

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

Warszawa, 19/02/2024

*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 dra Piotra Chmielarza*

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa opisuje badania, których przedmiotem był udział degeneracji w miejscu sinawym, noradrenergicznej części mózgu, w rozwoju głównej patologii w chorobie Parkinsona, czyli zwyrodnieniu neuronów dopaminergicznych w substancji czarnej, które prowadzi do niedoboru dopaminy w prążkowie odpowiedzialnym za generowanie celowego ruchu. Jest to kwestia mało zbadana, a o tyle istotna, że dotyczy prodromalnej fazy choroby Parkinsona, kiedy teoretycznie możliwe by było zatrzymanie lub spowolnienie choroby. W badaniach Doktorantka zmierzyła się z dużym problemem metodycznym – brakiem dobrego zwierzęcego modelu badawczego. Dlatego krytycznym celem pracy, obok zdobycia wyników potwierdzających hipotezę, było opracowanie takiego modelu śmierci neuronów w miejscu sinawym, który odpowiadałby zaburzeniom mogącym wystąpić w przebiegu choroby Parkinsona.

Badania zostały w zdecydowanej większości przeprowadzita bezpośrednio Doktorantka, która w rozprawie wykazała się gruntownym zrozumieniem technik badawczych, ich zalet i ograniczeń. O samodzielności badaczki świadczy też umiejętność współpracy, dzięki której uzyskała ciekawe dodatkowe wyniki.

W pierwszym etapie badań użyto opracowanego wcześniej modelu myszy z nokautem genu *Rrn3* kodującego czynnik inicjacji transkrypcji TIF-IA w komórkach noradrenergicznych DBH+ lub dopaminergicznych DAT+. Ablacja czynnika TIF-IA prowadzi do apoptozy, są to więc modele ze śmiercią odpowiednich populacji neuronów. W pierwszym przypadku (model TIF-IA^{DbhCre}) apoptozie ulegały przede wszystkim neurony noradrenergiczne mózgu, ale także inne komórki obwodowe wyrażające DBH. W drugim przypadku (model TIF-IA^{DatCreERT2}) były to neurony dopaminergiczne. Dodatkowo w drugim modelu nokaut był indukowany tamoksyfenem, co zapewniało czasową kontrolę wystąpienia neurodegeneracji. W pierwszym modelu zbadano wpływ degeneracji w układzie noradrenergicznym na układ dopaminowy, a w drugim ewentualną odwrotną zależność. Uzyskano wyniki weryfikujące brak wpływu układu dopaminowego na rozwój patologii w układzie noradrenergicznym. Jest to ważny kontrolny wynik, ponieważ wskazuje, że patologie układu noradrenergicznego występujące u ludzi prawdopodobnie nie są efektem wtórnym. Tym samym możliwy jest więc scenariusz z równoległymi lub pierwotnymi zmianami w układzie noradrenergicznym, przyczyniającymi się do degeneracji układu dopaminowego, zgodnie z postawioną hipotezą. Nie jest to hipoteza nowa, ale, nie doczekała się jeszcze przekonujących dowodów eksperymentalnych. W badaniach opisanych w rozprawie we wspomnianym modelu z apoptozą neuronów noradrenergicznych stwierdzono pojawienie się markerów stanu zapalnego w układzie dopaminowym, co było zgodne w powyższym scenariuszem i uzasadniało kontynuację badań w obranym kierunku. W rozprawie w wielu miejscach zwracano uwagę na ograniczone możliwości wnioskowania na podstawie wyników uzyskanych w modelu TIF-IA^{DbhCre}, ze względu na nokaut genu w komórkach poza mózgiem i spowodowane nim efekty obwodowe prowadzące do śmierci młodych myszy. *Ciekawa jestem, czy objawy stanu zapalnego wystąpiły u tych myszy w innych częściach mózgu, poza układem dopaminowym, co by faktycznie wskazywało na efekty niespecyficzne.*

Pozostała część pracy poświęcona została projektowi, walidacji i wykorzystaniu nowego modelu, w którym planowano uzyskanie degeneracji specyficznemu neuronów noradrenergicznych, specyficznemu w miejscu sinawym i w określonym czasie. Taki model mógłby odpowiadać prodromalnej fazie choroby Parkinsona. Strategia nokautu *Rrn3* została wszechstronnie przemyślana i metodycznie przeprowadzona, z wszelkimi możliwymi etapami kontrolnymi. Doktorantka zdecydowała się stworzyć nowy system oparty na technice CRISPR/Cas9, w którym mutujący konstrukt DNA wprowadzany byłby stereotaktycznie do wybranego miejsca w mózgu myszy linii Cre w wektorze lentiwirusowym. Opracowany konstrukt zawierał gen Cas9 w układzie double-flxed inverted open reading frame zależnym od rekombinazy Cre oraz gRNA skierowany na badany gen, w tym przypadku *Rrn3*. Jest to oryginalne i narzędzie, w którym wykorzystano szereg ciekawych rozwiązań technicznych, znanych opracowanych już wcześniej, ale po raz pierwszy użytych razem. Zgadzam się z Doktorantką, że zastosowane przez nią podejście jest efektywniejsze od poprzednio opracowanego w laboratorium Fenga Zhanga, ponieważ umożliwia skorzystanie z licznych dostępnych myszy linii Cre bez konieczności czasochłonnych krzyżowań. Jestem więc przekonana, że opracowane wektory będą wykorzystywane poza macierzystym laboratorium. Potencjalnym problemem w tym systemie może być niska skuteczność wyciszania ekspresji docelowego genu: uzyskano spadek liczby neuronów w miejscu sinawym zaledwie o kilkanaście procent. W przypadku przeprowadzonych badań może to być zaletą (sytuacja bliższa fizjologicznej), ale w innych badaniach może stanowić poważną wadę. *Zastanawiam się, czy dobrym kierunkiem zwiększenia wydajności nokautu byłoby podanie kilku gRNA? Doktorantka podawała w testowych eksperymentach in vivo po dwa wektory z różnym gRNA, ale nie zamieściła wyników tych testów. Ciekawa jestem, czy jest to podejście obiecujące i czy nie warto rozważyć podawania kilku gRNA w tandemie na jednym wektorze.*

Doktorantka bardzo skromnie pisze o wynikach analiz w opracowanym modelu i wyciąga bardzo ostrożne wnioski, oceniając te badania jako wstępne. W moim odczuciu pozostaje nie do końca jasne, co właściwie stało się na poziomie komórkowym i molekularnym w miejscu sinawym. *Jak zinterpretować brak spadku poziomu ekspresji genów kodujących markery neuronalne *Map1b* i *Th*, skoro obserwowano obniżenie liczby neuronów? Czy możliwe jest, że w miejscu sinawym zaszły zmiany plastyczne*

kompensujące ubytek neuronów? Również nie jest jasne, jakie zmiany zaszły w prążkowiu. *Jak zinterpretować wzrosty poziomu metabolitu dopaminy i (wprawdzie statystycznie nieistotny) poziomu samej dopaminy?* To są kwestie do dalszych badań, wykraczających poza zakres badań w projekcie doktorskim. Najważniejsze są jednak wyniki uzyskane dla układu dopaminowego, będące mocną przesłanką, że zaburzenie noradrenergiczne są częścią patomechanizmu choroby Parkinsona, a nowy model jest świetnym modelem prodromalnej fazy zmian zwyrodnieniowych. Potwierdziły to zarówno badania proteomiczne, gdzie pokazano zmiany w poziomie kilkudziesięciu białek, w tym białek powiązanych z chorobami neurodegeneracyjnymi, jak i badania elektrofizjologiczne, i w końcu liczne testy behawioralne. Warto docenić, że przeprowadzono je u obu płci, pokazując jak różne mogą być efekty tych samych pierwotnych zaburzeń. U samic zaobserwowano drastycznie większą lęklivość w teście podniesionego labiryntu krzyżowego. Ponieważ samice nie wykazały lęklivości w teście jasnego i ciemnego pola, zastanawiam się, czy problemy w podniesionym labiryncie krzyżowym nie wynikają z mniejszej pewności motorycznej. U samców z kolei zaobserwowano niewątpliwe deficyty motoryczne.

Krótko podsumowując, ten ambitny projekt doktorski zakończył się dużym sukcesem. Po pierwsze opracowano oryginalny system komórkowo i czasowo-specyficznego edycji genomu w mózgu. Po drugie opracowano nowy model wczesnej fazy choroby Parkinsona do badania wpływu degeneracji neuronów noradrenergicznych, pod wieloma względami lepszy od wcześniejszych modeli genetycznych lub farmakologicznych. Po trzecie potwierdzono, że degeneracja w LC prowadzi do dysfunkcji w układzie dopaminowym, a więc może być częścią patomechanizmu choroby Parkinsona.

Sama rozprawa ma formę tradycyjną. Czytałam ją z przyjemnością i zainteresowaniem, bo jest napisana bardzo dobrze zarówno pod względem językowym i konstrukcyjnym, jak i merytorycznym, logicznym i doboru treści.

Rozprawę rozpoczyna *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, które jest bardzo dobrym wprowadzeniem w tematykę, ułatwiającym czytelnikowi natychmiastowe umiejscowienie badań w szerszym kontekście i zrozumienie ich koncepcji. Bardzo doceniam, że cel badań jest jasny od samego początku. W liczącym 21 stron *Wstępie* treści zostały dobrane do tematu badań i przedstawione jasno i ciekawie, co świadczy o

swobodzie poruszania się w obszarze badań. W opisie choroby Parkinsona skupiono się na zróżnicowaniu objawów i ścieżek rozwoju patologii oraz komórkowych, molekularnych i genetycznych mechanizmach progresji zwyrodnienia. Zwrócono uwagę na etapy poprzedzające degenerację układu dopaminowego i teorie rozwoju patologii w prodromalnej fazie choroby. Jest to ujęcie od razu pokazujące perspektywę prowadzonych badań. Następnie omówiono zwierzęce i komórkowe modele choroby Parkinsona, ich zalety i słabe strony. Tę część *Wstępu* także ukierunkowano na badania w projekcie doktorskim, ponieważ szczególnie dokładnie omówiono system CRISPR/Cas9 do edycji genów i jego wykorzystanie w tworzeniu genetycznych modeli choroby Parkinsona. Na koniec, powracając do mechanizmów wczesnych faz rozwoju choroby Parkinsona, przedstawiono hipotezy udziału interakcji między systemem noradrenergicznym i dopaminowym w patogenezie zaburzenia, co bezpośrednio prowadziło do postawienia celów pracy. Tekst *Wstępu* uzupełniło 9 czytelnich ilustracji i tabela. Bezpośrednio po *Wstępie* zamieszczono *Cele pracy*, poprzedzając je rzeczowym uzasadnieniem zasadności podjęcia badań oraz umieszczono graficzne przedstawienie koncepcji badań. Strona graficzna jest wyróżnikiem rozprawy pani Justyny Barut. Właściwie wystarczy zapoznać się z rycinami, żeby zrozumieć tło pracy i pomysły na badania.

Dział *Wyniki* poprzedzony jest tradycyjnie rozdziałem *Materiały i Metody* liczącym aż 48 stron, w którym przedstawiono modele badawcze i zastosowane techniki badawcze. Precyzyjnie opisano przebieg klonowań i walidacji wektorów, operacji stereotaktycznych, testów behawioralnych i rejestracji elektrofizjologicznych oraz opisano metody analizy białek i kwasów nukleinowych. W tym rozdziale znalazło się 21 rycin i 37 tabel.

W *Dyskusji* (25 stron tekstu i dwie ryciny) na początku odniesienie się do pierwszej części badań na modelu TIF-IA^{DbhCre}. Krytycznie odniesiono się do modelu i wskazano na jego ograniczenia. Następnie wyjaśniono przyczyny wyboru modelu z użyciem Cre-zależnego systemu CRISPR/Cas9 i stereotaktycznym podaniem konstruktów lentiwirusowego. Wszelkstronnie przedyskutowano zalety nowego modelu. *Zastanawiam się jednak, czy dobrą alternatywą nie byłoby stereotaktyczne podanie neurotoksyn w niskim stężeniu do miejsca sinawego, pominięte w Dyskusji.* Pod koniec omówiono kwestię wpływu degeneracji w miejscu sinawym na układ dopaminowy.

Rozprawę skonkludowano konkretnie i jasno w finalnym rozdziale *Podsumowanie i wnioski*.

Podsumowując, pracę Pani Justyny Barut oceniam bardzo wysoko. Jestem przekonana o szerokiej wiedzy Doktorantki i umiejętności samodzielnego i krytycznego myślenia. Przeprowadzona oryginalna praca badawcza poszerzyła wiedzę na temat choroby Parkinsona i dostarczyła nowych narzędzi do edycji genomu w komórkach mózgu i do badań wczesnej fazy neurodegeneracji. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim (określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – Dz.U. 2023, poz. 742) i stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN 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. Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy. Zachwyliła mnie wszechstronność metodyczna i konsekwentna koncentracja na osiągnięciu głównego celu oraz przyjazny czytelnikowi opis badań.