



instytut biologii doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Prof. dr hab. Urszula Wojda
Kierownik Laboratorium Badań Przedklinicznych
o Podwyższonym Standardzie, Centrum Neurobiologii,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel: (4822) 5892578; email: u.wojda@nencki.gov.pl

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Danuty Piotrkowskiej pt. „Wyciszanie genów cdk2/4/6 za pomocą RNAi w celu neuroprotekcji

Choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimera (AD) są narastającym problemem medycznym i stanowią jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla wysoko rozwiniętych, starzejących się demograficznie społeczeństw. Ponieważ brak obecnie skutecznych metod leczenia przyczynowego AD, choroba ta jest przedmiotem wielu badań. Badania te są szczególnie trudne, ponieważ neurodegeneracja jest złożonym procesem, przebiegającym z zaburzeniem wielu funkcji komórkowych, które jak dotąd nie są w pełni poznane. Szczególne zainteresowanie i nadzieje wiąże się z badaniami molekularnych podstaw neurodegeneracji. Na bazie tej wiedzy rozwijane są nowe strategie terapeutyczne. Chociaż w przypadku AD jako główne punkty uchwytu leków badano białka związane z powstawaniem beta-amyloidu i nadmiernie ufosforylowanego białka tau, coraz większe znaczenie w patogenezie tego schorzenia przypisuje się zaburzeniom białek regulujących cykl komórkowy. Co więcej, wobec negatywnych wyników prób klinicznych z lekami ukierunkowanymi na beta-amyloid, poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych ma szczególne znaczenie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Danuty Piotrkowskiej podejmuje trudne wyzwanie poszukiwania nowej strategii terapeutycznej neurodegeneracji skierowanej na białka cyklu komórkowego. Zadaniem tej pracy była weryfikacji hipotezy zakładającej, że hamowanie cyklu komórkowego mogłoby zapobiegać indukcji apoptozy i w ten sposób działać neuroprotekcynie. W pracy testowano dwie strategie hamowania cyklu komórkowego: poprzez wyciszenie metodą interferencji RNA (RNAi) genów kinaz cyklinozależnych: cdk2, cdk4 i cdk6 lub poprzez nadekspresję białkowych inhibitorów kinaz cyklinozależnych: p16, p18, p21. Neuroprotekcynny potencjał strategii RNAi zbadano w mysich i ludzkich komórkach neuroblastomy poddanych stresowi oksydacyjnemu z zastosowaniem H₂O₂. Porównano także wydajność transfekcji komórek neuronalnych i wyciszenia genu cdk4 z zastosowaniem dwóch nośników kwasów nukleinowych: lipofektaminy oraz neurospecyficznego peptydu RVG-9R. Podsumowując, temat pracy jest nowatorski, bardzo istotny poznawczo i zarazem o dużym potencjale aplikacyjnym, ponieważ podejmuje kwestię możliwości modyfikowania cyklu komórkowego i apoptozy z zastosowaniem najnowszych technik biologii molekularnej.

Praca Pani mgr Piotrkowskiej została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi pod kierunkiem pani prof. dr hab. Barbary Nawrot. Zespół prof. Nawrot od lat z sukcesami prowadzi badania w zakresie terapii genowej, specjalizując się w projektowaniu i udoskonalaniu oligonukleotydowych inhibitorów ekspresji genów związanych z patogenezą choroby Alzheimera. Na bazie tego bogatego doświadczenia zostały podjęte i skutecznie przeprowadzone badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Opis formalny rozprawy

Dysertacja liczy 155 stron. Na początku, co cenne, zamieszczono opis dorobku naukowego doktorantki wraz ze spisem publikacji z Jej współautorstwem (2 opublikowane artykuły, w tym jeden przeglądowy, jeden manuskrypt w recenzji). Następnie znajdujemy Wykaz stosowanych skrótów i symboli wraz z zasadami pisowni genów i białek, Spis treści oraz Streszczenie zawierające sformułowanie celów pracy. Dalej następuje obszerny Wstęp (42 strony), bogato ilustrowany opis wyników, po którym zamieszczono zwięzłe i klarowne, 6-stronicowe Podsumowanie. W tej części zawarto także wnioski i bardzo krótką dyskusję znaczenia rezultatów pracy. Spis materiałów i metod (29 stron) wraz z opracowaniem statystycznym danych oraz spis pozycji literaturowych zamykają rozprawę. Praca ma przejrzystą konstrukcję, którą uzupełniają dobrze dobrane i opracowane schematy, tabele i ryciny. Bibliografia liczy 155 pozycji, które zostały właściwie wyselekcjonowane, w tym uwzględniono prace opublikowane w ostatnich latach.

Ocena Merytoryczna

Wstęp literaturowy składa się z dwóch tematycznych części: pierwsza wprowadza czytelnika w problematykę molekularnego podłoża choroby Alzheimera i przedstawia główne hipotezy patogenezy, ze szczególnym uwzględnieniem hipotezy cyklu komórkowego. Autorka umiejętnie potrafiła połączyć wiedzę na temat narastającego w przebiegu AD stresu oksydacyjnego, skutkującego uszkodzeniami kwasów nukleinowych, lipidów i białek, z możliwymi drogami sygnałowymi prowadzącymi od tych zmian do zaburzeń białek regulujących cykl komórkowy i w efekcie do ich śmierci. W drugiej części omówiono bardzo wyczerpująco zjawisko interferencji RNA, narzędzia RNAi stosowane do eksperymentalnego wyciszania genów oraz, co bardzo cenne, skutki uboczne i potencjalne zagrożenia związane z zastosowaniem technik RNAi. Zagrożenia te wynikają m.in. ze sposobów i charakteru wektorów służących do wprowadzania kwasów nukleinowych do komórek, w związku z czym w jednym z podrozdziałów dokonano krytycznego przeglądu tych metod, zarówno biologicznych, jak też chemicznych i fizycznych. Wstęp zawiera także przegląd cząsteczek miRNA zidentyfikowanych w takich zaburzeniach neurodegeneracyjnych i psychicznych jak AD, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, schizofrenia i autyzm. Mimo że te informacje nie mają bezpośredniego związku z badaniami podjętymi w niniejszej pracy, ich zamieszczenie poszerza horyzont o najnowsze dane dotyczące cząsteczek miRNA jako potencjalnych markerów i celów terapeutycznych w neurodegeneracji. Wstęp kończy krótki podrozdział podsumowujący wyniki dotychczasowych prób terapeutycznych z zastosowaniem RNAi w chorobach neurodegeneracyjnych oraz krótkie omówienie dalszej perspektywy wykorzystania interferencji RNA w terapii, ze zwróceniem uwagi na problemy i bariery do pokonania w tym zakresie, m.in. na potrzebę rozwoju metod neurospecyficznego dostarczania narzędzi RNAi. Tak postawione zagadnienie jest doskonałym wstępem do badań, jakie podjęła doktorantka.

Lektura Wstępu pozwala stwierdzić, że doktorantka dysponuje szeroką wiedzą w uprawianej dziedzinie. Szczególnie dużą wiedzę teoretyczną i metodyczną doktorantki dokumentuje część Wstępu poświęcona interferencji RNA. Informacje naukowe zostały bardzo dobrze wyselekcjonowane i podane w odpowiedniej kolejności, stanowiąc właściwe wprowadzenie do części eksperymentalnej. Przejrzyście zarysowano przy tym problemy badawcze podjęte w części eksperymentalnej dysertacji.

Badania własne Część eksperymentalna pracy jest prawidłowo opisana i zilustrowana. Sposób opisu badań świadczy o bardzo dobrym opanowaniu i organizacji złożonego warsztatu badawczego. Pierwsza część pracy polegała na wytworzeniu odpowiednich narzędzi interferencji RNA (seria dupleksów siRNA i rekombinowanych plazmidów zawierających wstawki shRNA). Następnie wykazano skuteczność interferencji i hamujący wpływ tych narzędzi na cykl komórkowy ludzkich, mysich i szczurzych neuronalnych linii komórkowych w hodowli. Kolejnym ważnym zadaniem było zbadanie podatności na stres oksydacyjny komórek, w których wyciszono gen *cdk4*.

Uznanie budzi zakres podjętych prac. Doktorantka zaprojektowała i uzyskała łącznie 21 cząsteczek siRNA skierowanych na ludzkie, mysie i szczurze geny kinaz cyklozależnych *cdk2*, *cdk4* i *cdk6*. Zsyntetyzowano wszystkie nici sensowne i antysensowne i poprzez hybrydyzację komplementarnych nici otrzymano cząsteczki siRNA, odpowiednio monitorując jakość uzyskanych cząsteczek. Aktywność interferencyjną wszystkich cząsteczek siRNA doktorantka oceniła zarówno na poziomie mRNA, jak też białek cyklozależnych kinaz w kilku liniach komórkowych, w tym w 3 liniach neuronalnych: ludzkiej (SH-SY5Y), mysiej (Neuro2a) oraz szczurzej (PC12). Na tej podstawie wyselekcjonowane zostały najbardziej aktywne cząsteczki siRNA, m.in. si1, który wyciszał ekspresję ludzkiego genu *CDK4* w około 90%. Następnie, w oparciu o sekwencje siRNA, doktorantka zaprojektowała i uzyskała plazmidy zawierające wstawki shRNA. Jej doświadczenia wykazały jednak, że cząsteczki shRNA cechuje słabsza aktywność interferencyjna wobec badanych genów niż odpowiadające im cząsteczki siRNA.

Stosując uzyskane narzędzia (cząsteczki siRNA), doktorantka otrzymała szereg znaczących wyników. Wykazała, że obniżenie poziomu ekspresji genu *CDK4* w komórkach ludzkich nieneuronalnych (HeLa) jak też w komórkach neuroblastomy (SH-SY5Y) skutkuje obniżeniem poziomu ekspresji białek charakterystycznych dla późniejszych faz cyklu komórkowego: cykliny A, cykliny E i PCNA. Co ciekawe, doktorantka sprawdziła, że obniżenie ekspresji genu *CDK4* powodowało także bardzo istotne obniżenie ekspresji genów kodujących białka amyloidogennej proteolizy APP (*BACE1* i *PS1*), bez wpływu na poziom ekspresji genu *APP*.

Następnie, analizując fazy cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej, doktorantka wykazała, że wyciszenie ekspresji genu *CDK4* w komórkach ludzkich (HeLa i neuroblastoma SH-SY5Y), zgodnie z przewidywaniami, hamuje progresję cyklu komórkowego i prowadzi do zatrzymania części komórek w fazie G1 cyklu (przyrost na poziomie około 8 %). Najciekawszy wynik pracy, w aspekcie potencjału terapeutycznego badanych siRNA, to demonstracja, że wyciszenie ekspresji kinazy *cdk4* ma pewne działanie ochronne wobec ludzkich komórek neuronalnych. Doktorantka traktowała komórki nadtlenkiem wodoru, który wywołuje stres oksydacyjny poprzez generowanie reaktywnych form tlenu. W serii eleganckich eksperymentów doktorantka najpierw zbadała profil cyklu komórkowego i poziom odpowiedzi apoptotycznej w funkcji wzrastających stężeń H_2O_2 . Wykazała, że komórki neuroblastomy SH-SY5Y są znacznie bardziej wrażliwe na stres oksydacyjny, niż komórki linii HeLa. Po dobraniu zakresu stężeń H_2O_2 tak, aby uniknąć indukcji intensywnej śmierci komórek, autorka analizowała profile cyklu komórkowego w komórkach z wyciszonym genem *CDK4*. Zaobserwowała, że po obniżeniu ekspresji genu

cdk4, w populacji komórek traktowanych H₂O₂ zmniejsza się nieznacznie (o ok. 2-3%) zawartość komórek w fazie S i G₂/M, a zwiększa w fazie G₀/G₁. Co ważne, w komórkach HeLa zaobserwowano nieznaczny (2-5%) spadek liczby komórek apoptotycznych. Wyniki te sugerują, że wyciszenie genu *cdk4* może działać ochronnie na komórki w warunkach stresu oksydacyjnego, uważanego za główny czynnik uszkodzający w chorobie Alzheimera.

Ponadto, doktorantka wykazała, że metoda RNAi z zastosowaniem siRNA jest bardziej skuteczna w modyfikacji progresji cyklu komórkowego niż nadekspresja inhibitorów kinaz cyklino-zależnych (p16, p18, p21). Dokonano także porównania wydajności wprowadzania do komórek siRNA i wyciszenia ekspresji genu *cdk4* z zastosowaniem niespecyficznego nośnika lipidowego Lipofectamine 2000 oraz neurospecyficznego peptydu RVG-9R. Doktorantka potwierdziła neurospecyficzność peptydu RVG-9R i wyciszenie docelowego genu *cdk4*. Drugi badany nośnik kwasów nukleinowych, Lipofectamine 2000, nie działał neuroselektywnie, jednak z większą wydajnością wprowadzał siRNA do obu typów komórek.

Można stwierdzić, że doktorantka wytworzyła ważne i skuteczne narzędzia do wyciszenia ekspresji cyklinozależnych kinaz, które mogą być stosowane w wielu dalszych badaniach i strategiach terapii nie ograniczających się do patogenezы chorób neurodegeneracyjnych, ale także takich schorzeń jak nowotwory. Uzyskane wyniki poszerzyły wiedzę na temat możliwości i znaczenia modulacji cyklu komórkowego z zastosowaniem RNAi w komórkach nieneuronalnych i neuronalnych.

Materiały i metody stosowane w pracy zostały opisane w sposób zwięzły, poprawnie, a zarazem na tyle szczegółowo, że mogą stanowić cenne źródło informacji dla innych badaczy. Opis materiałów zawiera bardzo starannie i przejrzysto opracowane wykazy stosowanych odczynników i roztworów, a nawet szczegółowy wykaz używanej aparatury i stosowanego oprogramowania. W celu realizacji zadań badawczych, doktorantka musiała opanować cały wachlarz różnorodnych i wymagających metod biochemii, biologii molekularnej i biologii komórki, takich jak projektowanie i przygotowanie oligonukleotydów siRNA, klonowanie i analiza elektroforetyczna DNA, transformacja bakterii i izolacja plazmidów, metody hodowli i transfekcji komórek eukariotycznych, metody izolacji RNA i białka z lizatów komórkowych, ocena poziomu transkryptów z zastosowaniem RT-PCR i *real time* PCR, ocena poziomu białka z zastosowaniem techniki SDS-PAGE i immunoblotting, a wreszcie metody cytometrii przepływowej do oceny faz cyklu komórkowego. Opis metod nie pozostawia wątpliwości, że doktorantka jest bardzo sprawnym i doświadczonym eksperymentatorem.

Podsumowując, dysertacja ma przejrzysty układ, doskonale wprowadza w problematykę badań i dobrane metody, a także bardzo systematycznie i klarownie przedstawia wyniki i wypływające z nich wnioski. W rozprawie nie występuje natomiast oddzielna i bardziej rozwinięta Dyskusja. Szkoda, bo umiejętność szerszej interpretacji znaczenia uzyskanych danych jest ważnym kryterium dojrzałości naukowej, a uzyskane w pracy wyniki dostarczają bogatego materiału do formułowania dalszych pytań. Zdaniem recenzenta, postęp naukowy zachodzi w równej mierze przez udzielanie odpowiedzi, jak przez stawianie nowych pytań, wynikających z prowadzonych doświadczeń.

Uwagi krytyczne

1. We Wstępie na str. 15 autorka omówiła hipotezę kaskady amyloidowej i stwierdziła, że hipoteza ta nie wyjaśnia pierwotnych źródeł tej choroby. Brak jednak krótkiego choćby wskazania na przesłanki uzasadniające takie stwierdzenie.

2. Dalej autorka stwierdza, że w związku z ograniczeniami hipotezy kaskady amyloidowej zaproponowano hipotezę cyklu komórkowego, wskazującą, że do rozwoju choroby Alzheimera dochodzi dużo wcześniej, jeszcze przed pojawieniem się typowych zaburzeń. Należałoby w tym miejscu wspomnieć też o innych alternatywnych hipotezach przyczyn patogenezy AD, takich jak m.in. hipoteza dyshomeostazy wapniowej czy hipoteza mitochondrialna.

3. Zastrzeżenia budzi koncepcja rozdziału 2.3 Wstępu, str. 17. Opisano tu wpływ beta-amyloidu na wzrost poziomu stresu oksydoredukcyjnego, aktywację szlaków mitogennych i aktywację apoptozy w mózgu w AD. O ile istotnie, jest wiele danych wskazujących na takie efekty beta-amyloidu, sposób przedstawienia tego zagadnienia przeczy hipotezie cyklu komórkowego. Opis wspiera przeciwną sekwencję wydarzeń, niż proponowana w hipotezie cyklu. Tekst odzwierciedla raczej wydzwięk referencji, z których korzystała autorka, pisanych z perspektywy kaskady amyloidu, gdzie amyloid uznawany jest jako przyczyna wszystkich zaburzeń. Zabrakło komentarza, że patogeneza AD opiera się na wielu dodatkich sprzężeniach zwrotnych. Amyloid może pojawiać się wskutek pogłębiającego się stresu oksydoredukcyjnego i zaburzeń cyklu komórkowego, po czym zwrótnie stymuluje neurodegenerację. Brak takiego komentarza obniża znaczenie terapii przyczynowych ukierunkowanych na cykl komórkowy jako zjawisko wtórne wobec beta-amyloidu

4. W komórkach ludzkiej neuroblastomy po wyciszeniu ekspresji genu kinazy *CDK4* za pomocą cząsteczki siRNA (si1) doktorantka zaobserwowała bardzo znaczne obniżenie poziomu mRNA dla PS1 i beta-sekretazy (dla PS1 maksymalnie około 50%, dla beta-sekretazy około 90%). To bardzo interesujący wynik, implikujący możliwe neuroprotektoryjne działanie tego siRNA. Brakuje jednak komentarza, czy są znane szlaki sygnalizacji, które mogłyby odpowiadać za powiązanie białek kontroli cyklu z białkami proteolizy APP?

5. Ponadto, trzeba zauważyć, że osiągnięte zahamowanie cyklu komórkowego i obniżenie poziomu ekspresji PS1 i beta-sekretazy w komórkach ludzkiej neuroblastomy nie zapewniło znaczącej ochrony komórek przed indukcją apoptozy pod wpływem nadtlenu wodoru. Jak autorka mogłaby to skomentować?

6. Odpowiedź na traktowanie komórek H_2O_2 odróżnia znacząco komórki nieneuronalne HeLa od komórek neuronalnych. Na traktowanie H_2O_2 w stężeniach w zakresie 150-200 μM komórki HeLa reagowały przechodzeniem z fazy G_1 do S oraz G_2M , a dopiero w wyższych stężeniach H_2O_2 obserwowano intensywną apoptozę. Komórki neuroblastomy natomiast już w 100 μM H_2O_2 głównie aktywowały proces apoptozy, a przy niższych stężeniach H_2O_2 przejawiały tendencję do zatrzymania się w fazie G_1 (rozdział 5.3). Ten wynik jest zastanawiający i wyraźnie inny, niż zakłada hipoteza cyklu komórkowego w odniesieniu do dojrzałych, postmitotycznych neuronów, które w warunkach stresu wydają się najpierw reaktywować cykl komórkowy, a dopiero wtórnie apoptozę. W tym świetle należy zauważyć, że wnioski z tych badań powinny być wyciągane ostrożnie, ponieważ badano komórki neuroblastomy, a zatem komórki proliferujące, przeciwnie do dojrzałych neuronów mózgu. Ważnym dalszym etapem podjętych badań byłyby analogiczne testy w hodowli neuronów pierwotnych myszy lub szczura. Ich dopełnieniem mogłyby być testy w pierwotnych hodowlach neuronalnych z wykorzystaniem zwierzęcych modeli AD.

7. Autorka słusznie stwierdza: „Uzyskane wyniki wskazują, że wyciszenie ekspresji genów kinaz cyklicznych, a w szczególności kinazy *cdk4*, działa ochronnie na komórki w

przypadku zaistnienia stresu oksydacyjnego. Świadczy o tym niższa o 15% aktywność kaspaz 3 i 7 w komórkach z wyciszoną, do poziomu 10%, ekspresją genu *cdk4* (aktywność kaspaz na poziomie 25%) w porównaniu do komórek kontrolnych, potraktowanych kontrolnym siRNA, gdzie kaspazy 3 i 7 były indukowane do poziomu 40%”. Należy jednak zauważyć, że w testach neuroprotektoryjnej roli wyciszenia ekspresji genu kinazy *cdk4* w komórkach ludzkiej neuroblastomy z zastosowaniem analizy faz cyklu komórkowego metodą cytometrii przepływowej uzyskano odmienne dane. Poziom apoptozy w tych analizach określano na podstawie oceny komórek w tzw. fazie SubG₁, która odzwierciedla poziom pofragmentowanego DNA w jądrze w końcowej fazie apoptozy. Wyniki pomiaru apoptozy na podstawie zawartości komórek w fazie SubG₁ są niezgodne z wynikami pomiaru aktywności kaspaz w linii mysiej neuroblastomy i nie potwierdzają neuroprotektoryjnego wpływu RNAi. Należałoby rozbieżność tych wyników przedyskutować.

8. W rozdziale 6, w opisie doświadczenia, w którym porównywano wyciszenie genu *cdk4* oraz jednocześnie 3 genów *cdk2*, *cdk4* i *cdk6* nie jest jasne, jakie były końcowe stężenia siRNA stosowane do transfekcji komórek Neuro2a (100 nM każdy siRNA?). Ma to istotne znaczenie dla interpretacji wyników.

9. Ryc. 18, prawy panel, zdjęcie immunoblotu – obraz poziomu białka *cdk4* w stosunku do białka referencyjnego (beta-aktyny) nie wskazuje na podobny poziom wyciszenia ekspresji, przeciwnie do stwierdzenia, jakie znajduje się w tekście.

10. Str. 10: Jak można wytłumaczyć, że w przypadku zastosowania cząsteczek si10 nie zaobserwowano zmiany w poziomie mRNA, natomiast stwierdzono około 60% spadek poziomu białka CDK4?

11. Str. 63: immunoblotting jest metodą półilościową, nie ilościową.

12. Str. 14: „...preseniliny występują głównie w neuronach” – trudno się w pełni zgodzić; wysoki poziom PS1 jest obserwowany w neuronach, ale białka te są obecne także w wielu innych typach komórek, m.in. w limfocytach.

13. Str. 43, Tabela 3: schizofrenia i autyzm nie należą do klasycznych chorób neurodegeneracyjnych.

Edytorska strona przygotowania rozprawy:

Praca napisana jest w sposób zwięzły, z dyscypliną dla słowa pisanego, a zarazem ciekawie i zrozumiale. Autorka posługuje się na ogół poprawnym, naukowym językiem. To pozytywne wrażenie osłabiają drobne niedociągnięcia redakcyjne, głównie w postaci dość licznych literówek, szczerkowych fragmentów wcześniejszych wersji zdań oraz błędów interpunkcji. Szczegółowy wykaz niedociągnięć edycyjnych przekazałam bezpośrednio Autorce. Elegancję wypowiedzi nieco psują też nieliczne błędy terminologiczne i językowe, wśród których z obowiązku recenzenta muszę tu kilka przykładowo wymienić:

Str. 17: „czynnik mitogeny kinazy białkowej MAPK” - powinno być kinaza białkowa aktywowana mitogenami (Mitogen Activated Protein Kinase).

Str. 14: „ilość komórek” powinno być: liczba komórek.

Str. 13 „...nikotyna obecna w dymie papierosowym rekompensuje częściowo niedobory receptorów nikotynowych wynikające z utraty neuronów w mózgu [9,10]” .

To zapewne skrót myślowy. Ligand/agonista (nikotyna) nie rekompensuje bezpośrednio utraty receptorów nikotynowych.

Str. 44 „Choroba Alzheimerera i choroba Parkinsona to „...choroby neurodegeneracyjne, których prawdopodobieństwo zachorowania wzrasta wraz z wiekiem” błąd stylistyczny; powinno być: „Prawdopodobieństwo zachorowania na takie choroby neurodegeneracyjne jak AD lub PD wzrasta wraz z wiekiem”.

Według klasycznej zasady, praca naukowa powinna zawierać ryciny, nie „rysunki” (rysunek to nazwa potoczna).

Str. 54 i inne: nici sensowne i antysensowne raczej zamiast „nici sensowe i antysensowe”.

W kilku miejscach stosowane są różne nazwy beta-amyloidu (np. str. 14 beta amyloid, str. 15 A β , str. 17 amyloid beta i amyloid β). Zapis powinien być ujednolicony.

Ryc. 15, prawy panel – usterka techniczna, przesunięcie podpisów wobec ścieżek białkowych.

Brak w tekście odniesień do Ryciny 2.

Podsumowanie

Mimo kilku uwag krytycznych, których celem jest głównie zachęta do dalszej dyskusji, wysoko oceniam przedstawioną do oceny dysertację. Praca jest wartościowa, a zaplanowane doświadczenia są przeprowadzone bardzo precyzyjnie. Autorka podjęła się zadania trudnego metodycznie i znaczącego poznawczo, konstruując narzędzia do wyciszania genów cyklinozależnych kinaz i hamowania progresji cyklu komórkowego, a następnie testując potencjał neuroprotektyny tych strategii. Na uznanie zasługuje opanowanie bogatego warsztatu metodycznego. Uzyskane wyniki mają w większości nowatorski charakter i stanowią wkład w rozwój nowych metod terapii chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimerera. Co ważne, rezultaty badań inspirują do formułowania kolejnych pytań, odkrywają zatem nowe horyzonty poznawcze.

Lektura dysertacji wskazuje, że Pani mgr Danuta Piotrkowska ma duże doświadczenie i sprawność eksperymentalną, rozległą wiedzę i umiejętność krytycznej analizy danych, a tym samym zdolność właściwego i samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Stwierdzam, że praca spełnia wszystkie wymogi Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym stawiane rozprawom doktorskim. Z pełnym przekonaniem wnioskuję zatem do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Danuty Piotrkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Urszula Wojda

Warszawa, 28 lutego 2014 r.