



**nencki institute**  
of experimental biology

Prof. dr hab. Małgorzata Kossut  
Laboratorium Neuroplastyczności  
Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN  
ul. Pasteura 3, Warszawa 02-093

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR BARTOSZA DOKTORA  
„ROLA WYBRANYCH BIAŁEK MITOCHNDRIALNYCH W CHOROBI  
PARKINSONA - BADANIA NA MODELU DROSPHILA MELANOGASTER”

Pan mgr Bartosz Doktor przedstawia do oceny rozprawę doktorską składającą się z trzech publikacji eksperymentalnych w języku angielskim i obszernego wprowadzenia po polsku. Pisma, w których ukazały się publikacje to *Acta Neurobiologiae Experimentalis* (IF 1,286), *BMC Neuroscience* (IF 2,665) i *Frontiers in Neuroscience* (IF 3,656). Prace są wieloautorskie i współautorzy złożyli stosowne oświadczenia.

Badania dotyczyły mechanizmów działania genów *mul1*, *parkin* i *pink1*, kodujących odpowiednio mitochondrialną ligazę ubikwityny, cytoplazmatyczną ligazę ubikwityny i mitochondrialną kinazę serynowo/treoninową. Geny te są związane z chorobą Parkinsona u ludzi, a ich mutacje powodują również objawy podobne do choroby Parkinsona (zaburzenia motoryki, obumieranie neuronów dopaminergicznych) u *Drosophila*. Ponadto zbadano zmiany morfologiczne i synaptyczne w modelu choroby Parkinsona wywołanej neurotoksyną rotenonem. Szczególną uwagę poświęcił doktorant zaburzeniom cyklu dobowego i wpływie badanych mutacji na molekularny mechanizm zegara okołodobowego, ponieważ zakładał, że zaburzenia

snu, występujące u parkinsoników wynikają z nieprawidłowo funkcjonującego zegara dobowego.

Pierwsza publikacja pt. „Effects of MUL1 and PARKIN on the circadian clock, brain and behaviour in *Drosophila* Parkinson's disease models”, była opublikowana w BMC Neuroscience. Opisano w niej wzrost poziomu wolnych rodników I spadek poziomu dyzmutazy nadtlenkowej w mózgach obu mutantów, będący prawdopodobnie skutkiem uszkodzenia mitochondriów. Obie mutacje zakłócały normalną ekspresję genów zegara okołodobowego. Silniejsze zaburzenia niż w ekspresji mRNA genu per wystąpiło w poziomie białka PER, zapewne z powodu nienormalnej aktywności czynników translacyjnych, na które może wpływać poziom wolnych rodników. Także obie mutacje powodowały skrócenie długości życia i redukcję czasu snu. Wyniki badania immunocytochemicznego przy pomocy przeciwciał na ATG5, białka związanego z autofagią oraz neuropeptydu PDF w neuronach bocznych brzusznych o dużym ciele komórkowym pokazały bardzo duży spadek poziomu ATG5 u mutantów mul1 i mniejszy, nie osiągający istotności statystycznej w mutancie park. Wskazuje to na zakłócenie procesu autofagii.

Druga publikacja, która ukazała się w Frontiers of Neuroscience to „Overexpression of mitochondrial ligases reverses Rotenone-induced effects in a *Drosophila* model of Parkinson's disease”. W pracy tej znaleziono efekt neuroprotekcyny nadekspresji genów mul1 i park, przejawiający się zmniejszeniem degeneracji neuronów dopaminergicznych i normalną aktywnością lokomotoryczną. Nadekspresja obu genów zahamowała zmiany w obrębie zony aktywnej synaps i zapobiegła zmianie kształtu pęcherzyków synaptycznych.

Trzecia publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej to opublikowana w Acta Neurobiologiae Experimentalis praca pt. „Effects of PINK1 mutation on synapses and behavior in the brain of *Drosophila melanogaster*”. Znaleziono w niej inne efekty behawioralne, niż w przypadku genów park i mul1, aktywność motoryczna zwierząt była obniżona a czas snu był zredukowany. Nie przeprowadzono w tej pracy badań wpływu mutacji na ekspresję genów zegara okołodobowego, natomiast zbadano poziom wybranych białek presynaptycznych za pomocą pomiaru immunofluorescencji. Większość z nich miała obniżony poziom w mózgu. Zaobserwowano zmiany dobowego rytmu liczby mitochondriów w interneuronach L2 struktury Lamina (oszacowanie za pomocą pomiaru immunofluorescencji). Ich

najwyższa liczba była zaobserwowana w ciągu dnia, odwrotnie niż w przypadku synaps tetradycznych w tej samej strukturze. Synaps tych było mniej i były uszkodzone. Lamina nie jest co prawda strukturą ruchową, ale autorzy przypuszczają, że w innych obszarach mózgu *Drosophila* efekty synaptyczne są takie same.

Wprowadzenie jest napisane jest niestarannie. Jest w nim wiele nieścisłych sformułowań, np. "badania potwierdzają aktywację mikrogleju i astrocytów w uszkodzonych komórkach dopaminowych" lub "synapsy glutaminergiczne". Są też sformułowania nieprawdziwe, jak "w warstwie V kory ruchowej dochodzi do znaczącej eliminacji dendrytów (w cytowanej publikacji chodzi o kolce dendrytyczne) lub "LTP i LTD w korze ruchowej jest silnie zredukowane, co może być przyczyną niefunkcyjnych receptorów dopaminowych". W rozdziale o plastyczności synaptycznej cytowanie pracy Hughes 1958 jest niewłaściwe, należy tu przytoczyć pracę Bliss i Lomo, opisującą po raz pierwszy długotrwałe wzmocnienie synaptyczne. Nie będę wymieniała niezręczności językowych; jest ich bardzo dużo. A przede wszystkim brakuje uzasadnienia wyboru modelu *Drosophila* do przeprowadzonych badań. Brakuje też dyskusji wszystkich trzech prac razem i ogólnych konkluzji rozbudowanych bardziej niż jedno zdanie.

Podsumowując – doktorant zmierzył się z niełatwym tematem. W serii interesujących doświadczeń pokazał, jak mutacje związane z dysfunkcją mitochondriów i chorobą Parkinsona wpływają na cykl aktywności okołodobowej *Drosophila*, sterujące nim geny oraz strukturę synaps. Doktorant przekonuje, że te zaburzenia są skutkiem upośledzonej autofagii. Ponadto udało mu się pokazać, że nadekspresja dwóch badanych genów zapobiega objawom w modelu choroby Parkinsona wywołanym pestycydem. Otrzymane przez doktoranta wyniki są istotnym uzupełnieniem wiedzy o mechanizmach molekularnych rozwoju choroby Parkinsona.

Rozprawa mgr Bartosza Doktora zawiera bogaty i dobrze opisany materiał eksperymentalny. Rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, oz.595, z późn.zm.). Wnioskuje

zatem o dopuszczenie mgr Bartosza Doktora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Kossut

*M. Kossut*

Warszawa, 20.08.2019