

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Piotra Pankiewicza pt.

„Rozwój innowacyjnych, małowzrostkowych agonistów TrkB w terapii chorób układu nerwowego”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Piotra Pankiewicza została wykonana pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Kaluty-Bykowskiej oraz dr Jerzego Pieczykolana w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego w Warszawie oraz w Laboratoriach Celon Pharma. S.A. w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy.

Zrozumienie molekularnego podłoża chorób układu nerwowego przyczyniło się do burzliwego rozwoju współczesnej neuropsychofarmakologii i poszukiwania małowzrostkowych agonistów lub antagonistów poznanych ścieżek sygnalizacji komórkowej. Neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), jest jednym z najintensywniej badanych czynników troficznych wydzielanych przez komórki w mózgu. BDNF działa za pośrednictwem receptora o aktywności kinazy tyrozynowej dla BDNF (TrkB) i odpowiada za prawidłowy rozwój i funkcjonowanie układu nerwowego. Zaburzenie wydzielania BDNF może prowadzić między innymi do zaburzeń depresyjnych.

Podjęcie badań zmierzających do odkrycia nowych cząsteczek zdolnych przenikać barierę krew-mózg i zastąpić BDNF w jego protekcyjnym działaniu na komórki nerwowe jest w pełni uzasadnione.

W swojej pracy doktorskiej mgr inż. Piotr Pankiewicz podjął próbę identyfikacji małowzrostkowych agonistów receptora TrkB. W tym celu autor pracy stworzył tzw. „platformę badawczą”, która miała pozwolić na identyfikację cząsteczek, potencjalnych agonistów receptora TrkB, wybranych z biblioteki związków o różnych chemotypach.

W pierwszej kolejności doktorant poddał ocenie stopień wiązania wybranych cząsteczek z receptorem TrkB oraz jego aktywację, następnie zbadał wpływ na uruchomienie przez nie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, i wreszcie przeanalizował właściwości protekcyjne wybranych cząsteczek w komórce w warunkach stresu mitochondrialnego.

Niestety, pomimo dużego nakładu pracy nie udało się zidentyfikować cząsteczek o pożądanych cechach agonisty TrkB.

Ważną część pracy stanowi charakterystyka związków o postulowanej lub udokumentowanej w literaturze aktywności względem receptora TrkB. Autor pracy w dobrze zaplanowanych eksperymentach dowiódł, że związki te nie posiadają właściwości agonistów receptora TrkB i są zasadniczo nieaktywne zarówno na poziomie interakcji z receptorem jak i funkcjonalnym.

Dla najszerszej opisanego z tej grupy związków 7,8-dihydroksyflawonu (7,8-DHF) przeprowadzono badania selektywności *in vitro* oraz farmakologiczne badania *in vivo*. Wyniki wskazują na niekorzystny profil farmakokinetyczny cząsteczki i na brak aktywności 7,8-DHF zarówno względem TrkB jak i innych ścieżek molekularnych w mózgu u myszy. Ponadto Autor pracy wykazał, że 7,8-DHF w warunkach *in vitro* wykazuje zdolność do interakcji z wieloma celami molekularnymi, co świadczy o niskiej selektywności związku względem TrkB.

Praca ma klasyczną budowę i składa się ze wstępu, rozdziału opisującego metody, wyniki oraz z dyskusji. Jako osobne rozdział zostały wydzielono Cel pracy oraz Wnioski. Praca zawiera wymagane streszczenie w języku angielskim i polskim. Dodatkowo w pracy zamieszczono załącznik zawierający struktury chemiczne badanych związków małowcząsteczkowych, tabelę wyznaczonych wartości stałej dysocjacji (K_d) z użyciem mikroskalowej termoforezy kapilarnej oraz szczegółowe wyniki selektywności 7,8-DHF względem różnych celów molekularnych. Bibliografia zawiera 247 cytowań. Praca jest napisana, jasnym, zrozumiałym językiem dzięki czemu czytelnik nie ma problemu z jej śledzeniem.

We **Wstępie** Autor wprowadza czytelnika w tematykę pracy opisując potencjalne korzyści płynące z odkrycia związków małowcząsteczkowych, jako leków modulujących aktywność receptora TrkB. Opisuje dokładnie biologiczne funkcje BDNF i jego wydzielanie w różnych strukturach mózgu oraz regulację ekspresji genu kodującego BDNF, która jest złożona i była intensywnie badana w kontekście regulowanej translacji synaptycznej. Na stronie 21 pojawia się zdanie *„Alternatywne składanie egzonów (ang. splicing) kończy transkrypcję genu białka BDNF w dwóch możliwych miejscach poliadenylacji, dając początek dwóm populacjom mRNA BDNF o różnej długości, które trafiają do określonych przedziałów neuronalnych. Krótkie transkrypty BDNF są lokalizowane w ciele komórki gdzie utrzymują podstawową produkcję BDNF. Natomiast długie transkrypty BDNF kierowane są do dendrytów, gdzie*

ulegają lokalnej translacji w efekcie pobudzenia neuronalnego". Jest to dosyć niefortunny skrót myślowy. Czy Autor mógłby wyjaśnić jaką rolę w transporcie mRNA i regulacji jego translacji odgrywają sekwencje niekodujące obecne w cząsteczce mRNA BDNF takie jak 5' i 3'UTR?

Po opisanu powstawania dojrzałej cząsteczki białka BDNF Autor pracy poświęca sporo miejsca na opis właściwości receptorów TrkB opisując ich warianty, występowanie i charakterystykę strukturalną. Na stronie 27 czytamy: *„Następnie, receptor jest pakowany do pęcherzyków wydzielniczych i kierowany do błony komórkowej na krańcach aksonów bądź dendrytów. Transport TrkB odbywa się wzdłuż mikrotubul, a w proces ten zaangażowane są białka motoryczne z rodziny kinezyn. Czy doktorant mógłby wyjaśnić czym są wspomniane „krańce aksonów bądź dendrytów” oraz czy chodzi tutaj o transport mRNA czy białka?*

Aktywacja ścieżek sygnałowych uruchamianych po związaniu receptora TrkB jest szczegółowo opisana z podziałem na poszczególne kinazy. I wreszcie autor przechodzi do opisu zaburzenia interakcji BDNF-TrkB w chorobach neuropsychiatrycznych na przykładzie depresji. Szczególnie we Wstępie podobał mi się rozdział „Proces rozwoju nowego leku”, w którym autor niezwykle jasno opisał proces tzw. „drug discovery”.

Sekcja **Materiały i Metody** jest zwięzłym spisem zastosowanych metod badawczych oraz użytych materiałów. Ta część pracy jest dostatecznie wyczerpująca, a jednocześnie odpowiednio zwięzła i nie mam do niej uwag krytycznych. Autor pracy szczegółowo opisał wykorzystane linie komórkowe, warunki ich hodowli i różnicowania oraz badania prowadzone *in vivo*. Wykorzystana w pracy metodyka była bogata i wymagała od doktoranta opanowania szeregu metod z zakresu chemii, biologii molekularnej, biologii komórki czy analizy farmakodynamicznej.

Wyniki są opisane w sposób niezwykle klarowny, a ryciny przygotowano z należytą starannością. W pierwszej części tego rozdziału autor opisuje bibliotekę małowcząsteczkowych związków chemicznych, na którą składały się zsyntetyzowane przez departament Chemii Medycznej Celon Pharma S.A oryginalne, własne związki chemiczne, komercyjnie dostępna biblioteka łącznie 987 związków oraz pula związków referencyjnych. W wyniku badań przesiewowych autor wyselekcjonował 59 związków chemicznych (w tym cząsteczki referencyjne). Następnym etapem pracy było sprawdzenie ich zdolności do aktywacji receptora TrkB w komórkach SN56 T48 ze stabilną nadekspresją receptora TrkB. O aktywacji receptora TrkB świadczyła fosforylacja jego domeny wewnątrzkomórkowej na tyrozynie 706 (Tyr706), a efekt ten wykazały jedynie 4 spośród 59 przebadanych związków małowcząsteczkowych i były

to związki referencyjne, przy czym ich aktywność była zdecydowanie niższa w porównaniu do BDNF. Uzyskany wynik wskazuje, że w wykorzystanej bibliotece nie udało się zidentyfikować żadnych związków małocząsteczkowych zdolnych aktywować ortosterycznie receptor TrkB.

Pomimo tych niepowodzeń Autor pracy nie poddał się, ale skupił na ciekawym aspekcie uzyskanych wyników, a mianowicie aktywności związków referencyjnych i zbadał ich zdolność do naśladowania funkcji BDNF.

Autor użył metody inkubacji zewnątrzkomórkowej domeny TrkB ze związkami małocząsteczkowymi oraz BDNF *in vitro* i wykazał, że żaden z zbadanych związków nie wykazywał zdolności do indukowania dimeryzacji exTrkB, podczas gdy 4 z nich (DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071, CPL503113) powodowały fosforylację TrkB w modelu komórkowym. Tą ciekawą obserwację Autor wyczerpująco przedyskutował na stronie 93, chciałabym jednak spytać czy jego zdaniem powinno się w badaniach przesiewowych pominąć etap sprawdzania oddziaływania związków z receptorem *in vitro* i badać je bezpośrednio w systemach komórkowych?

W następnym kroku Autor użył linii komórkowej SN56 T48 z nadekspresją receptora TrkB którą traktował 11 związkami referencyjnymi (w odniesieniu do BDNF) i stwierdził, że żaden z nich nie powoduje aktywacji receptora TrkB oraz fosforylacji białek efektorowych takich jak PLCγ1, Akt1, ERK1/2, co oczywiście sugerowało brak aktywności tych związków. Cztery pozostałe związki (DMAQ-B1, CPL503052, CPL503071 oraz CPL503113) aktywowały szlak TrkB, a zastosowanie inhibitora K252a zablokowało aktywność TrkB i częściowo także fosforylację białek sygnałowych. Jednak w przypadku CPL503052 silna fosforylacja kinazy Akt1 w obecności inhibitora K252a wskazywała na alternatywny mechanizm działania tej cząsteczki w komórkach SN56 T48, dlatego w dalszych badaniach Autor posłużył się innym modelem komórkowym, linią ludzkiej neuroblastomy SH-SY5Y w której podczas różnicowania indukowany jest TrkB. Analogiczny eksperyment powtórzono z czterema wymienionymi cząsteczkami plus dodatkowo z 7,8-DHF powszechnie używanym w literaturze naukowej agonistą TrkB. Również w tych komórkach autor zauważył niezależną od receptora TrkB fosforylację kinaz efektorowych. Tutaj przeprowadzono także bardzo elegancki eksperyment kontrolny na niezróżnicowanych komórkach neuroblastomy (w których brak jest ekspresji TrkB), co pozwoliło potwierdzić niezależny od receptora TrkB mechanizm działania tych związków. Co ciekawe 7,8-DHF nie aktywował receptora TrkB, ani kinaz efektorowych.

Badane związki nie wykazywały też właściwości cytoprotekcyjnych, nie chroniły komórek przed indukowaną stresem mitochondrialnym śmiercią komórkową co czynił BDNF.

Kolejne badania przeprowadzono z wykorzystaniem zwierząt eksperymentalnych myszy szczepu BALB/c, którym podawano 7,8-DHF drogą doustną lub dożylną w celu analizy profilu farmakokinetycznego. Uzyskane przez Autora wyniki wskazywały na niekorzystny profil farmakokinetyczny 7,8-DHF u myszy i jego szybką eliminację z organizmu. Jego podanie nie prowadziło także do wzrostu fosforylacji receptora TrkB i zależnych od niego kinaz z hipokampie i korze czołowej traktowanych myszy.

Ponieważ wszystkie przeprowadzone przez Autora oświadczenia wskazywały na to, że powszechnie używany jako inhibitor TrkB związek 7,8-DHF nie wykazuje aktywności biologicznej postanowił on zbadać jego wiązanie z innymi białkami i zidentyfikował 12 białek - celów molekularnych 7,8-DHF. Doświadczenie to ma wartość poznawczą i wybiega poza schemat doktoratu wdrożeniowego, stanowi jednak próbę odpowiedzi na ciekawe pytanie jakie są wewnątrzkomórkowe efekторы cząsteczki 7,8-DHF.

Dyskusja zaczyna się od dobrze napisanego podsumowania uzyskanych wyników. Jest dosyć długa, liczy 16 stron, ale sprawnie napisana i świadczy o dojrzałości naukowej Autora. W ogólnej ocenie merytorycznej pracy chciałabym podkreślić, że doktorant potrafi właściwie zaplanować eksperymenty i zastosować odpowiednie techniki do ich wykonania. Ponadto umie prawidłowo zinterpretować dane eksperymentalne, porównać z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy oraz zaproponować prawdopodobny mechanizm badanych zjawisk.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca mgr. inż. Piotra Pankiewicza spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM w Warszawie o dopuszczenie mgr. inż. Piotra Pankiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie mu stopnia naukowego doktora.

dr hab. Magdalena Dziembowska, prof. ucz.

Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego