

**Recenzja****pracy doktorskiej Darii Grobys****pt. „Udział kanału VDAC w patogenezie choroby Huntingtona w oparciu o badania modeli komórkowych”**

Choroba Huntingtona (HD) należy do grupy neurodegeneracyjnych, uwarunkowanych genetycznie, dziedzicznych chorób mózgu. W przebiegu choroby Huntingtona dochodzi do narastającej w czasie utraty neuronów, głównie w obszarze prążkowie i głębszych warstw kory mózgowej. Zaliczana jest ona do chorób związanych z ekspansją reszt glutaminowych. Przyczyną choroby jest mutacja w pierwszym egzonie genu *HTT* kodującym białko huntingtynę (Htt). Mutacja ta polega na ekspansji trójki nukleotydowej CAG (kodon odpowiadający glutaminie), co powoduje pojawienie się długiego ciągu glutamin w sekwencji aminokwasowej huntingtyny. Jeśli powtórzeń trójki CAG jest więcej niż 35, mutacja staje się niestabilna i przy kolejnych podziałach komórkowych liczba powtórzeń się zwiększa. Do tej pory nie udało się opracować skutecznej strategii terapeutycznej, która opóźniałaby lub istotnie spowalniała postęp choroby. Huntingtyna jest białkiem charakterystycznym dla kręgowców, zlokalizowanym głównie w cytoplazmie, wykazującym aktywność antyapoptotyczną, zdolność oddziaływania z wieloma białkami oraz uczestniczącym w transporcie pęcherzyków w obrębie komórki i czynników transkrypcyjnych między cytoplazmą i jądrem komórkowym. Uważa się, że przyczyną pojawienia się objawów chorobowych może być zarówno utrata funkcji przez Htt jak i pojawienie się nowych funkcji zmutowanej huntingtyny (mHtt). Wiadomo jednak, że neurotoksyczność mHtt jest powiązana z aktywnością mitochondriów. Badania dotyczące roli dysfunkcji mitochondriów w patogenezie choroby Huntingtona prowadzone są od wielu lat. Nie ulega wątpliwości, iż prawidłowe funkcjonowanie neuronów wymaga dużego zasilania energetycznego,



realizowanego przez mitochondria. Prawidłowo działające mitochondria są gwarancją właściwego funkcjonowania neuronów. Badania na zwierzętach pozwoliły zidentyfikować zmiany w aktywności mitochondriów, które towarzyszą patogenezie choroby Huntingtona: należą do nich oddziaływanie mHtt z zewnętrzną błoną mitochondrialną, zmniejszenie syntezy ATP, zmiana wrażliwości na jony wapnia i zwiększona podatność na permabilizację błon mitochondrialnych (MMP). Jednak mechanizm molekularny pojawiających się zmian jest nadal dyskutowany. Prawidłowo działający łańcuch oddechowy jest kluczowy dla metabolicznych funkcji mitochondriów, a jego właściwe funkcjonowanie wymaga prawidłowo przebiegającego importu białka i transportu metabolitów. Jednym z podstawowych narzędzi wymiany metabolitów między mitochondriami i cytoplazmą jest kanał VDAC. W mitochondriach ludzkich występują trzy izoformy białka VDAC: VDAC1, VDAC2 i VDAC3. Białko to tworzy w zewnętrznej błonie mitochondrialnej zależny od potencjału kanał anionowy którego działanie ma kluczowe znaczenie dla wielu procesów komórkowych, w tym dostępu ATP, homeostazy wapniowej i aktywacji apoptozy. Od dawna wspomina się o znaczeniu VDAC w przebiegu wielu chorób, w tym chorób neurodegeneracyjnych.

Badania prowadzone przez mgr Darię Grobys skupiły się wokół związanego z kanałem VDAC aspektu mechanizmu patogenezy choroby Huntingtona. Przedmiotem pracy doktorskiej mgr Grobys było wyjaśnienie czy białko kanałowe VDAC, kluczowy regulator funkcji mitochondrialnych, może oddziaływać z huntingtyną i jej zmutowaną formą, co wskazałoby na jego udział w przebiegu HD. Żeby osiągnąć zamierzony cel doktorantka sformułowała 6 zadań badawczych obejmujących: skonstruowanie nowego modelu HD w drożdżach *Sacharomyces cerevisiae*, prezentującego różne warianty indukowanej ekspresji Htt i mHtt, w obecności drożdżowego białka yVDAC oraz trzech izoform ludzkiego białka VDAC (hVDAC1-hVDAC3), analizę wpływu ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne drożdżowego modelu HD, z uwzględnieniem stresu temperaturowego oraz wykorzystanie szczurzego modelu HD (komórki PC12-HD-Q23 i PC12-HD-Q74) do badania wpływu ekspresji Htt/mHtt na aktywność kanałową białka VDAC i poziom ekspresji jego izoform.



Doktorantka skonstruowała model HD w oparciu o 19 szczepów drożdży *S. cerevisiae* M3 (szczep dziki), Δ por1T4 (mutant delecyjny pozbawiony genu POR1), wykorzystując ponadto konstrukty YIP351Q25 i YIP351Q103 (wprowadzające sekwencje kodujące, odpowiednio, Htt i mHtt) oraz pYX212hVDAC1-3 (wprowadzające sekwencje ludzkich izoform VDAC). Model zawiera także dwa markery selekcyjne *LEU2* oraz *URA3*. Mgr Grobys uzyskała różne warianty indukowanej ekspresji natywnej i zmutowanej wersji huntingtyny w obecności lub przy braku funkcjonalnego drożdżowego kanału VDAC (yVDAC1) oraz 3 izoform ludzkiego białka VDAC (hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3), jak i markera auktotroficznego *LEU2*.

Wykorzystując możliwość swobodnego manipulowania odpowiednimi konstruktami, doktorantka mogła wpływać na warunki eksperymentu analizując przeżywalność komórek drożdżowych oraz funkcje bioenergetyczne mitochondriów w tych komórkach w warunkach normalnego wzrostu drożdży (28°C) oraz stresu temperaturowego (37°C) w obecności wszystkich konstruktów, bądź różnej ich aranżacji, co bardzo zwiększyło możliwość uzyskania ciekawych wyników i oryginalnych wniosków.

Mgr Grobys wykazała, że ekspresja Htt i mHtt połączona z ekspresją natywnego drożdżowego yVDAC1 w warunkach natywnych (28°C) oraz szoku temperaturowego tj. 37°C, nie wywiera wpływu na parametry bioenergetyczne komórek, natomiast w przypadku wyłączenia ekspresji yVDAC i aktywacji ekspresji hVDAC1 obserwowana jest wyraźna zmiana analizowanych parametrów bioenergetycznych, której towarzyszy zmiana w przeżywalności komórek. Doktorantka zaobserwowała także, że mHtt, ale nie Htt, zmienia rozkład przewodnictwa kanałów tworzonych przez izoformy szczurzego białka VDAC.



Innym ważnym odkryciem doktorantki było wykazanie, że cytotoksyczność mHtt jest związana z wysokim poziomem ekspresji VDAC1, najczęściej występującego wariantu białka VDAC. Wynik ten został potwierdzony w komórkach szczurzych PC12. Natomiast białka VDAC 2 i VDAC3 nie wywołują podobnych efektów. Pewne metaboliczne niedoskonałości układu drożdżowego (np. obecność galaktozy w pożywce), które doktorantka potrafiła zdefiniować nie udaremniły uzyskania interesujących wyników. Należy jednak zaznaczyć, że wyniki uzyskane dla obu modeli HD są w dużym stopniu spójne.

Mgr Grobys wykazała się umiejętnością wykorzystania skomplikowanej metodologii pracując na dwóch różnych systemach komórkowych. Warto podkreślić, że doktorantka w swoich badaniach łączyła różnorodne techniki badawcze: biologię molekularną z fizjologią komórki, jak np. zastosowanie pomiarów oksygraficznych, które umożliwiły jej wyznaczenie szybkości zużycia tlenu w wybranych stanach oddechowych oraz stanu sprzężenia energetycznego mitochondriów w badanych komórkach drożdży. Mgr Grobys badała także przewodnictwo kanałowe białka VDAC w sztucznych błonach lipidowych. Zatem, opisane w pracy doktorskiej wyniki mgr Grobys uzyskała dzięki wieloaspektowym eksperymentom, a ich istotność statystyczna została przez nią zweryfikowana.

Układ pracy i jej podział na rozdziały są poprawne i zgodne z ogólnie przyjętymi zasadami dla prac doktorskich.

Rozprawę rozpoczyna Wstęp napisany przejrzystie i zrozumiale na 36 stronach. Mgr Grobys opatrzyła tę część opracowania przemyślanymi rysunkami ułatwiającymi zrozumienie tekstu. Część Materiały i Metody, w której autorka dokładnie opisuje wszystkie wykorzystane w pracy procedury eksperymentalne, jest napisany w sposób klarowny, świadczący o jej dużej wiedzy w zakresie prowadzonych eksperymentów. Wyniki badań przedstawione na 38 stronach są opisane szczegółowo i opatrzone dużą ilością rysunków oraz tabel, które ułatwiają podążanie za tokiem myślenia autorki. Doktorantka wnikliwie podeszła do wielostronnego analizowania swojego modelu HD w drożdżach posługując się przemyślaną grupą badań kontrolnych służących weryfikacji uzyskanych wyników, o czym wspominałam wcześniej. Część Dyskusja oceniam wysoko za poważną analizę badanego tematu



i wykorzystanie najnowszych publikacji do interpretacji i omówienia uzyskanych wyników na podstawie, których mgr Grobys sformułowała wnioski końcowe podsumowujące najważniejsze osiągnięcia niniejszej pracy doktorskiej.

Reasumując, wyniki badań uzyskane przez mgr Darię Grobys jednoznacznie wskazują, że uzyskała ona funkcjonalny model badawczy choroby Huntingtona w drożdżach *Sacharomyces cerevisiae* z funkcjonalną ekspresją kluczowych dla jej badań białek. Doktorantka rozszerzyła zakres eksperymentów o drugi model zbudowany w oparciu o komórki szczurze, który pomógł jej zweryfikować i rozszerzyć zakres prowadzonych badań.

Jednak ze względów formalnych recenzent musi zaznaczyć, że mgr Grobys nie ustrzegła się drobnych błędów redakcyjnych, stylistycznych i nieścisłości terminologicznych. Na przykład nie zgadzam się żeby bufony nazywać płynami, jeśli w ich składzie znajduje się składnik określający pH.

Uważam, że doktorantka za słabo podkreśliła w podsumowaniu wyników wątek bioenergetyczny pracy badawczej, który bardzo podnosi poziom uzyskanych wyników. Uchybienia te nie mają jednak większego znaczenia dla oceny formalnej i merytorycznej pracy przygotowanej przez mgr Grobys.

Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki pozwalają stwierdzić, że doktorantka stworzyła dobrze udokumentowany model HD w układzie drożdżowym pozwalający na prowadzenie badań nad wpływem Htt i mHtt na funkcjonowanie mitochondriów, w różnych kluczowych dla nich aspektach, posługując się skomplikowaną technicznie metodologią, uzyskując wyniki statystycznie istotne, które są już częściowo opublikowano w pracy o zasięgu międzynarodowym.



Obowiązkiem recenzenta jest zadanie kilku pytań:

1. Chciałam prosić o wyjaśnienie dlaczego zmutowana huntingtyna nie oddziałuje z białkiem yVDAC w drożdżach oraz w jaki sposób mitochondria drożdżowe kompensują brak yVDAC.
2. W opracowaniu literaturowym mgr Grobys przedstawiła w tabelach komórkowe i zwierzęce modele badawcze choroby Huntingtona. W trakcie realizacji pracy doktorskiej były stosowane dwa modele badawcze (drożdżowy i ssaczy). W dyskusji pracy doktorskiej zabrakło mi szerszej polemiki na temat tego co wyróżnia drożdżowy model na tle istniejących lub wybranych modeli HD. W związku z tym proszę o wypowiedź na ten temat.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Darii Grobys zawiera cenne naukowe wyniki i stanowi wartościowy wkład w badania podłoża molekularnego patogenezy choroby Huntingtona. Zatem, rozprawa doktorska mgr Darii Grobys odpowiada warunkom Ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016, poz. 882). Recenzent chciałby także podkreślić, że dorobek naukowy mgr Darii Grobys uzasadnia nadanie jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych. Na dorobek ten składają się trzy prace opublikowane w 2016 roku w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (Front Oncol., Eur J Cell Biol. Mitochondrion), w tym jedna bezpośrednio dotycząca tematu pracy doktorskiej, w których doktorantka jest drugim autorem. W związku z tym, recenzent wnosi o dopuszczenie mgr Darii Grobys do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość naukową, potwierdzoną publikacjami, recenzent wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Darii Grobys.