

**Prof. dr hab. inż. Andrzej Okruszek**

Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Instytut Biochemii Technicznej, Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź  
E-mail: [andrzej.okruszek@p.lodz.pl](mailto:andrzej.okruszek@p.lodz.pl)

## **R E C E N Z J A**

### **rozprawy doktorskiej mgr Danuty Piotrkowskiej „Wyciszanie genów cdk2/4/6 za pomocą RNAi w celu neuroprotekcji”**

Choroby neurodegeneracyjne, a wśród nich choroba Alzheimera należą do najpoważniejszych schorzeń współczesnego społeczeństwa. Cechą procesu chorobowego jest stopniowe i nieodwracalne zaburzenie homeostazy organizmu u osób starszych (zwykle powyżej 65 roku życia), charakteryzujące się stopniowym zanikiem pamięci oraz funkcji poznawczych. Charakterystycznym objawem choroby Alzheimera jest demencja oraz ogólne pogorszenie zdolności intelektualnych, zaburzenie orientacji przestrzennej oraz upośledzenie mowy. Prowadzi to do niesamodzielności i uzależnienia od opiekuna. Zasadniczą rolę w rozwoju choroby odgrywają zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Ocenia się, że na świecie choruje na chorobę Alzheimera ok. 30 mln osób a w Polsce ok. 250 tys., przy czym szacuje się, iż liczby te do 2050 roku mogą ulec potrojeniu ze względu na starzenie się społeczeństw w krajach uprzemysłowionych.

Do tej pory nie poznano w pełni patogenezy choroby Alzheimera, choć istnieje kilka hipotez dotyczących jej źródeł, takich jak np. hipoteza kaskady amyloidowej czy hipoteza rozregulowania cyklu komórkowego w post-mitotycznych neuronach. Z weryfikacją tej ostatniej hipotezy związane są badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

Głównym celem, jaki postawiła sobie Autorka przedstawionej do oceny pracy było sprawdzenie, czy obniżenie stopnia ekspresji genów kinaz cyklino-zależnych cdk2, cdk4 oraz cdk6 w komórkach neuronalnych, których aktywacja następuje podczas podziału komórek, może doprowadzić do zahamowania cyklu komórkowego i uchronić komórki przed apoptozą (działanie neuroprotekcyjne). Reaktywacja cyklu komórkowego w niedzielących się neuronach (znajdujących się normalnie w fazie G0) u pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera prowadzi bowiem do wejścia tych komórek na szlak apoptozy. Planowane było również zbadanie konsekwencji obniżenia poziomu ekspresji wymienionych genów kinaz cyklino-zależnych na cykl komórkowy badanych komórek oraz na poziom ekspresji wybranych genów cyklu komórkowego i kaskady amyloidowej, szczególnie w warunkach stresu oksydacyjnego. Badania te stanowią fragment prac nad inhibicją ekspresji genów związanych z fenotypem choroby Alzheimera prowadzonych od kilkunastu lat w zespole naukowym prof. Barbary Nawrot, promotora niniejszej pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest obszernym, liczącym 155 stron opracowaniem, podzielonym na kilka zasadniczych części, obejmujących wstęp literaturowy, badania własne, podsumowanie otrzymanych wyników, opis zastosowanych metod badawczych oraz wykaz cytowanej literatury. We wstępie sformułowany został również cel pracy i wykaz zadań cząstkowych przyjętych do

realizacji.

W 35-stronicowym „Przeglądzie literatury” Doktorantka omówiła w zwięzły sposób zagadnienia związane bezpośrednio z tematyką rozprawy takie jak charakterystyka i etiologia choroby Alzheimera, cykl komórkowy, wyciszanie ekspresji genów metodą interferencji RNA, stres oksydacyjny, metody wprowadzania terapeutycznych kwasów nukleinowych do komórek neuronalnych, niekodujące RNA w mózgu, wykorzystanie interferencji RNA w terapii chorób neurodegeneracyjnych oraz perspektywy zastosowania RNAi w terapii. W opinii recenzenta przedstawione zagadnienia ściśle wiążą się problematyką badań stanowiących zasadniczą część dysertacji. Zawarte treści oraz sposób ich prezentacji oceniam pozytywnie. Ilustracje są dobrze dobrane i wykonane bez zarzutu.

Opis „Badań własnych”, stanowiący zasadniczą część pracy (64 strony) został podzielony na sekcje dotyczące realizacji poszczególnych etapów projektu badawczego. Najważniejsze elementy rozprawy i wyniki osiągnięte przez Doktorantkę można podsumować w następujący sposób:

- Obiektem badań były hodowle komórek ludzkich HeLa (nowotworowe) i SH-SY5Y (neuralne), mysich Neuro2a (neuralne) i szczurzych PC12 (nowotworowe będące modelem komórek neuronalnych);
- Zaprojektowano i zsyntetyzowano we własnym zakresie 21 dwuniciowych cząsteczek siRNA skierowanych na geny cyklino-zależnych kinaz cdk4, cdk6 oraz cdk2 obecne w wymienionych komórkach;
- Stosując półilościowy RT-PCR, RT-PCR w czasie rzeczywistym oraz technikę Western blotting określono właściwości wyciszające otrzymanych dupleksów siRNA na poziomie 60-90% (gen cdk4), 80-88% (gen cdk6) oraz 60-90% (gen cdk2); transfekcję prowadzono z użyciem lipofektaminy i/lub metodą nukleofekcji;
- W oparciu o sekwencje najbardziej aktywnych cząsteczek siRNA wobec genów cdk4 oraz cdk6 zaprojektowano i zsyntetyzowano 9 oligonukleotydów kodujących cząsteczki shRNA, które następnie umieszczono w plazmidzie ekspresyjnym pSilencer 2.0-U6 i wprowadzono do komórek HeLa, Neuro2a oraz PC12. Stwierdzono, że otrzymane cząsteczki shRNA wykazują słabszą aktywność wyciszającą w stosunku do wybranych genów niż macierzyste dupleksy siRNA (50-60% wyciszenia genu cdk4 oraz 60-70% wyciszenia genu cdk6);
- W komórkach HeLa i SH-SY5Y z wyciszoną ekspresją genu cdk4 zbadano poziom mRNA cykliny A, cykliny E oraz PCNA stwierdzając jego obniżenie w odniesieniu do kontroli o ok. 30% (HeLa) lub o 60-90% (SH-SY5Y), co wskazuje na zatrzymanie badanych komórek w fazie G1 cyklu komórkowego;
- W komórkach SH-SY5Y z wyciszoną ekspresją genu cdk4 zbadano poziom mRNA białek APP, PS1 oraz BACE1 wykazując obniżenie poziomu ekspresji genów BACE1 i PS1 w odniesieniu do kontroli i brak zmiany dla genu APP, co może sugerować neuroprotekcję tych komórek;
- Metodą cytometrii przepływowej wykazano, że w populacji komórek HeLa i SH-

SY5Y z wyciszoną ekspresją genu cdk4 więcej komórek znajduje się w fazie G0/G1 niż w przypadku komórek kontrolnych;

- Zbadano podatność komórek HeLa i SH-SY5Y z obniżoną ekspresją genu cdk4 na stres oksydacyjny (generowany za pomocą nadtlenu wodoru) wykazując, że wyciszenie genu cdk4 działa ochronnie na badane komórki (mniejsza ilość komórek w fazie S i G2M i większa w fazie G0/G1) w warunkach stresu oksydacyjnego, uważanego za główny czynnik uszkadzający w chorobie Alzheimera;
- Stwierdzono, iż w komórkach Neuro2a wyciszenie genu cdk4 działa ochronnie na komórki poddane stresowi oksydacyjnemu, co objawia się obniżeniem stopnia indukcji apoptozy wyrażonym przez spadek aktywności kaspaz 3 i 7;
- Metodą cytometrii przepływowej przeprowadzono analizę zmiany faz cyklu komórkowego w komórkach HeLa z nadekspresją inhibitorów kinaz cyklino-zależnych cdk2, cdk4 i cdk6 (odpowiednio, p16, p18 i p21) stwierdzając jedynie nieznaczne zmiany populacji komórek, z niewielkim wzrostem ich populacji w fazie G0/G1;
- Stosując komórki HeLa oraz Neuro2a wykazano, iż cząsteczki siRNA w postaci kompleksu z peptydem RVG-9R są transportowane jedynie do komórek neuronalnych (Neuro2a) zawierających receptory nikotynowe. W odróżnieniu od tego uniwersalny odczynnik transportujący – lipofektamina - nie wykazuje neuroselektywności wprowadzając efektywnie kwasy nukleinowe do obu typów komórek.

Część rozprawy dotycząca badań własnych Doktorantki została napisana w sposób niezwykle precyzyjny, co jest szczególnie istotne w przypadku dużej liczby prezentowanych doświadczeń. Wszystkie eksperymenty są ilustrowane zdjęciami żeli elektroforetycznych oraz wydrukami z cytometru przepływowego. Wyniki pomiarów ilościowych (np. analizy densytometrycznej prążków w żelach elektroforetycznych) przedstawiono w postaci standardowych schematów blokowych z zaznaczeniem dokładności pomiarów. Przedstawiono pełne sekwencje nukleotydowe obu nici zszyntetyzowanych dupleksów siRNA skierowanych na wyciszenie ekspresji genów poszczególnych cyklino-zależnych kinaz oraz otrzymanych wstawek genów shRNA przeznaczonych do umieszczenia w plazmidzie ekspresyjnym pSilencer 2.0-U6. Wszystkie oligorybonukleotydy wykazały się odpowiednią czystością (analiza elektroforetyczna) i właściwymi masami cząsteczkowymi (analiza MALDI TOF MS). Otrzymane rezultaty badań przedstawiono w postaci 65 rysunków oraz 16 tabel. Załączony materiał ilustracyjny znakomicie uzupełnia dane przedstawione w tekście rozprawy. Jego dobór, czytelność i estetyka nie budzi zastrzeżeń. Wszystkie podrozdziały zawierają również dyskusję otrzymanych wyników oraz (w niektórych przypadkach) sugestie dotyczące dalszych kierunków badawczych. Otrzymane wyniki oraz wnioski wynikające z przeprowadzonych badań zostały w zwięzły sposób podsumowane w kilkustronicowym podrozdziale zatytułowanym „Podsumowanie i wnioski”.

Ważnym uzupełnieniem opisu i dyskusji badań Doktorantki jest 24-stronicowy rozdział „Materiały i metody”, w którym zostały opisane stosowane odczynniki

- W badaniu podatności na stres oksydacyjny transfekcja komórek Neuro2a dupleksami siRNA była prowadzona albo jednym (si4 skierowanym cdk4), albo zespołem kilku dupleksów skierowanych na trzy geny (cdk2, cdk4, cdk6) (str. 88). Wbrew temu co sugeruje Autorka można tu mówić tylko o działaniu ochronnym wyciszenia genu cdk4 a nic nie można powiedzieć o wpływie wyciszenia genów cdk2 i cdk6;
- Na str. 120 (i w kilku innych miejscach) Doktorantka pisze o ...”wodzie podwójnie destylowanej milliQ”. Jest to błędne, ponieważ do otrzymywania wody milliQ nie jest stosowana destylacja a wielokrotna filtracja (odwrotna osmoza, wymiana jonowa, filtr węglowy, filtr Organex);
- W opisie syntezy oligorybonukleotydów na str. 122 nie podano grupy blokującej w pozycji 2' rybozy.

Powyższe uwagi krytyczne (niekiedy dyskusyjne) nie zmieniają ogólnej oceny przedstawionej do recenzji dysertacji, która jest bardzo dobra. Wyrażam opinię, iż recenzowana praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i z pełnym przekonaniem wnoszę o dopuszczenie jej Autorki, mgr Danuty Piotrkowskiej, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysokie walory merytoryczne oraz techniczne recenzowanej rozprawy doktorskiej wnoszę o wyróżnienie jej Autorki, mgr Danuty Piotrkowskiej.

Łódź, 11.02.2014 r.

