

Lublin, 5 sierpnia 2019 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Gerszon pt. „Neuroprotektoryjne właściwości piceatannolu w modelowych układach biologicznych”

Choroby neurodegeneracyjne, w tym choroba Alzheimera, jawią się jako poważne i dynamicznie rosnące zagrożenie kondycji zdrowotnej naszego społeczeństwa, paradoksalnie, również w związku ze wzrostem średniej długości życia, jakiego jesteśmy świadkami. Wobec nikłych perspektyw skutecznego i szybkiego leczenia tego typu schorzeń, wynikających z dotychczasowych niepowodzeń, profilaktyka wydaje się być obiecującym kierunkiem aktywności w celu zapewnienia funkcjonalności komórek układu nerwowego w okresie całego życia. Ważnym elementem strategii profilaktycznych w tym zakresie wydaje się być właściwa dieta oraz suplementacja żywności, mająca na celu dostarczenia do organizmu związków, które mogłyby zapobiegać formowaniu struktur amyloidowych białek, leżących u podstaw wielu chorób neurodegeneracyjnych, zarówno bezpośrednio jak i pośrednio poprzez modulowanie szlaków sygnałowych związanych z tymi schorzeniami. Kluczowym elementem tego typu strategii jest uzyskanie precyzyjnej wiedzy w zakresie mechanizmów molekularnych związanych z neuroprotektoryjną aktywnością związków potencjalnie wartościowych z punktu widzenia ich suplementacji. Praca doktorska pani mgr Joanny Gerszon poświęcona została charakterystyce neuroprotektoryjnej aktywności piceatannolu, naturalnego związku

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



z grupy polifenoli występującego w naszej diecie. W mojej ocenie, w aspekcie wspomnianych powyżej informacji dotyczących przeciwdziałaniu postępowi chorób neurodegeneracyjnych, obrona tematyka pracy doktorskiej jest nie tylko bardzo interesująca ale również bardzo ważna.

Praca doktorska wykonana została pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Rodackiej, w Katedrze Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Rozprawa przedstawiona została w formie zestawienia, tak zwanej „zszywki”, trzech oryginalnych artykułów badawczych oraz trzech artykułów przeglądowych. Prezentacja tych prac, w ramach rozprawy doktorskiej, opatrzona została wstępem zawierającym zestawienie całości dorobku naukowego doktorantki oraz streszczeniami w języku polskim oraz angielskim. Ponadto, rozprawa zawiera załączniki obejmujące oświadczenia współautorów artykułów o ich wkładzie w proces twórczy, który doprowadził do publikacji. We wszystkich artykułach eksperymentalnych oraz w dwóch spośród trzech przeglądowych, doktorantka występuje jako pierwsza autorka oraz, jak wynika z załączonych oświadczeń, jej wkład uznać można jako kluczowy.

Pierwsza z prac zaprezentowanych w ramach zestawienia, opublikowana została w 2018 r. w czasopiśmie Plos One i dotyczy mechanistycznych aspektów oraz funkcjonalnych następstw wiązania piceatannolu do dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Przesłanką do przeprowadzenia cyklu badań z tym właśnie białkiem stały się wyniki obserwacji wskazujące na fakt, iż zagregowane formy GAPDH promują formowanie supramolekularnych struktur peptydów amyloidowych β ($A\beta$), prowadząc do śmierci komórek neuronalnych. Prace eksperymentalne przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych, powszechnie uznanych za reprezentatywne w badaniach schorzeń układu nerwowego, wywodzących się z komórek hipokampalnej linii prawidłowej (mHippoE-18) oraz komórek nerwiaka płodowego (N2a). W pracy, w sposób modelowy, zaangażowano wiele komplementarnych podejść i technik eksperymentalnych dobieranych pod kątem uzyskania pełnych informacji dotyczących mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za oddziaływanie piceatannolu z GAPDH. Wśród nich, kalorymetryczne miareczkowanie izotermiczne (ITC, isothermal titration calorimetry), pomiary potencjału Zeta, dichroizm kołowy (CD), pomiary



spektrofluorometryczne, transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) oraz obliczeniowe badania związane z modelowaniem molekularnym. Pierwszym z ważnych wyników, uzyskanych w ramach cyklu badań opisanego w tej pracy, jest uzyskanie stechiometrii wiązania piceatannolu do GAPDH: 8 cząsteczek polifenolu na białko. Kolejny wynik dotyczy precyzyjnego wskazania miejsc wiązania związku, wraz z identyfikacją oddziaływań chemicznych odpowiedzialnych za ten proces (pomysłowy i bardzo przejrzysty schemat prezentowany w ramach Fig. 7). Kolejnym, szczególnie istotnym wynikiem jest, w moim odczuciu, pokazanie, że piceatannol hamuje modyfikację oksydacyjną białka, promującą formowanie uporządkowanych struktur zagregowanych, wraz z precyzyjnym wskazaniem mechanistycznych elementów tej aktywności.

Druga z cyklu zestawionych prac eksperymentalnych ukazała się w 2019. roku, w czasopiśmie *Journal of Functional Foods*. Praca dotyczy bezpośrednio analizy wpływu piceatannolu na proces agregacji białka GAPDH w komórkach hipokampalnych. Podobnie jak w poprzednim przypadku, wiele technik eksperymentalnych zaangażowanych zostało w procesie badawczym, w celu pełnej charakterystyki układów, między innymi z wykorzystaniem cystometrii przepływowej oraz analizy „western blot”. W sposób szczególny, uwagę przyciągają oraz budzą podziw, prezentowane w ramach tej pracy wyniki uzyskane w oparciu o obrazowanie z zastosowaniem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej (Fig. 3). Barwienie preparatów różnymi specyficznymi znacznikami fluorescencyjnymi oraz precyzyjnie dobierane długości fali wzbudzenia fluorescencji umożliwiły selektywną i wieloaspektową analizę lokalizacji oraz wpływu piceatannolu na indukowane ekspozycją na H_2O_2 efekty na poziomie strukturalnym oraz fizjologicznym. Zasadniczy wniosek jaki wypływa z badań opisanych w ramach tego artykułu dotyczy efektu translokacji GAPDH do jądra komórkowego, obserwowanego szczególnie w warunkach ekspozycji białka na stres oksydacyjny oraz, co bardzo ważne, supresji tego mechanizmu przez piceatannol.

Trzecia z zestawionych prac eksperymentalnych ukazała się w 2017. roku, w czasopiśmie *Journal of Functional Foods*, i dotyczy bezpośrednio osłaniającego efektu piceatannolu przed indukowaną nadtleniem wodoru degradacją neuronów w modelu komórkowym linii N2a (nerwiaka płodowego). Wyniki cyklu badań ogłoszonych w tym artykule wskazują na udział piceatannolu w regulacji ścieżki sygnałowej, istotnej z punktu



widzenia rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Wyniki wskazują na złożony efekt protekcyjny, polegający, między innymi, na zwiększonej ekspresji obraz podniesionej aktywności peroksydaz glutationowych.

Wszystkie zestawione w ramach rozprawy prace eksperymentalne zawierają znaczny ładunek nowości naukowej. Dodatkowym ich walorem jest wyjątkowo przejrzysta i logiczna konstrukcja oraz wysoka jakość grafik. Prezentowane w ramach rozprawy prace przeglądowe zawierają nie tylko omówienie rezultatów z prac eksperymentalnych oraz ich dyskusję w nieco poszerzonym kontekście ale, przede wszystkim, stanowią wartość samą w sobie, prezentując i dyskutując krytycznie wyniki uzyskane w wielu światowych laboratoriach, kształtujące najbardziej aktualne poglądy w obszarze neuroprotekcji związanej z aktywnością związków o niskiej masie cząsteczkowej.

Tak zaawansowane i obszerne opracowanie, jakim jawi się rozprawa doktorska pani mgr Joanny Gerszon, dostarcza wielu nowych oraz cennych informacji, rozbudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. W ramach cyklu badań, których wyniki prezentowane są w publikacji J. Gerszon et al., Plos One, 2018, precyzyjne analizy dichroizmu kołowego wykorzystane zostały do wykazania iż ekspozycja GAPDH na piceatannol, zarówno krótkotrwała jak i długotrwała, nie zaburza struktury drugorzędowej białka (Fig. 4). Ciekaw jestem czy to samo podejście, ewentualnie poszerzone o badania z zastosowaniem spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (FTIR), mogło by być zastosowane do pogłębionej analizy formowania struktur zagregowanych GAPDH w warunkach stresu oksydacyjnego? Wyniki tego typu analiz formowania struktur typu fibryli amyloidowych mogły by być zestawione i porównane z wynikami pomiarów intensywności fluorescencji tioflawiny T, które na pierwszy rzut oka wydają się być metodą monitorowania formowania amyloidów bardziej pośrednią, choć uznawaną i powszechnie stosowaną.
2. Bardzo interesujący wydaje mi się efekt dramatycznie obniżonego poziomu glutationu w komórkach inkubowanych w obecności piceatannolu a następnie poddanych działaniu H_2O_2 (Fig. 6F, J. Gerszon et al., J. Functional Foods, 2017).



Czy znane są może bardziej szczegółowe mechanizmy/szlaki regulacyjne związane z tym, tak wyrazistym efektem?

Formułując konkluzję, chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Joanna Gerszon przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych prac eksperymentalnych. Wyniki tych prac zostały upowszechnione w trzech oryginalnych artykułach badawczych oraz omówione i poddane wieloaspektowej dyskusji w kontekście aktualnej wiedzy w tym obszarze, w trzech pracach przeglądowych. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez panią mgr Joannę Gerszon zawiera rozwiązania istotnych, oryginalnych wyzwań poznawczych spełniając w pełni warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). W oparciu o powyższą konkluzję, uprzejmie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie pani mgr Joanny Gerszon do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony. Biorąc pod uwagę ogromny zakres przeprowadzonych prac badawczych, rangę uzyskanych rezultatów oraz ich bardzo wysoki potencjał, w aspekcie możliwych zastosowań w kierunku opracowania strategii zapobiegania chorobom neurodegeneracyjnym, uprzejmie wnoszę również o uznanie przedmiotowej pracy doktorskiej za wyróżniającą.