



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Macieja Stępkowskiego pt.
„Modyfikowane komórki LUHMES w badaniach mitochondrialnych implikacji choroby
Parkinsona: Analiza procesów dynamiki mitochondriów i efektów nadekspresji
mitochondrialnej fosfatazy PGAM5”**

Choroba Parkinsona jest poważnym problemem dla medycyny i opieki społecznej, bowiem dotyczy 1% osób w wieku powyżej 60 lat i 1,9% osób w wieku powyżej 80 lat. Biorąc pod uwagę starzenie się społeczeństw - wydłużanie się średniego czasu życia (o 1 rok co 4 lata w krajach Unii Europejskiej), problem ten staje się coraz bardziej istotny. Etiologia choroby nie została do tej pory wyjaśniona, ale badania zarówno dziedzicznej jak i chemicznie indukowanej postaci choroby Parkinsona (PD), a także wywołujących podobne objawy zatruc 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) i manganem wskazują na istotną rolę mitochondriów w etiologii PD. Badania zmian struktury i funkcji mitochondriów w komórkach osób dotkniętych chorobą Parkinsona i zrozumienie mechanizmów zmian mogących prowadzić do zaburzeń typowych dla choroby Parkinsona jest więc zagadnieniem bardzo aktualnym i istotnym.

Celem rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Stępkowskiego było "poszukiwanie nowych mechanizmów związanych z rolą mitochondriów w etiologii choroby Parkinsona". Cel ten był realizowany poprzez określenie zmian dynamiki mitochondriów w komórkach LUHMES traktowanych modelowymi neurotoksynami oraz zbadanie wpływu zmian ekspresji mitochondrialnej fosfatazy PGAM5 na ekspresję genów związanych z etiologia choroby Parkinsona w komórkach LUHMES traktowanych 6-hydroksydopaminą.

Rozprawa jest zbiorem trzech artykułów opublikowanych w języku angielskim w dobrych czasopismach naukowych, opatrzonym obszernym 37-stronicowym omówieniem w języku polskim ("Autoreferatem pracy doktorskiej"). Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich publikacji. Taka forma rozprawy doktorskiej jest zgodna z wymogami art. 13 p. 2 znowelizowanej *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*, który mówi, że "Rozprawa doktorska może mieć formę [...] spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki".

Mam uwagę w kwestii formalnej. Dziwi mnie nieco jeden z punktów Oświadczenia odnośnie zarządzenia Rektora IJK nr 33/2016: "pracę napisałem samodzielnie". Nie mam wątpliwości, że Doktorant samodzielnie napisał Autoreferat rozprawy, jednak istotą rozprawy są publikacje, a te są współautorskie. O dominującej roli Doktoranta w powstaniu trzeciej publikacji wchodzącej w skład cyklu świadczą zawarte w artykule oświadczenia o wkładzie współautorów (*Authors contributions*) - w 2017 r. redakcja czasopisma *Cellular and Molecular Neurobiology* wymagała już takich oświadczeń - Doktorant był autorem koncepcji pracy, wykonał główne doświadczenia,

analizował wyniki i przygotował manuskrypt - a więc w tym przypadku mamy dowód, że Oświadczenie podpisane jest zgodne z prawdą. Zapewne było tak także w dwu pozostałych przypadkach.

Uwaga powyższa nie ma na celu jakiegokolwiek dezawuacji wkładu Doktoranta w powstanie rozprawy, ale wskazanie na niespójność wymogów dotyczących tej formy rozprawy doktorskiej, która w moim przekonaniu winna stać się podstawową formą rozprawy doktorskiej w naukach przyrodniczych. Warto podkreślić, że Doktorant jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym wszystkich publikacji, co jednoznacznie wskazuje na Jego istotny wkład w powstanie tych prac.

Pierwszy z trzech artykułów wchodzących w skład rozprawy jest artykułem przedstawiającym hipotezę naukową (nie znajduję lepszego sformułowania będącego odpowiednikiem angielskiego terminu *hypothesis article*). Świetnie napisany 10-stronicowy artykuł przedstawia interakcje molekularne pomiędzy szlakiem sygnałowym NRF2/KEAP1, autofagią i apoptozą i przedstawia m. in. hipotezę postulującą rolę mitochondrialnej fosfatazy serynowo-treoninowej PGAM5 w regulacji szlaku sygnałowego NRF2/KEAP1 i jego znaczenia w etiologii choroby Parkinsona. W myśl tej hipotezy, białko PGAM5 jest ogniwem łączącym szlak sygnałowy NRF2, i regulację morfogenezy mitochondriów oraz apoptozę. To białko zewnętrznej błony mitochondrialnej może wiązać białko KEAP1, kierować je do błony mitochondrium i aktywować MAPK kinazę ASK1, odgrywającą kluczową rolę w indukcji apoptozy. Mam duże uznanie dla autorów tego artykułu - Doktoranta i Jego Promotora za znakomitą znajomość bieżącego piśmiennictwa i twórczą analizę problematyki, które pozwoliły na sformułowanie hipotezy nowej dla tego gorącego pola badań i świetne jej przedstawienie, umożliwiające przyjęcie pracy przez czasopismo *Free Radical Biology and Medicine* (2011; współczynnik wpływu - *impact factor* = 5,606). W moim przekonaniu opublikowanie *hypothesis article* w tym czasopiśmie jest nawet trudniejsze niż ulokowanie tam pracy doświadczalnej i jest świadectwem wysokiej klasy artykułu.

Wiadomo, że nokaut genu *Pgam5* u myszy powoduje zaburzenia ruchu przypominające objawy choroby Parkinsona (Lu et al., *Nature Commun.* 5, 4930 (2014)). Postulowana rola fosfatazy PGAM5 w mitofagii i apoptozie prowadzącej do choroby Parkinsona była bodźcem do przeprowadzenia badań podsumowanych w drugiej publikacji wchodzącej w skład rozprawy, poświęconej efektom nadekspresji białka PGAM5 w komórkach LUHMES (*Cellular and Molecular Neurobiology* 2015; *IF* = 2,939). Doktorant transfekował komórki sekwencją kodującą długą izoformę białka PGAM5 i badał poziom ekspresji 84 genów mających bezpośredni lub pośredni związek z PD stosując RT-PCR w tych komórkach oraz po poddaniu komórek działaniu 100 μ M 6-hydroksydopaminy. Wyniki tych badań wskazują na brak wpływu nadekspresji białka PGAM5 na poziom ekspresji badanych genów, a także na zmiany poziomu ekspresji 44 spośród tych genów indukowane przez 6-hydroksydopaminę. Interesujące są efekty samej 6-hydroksydopaminy na poziom ekspresji badanych genów, zwłaszcza zmiany w poziomach ekspresji genów, których białkowe produkty są zaangażowane w regulacje procesów sygnalizacji synaptycznej, metabolizm dopaminy i ponad 5-krotny wzrost poziomu ekspresji genu kodującego peptyd S100B, wytwarzany w zwiększonych ilościach przez komórki glejowe w stanie zapalnym związanym z PD. Obserwowany brak wpływu nadekspresji białka PGAM5 na poziom ekspresji badanych genów w moim przekonaniu nie wyklucza jego roli w etiogenezie PD; znane są

przykłady białek, obniżenie poziomu lub brak których powoduje drastyczne efekty, a których nadekspresja powoduje niewielkie efekty lub brak efektów.

Trzecia praca wchodząca w skład cyklu (*Cellular and Molecular Neurobiology 2016*) poświęcona jest analizie morfologii i dynamiki mitochondriów w komórkach utworzonej przez Autorów stabilnej linii mitoLUHMES i pokazuje, że ta linia może być nowym, użytecznym narzędziem do badania wpływu różnych czynników na strukturę i funkcję mitochondriów. Warto wspomnieć na początku, że wyjściowa dla tej linii immortalizowana linia komórek neuroblastycznych LUHMES stanowi świetny, nowoczesny model badawczy. Komórki te mogą różnicować się do dojrzałych neuronów dopaminergicznych lub cholinergicznych po dodaniu do medium tetracykliny i usunięciu czynnika wzrostu fibroblastów (FGF). Komórki te, w przeciwieństwie do komórek nowotworowych wywodzących się z układu nerwowego, ekspresują większość białek związanych z procesami neurodegeneracji, m. in. α -synukleinę i białko prekursorowe amyloidu APP965, nadają się więc do badania procesów związanych z modelami chorób neurodegeneracyjnych. Wiadomo, że mitochondria grają kluczową rolę w rozwoju tych chorób, celowa była więc konstrukcja linii mitoLUHMES, wywodzącej się z linii LUHMES, umożliwiająca łatwą wizualizację mitochondriów. Okazało się to możliwe poprzez transdukcję lentowirusową komórek cząstkami zawierającymi sekwencję białkiem fluorescencyjnym DsRed2 z sekwencją importu do mitochondrium (mtDsRed2) pod kontrolą słabego promotora genu kodującego ubikwitynę 3. Dodatkowo, do komórek tych wprowadzono drugi wektor, zawierający sekwencję GFP pod kontrolą silnego promotora czynnika elongacji translacji EF1A. Ekspresja białek fluorescencyjnych pozwoliła na lokalizację komórek i obserwację mitochondriów w pojedynczych neurytach w bardzo gęstej hodowli, co zostało udokumentowane w dostępnym w internecie filmie. Istotne jest, morfologia mitochondriów zawierających białko DsRed2 nie uległa zmianie w stosunku do mitochondriów linii LUHMES i że nawet półgodzinna obserwacja mikroskopowa nie powodowała efektu fototoksyczności. Interesujące byłoby oszacowanie potencjału mitochondrialnego w komórkach LUHMES i mitoLUHMES, choć nie byłoby to łatwe za pomocą sond JC-1 czy JC-10, ze względu na pokrywanie się widm emisji (582 nm dla DsRed2, ok. 590 dla agregatów JC-1 i JC-10). Analiza ruchu mitochondriów wykazała, że fuzje mitochondriów są częstsze między mitochondriami poruszającymi się a mitochondriami nie będącymi w ruchu niż w ramach puli mitochondriów poruszających się. Ciekawa była też rejestracja szybkiego zawracania mitochondriów od ruchu anterogradalnego do ruchu retrogradalnego.

Doktorant wykorzystał ten model do badania zmian w strukturze i funkcji mitochondriów w komórkowych modelach choroby Parkinsona, indukowanych działaniem 6-hydroksydopaminy i protonoforu karbonylocyjanu-3-chlorofenylo-hydrazonu (CCCP), rozprzegającego gradient protonowy wewnętrznej błony mitochondrialnej. Stwierdził, że 6-hydroksydopamina (100 μ M) i CCCP (10 μ M) powodowały skrócenie mitochondriów, co może wiązać się z procesem mitofagii. 6-Hydroksydopamina zmniejszała częstotliwość ruchu mitochondriów, zaś CCCP obniżał szybkość ich ruchu. Obserwacje te są cenne dla badaczy choroby Parkinsona, główną wartość pracy upatruję jednak w stworzeniu linii komórkowej umożliwiającej obserwację mitochondriów w komórkach neuronalnych.

Prace składające się na rozprawę doktorską przeszły ocenę recenzentów powoływanych przez redakcje czasopism, nie mam więc uwag do treści tych prac z wyjątkiem marginalnej. We

Wstępie do drugiej z prac składających się na rozprawę Doktorant określa białko PGAM5 jako fosfogliceromutazę 5, podczas gdy w bazie danych genomu ludzkiego białko to określane jest jako członek 5 rodziny PGAM (PGAM Family Member 5, Mitochondrial Serine/Threonine Protein Phosphatase). Białko to istotnie zaliczane jest do rodziny fosfogliceromutaz, jednak nie ma aktywności enzymatycznej fosfogliceromutazy, ma natomiast aktywność serynowej/treoninowej fosfatazy białkowej.

Rozprawę doktorską mgr Tomasza Macieja Stępkowskiego oceniam bardzo wysoko ze względu na ważki i aktualny problem podjęty w badaniach, bogatą i zaawansowaną metodykę, nakład pracy, oryginalność wyników i ich publikację w dobrych czasopismach z listy JCR.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Tomasza Macieja Stępkowskiego spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Tomasza Macieja Stępkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sądzę też, że ze względu na wymienione walory rozprawa zasługuje na wyróżnienie, o które wnioskuję.

Łódź, dnia 21 listopada 2017


Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz