

Warszawa, 12 lutego 2024

Ocena pracy doktorskiej 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”**

**mgr Justyny Barut**

wykonanej w Zakładzie Biochemii Mózgu  
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk  
pod kierunkiem dr. hab. Grzegorza Kreinera  
(promotor pomocniczy: dr Piotr Chmielarz)

Temat rozprawy doktorskiej. Celem przeprowadzonych badań było opracowanie modelu mysiego pozwalającego na badanie wpływu degeneracji układu noradrenergicznego na funkcjonowanie układu dopaminowego i rozwój choroby Parkinsona. Model taki mógłby posłużyć do weryfikacji hipotezy Braaka, zgodnie z którą w okresie prodromalnym choroby Parkinsona pojawiają się zmiany w rdzeniu przedłużonym i miejscu sinawym, w szczególności zmiany te obejmują układ noradrenergiczny. Zmiany takie miałyby być przyczyną pierwszych, niespecyficznych objawów obserwowanych u pacjentów. W weryfikacji tej hipotezy bardzo pomocny byłby model zwierzęcy stopniowej degeneracji układu noradrenergicznego. Badanie przeprowadzone we wstępnej fazie projektu, w już istniejącym modelu mysim, wykazały, że konstytutywna delecja czynnika transkrypcyjnego TIF-IA, pod kontrolą promotora beta-hydroksylazy dopaminowej, prowadząca do postępującej degeneracji układu noradrenergicznego rzeczywiście negatywnie wpływa na funkcjonowanie układu dopaminowego. Jednak ze względu na towarzyszącą degenerację obwodowego układu sympatycznego model ten nie był optymalny do badań nad znaczeniem degeneracji neuronów noradrenergicznych w mózgu. Dlatego stworzono i zweryfikowano model mysiej, w którym delecja czynnika transkrypcyjnego TIF-IA prowadzi do selektywnej, ograniczonej do miejsca sinawego i progresywnej degeneracji neuronów noradrenergicznych. Do stworzenia tego modelu wykorzystano system edycji genów CRISPR/Cas9, osiągając specyficzność co do rejonu w mózgu poprzez podanie wektora lentiwirusowego do miejsca sinawego podczas operacji stereotaktycznej. W celu weryfikacji hipotezy o negatywnym wpływie degeneracji układu noradrenergicznego, zbadano zachowanie myszy

oraz funkcjonowanie układu dopaminowego. Wpływ degeneracji układu noradrenergicznego na rozwój choroby Parkinsona jest słabo opisany, a ważną przyczyną tego stanu rzeczy jest brak odpowiednich modeli zwierzęcych. Dlatego wybrany temat pracy jest ważny.

Analiza zawartości rozprawy doktorskiej. Praca doktorska ma typowy układ. Rozpoczyna się obszernym wstępem, w którym opisane są objawy i znane przyczyny choroby Parkinsona, w szczególności naświetlony jest problem zaangażowania innych niż dopaminowy układów neuroprzekaźnikowych w rozwój choroby i hipoteza Braaka. Omówione są również różne modele zwierzęce choroby Parkinsona oraz zasady działania systemu edycji genów CRISPR/Cas9. Wstęp stanowi dobre wprowadzenie do problematyki, której dotyczą przeprowadzone badania. W rozdziale Materiały i Metody szczegółowo i starannie opisane są wykorzystywane procedury eksperymentalne. Na opis wyników składają się cztery podrozdziały. W pierwszym z nich opisano wyniki otrzymane w pierwszej fazie projektu. Wykazano, że konstytutywna delecja czynnika transkrypcyjnego TIF-IA w neuronach noradrenergicznych prowadzi do wzrostu poziomu markerów stanu zapalnego w rejonie istoty czarnej (SN) i polu brzusznej nakrywki (VTA). Wyniki te zostały opublikowane (Barut i in. *Neurochem. Int.* 2022). Ponadto, wykorzystując myszy TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> charakteryzujące się progresywną degeneracją komórek dopaminowych, stwierdzono, że taka degeneracja nie wpływa na liczbę neuronów w miejscu sinawym. Kolejna część wyników poświęcona jest opisowi doświadczeń, które doprowadziły do stworzenia modelu selektywnej delecji TIF-IA w rejonie miejsca sinawego, opartego o system edycji genów CRISPR/Cas9 u myszy z ekspresją rekombinazy Cre pod kontrolą promotora Dbh. Szczegółowo opisano projektowanie i produkcję wektorów wirusowych, jak również weryfikację ich działania. Działanie wektorów zweryfikowano w hodowlach neuronalnych, jak i *in vivo*, u myszy. Zoptymalizowano warunki operacji stereotaktycznych i wybrano najefektywniej działające gRNA. W trzeciej części wyników opisano doświadczenia, które pozwoliły na wykazanie, że wprowadzona mutacja powoduje selektywną degenerację neuronów noradrenergicznych w miejscu sinawym. Stwierdzono zmiany w poziomie noradrenaliny i serotoniny w prążkowie u samców z wprowadzoną mutacją. Zmian takich nie stwierdzono natomiast w hipokampie. Stwierdzono również obniżenie poziomu ekspresji mRNA dla transportera noradrenaliny w miejscu sinawym, ale nie w hipokampie. W ostatniej części wyników opisano efekty wprowadzonej mutacji na funkcjonowanie układu dopaminowego. Stwierdzono, że myszy z wprowadzoną mutacją nie wykazują zmian masy ciała w stosunku do zwierząt kontrolnych. Natomiast samce myszy z wprowadzoną mutacją wykazują zaburzenia motoryczne mierzone w teście RotaRod i teście statycznych prętów. Niewielkie zmiany w ruchliwości zaobserwowano również u samców w teście otwartego pola. Zarówno samce, jak i samice wykazywały wydłużony czas bezruchu w teście zawieszenia za ogon, a samice – wyższy poziom lęku mierzony w uniesionym labiryncie krzyżowym. Wykazano zatem zmiany fenotypowe w zakresie

koordynacji ruchowej, poziomu lęku i zachowań depresyjnych, które wydają się być zależne od płci. Ponadto, stwierdzono, że liczba neuronów dopaminowych w SN i VTA nie ulega zmianie, natomiast zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA dla transportera noradrenaliny i podniesienie poziomu miR223, będącego wczesnym markerem choroby Parkinsona. Analiza proteomiczna rejonów SN i VTA wskazuje na zmiany w ekspresji licznych białek u zwierząt z wprowadzoną mutacją. Co ważne, wykazano również zmiany we właściwościach elektrofizjologicznych neuronów dopaminowych w SN i VTA u myszy z degeneracją układu noradrenergicznego. Zatem przeprowadzone badania potwierdziły negatywny wpływ degeneracji układu noradrenergicznego na funkcjonowanie neuronów dopaminowych. Ponadto, stwierdzono korelację pomiędzy aktywnością miejsca sinawego u myszy z wprowadzoną mutacją a średnicą źrenicy oka, co może stanowić marker stopnia degeneracji układu noradrenergicznego. Wyniki opisane są w sposób czytelny, są też bogato ilustrowane zdjęciami mikroskopowymi, wykresami i diagramami. Przeprowadzone analizy statystyczne i wyciągnięte wnioski są w większości poprawne (zob. również uwagi poniżej). Następująca po opisie wyników dyskusja porusza kwestię przydatności opracowanego modelu do badań wpływu degeneracji neuronów noradrenergicznych na neurony dopaminowe, porównując go z wcześniej dostępnym modelem testowanym w pierwszej fazie projektu. Dyskutowane są zarówno zalety, jak i ograniczenia zastosowanego podejścia. Dogłębnie rozważane są aspekty metodyczne tworzenia modeli chorób neurodegeneracyjnych z wykorzystaniem systemu edycji genów CRISPR/Cas9. Następnie dyskutowane są wyniki badań nad fenotypem opracowanego modelu i jego przydatnością do badania zmian charakterystycznych dla wczesnej fazy choroby Parkinsona. Dyskutowane są także zaobserwowane różnice płciowe. Dyskusja jest dość obszerna i wyczerpująca, autorka właściwie cytuje literaturę przedmiotu (pewne uwagi krytyczne znajdują się poniżej). Pracę kończy rozdział Podsumowanie i wnioski oraz obszerna bibliografia.

Uwagi krytyczne. Lektura rozprawy nasuwa kilka problemów, które nie są wystarczająco dyskutowane:

1. Czy postulowane zmiany w układzie noradrenergicznym są przyczyną zaburzeń w układzie dopaminowym czy też jednym z ogniw w łańcuchu wydarzeń? Czy też może układ noradrenergiczny odgrywa rolę kompensacyjną - w pracy pojawia się stwierdzenie, że noradrenalina może kompensować efekty utraty komórek dopaminowych (str. 31).
2. Czy model myszy jest optymalny do badań nad rolą układu noradrenergicznego w chorobie Parkinsona? Zastosowanie systemu edycji genów CRISPR/Cas9 daje możliwość rozważenia innych niż myszy modeli zwierzęcych.
3. Wniosek 2: 'Wykazano, wykorzystując model mysiego parkinsonizmu TIF-IA<sup>DATCreERT2</sup> w zaawansowanym stadium, że degeneracja LC nie jest wtórnym efektem wynikającym z ubytku

neuronów dopaminowych w SN/VTA.’ nie jest w pełni uprawniony. Cytowane w pracy wyniki pokazują, że zmiany przekładające się na funkcję neuronów niekoniecznie dotyczą zmiany ich liczby. Mogą to być zmiany, na przykład, dotyczące ich aktywności. Zatem nie da się wykluczyć, że degeneracja neuronów dopaminowych ma wpływ na funkcjonowanie neuronów noradrenergicznych.

Mam również kilka uwag dotyczących analizy i prezentacji wyników:

4. W pracy nie są podawane źródła obrazków na rycinach, np. rysunki myszy na Ryc. 6.
5. Zdjęcia mikroskopowe na Rycinach 38, 39 i 45 są nieczytelne; z opisu Ryciny 46 nie wynika skąd pojawia się ekspresja mCherry; na Rycinie 51 brakuje panelu d.
6. W przypadku analizy wariancji stosowanej do określenia istotności wyników testów behawioralnych bardziej poprawnym podejściem statystycznym byłoby uwzględnienie płci jako czynnika w analizie zamiast oddzielnej analizy dla samców i samic. W przypadku analizy metabolitów bardziej poprawna byłaby analiza uwzględniająca fakt, że poziomy metabolitów nie są od siebie niezależne.
7. W opisie wyników w teście otwartego pola pojawia się stwierdzenie, że dystans eksploracji wzrastał wraz z długością przebywania w klatce (str. 166, dane pokazane na Rycinie 65). Jest to stwierdzenie nieprecyzyjne, bo otrzymane wyniki wskazują na tendencję do większej ruchliwości myszy z wprowadzoną mutacją w ciągu pierwszych 5 minut pomiaru.
8. Na Rycinie 61 powinna być masa, a nie waga (w opisie osi wykresu).
9. Podtytuł 4.4.2.4. jest nieadekwatny do treści podrozdziału.
10. Test statycznych prętów jest niekiedy nazywany testem statycznych patyków, a nawet statystycznych prętów.
11. Stwierdzenie: „myszy uczą się, że po pokonaniu pręta wrócą do klatki domowej, dlatego test ten ma również aspekt nagradzający” nie jest prawdziwe. Taki tok rozumowania prowadziłby do stwierdzenia, że test warunkowania strachu, który jest bardzo awersyjny dla zwierząt, ma wartość nagradzającą, bo zwierzęta wracają po nim do klatki domowej.
12. Niektóre z opisów wyników analiz statystycznych są niepoprawne, np. „Znamienny wpływ miała również interakcja obu zmiennych” (str. 125)
13. W tekście pojawia się sporo niezręczności językowych, które jednak nie wpływają znacząco na jakość odbioru przekazywanych treści.

Podsumowanie. Kilka uwag krytycznych, które nasunęły mi się podczas lektury (wymienionych powyżej) nie wpływają na moją ogólną **pozytywną** ocenę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Przedstawiona rozprawa wskazuje na dojrzałość naukową kandydatki, stanowi oryginalne rozwiązanie



problemu naukowego, odzwierciedla dużą wiedzę kandydatki w dziedzinie neurobiologii i biologii molekularnej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a tym samym spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2023, poz. 742) będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora. Mam zaszczyt przedstawić wniosek do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Justyny Barut do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne.

Prof. dr hab. Ewelina Knapska