

## **Recenzja pracy doktorskiej mgr farm. Igi Wieczorek pt „ Analiza działania modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu w eksperymentalnych modelach choroby Alzheimerera”**

Rozprawa ma układ typowy. W jej skład wchodzi długi wstęp, w którym doktorantka opisuje bardzo szeroko różne patomechanizmy choroby Alzheimerera (ChA). Dużą część zajmują informacje ogólne, często odbiegające od zasadniczego tematu i celu pracy. Niezależnie od tego zastrzeżenia, wstęp ma charakter wielokierunkowej pracy pogładowej. Jest napisany dobrym polskim językiem naukowym pozwalającym na łatwą lekturę i zrozumienie poszczególnych zagadnień.

Niemniej w podrozdziale 1.1.2.1. amyloid  $\beta$  błędnie opisano diagnostykę ChA za pomocą oznaczania izoform  $A\beta_{1-42}$  i  $A\beta_{1-40}$ . Poziom  $A\beta_{1-42}$  w PMR ulega znacznemu obniżeniu, poziom  $A\beta_{1-40}$  nie zmienia się lub nieznacznie wzrasta. Czulość diagnostyczna oznaczeń samego  $A\beta_{1-42}$  jak i  $A\beta_{1-42} / A\beta_{1-40}$  jest podobna (ok. 80%). Są to wyniki dobrze udokumentowane przez setki badań klinicznych (tych które spełniły warunki GLP) i dziesiątki metaanaliz. Zwiększona akumulacja obu peptydów dotyczy w szczególności kory mózgowej/hipokampa i może być wykryta za pomocą nieradioaktywnych ligandów badaniem PET jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych zarówno u ludzi jak i myszy transgenicznym.

Opis amyloidogenezy jest zbyt uproszczony jak na pracę dotyczącą mechanizmów ChA. Wiadomo, że  $A\beta_{1-42}$  jest generowany przez BACE1 głównie w endosomach i reticulum endoplazmatycznym, gdzie panuje pH 5.5-6.0 optymalne dla tego enzymu.

Nie cytozol a cytosol (od solutio) str.26, 105 i inne.

str. 37 Nie ma wzrostu nieznamienno statystycznie należałoby mówić o braku znamienno wzrostu, braku różnicy.

Zgodnie z tytułem pracy autorka dokładnie opisała kompartmentację oraz strukturalne i funkcjonalne właściwości różnych klas receptorów S1PR 1-5. Jednakże brakuje tutaj syntetycznej ryciny dotyczącej zagadnienia, podczas gdy ryciny zamieszczono przy omawianiu zagadnień pobocznych. Str. 27 -36. Natomiast rycina 9 zamieszczona na końcu rozdziału dobrze prezentuje działania ksenobiotycznych ligandów S1PR, które są aktualnie stosowane lub mają potencjalne właściwości terapeutyczne u pacjentów z ChA. Dzięki temu wstęp stanowi dobre uzasadnienie dla wymienionych celów pracy. Są one przedstawione jako cele same w sobie ze stosunkowo mało widocznym celem ogólnym integrującym się z patomechanizmami ChA.

**Materiał i metody** zawiera dość dokładne opisy stosowanych metod analitycznych, a w szczególności stosowanych specyficznych sond i przeciwciał. Brak jest wyników wewnętrznej kontroli jakości dokumentującej trwałość wiązania białek z membranami przy ich wielokrotnym płukaniu (str. 56-57). Zgodnie z obecnym stanem wiedzy autorka dokonała trafego wyboru białek strukturalnych i regulacyjnych kompleksu SNARE.

Jednakże, myszy FVB APP<sup>+</sup> i APP<sup>-</sup> zostały niewystarczająco scharakteryzowane. Należało podać ich parametry testów poznawczych, poziom białka amyloidu –beta 1-42 i 1-40 w korze i hipokampie. Również układ doświadczalny powinien uwzględniać zmiany ekspresji genów i poziomów białek w czasie pomiędzy 3 i 12 miesiącem życia..

**Wyniki** zostały przedstawione na 16 złożonych lecz przejrzystych rycinach. Legendy do rycin przedstawiają dokładną analizę statystyczną różnic pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt. Jednakże sam tekst rozdziału zawiera sporo niedokładności w opisach rycin.. Można tu przytoczyć niedokładności w rycinach 10 i 11.

W ryc. 10A,C pominięto obecność wyższych poziomów SNAP25 i *Stx1a* mRNA w korze mózgowej 12 miesięcznych APP<sup>+</sup> traktowanych FTY720 niż u APP<sup>+</sup> kontrolnych. Taki wzrost opisano jedynie dla *Vamp* (Ryc. 10E). Pominięto również fakt, że mRNA dla *Vamp1* w 3 i 12 miesięcznych korach mózgowych APP<sup>+</sup>, był niższy niż w odpowiednich próbkach APP<sup>-</sup>. Należy wyjaśnić przyczyny pomijania odpowiednich opisów.

W hipokampie 12 miesięcznych myszy APP<sup>+</sup> Fingolimod zapobiegał spadkowi nie tylko mRNA *SNAP25* i *Stx1a* (Ryc. 11A,C) lecz również podwyższał poziom mRNA *Vamp* w stosunku do kontroli APP<sup>+</sup> (Ryc. 11E) czego autorka nie opisała. Należałoby to wyjaśnić. Pominięto również fakt, że Fingolimod podwyższał mRNA *Vamp* w hipokampie 12 miesięcznych myszy APP<sup>-</sup>. Przy uwzględnieniu tych danych można byłoby postawić tezę o jednolitym ochronnym działaniu tego związku na ekspresję genów białek strukturalnych kompleksu SNARE. Wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska to oczywiście osobna sprawa. Przy opisie zmian przydałyby się ich wartości liczbowe, które pozwalałyby na ocenę, czy mogą być one patofizjologicznie istotne.

W ryc. 13BD uwagę zwracają istotne wzrosty poziomu białek synaptofizyny i synaptotagminy odpowiednio w hipokampie 3 i 12-miesięcznych kontrolnych APP<sup>+</sup> w stosunku do APP<sup>-</sup>. Zanotowano spadek poziomu neureksyny w korze 12 mc. APP<sup>+</sup>, lecz pominięto wzrost białka neureksyny pod wpływem fingolimodu w tej grupie (Ryc. 13E). To samo dotyczy minimalnego wzrostu mRNA kompleksyny w 12 miesięcznej korze APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> pod wpływem tego związku oraz jej obniżenia w 12 miesięcznym kontrolnym APP<sup>+</sup> w stosunku do APP<sup>-</sup> (Ryc. 13G).

Ciekawymi, lecz wymagającymi uzupełnienia badaniami aktywności i żywotności jest wykazanie braku zmian poziomów mRNA, białka pAKT w korze i fosforylacji jego reszt serynowych w pozycji 473 w korze mózgowej myszy 3 i 12-miesięcznych APP<sup>-</sup> i APP<sup>+</sup> (Ryc. 14). Byłoby to niezgodne z postulowaną rolą AKT w neurodegeneracji. To samo dotyczyłoby mRNA i białka BAD, pBAD i GSK3 $\beta$  (Ryc. 15,16).

Natomiast w hipokampie APP<sup>+</sup>, 100% wzrost poziomu białka pAKT od 3 do 12 miesiąca w stosunku do APP<sup>-</sup> wskazywałby na aktywację procesów apoptozy, przy braku wpływu aktywacji receptorów S1P przez FTY720 (ryc. 17D). Podobnie wysoki poziom pGSK-3 w 12 miesięcznym hipokampie APP<sup>+</sup> w stosunku do 12-m-c. APP<sup>-</sup> pozostaje w zgodzie z profilem pAKT. Jednakże te dość istotne wyniki, jak również brak wpływu FTY720 nie zostały omówione (Ryc. 19D). W tych doświadczeniach brak jest porównania poziomów w stosunku

do jednej 3-miesięcznej kontroli APP-, co uniemożliwia prześledzenie wpływu starzenia na te parametry.

Szczegółowe obserwacje dotyczące ekspresji genu *Mapt* oraz poziomu białka tau całkowitego i fosforylowanego (poz. 199/202, 396, 416 w korze mózgowej i hipokampie 3 i 12 miesięcznych APP+ i APP- zdają się przeczyć udziałowi tego białka w patomechanizmie neurodegeneracji w tym modelu AD (Ryc. 20). W tym kontekście ok. 20% wzrost fosforylacji w seryny 416 wydaje się nie mieć istotnego znaczenia (Ryc. 21G). W mózгах z ChA poziomy tau/p<sub>tau</sub> wskutek akumulacji w postaci splotów neurofibrylarnych są dużo wyższe niż u ludzi i zwierząt zdrowych.

Istotnym zastrzeżeniem jest również to, że wyniki nie pozwalają na porównanie tych samych parametrów pomiarowych w mózгах myszy 12 względem 3 miesięcznych. Krytycznym punktem jest brak oceny czy poziom białka tau i ufosforylowanego białka tau ulega zmianom podczas starzenia. Narastanie poziomów A $\beta$  oraz p $\tau$ , w różnych regionach jest typowym zjawiskiem w starzejących się mózгах osób z dziedzicznymi postaciami ChA. Wyprzedzają one o dekadę wystąpienie objawów zaburzeń poznawczych. Układ doświadczeń w przedstawianej pracy nie pozwolił na taką obserwację. Myszy 3 i 12 miesięczne musiałyby być badane porównawczo w jednym eksperymencie, czego nie wykonano. Co więcej, wydaje się poziomy białek tau nie ulegają zmianie, a poziomy A $\beta$  w mózгах myszy APP- powinny być bliskie 0, względem narastających w czasie poziomów A $\beta$  u APP+. Dostępne są dane literaturowe na ten temat w wielu modelach ChA-Tg włączając FVB.

Badania *in vivo* zostały uzupełnione doświadczeniami *in vitro* na neuronach mysiego hipokampa HT22, i mikrogleju BV2. Interesującym chociaż nie nowatorskim faktem, jest wykazanie podobnej wrażliwości komórek HT22 i BV2 na stężenie A $\beta$  występujące w ludzkich i mysich mózгах z genetycznie uwarunkowaną ChA. Nową obserwacją jest natomiast wykazanie 50% spadku *Slpr1* pod wpływem A $\beta$  przy niezmiennym jego poziomie w HT22 (Ryc. 22AB). Obniżenie ekspresji genu *Bcl2* przy niezmiennym poziomie Bax mogłoby tłumaczyć występujące spadki potencjału błonowego i żywotności pod wpływem A $\beta$ . (Ryc. 23CDEF, Takie badania mogłyby stanowić cenne uzupełnienie badań *in vivo*, poprzez możliwość wykazania komórkowej kompartmentacji tych zmian. W przedstawianej pracy profil badań *in vitro* jest mało kompatybilny z profilem badań na całej tkance mózgowej. Dotyczy on bowiem ekspresji poszczególnych genów receptorów sfingozynowych, w obecności ich specyficznych agonistów i żywotności komórek. Natomiast badania całej tkanki dotyczą wpływu nieselektywnego fingoimidu na ekspresję genów i poziomów kompleksów białek pęcherzykowych i *tau/taup* u zwierząt WT i Tg, w których trudno doszukać się receptorów sfingozyno-1-P. Występuje tutaj wyraźna rozbieżność między tytułem pracy a jej zawartością. To właśnie receptory sfingozynowe będące tematem pracy doktorskiej i powinny być wyeksponowane na pierwszym planie rozdziału

Tymczasem obserwacje genów *Spr* stanowią małą część wszystkich wyników i dotyczą tylko linii komórkowych. Brak jest danych dot. poziomu białek Spr, które decydują o metabolizmie S-1-P. Generalnie, wykazują brak związku między ekspresją genów Spr3-5 w obecności A $\beta$ , a żywotnością komórek mikrogleju BV2. Natomiast obserwacja, że znaczne obniżenie ekspresji *Slpr1*, i być może mniejsze *Slpr5*, pod wpływem A $\beta$  występuje równoległe ze spadkiem

potencjału błonowego i żywotności BV2 oraz wzrostem ekspresji *IL1*, *IL6*, *TNF* i nie jest modyfikowane przez specyficznych agonistów różnych S1pr, stanowi oryginalne osiągnięcie kandydatki. Jednakże i tutaj brak jest analizy porównawczej ekspresji badanych genów w HT22 i BV2, co miałyby znaczenie w ocenie kompartmentacji międzykomórkowej tych zjawisk w mózгах myszy Tg. Wydaje się również niezbędne przeprowadzenie porównawczego badania ekspresji, przynajmniej *S1pr1* w korze i hipokampie dla przeprowadzenia analizy regionalnej kompartmentacji receptora w mózgu. Efekt niespecyficznego aktywatora receptorów S1pr nie jest równoznaczny z oznaczeniem ich poziomu w badanych regionach mózgu.

**Dyskusja.** Dyskusja jako całość jest dobrze zorganizowana. Jednakże zawiera sporo powtórzeń ze wstępu. Dotyczy to np. str. 102 gdzie dyskusja na temat A $\beta$  i leczenia nie wiąże się z tematyką pracy i nie wnosi nic do interpretacji wyników. Przecież nie oznaczono A $\beta$  ani w hipokampie ani w korze APP- czy APP+. Przy omawianiu modelu myszy FVB nie podano literaturowego stężenia A $\beta$  w mózгах Tg-ChA, które uzasadniałoby ewentualnie użycie 0.001 mM peptydu w drugiej części eksperymentów na liniach komórkowych.

Obniżenie ekspresji kompleksu genów białek strukturalnych SNARE u myszy APP+ jest zgodne z odpowiednimi danymi literaturowym. Co więcej wykazano, że agonista FTY720 powoduje istotne statystycznie choć ilościowo nieznaczne zwiększenie ekspresji. kilku tych genów w hipokampie i korze APP+. Wskazywałyoby to na istotne znaczenie S1tr1 w procesie fuzji pęcherzyków synaptycznych z błoną plazmatyczną. Nie można jednak mówić o tendencji do zmian przy  $P \gg 0.05$  (str. 104). Wątpliwości co do istotności zmian na poziomie transkrypcji wzbudza fakt, że poziomy białek kompleksu SNARE nie ulegały istotnym zaburzeniom u zwierząt APP+. Wynikałoby stąd, że receptory te nie są zaangażowane w proces egzocytozy pęcherzyków synaptycznych. W tej sytuacji wniosek, że: „*A to, które z białek przyczynia się do upośledzenia funkcji kompleksu SNARE, zależy od badanej struktury mózgu i grupy wiekowej*„, jest zbyt spekulatywne.

Część dyskusji dotyczącej roli Ca<sup>2+</sup> w regulacji funkcji SNARE (str. 105) jest w świetle profilu badawczego pracy nieuzasadniona. Nie tłumaczy mechanizmu żadnej przedstawionej zmiany poziomów jego białek regulacyjnych. Dyskusja dotycząca białek regulacyjnych SNARE synaptotagminy, synaptofizyny, kompleksyny, neureksyny jest poprowadzona dobrze poprzez analizę porównawczą z danymi literaturowymi dotyczącymi zmian w mózgu ludzkim. Stanowi pozytywny, chociaż słaby dowód na ich rolę w zaburzeniach neuroprzebieżności w ChA. Niemniej oryginalną obserwacją autorki było wykazanie, że aktywacja receptorów S1Pr fingolimodem może przywracać obniżoną ekspresję genów wyżej wymienionych białek regulatorowych w hipokampie myszy APP+. Słabą stroną tej hipotezy był brak zmian poziomów odpowiednich białek. Przez to nie tłumaczy ona mechanizmu ewidentnego uszkodzenia fenotypu neuroprzebieżniczego w modelu FVB-Tg ChA i w ChA u ludzi. Mimo tych zastrzeżeń wyniki i ich interpretacja noszą cechy oryginalności i mogą otwierać nowe kierunki badawcze.

W wielu miejscach dyskusji są przytaczane statystycznie nieistotne zmiany badanych parametrów w pracy własnej jak i w licznych danych literaturowych, jako argumenty wspierające lub wykluczające jakąś tezę. Nie mają one znaczenia merytorycznego w

tłumaczeniu mechanizmu fosforylacji AKT. Dotyczy to min. 7-mio krotnego użycia sformułowań o nieznamiennych zmianach w ekspresji genów i fosforylacji białek BAD, AKT, GSK3 $\beta$  jako argumentów na stronach 108-114, dotyczących mechanizmów zachowania żywotności komórek w starzejącym się mózgu. Może to świadczyć o wysokim stopniu trudności w uzyskaniu przez wielu badaczy powtarzalnych wyników dotyczących wpływu na receptory sfingozyno-1-P.

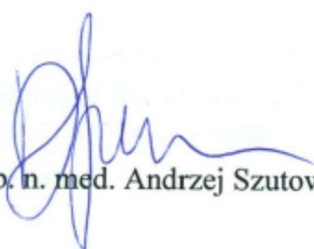
Słabą stroną wyników badań tau na mózgach jest wykazanie podobnego stopnia akumulacji i różnych fosforylacji tau u myszy APP- i APP+. Jedyńm wynikiem, różnicującym oba genotypy jest izolowany wzrost fosforylacji p416Tau u 12-miesięcznych APP+. Do pełnej interpretacji wyników potrzebne byłyby porównawcze oznaczenia poziomów tau/tau-p w mózgach 3 i 12 miesięcznych.

Na stronach 107-8 autorka zawarła dość szczegółowy opis danych literaturowych dotyczących wpływu fingolimodu na proteomikę mózgu. Ułatwiło to interpretację własnych dot. granicznie dodatniego wpływu fingolimodu na szereg genów i ich białek postsynaptycznych u myszy APP+. Podkreśliła też, brak wpływu tego związku na niektóre parametry zgodne z danymi literaturowymi. Jednak, brak odnośników do odpowiednich rycin (zgodnie z obecną „modą”) znacznie utrudnia rozróżnienie wyników własnych od literaturowych.

Wiarygodność przedstawianych w pracy danych dotyczących negatywnego wpływu A $\beta$ <sub>0</sub> powodującego, spadki potencjału błonowego mitochondriów oraz żywotności pod wpływem tego peptydu. Nie wiemy jednak, jakie są różnice względne w wielkości tych parametrów w obu grupach komórek. Wiadomo również, że ekspresja genów w różnych typach komórek mózgu może się znacznie różnić. Tutaj znowu uwidacznia się brak odpowiednich eksperymentów porównawczych między HT22 i BV2, które można było wykonać przez odpowiednie zestawienie próbek. Nie zbadano również wpływu samych agonistów na te komórki w nieobecności A $\beta$ <sub>0</sub>. Autorka potwierdziła również dobrze udokumentowane dane dotyczące aktywacji mikrogleju BV2 przez A $\beta$ <sub>0</sub> w postaci wzrostu ekspresji w mikrogleju prozapalnych genów *IL1b, IL6* i inhibicji prozapalnego *IL-18*. Kompatybilne z literaturą są również wyniki wykazujące względnie małe odpowiedzi komórek neuronalnych HT22. Oryginalną obserwacją jest natomiast nasilenie przez agonistów genów wszystkich receptorów S1PR prozapalnego działania A $\beta$ <sub>0</sub> -wzrostu ekspresji genu *IL-1b*. Z drugiej strony brak jest bezpośredniego dowodu w postaci oznaczeń samych interleukin. Tym  $\beta$  autorka potwierdziła, że receptory S1PR partycypują w nasilaniu reakcji zapalnej mikrogleju poprzez zwiększenie transkrypcji odpowiednich genów *IL*. Interpretacja badań ekspresji genów *BAD, BAX* i *Bcl2* pod kątem ich wpływu pro lub antyapoptotycznego stwarza autorce sporo trudności głównie ze względu na względnie małe wahania tych parametrów pozostające ciągle w granicach błędu metody. Świadczy o tym również brak korelacji między parametrami żywotności, a względnymi zmianami *Bcl2, BAD* i *BAX*. Wobec tych wątpliwości, końcowe stwierdzenie autorki, że koniecznym warunkiem do ujawnienia antyzapalnego pobudzenie S1PR-ów jest jednoczesna aktywacja kilku z nich.

W sumie autorka przedstawiła kilka oryginalnych wyników dotyczących grup białek: związanych z proteomiką i genomiką sygnalizacji pęcherzykowej, akumulacją białek tau, w

mózgach myszy TGg i białek, wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału. Przedstawiła próbę umieszczenia ich w modelu zmian neurodegeneracyjnych związanych z A $\beta$ , pomimo braku pewnych dowodów, związanych z zależnością od wieku. Praca napisana jest dobrym językiem naukowym, ma logiczny układ który umożliwia łatwe śledzenie jej kolejnych etapów. Dlatego uważam, że pomimo zastrzeżeń, rozprawa doktorska Pani mgr Igi Wieczorek pt. „Analiza działania modulatorów receptorów dla sfingozyno-1-fosforanu w eksperymentalnych modelach choroby Alzheimera” spełnia wymagania stawiane pracom na stopień doktora. W związku z tym składam do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego wniosek o dopuszczenie Pani Igi Wieczorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Andrzej Szutowicz

Gdańsk 4 września, 2023