



czwartek, 4 kwietnia 2019

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN

uzasadniał
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
wpłynęło dn. 2019.04.10
podpis MMO l.dz. 524

Ocena pracy doktorskiej mgr Wioletty Rozpędek „Inhibitory zależnej od stresu ER kinazy PERK jako potencjalne nowe podejście do terapii choroby Alzheimera”.

Choroba Alzheimera jako najczęściej występująca forma demencji, wraz z innymi chorobami neurodegeneracyjnymi, jest zaliczana do chorób cywilizacyjnych narastających w starzejących się społeczeństwach. Obecnie dostępne leczenie AD jest wyłącznie objawowe a molekularne mechanizmy związane z wystąpieniem tego schorzenia są tylko częściowo poznane. Niewątpliwie AD jest związana z agregacją neurotoksycznych płytek starczych, która jest wynikiem mutacji w prekursorowym białku amyloidu beta oraz nadmiernej aktywacji szlaku sygnałowego adaptacyjnej odpowiedzi na stres (UPR). Indukcja stresu Retikulum Endoplazmatycznego wywołuje fosforylację oraz oligomeryzację kinazy PERK, która fosforyluje czynnik inicjacji translacji 2α co przy przedłużającym się stresie prowadzi do uruchomienia procesów apoptotycznych, inicjacji procesu neurodegeneracji ściśle skorelowanego z patogenezą i progresją AD. Dlatego też należy stwierdzić, że postawione przed Doktorantką cele pracy zmierzające do oceny poziomu białek szlaku PERK w liniach komórek traktowanych niskocząsteczkowymi inhibitorami kinazy oraz oceny cytotoksyczności użytych inhibitorów w warunkach in vitro oraz poziomu apoptozy oraz progresji cyklu komórkowego są nie tylko cenne z punktu widzenia badań podstawowych ale także dają nadzieje na postęp w poszukiwaniach skutecznych, celowanych leków przeciwko AD. Przeprowadzenie zaplanowanych badań w zespole promotora pracy, prof. dr hab. Ireneusza Majsterka we współpracy z zespołem z Medical University of South Carolina dała Doktorantce szanse realizacji ambitnych celów pracy.



Przeprowadzone badania oraz wykonana przez Doktorantkę analiza dostępnej literatury naukowej stanowiły podstawę publikacji dwóch prac przeglądowych, które ukazały się w dobrych czasopismach naukowych takich jak *Current Medicinal Chemistry* oraz *Current Molecular Medicine* oraz dwóch prac eksperymentalnych opublikowanych w polskojęzycznych czasopismach. Powyższe publikacje zamieszczone w pracy doktorskiej zostały poprzedzone uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej, założeniami i celem naukowym badań, opisem części metodycznej i doświadczalnej wraz z dyskusją. Włączenie do ocenianej dysertacji, oprócz opublikowanych prac, także ww. części metodycznej i wynikowej uzasadnia zamieszczenie w nich wyników, które na etapie składania doktoratu były jeszcze nieopublikowane a ukazały się drukiem w lutym 2019 roku w uznanym czasopiśmie specjalistycznym *Curr Alzheimer Res*. W pracy tej, tak samo jak w zamieszczonych w dysertacji pracach przeglądowych i pozostałych pracach eksperymentalnych Doktorantka jest pierwszym autorem co wraz z oświadczeniami współautorów jednoznacznie wskazuje na dominującą rolę mgr Wioletty Rozpędek w ich powstaniu.

Zamieszczone przez Doktorantkę uzasadnienie podjętej tematyki badawczej jest dobrze przemyślane, napisane ładnym językiem naukowym a autorka zapoznaje czytelnika z aktualną wiedzą dotyczącą choroby Alzheimera jako schorzenia neurodegeneracyjnego, podłożem genetycznym tej choroby, mechanizmami powstawania złogów amyloidu beta, stresu retikulum endoplazmatycznego oraz mechanizmami aktywacji szlaku kinazy PERK. Jako znaczne poszerzenie części teoretycznej pracy należy uznać dwie prace przeglądowe stanowiące integralną część dysertacji. Zostały one odpowiednio poświęcone dyskusji nad kinazą PERK jako potencjalną tarczą w leczeniu choroby Alzheimera oraz rozważaniom nad małymi inhibitorami transdukcji sygnału stresu retikulum endoplazmatycznego. Prace te zawierają między innymi opis aktualnego stanu wiedzy dotyczącego genetycznych podstaw choroby Alzheimera, procesu powstawania peptydów amyloidu B, aktywacji sygnalingu UPR w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego, jego wpływu na choroby neurodegeneracyjne, oraz możliwości zastosowania niskocząsteczkowych inhibitorów kinazy PERK w terapii tych chorób.

W literaturze naukowej proponowano szereg hipotez próbujących wyjaśnić molekularne podłoże choroby Alzheimera takich jak hipoteza genetyczna, cholinergiczna, amyloidowa, tau, neurowaskularna i szereg innych. **W 2019 roku pojawiła się praca z zespołu prof. Potempy**



wiążąca AD z obecnością gingiwaliny, proteazy wytwarzanej przez bakteryjny patogen przyzębia *Porphyromonas gingivalis*. Poproszę Doktorantkę podczas publicznej obrony o krótkie omówienie tej nowej hipotezy wskazującej na potencjalną rolę czynnika infekcyjnego w AD.

W pracach eksperymentalnych, włączając w to pracę opublikowaną w Curr Alzheimer Res. Doktorantka przeprowadziła analizę ilościową białek eIF2 α oraz CHOP w liniach komórkowych embrionalnych fibroblastów mysich z ekspresją kinazy PERK oraz defektywnych w ekspresji PERK po indukcji stresu retikulum endoplazmatycznego w obecności badanych inhibitorów. Wysoki poziom białka p-eIF2 obserwowano w komórkach zdolnych do ekspresji PERK wykazując, że fosforylacja eIF2 zachodzi wyłącznie w wyniku aktywacji PERK w warunkach stresu ER. Zaobserwowano również wysoki poziom inhibicji fosforylacji eIF2 w obecności badanego inhibitora. Ponadto zaobserwowano, że w warunkach indukcji stresu ER wzrasta poziom ekspresji markera pro-apoptycznego szlaku UPR, białka CHOP a zastosowane inhibitory wydajnie hamują ten proces. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazywały, że wysoki poziom białek eIF2 α oraz CHOP świadczący o aktywacji szlaku UPR związany z patogenezą AD może być obniżany poprzez zastosowanie niskocząsteczkowych inhibitorów kinazy PERK. Możliwość zastosowania badanych inhibitorów w praktyce klinicznej jest często limitowana poprzez ich cytotoksyczność. Doktorantka przeprowadziła więc również analizy określające cytotoksyczność badanych inhibitorów w warunkach in vitro. Przeprowadzone badania wykazały, że badany inhibitor nie wywołuje efektu cytotoksycznego w stosunku do komórek neuroblastomy, mysich neuronów oraz szczerzych astrocytów międzymózgowia w żadnym z badanych stężeń. Z drugiej strony inhibitor GSK2606414 nie został dopuszczony do badań klinicznych ze względu na cytotoksyczność w stosunku do prawidłowych komórek trzustki u zwierząt doświadczalnych. **Czy Doktorantka wraz z Promotorem planują poszerzenie przeprowadzonych analiz cytotoksyczności in vitro o badania na zwierzętach ? Dlaczego Doktorantka nie zdecydowała się wyznaczyć IP₅₀ dla badanego związku a oceniała tylko toksyczność wybranych stężeń inhibitora ?** Przeprowadzone badania były uzupełnione o ocenę poziomu apoptozy oraz progresji cyklu komórkowego in vitro na komórkach tych samych linii **traktowanych inhibitorem kinazy PERK**. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że inhibitor LDN-0060609 nie wywołuje w badanych komórkach aktywacji apoptozy w żadnym z badanych stężeń co wskazywało na neuroprotektoryjne właściwości badanego związku. Nie



zaobserwowano również zmian w progresji cyklu komórkowego astrocytów szczurzych traktowanych badaniem inhibitorem.

W przedstawionej do oceny pracy na szczególną uwagę zasługuje bardzo dobre przygotowanie metodyczne autorki, właściwy dobór linii komórkowych oraz zastosowanych metod badawczych. Dyskusja stanowiąca integralną część opublikowanych prac jak i zawarta w omówieniu wyników jest napisana w sposób profesjonalny i świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy badawczej. Wnioski wyciągnięte na podstawie uzyskanych wyników mają silne podstawy w przeprowadzonych badaniach oraz w dostępnej literaturze naukowej, choć nie do końca przekonuje mnie ich przedstawienie w trybie warunkowym. Wolałbym aby wnioski dotyczyły bezpośrednio badanych procesów molekularnych a ich potencjał kliniczny był omówiony wyłącznie w dyskusji.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Wioletty Rozpędek uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki. Wnoszę do Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego o dopuszczenie mgr Wioletty Rozpędek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na uzyskane cenne wyniki poznawcze oraz potencjał aplikacyjny pracy proszę Szanowną Radę o nagrodzenie pracy doktorskiej Pani mgr Wioletty Rozpędek przewidzianą w regulaminie nagrodą.

Mierownik

Biologii i Fizjologii Mycobacterium

dr hab. Jerzy Dziadek