii badawczych, łączących różnorodne modele choroby z zaawansowanymi technikami genetycznymi, biochemicznymi i behawioralnymi. Takie podejście umożliwi nie tylko głębszą analizę wpływu degeneracji LC na układ dopaminergiczny, ale także pozwoli na ocenę, w jaki sposób te zmiany przyczyniają się do rozwijających się dysfunkcji przekąźnictwa dopaminowego oraz jakie mają one konsekwencje dla progresji choroby Parkinsona.

Podsumowując, badanie to otwiera nowe perspektywy dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw choroby Parkinsona, jednocześnie podkreślając potrzebę dalszych, szczegółowych badań, które zintegrują różnorodne metody i modele. Takie zintegrowane badania są niezbędne do pełnego zrozumienia roli dysfunkcji przekąźnictwa noradrenergicznego w chorobie Parkinsona oraz, być może w przyszłości, do opracowania skutecznych strategii terapeutycznych.

Wszystkie przedstawione w niniejszej recenzji argumenty w sposób bezsprzeczny wskazują, że Pani magister Justyna Barut wykazała się ponadprzeciętną wiedzą teoretyczną w dyscyplinie, posiada umiejętności samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych oraz posługuje się szeroką gamą technik badawczych a wykonana praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego - tym samym rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2023 poz. 742) i spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom promocyjnym na stopień doktora.

W związku z tym, zwracam się z wnioskiem do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie magister Justyny Barut do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne. Jednocześnie proszę o wyróżnienie pracy z powodu praktycznej istotności otrzymanych wyników. Doktorantka stworzyła nowy model doświadczalny, który zapewne będzie ważnym narzędziem badawczym w kolejnych projektach.

ADJUNKT  
Katedra i Zakład Farmakologii  
Doświadczalnej i Klinicznej  
Centrum Badań Przemysłowych (CBP)  
J. Joniec - Macepak  
dr hab. n. med. Iwona Joniec-Maciejał