



Poznań, dn. 21.09.2023 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Wituckiego pt.: „Epigenetyczny mechanizm deregulacji szlaku sygnałowego mTOR i procesu autofagii w nowych mysich modelach choroby Alzheimera”.

Promotor: Prof. dr hab. Hieronim Jakubowski

Promotor pomocniczy: dr inż. Joanna Suszyńska-Zajczyk

Praca została zrealizowana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz w Katedrze Mikrobiologii, Biochemii i Genetyki Molekularnej na Uniwersytecie Rutgers New Jersey Medical School w Newark, USA.

Homocysteina (Hcy) jest aminokwasem siarkowym, który nie występuje w sekwencji pierwszorzędowej białek. Źródłem Hcy w organizmie człowieka jest dostarczana w pokarmach białkowych metionina. Metabolizm metioniny poprzez syntezę S-adenozylu-L-metioniny (SAM) prowadzi do powstania homocysteiny. W komórce prawie cała Hcy ulega enzymatycznej remetylacji do metioniny w wyniku działania syntazy metioninowej (MS) oraz dwuetapowej reakcji transsulfurylacji, z udziałem β -syntazy cystationiny (CBS). Syntaza metioniny współdziałając z witaminą B12 wykorzystuje 5-10-metylenotetrahydrofolian jako donora grup metylowych. Remetylacja Hcy do metioniny jest również katalizowana przez metylotransferazę betainowo-homocysteinową, w której donorem grup metylowych jest betaina.

Hiperhomocysteinemia (HHcy) jest stanem patologicznym, w którym stężenie Hcy w osoczu krwi człowieka przekracza 15 μ M. HHcy ma najczęściej podłoże genetyczne i jest wynikiem mutacji genów kodujących enzymy metabolizmu Hcy na drodze transsulfurylacji

i remetylacji. HHcy również może być spowodowana niedoborem witaminy B12 oraz kwasu foliowego. HHcy odpowiada za rozwój wielu chorób w tym chorób nowotworowych, sercowo naczyniowych, komplikacji rozwoju ciąży czy chorób neurodegeneracyjnych np. choroby Alzheimera (AD).

Hcy ze względu na podobieństwo strukturalne do metioniny, może być substratem dla niektórych syntetaz aminoacylo-tRNA, zwłaszcza syntetazy metionylotRNA. Prowadzi to do powstania Hcy-AMP, z którego powstaje tiolakton homocysteiny (HTL). Znane są trzy enzymy, które mogą przekształcić HTL z powrotem do Hcy, należą do nich cytoplazmatyczna hydrolaza bleomycyny (BLMH), mitochondrialna hydrolaza bifenylu (BPHL) oraz zewnątrzkomórkowa paraoksonaza 1 (PON1).

Zaobserwowano, że wysokie stężenie HTL wywiera silny efekt toksyczny zarówno w warunkach *in vivo* jak *in vitro*. W warunkach fizjologicznych HTL reaguje z ϵ -aminowymi grupami lizyny powodując N-homocysteinylacje białek. Tiolakton homocysteiny poprzez N-homocysteinylacje enzymów hamuje szereg reakcji biochemicznych, blokuje aktywacje kinaz, dereguluje metabolizm oraz proliferację komórek. Wysokie stężenie HTL we krwi koreluje z rozwojem wielu chorób cywilizacyjnych w tym chorób neurodegeneracyjnych oraz jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy.

Paraoksonaza 1 jest enzymem wytwarzanym przez hepatocyty, skąd jest uwalniana do krwi obwodowej jako składowa lipoprotein o wysokiej gęstości. PON1 jest jednym z kluczowych enzymów hydrolizujących HTL do Hcy. Aktywność tego enzymu jest zdeterminowana przez zmiennością genetyczną. Wykazano, że aktywność PON1 jest niższa u osób z zdiagnozowaną chorobą Alzheimera niż grupie osób zdrowych. Blmh jest kolejnym enzymem, który rozkłada HTL do Hcy. U pacjentów z AD wykazano obniżoną aktywność BLMH. Ponadto niektóre badania sugerują, że pewne warianty genu *BLMH* mogą zwiększać ryzyko zachorowania na AD. Enzym CBS pełni kluczową rolę w dwuetapowej reakcji transsulfuracji Hcy do cysteiny. CBS ulega ekspresji w mózgu, wątrobie i trzustce. Aktywność CBS jest zależna od witaminy B6 oraz wariantu genetycznego *CBS*. Niedobór CBS najczęściej prowadzi do zatorowości oraz miażdżycy naczyń krwionośnych, a także opóźnienie umysłowego. AD charakteryzuje się gromadzeniem beta-amyloidu w mózgu pacjentów co częściowo może mieć związek z osłabieniem procesu autofagii, który jest skorelowany z szlakiem mTOR.

Kinaza serynowo-treoninowa mTOR kontroluje również translacje, transkrypcje proliferacji komórek. Szlak mTOR również reguluje metabolizmem energetycznym komórki oraz reguluje degradacją białek. Deregulacja szlaku mTOR została powiązana z rozwojem wielu chorób neurodegeneracyjnych w tym AD. Badania na mysich modelach AD wykazały, że wyższa aktywność szlaku mTOR korelowała z gromadzeniem się beta-amyloidu w mózgach myszy. Aktywność szlaku mTOR jest odwrotnie skorelowana z procesem autofagii, którego zaburzenia zaobserwowano w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych w tym chorobie Parkisona, Huntigtona oraz AD. Zahamowanie procesu autofagii ma związek z gromadzeniem się beta-amyloidu oraz białka tau, w tkance mózgowej pacjentów z AD. Aktywność szlaku mTOR jest powiązana z demetylazą histonową, Phf8. Enzym ten usuwając grupy metylowe z wybranych histonów chromatyny wpływa selektywnie na ekspresję genów. Mutacje w genie *PHF8* u człowieka odpowiadają za rozwój zaburzeń twarzoczaszki, rozczepienie warg i/lub podniebienia oraz innymi anomalii w obrębie twarzoczaszki. Deficyt genu *Phf8* u *Danio rerio* aktywuje apoptozę komórek nerwowych a u myszy deficyt genu *Phf8* aktywuje szlak sygnałowy mTOR.

Choroba Alzheimera (AD) jest jednym z najczęstszych schorzeń neurodegeneracyjnych i główną przyczyną demencji u osób starszych. AD może być uwarunkowana rodzinnie lub rozwijać się sporadycznie. Rozwój tej choroby neurodegeneracyjnej jest związany z powstawaniem płytek starczych i splątków neurofibrilarnych zawierających beta-amyloid oraz hiperfosforylowane białko tau. W badaniach nad AD często wykorzystuje się modele mysie, które charakteryzują się bardzo szybką akumulacją beta-amyloidu w mózgu. W modelu mysim 5xFAD zostały wprowadzone wszystkie mutacje powodujące sporadyczny/rodzinny typ AD. W badaniach na AD wykorzystuje się również komórkowy model AD N2a-APP_{swe}. Model ten powstał poprzez wprowadzenie do mysich komórek neuroblastomy zmutowanego ludzkiego genu APP zawierającego mutacje prowadząca do nadprodukcji beta-amyloidu.

Rozprawa doktorska mgr Łukasza Wituckiego podejmuje próbę wyjaśnienia mechanizmów biochemicznych aktywowanych hiperhomocysteinemią powiązaną z czynnikami genetycznymi oraz dietą bogatą w metioninę na rozwój AD. Poznanie tych mechanizmów będzie miało ogromny wpływ na opracowanie nowej generacji leków stosowanych w terapii AD.

Ocena rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr Łukasza Wituckiego została przygotowana jako cykl trzech oryginalnych publikacji. Należy podkreślić, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) i wysokiej wartości punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Łączna wartość IF tych prac wyniosła ok. 16,5. Dwie pierwsze prace oryginalne zostały opublikowane w 2023 r. w czasopiśmie *Cells* (IF=7,677, 140 pkt. MNiSW) oraz *J. Inherit. Metab. Dis* (IF=4,429, 100 pkt. MNiSW), trzecia praca oryginalna została zaakceptowana w 2023 r. do druku w *Journal of Alzheimer's disease* (IF=4,372, 100 pkt. MNiSW).

W wszystkich publikacjach wchodzących w skład cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską mgr Łukasz Witucki jest pierwszym autorem, co świadczy o dużym zaangażowaniu i samodzielności autora.

Nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej było poznanie roli hiperhomocysteinemii powiązanej z czynnikami genetycznymi oraz dietą bogatą w metioninę na występowanie wybranych biochemicznych markerów choroby Alzheimera. Cele szczegółowe badań obejmowały:

Zbadanie wpływu deficytu *Pon1* oraz *Blmh*, wieku oraz diety bogatej w metioninę na zdolności poznawcze myszy *5xFAD*, akumulacje beta-amyloidu, aktywność *Phf8* oraz szlaku *mTOR* i aktywność procesu autofagii w mózgach myszy *5xFAD*.

Doktorant postanowił również określić wpływ metabolitów homocysteiny, niedoboru *Pon1*, *Blmh*, lub *Cbs* oraz diety bogatej w metioninę na akumulacje beta-amyloidu, aktywność *Phf8* oraz aktywność szlaku sygnałowego *mTOR* w komórkach *N2a-APP_{swe}*.

Pan Mgr Łukasz Witucki osiągnął założone cele badań. Wykazał, że niedobór *Blmh* oraz dieta bogata w metioninę korelowała z neurodegeneracją oraz ograniczeniem funkcji poznawczych myszy *5xFAD*. Niedobór aktywności enzymów *Blmh*, *Pon1* lub *Cbs* oraz dieta bogata w metioninę powodowały gromadzenie się beta-amyloidu w mózgach myszy. Deficyt enzymów *Blmh*, *Pon1* lub *Cbs* korelował ze wzrostem stężenia *Hcy*, *HTL* oraz *N-homocysteinylo*wanych białek. *N-homocysteiny*lacja białek upośledza ich funkcje co między innymi ograniczało aktywność *Phf8*, wzrost aktywności szlaku *mTOR*, zahamowanie procesu autofagii oraz akumulacje beta-amyloidu w mózgach myszy.

Podsumowując niedobór aktywności enzymów *Blmh*, *Pon1* lub *Cbs* oraz dieta bogata w metioninę przyczyniała się do nieprawidłowej funkcji *Phf8*, aktywacji szlaku sygnałowego *mTOR* oraz zahamowanie procesu autofagii i zintensyfikowania ekspresji *APP*.

Dążąc do osiągnięcia postawionych celów, Doktorant wykorzystał szereg nowoczesnych narzędzi badawczych biologii molekularnej, bardzo dobrze dobranych i zmodyfikowanych na potrzeby badań własnych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki, które zostały zaprezentowane w publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej. Pan mgr Łukasz Witucki doskonale opanował szereg narzędzi badawczych, prace na mysim modelu AD oraz hodowle komórek *in vitro*, wywiązał się całkowicie z zadań, jakie zostały postawione w celu pracy.

Rozprawa doktorska napisana przez mgr Łukasza Wituckiego świadczy o jego dojrzałości naukowej, zawiera wnikliwą, twórczą dyskusję, co wskazuje na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną. Przedstawiona rozprawa doktorska ma również duży potencjał aplikacyjny wyjaśniający role niedoboru aktywności enzymów Blnh, Pon1 lub Cbs oraz diety bogatej w metioninę na zmiany biochemiczne charakterystyczne dla AD. Poznanie tych mechanizmów może pomóc w korygowaniu zaburzeń biochemicznych odpowiedzialnych za rozwój AD.

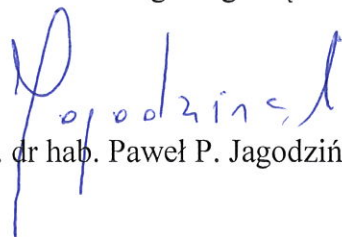
Czytając rozprawę doktorską, można zauważyć drobne błędy interpunkcyjne. Praca doktorska jest jednak napisana bardzo dobrze, a drobne błędy interpunkcyjne w żaden sposób nie umniejszają jej wyjątkowej wartości. Uzyskane wyniki pomogą w opracowaniu nowoczesnych terapii AD oraz innych chorób neurodegeneracyjnych.

Rozprawa doktorska mgr Łukasza Wituckiego jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr Łukasza Wituckiego zatytułowana „Epigenetyczny mechanizm deregulacji szlaku sygnałowego mTOR i procesu autofagii w nowych mysich modelach choroby Alzheimera”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi art. 13 ust. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z póź. zm).

W związku z powyższym, przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN wniosek o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Wituckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy

Autora, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Wituckiego nagrodą.



Prof. dr hab. Paweł P. Jagodziński