

OCENA

rozprawy doktorskiej lek. Łukasza Milanowskiego pt. „Poszukiwanie nowych zmienności genetycznych u pacjentów z rodzinnymi parkinsonizmami w populacji polskiej” wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. Dariusza Kozłorowskiego w Klinice Neurologii, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, część pracy doktorskiej wykonano w ramach Stypendium im. Wilhelminy Iwanowskiej, Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej PPN/IWA/2018/1/00006/U/00001/01 (pobyt doktoranta w Mayo Clinic, Jacksonville, FL USA) oraz grantu Narodowego Centrum Nauki MINIATURA 2017/01/X/NZ4/01450.

Choroba Parkinsona (ChP) jest przewlekłą chorobą układu nerwowego, zaliczaną do schorzeń neurodegeneracyjnych. Pierwotnie, patogenезę objawów klinicznych choroby Parkinsona wiązano z wybiórczym uszkodzeniem neuronów dopaminowych, lokalizujących się głównie w obrębie części zbitej istoty czarnej mózgu, w chwili obecnej wiadomo, że proces patologiczny jest zdecydowanie bardziej rozległy. Istotą procesu neurodegeneracji jest utrata określonej populacji neuronów, często przebiegająca z nagromadzeniem patologicznych form białek. Powstawanie wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowych wtrętów może być wynikiem nieprawidłowej interakcji typu białko – białko, zaburzonego procesu potranslacyjnej modyfikacji białka lub dysregulacji systemu ubikwityno-proteosomalnego (UPS). Pojęcie proteinopatii, które z całą pewnością odnosi się również do ChP, wskazuje na kluczową rolę nieprawidłowych form białek w powstawaniu i szerzeniu się procesu uszkadzającego neurony. Opisane ogniwo patogenetyczne jest jednak wspólne dla wielu chorób neurodegeneracyjnych, co skłania do poszukiwania czynnika inicjującego nieprawidłowości opisywane w zakresie ośrodkowego układu nerwowego oraz w tkankach obwodowych. Patofizjologiczne mechanizmy leżące u podłoża choroby Parkinsona są złożone i mimo osiągnięć genetyki i biochemii dotychczas nie w pełni poznane. Obecnie przyjmuje się, że za patogenезę ChP może odpowiadać złożona interakcja czynników genetycznych i środowiskowych, opisywana hipotezą tzw. podwójnego trafienia. Zakłada ona, że do rozwoju ChP dochodzi u pacjenta będącego nosicielem wrażliwego genu i jednocześnie narażonego na działanie specyficznej toksyny środowiskowej. Znaczenie czynników genetycznych w rozwoju choroby Parkinsona jest obecnie niepodważalne. Przeprowadzone badania epidemiologiczne oraz obserwacje bliźniąt jedno- i dwujajowych wskazują, że oprócz wieku, dodatni wywiad rodzinny jest obecnie najważniejszym czynnikiem potwierdzającym zwiększone ryzyko zachorowania na ChP. Większość przypadków ChP jest sporadyczna, a jedynie 15% to postaci rodzinne, w powstawaniu których uwzględnia się zarówno te potwierdzone, jak i dotychczas jeszcze nieopisane predyspozycje genetyczne. W przypadku pacjentów, u których objawy choroby ujawniają się przed 50

rokiem życia, istotnie częściej udaje się potwierdzić znaczenie czynników genetycznych, obecnie w bazie danych OMIM znajdują się 23 geny, powiązane z monogenicznymi postaciami choroby, chociaż na podstawie wyników badania GWAS opublikowanego w 2020 roku ryzyko ChP powiązano aż z 90 loci genowymi. Częstość występowania choroby Parkinsona różni się w różnych grupach etnicznych, co może stwarzać pewne trudności w ocenie predyspozycji genetycznych w krajach zróżnicowanych etnicznie. Ze względu na jednorodność etniczną Polski, populacja polska może być uznana za dobre miejsce do poszukiwania predyspozycji genetycznych w chorobie Parkinsona.

W oparciu o powyższe przesłanki Doktorant sformułował cel pracy doktorskiej, który dotyczył oceny zmienności genetycznych związanych z parkinsonizmem w populacji polskiej. O znaczeniu podjętej tematyki badawczej świadczy fakt przyznania funduszy zewnętrznych na realizację niektórych zadań badawczych tzn. Stypendium im. Wilhelminy Iwanowskiej, Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej PPN/IWA/2018/1/00006/U/00001/01 oraz grantu Narodowego Centrum Nauki MINIATURA 2017/01/X/NZ4/01450. Realizacja powyższych zadań badawczych umożliwiła publikację wyników w renomowanych czasopismach takich jak Polish Journal of Neurology and Neurosurgery, Journal of Clinical Neuroscience i Parkinsonism and Related Disorders.

Praca jest napisana w sposób przejrzysty. Jej podstawę stanowią cztery artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach: 1. **Genetics of Parkinson's disease in the Polish population.** (Milanowski Ł, Ross OA, Friedman A, Hoffman-Zacharska D, Gorka-Skoczylas P, Jurek M, et al.), Neurol Neurochir Pol. 2021. Vol 55. 2 (IF=1,025). 2. **The matter of significance—Has the p.(Glu121Lys) variant of TOR1A gene a pathogenic role in dystonia or Parkinson disease?** (Milanowski Ł, Hoffman-Zacharska D, Geremek M, Friedman A, Figura M, Koziorowski D.) Journal of Clinical Neuroscience; 2020;72:501-3 (IF=1,76). 3. **Cognitive and behavioral profile of Perry syndrome in two families** (Milanowski Ł, Sitek EJ, Dulski J, Cerquera-Cleves C, Gomez JD, Brockhuis B, et al.), Parkinsonism & Related Disorders. 2020;77:114-20 (IF=3,926). 4. **Frequency of Mutations in PRKN, PINK1, and DJ1 in Patients With Early-Onset Parkinson Disease From Neighboring Countries in Central Europe** (Milanowski LM, Lindemann JA, Hoffman-Zacharska D, Soto-Beasley AI, Barcikowska M, Boczarska-Jedynak M, et al.) Parkinsonism & Related Disorders. 2021;86:48-51 (IF=3,926). Sumaryczny współczynnik oddziaływania powyższych publikacji na dzień złożenia pracy doktorskiej wynosił 10,637 i przekraczał wymagania stawiane w postępowaniu o nadanie stopnia doktora. Na uwagę zasługuje fakt, że we wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, co wskazuje na jego wiodącą rolę w ich powstaniu, potwierdzone w oświadczeniach pozostałych współautorów publikacji.

Do oceny Doktorant przedstawił cykl publikacji oraz ich omówienie, obejmujące następujące podrozdziały: wstęp, cele pracy, dyskusja, podsumowanie i wnioski jak również piśmiennictwo, oświadczenia

współautorów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów.

We wstępie omówienia, Doktorant prezentuje bardzo ogólne informacje na temat choroby Parkinsona, jej patogenety, zmian neuropatologicznych, diagnostyki, objawów klinicznych jak również różnic w częstości występowania choroby Parkinsona w różnych grupach etnicznych. Szkoda, że w tej części pracy problem znaczenia predyspozycji genetycznych ChP potraktowany jest skrótowo, bardziej wnikliwe przedstawienie tak interesującego i szerokiego zagadnienia byłoby dobrym wstępem dla lektury kolejnych artykułów opublikowanych przez Doktoranta. Pierwsza praca z przedstawionego cyklu w pewnym stopniu rekompensuje skrótowo potraktowane zagadnienie genetyki w części omówienia artykułów. Praca „Genetics of Parkinson's disease in the Polish population” jest bowiem przeglądem literatury dotyczącym dotychczas wykonanych badań genetycznych wśród pacjentów z ChP w populacji polskiej. Artykuł w sposób systematyczny przedstawia dotychczas przeprowadzone analizy różnych zmienności genetycznych, w tym wariantów odpowiedzialne za monogenową postać ChP, czynniki genetyczne dotyczące czynników ryzyka choroby Parkinsona w tym *APOE*, *GBA*, *MMP12*, czy też polimorfizmów genów kodujących aktywność enzymów zaangażowanych w katabolizm dopaminy (*COMT*, *MAO-B*).

Celem pierwszej pracy oryginalnej, to jest “The matter of significance—Has the p.(Glu121Lys) variant of *TOR1A* gene a pathogenic role in dystonia or Parkinson disease?” była ocena patogenności mutacji genu *TOR1A* oraz jej potencjalne powiązanie z rodzinną postacią choroby Parkinsona. Mutacja w genie *TOR1A* odpowiada za ekspresję białka torsyny A, należącej do rodziny ATPaz. Opisywana mutacja jest związana z występowaniem dystonii torsyjnej typu 1 (DYT1). Oceniany w pracy Doktoranta wariant p.Glu121Lys był do chwili obecnej opisany tylko u jednego pacjenta spośród 162 serbskich pacjentów z pierwotną dystonią. Do badania zakwalifikowano dwóch członków rodziny, to jest pacjentkę z rozpoznaną chorobą Parkinsona oraz jej ojca. Wykonane badanie polegające na sekwencjonowaniu całego genomu (WES) wykazało obecność mutacji p.(Glu121Lys) w genie *TOR1A*, przy braku obecności innych 23 mutacji powiązanych z ChP, opisywanych w bazie OMIM. Doktorant przeanalizował dodatkowo dostępne bazy danych (np. NHLBI, gnom AD, baza WES Zakładu Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka, PolyPhen2, HumDiv/HumVar algorytms, MutationTaster oraz CADD), co ostatecznie pozwoliło na sformułowanie wniosku o braku wpływu wariantu p.Glu121Lys w genie *TOR1A* w patogenecie rodzinnej postaci choroby Parkinsona.

Kolejna praca z cyklu dotyczyła problemu zagadnień neuropsychologicznych występujących u członków dwóch rodzin z rozpoznany zespołem Perry’ego (pacjenci z populacji polskiej i kolumbijskiej). Autor w początkowej części pracy przedstawia charakterystyczne cechy kliniczne oraz sposób dziedziczenia schorzenia, a następnie przeprowadza wnikliwą analizę kliniczną dwóch rodzin, zrekrutowanych do badania. Zespół Perry’ego jest chorobą o dziedziczeniu autosomalnie dominującym, z typowymi objawami klinicznymi takimi jak parkinsonizm niewrażliwy na leczenie lewodopą, utrata masy ciała, niewydolność

oddechowa o typie ośrodkowym oraz zaburzenia psychiczne. Zespół Perry'ego należy do schorzeń rzadkich, do chwili obecnej opisano jedynie 23 rodziny z tą formą parkinsonizmu. Bezspornym walorem pracy opublikowanej przez Doktoranta jest przeprowadzenie dokładnej oceny objawów psychicznych występujących u pacjentów, ze zwróceniem uwagi na profil zaburzeń zachowania oraz problem nasilonych objawów zaburzeń nastroju o charakterze depresji oraz apatii.

Następna praca oryginalna analizuje występowanie 3 najczęstszych genów związanych z rozwojem choroby Parkinsona o wczesnym początku z 4 sąsiadujących krajów w Europie Centralnej to jest Czech, Niemiec, Ukrainy oraz Polski. W przeprowadzonej przez Doktoranta analizie uwzględniono pacjentów z rodziną (17.2%; n=93) oraz sporadyczną postacią ChP. Do badań zakwalifikowano 541 pacjentów z EOPD, odpowiednio z Republiki Czeskiej n=11, Niemiec n=38, Polski n=476 oraz Ukrainy n=16. U wszystkich pacjentów przeprowadzono sekwencjonowanie metodą Sangera w celu oceny obecności mutacji w genach *PRKN*, *PINK1* oraz *DJ1*. Wybór genów miał związek z faktem, że w wymienionych genach są najczęściej identyfikowaną przyczyną choroby Parkinson o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym.

W grupie zakwalifikowanej do badań obecność mutacji homozygotycznej lub złożonej heterozygotycznej w genie *PRKN* wykazano odpowiednio u 17 pacjentów, w tym 1 Czecha (9.1%), 1 Niemca (2.6%), 14 Polaków (2.9%), oraz 1 Ukrainę (6.3%). Przeprowadzona analiza w grupie pacjentów należących do populacji polskiej wykazała również obecność 3 homozygotycznych mutacji w genie *PINK1*, co istotne w przeprowadzonej analizie nie potwierdziło nosicielstwa mutacji *DJ1*.

Cele, które zostały przedstawione przez Doktoranta dotyczyły oceny charakterystycznej dla badanej kohorty zmienności genetycznej związanej z parkinsonizmem. Należy stwierdzić, że badania zaplanowano adekwatnie do sformułowanych celów pracy, chociaż w opinii recenzenta, w opisie celów pracy warto było uwzględnić przeprowadzone przez Doktoranta badania dotyczące obrazu klinicznego zespołu Perry'ego. W czasie realizacji badań Doktorant opanował umiejętność przeprowadzania wielu testów molekularnych, co umożliwiło mu następnie ocenę uzyskanych wyników. Umiejętność przeprowadzenia ww. badań oraz interpretacji uzyskanych wyników świadczą o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktoranta. W podsumowaniu tej części recenzji należy stwierdzić, że metodyka badania jest bardzo nowoczesna, plan badań dobrze skonstruowany, metody statystyczne prawidłowo dobrane.

Doktorant wykazał m. in. brak istotnego znaczenia mutacji p.(Glu121Lys) w genie *TOR1A* w rodzinnej postaci choroby Parkinsona w populacji polskiej. Ponadto Doktorant po raz pierwszy dokonał oceny obrazu klinicznego, ze szczególnym uwzględnieniem objawów psychicznych, pacjentów z zespołem Perry'ego, oraz na podstawie długoletnich, 11-letnich obserwacji ustalił wariant behawioralny otępienia czołowo-skroniowego jako dominujący fenotyp neuropsychologiczny występujący w polskiej rodzinie z zespołem Perry'ego. W kolejnej pracy wykazał obecność dotychczas nieraportowanych mutacji w polskiej populacji

oraz dostępnych bazach danych w genie *PRKN* p.Glu79Ter oraz p.Cys466P. Ponadto w ostatniej z prezentowanych prac Autor wykazał, że badane zmienności genetyczne to jest mutacje w genach *PRKN*, *PINK1*, i *DJ1* nie należą do często występujących zmienności genetycznych warunkujących wystąpienie autosomalnie recesywnych postaci ChP, w badanych populacjach 4 sąsiadujących krajów w Europie Centralnej.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autor przedstawił dwa wnioski: w populacji polskiej mogą występować charakterystyczne dla rodzinnych parkinsonizmów zmienności genetyczne oraz identyfikacja specyficznych wariantów w znanych genach jest pierwszym krokiem do przyszłego odkrycia nowych genów w chorobie Parkinsona.

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autora, który perfekcyjnie opanował trudny warsztat badawczy i wykazał bardzo dobre merytoryczne przygotowanie do badań. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Fakt opublikowania wszystkich prac w renomowanych czasopismach świadczy o aktualności podjętej tematyki badawczej, jak również o umiejętności Doktoranta, który co warto podkreślić, był pierwszym autorem wszystkich publikacji. Pomimo niezaprzeczalnej wartości opublikowanych przez Doktoranta prac, wydaje się, że omówienie prac jest zbyt skrótowe, szczególnie w odniesieniu do genetycznych predyspozycji do wystąpienia choroby Parkinsona. Poza tym wydaje się, że Autor powinien bardziej starannie podejść do przedstawionego do recenzji omówienia, np. w kontekście jednolitego sposobu zapisywania nazw genów. Niezależnie od przedstawionych uwag, uważam, że przedstawiony do oceny cykl prac stanowi dużą wartość w nauce, a rozprawa doktorska lek. Łukasza Milanowskiego pt. „Poszukiwanie nowych zmienności genetycznych u pacjentów z rodzinnymi parkinsonizmami w populacji polskiej” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie lek. Łukasza Milanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na dużą wartość poznawczą wyników oraz opublikowanie ich w renomowanych czasopismach (Doktorant we wszystkich jest pierwszym autorem) wnioskuję o wyróżnienie pracy „*Summa cum laude*”.

Prof. dr hab. n. med. Monika Białecka
prof. dr hab. n. med. Monika Białecka