



Prof. dr hab. Jacek Kuźnicki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie
ul. Księcia Trojdena 4
02-109 Warszawa
e-mail: jacek.kuznicki@iimcb.gov.pl
tel. (0)22 597 07 06

Warszawa, dn. 31 sierpnia 2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Piotra Pankiewicza
pt. „Rozwój innowacyjnych, małowcząsteczkowych agonistów TrkB
w terapii chorób układu nerwowego”
pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. Katarzyny Kality-Bykowskiej
oraz promotora pomocniczego Pana dr. Jerzego Pieczykolana**

Ogólny opis pracy

Tematem ocenianej pracy doktorskiej było poszukiwanie małowcząsteczkowych agonistów receptora TrkB jako potencjalnych leków w terapii chorób układu nerwowego. Rozprawa ma typową strukturę prac doktorskich, chociaż jest „doktoratem wdrożeniowym”. Szczegółowy spis treści pozwala łatwo dotrzeć do poszukiwanych części we Wstępie, Metodach i Wynikach. Praca napisana jest poprawnie, aczkolwiek nie udało się Autorowi uniknąć błędów redakcyjnych i niespotykanych w języku polskim sformułowań zaczerpniętych z języka angielskiego (pełną ich listę przekazałem Autorowi do ew. korekty egzemplarza bibliotecznego).

W pracy podjęto próbę identyfikacji małowcząsteczkowych związków chemicznych, które miałyby aktywność neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF), który jest fizjologicznym aktywatorem receptora o aktywności kinazy tyrozynowej (TrkB). Gdyby uzyskano wyniki pozytywne, dałoby to szansę na stworzenie leków dla wybranych chorób ośrodkowego układu nerwowego, w tym depresji. Uważa się bowiem, że modulowanie szlaków sygnałowych BDNF-TrkB może przynieść efekty terapeutyczne. Do identyfikacji potencjalnych agonistów TrkB spośród różnych związków chemicznych wykorzystano zestaw technik przesiewowych oraz testów funkcjonalnych określonych jako „platforma badawcza”. Przy ich pomocy dokonano także szczegółowej charakterystyki związków, które wcześniej opisano w literaturze jako aktywne względem receptora TrkB. Chociaż nie udało się zidentyfikować cząsteczek o pożądanych cechach agonisty TrkB, recenzowana praca ma

bardzo duże walory poznawcze i metodyczne. Wykazano w tej pracy na przykład, że informacje literaturowe będące punktem wyjścia do poszukiwania leków działających za pośrednictwem TrkB nie potwierdzają się, a to wstrzymuje kontynuowanie badań w nieobiecującym kierunku i umożliwia podjęcie prac w oparciu o inne przesłanki. Z kolei wypracowana „platforma badawcza” i szczegółowe opisanie metod oraz interpretacja wyników mogą być wykorzystane w przyszłych badaniach do poszukiwania związków chemicznych działających na inne receptory i ścieżki sygnałowe. Poniżej opisuję dokładnie treść rozprawy, jej wyniki i dyskusję.

Wstęp zawiera szczegółowe informacje o BDNF, przedstawia przesłanki podjęcia tej pracy oraz procesy rozwoju nowego leku. Rozpoczyna się uzasadnieniem klinicznym pod hasłem „Identyfikacja potrzeby medycznej”. Następnie, Autor opisuje biologię BDNF, regulację jego ekspresji i główne mechanizmy regulatorowe. Podaje też, w jaki sposób powstają różne formy tego czynnika, co jest istotne dla zrozumienia niektórych z zastosowanych metod. W kolejnej części Autor opisuje białka z rodziny receptorów Trk, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu aktywacji receptora TrkB, zmian jego konformacji i transdukcji sygnału. Wskazanie, które ścieżki sygnałowe są aktywowane przez TrkB, a które przez inne receptory, okaże się istotne przy wyjaśnieniu niespecyficznego działania niektórych badanych związków. Kolejną ważną częścią Wstępu jest opis zaburzeń interakcji BDNF-TrkB w depresji, a następnie historia odkrywania małowcząsteczkowych agonistów TrkB jako potencjalnych leków. Jedyną krytyczną uwagę jaką można podnieść wobec Wstępu jest to, że z logicznego punktu widzenia dopiero w tej części powinno się znaleźć to, co na jego początku, czyli uzasadnienie kliniczne. Biorąc jednak pod uwagę to, iż jest to doktorat wdrożeniowy taka struktura Wstępu może być uzasadniona.

Jako główny cel pracy Autor wskazał próbę identyfikacji innowacyjnych, małowcząsteczkowych agonistów TrkB o potwierdzonej aktywności *in vitro* i *in vivo*, gotowych do dalszego rozwoju przedklinicznego i mających potencjalne zastosowanie w terapii chorób ośrodkowego układu nerwowego. Realizację tego celu Autor podzielił na trzy zadania:

- Badania przesiewowe związków w celu identyfikacji innowacyjnych związków oddziałujących z zewnątrzkomórkową domeną TrkB oraz aktywujących receptor TrkB w warunkach *in vitro*.
- Kompleksowa charakterystyka opisanych w literaturze małowcząsteczkowych związków referencyjnych o właściwościach naśladujących działanie BDNF.
- Badania farmakologiczne jednego z nich, tj. 7,8-dihydroksyflawonu w celu ustalenia mechanizmu jego działania.

Prace doświadczalne przeprowadzano realizując program *Doktoratu Wdrożeniowego*. Miały one zatem charakter badawczo-rozwojowy, tj. ich nadrzędnym celem była możliwość komercjalizacji otrzymanych rezultatów.

Nie kwestionując głównego celu tej pracy, nie można z pozycji recenzenta nie wskazać, iż drugie i trzecie zadanie wynika z braku wyników pozytywnych etapu pierwszego.

Jeśli tak jest, to nie mogą to być zadania, które zaplanowano przed podjęciem prac doświadczalnych. Co więcej, jeśli celem ma być komercjalizacja, to wykorzystanie związków o opisanych właściwościach przez innych autorów nie mogłoby mieć miejsca ze względu na niemożność patentowania. Drugą uwagą krytyczną jest użycie w opisie celu pracy słowa „innovacyjne”. Wykorzystanie tego słowa w tytule obiecuje, iż badania będą prowadzone w oparciu o rozwój innowacyjnych związków, co w istocie nie ma miejsca, ponieważ wykorzystywane są głównie związki z istniejącej biblioteki, a dodatkowe są syntetyzowane na ich bazie. Co więcej, te które zsyntetyzowano i selekcjonowano były stworzone na podobieństwo struktur chemicznych dla opisanych w piśmiennictwie agonistów TrkB. Niejasna jest więc wskazywana „innovacyjność” i nieuzasadnione wydaje się używanie tego słowa w tym kontekście. Jest ono w moim odczuciu nadużywane nie tylko w tej części, ale i w całej pracy - pojawia się bowiem 15 razy. Jest ono niepotrzebne również dlatego, że i bez podkreślania tej cechy praca stanowi nowy i ważny wkład do nauki o aktywacji TrkB i kluczowy etap w poszukiwaniu sposobu specyficznej jego aktywacji dla celów klinicznych.

Rozdział **Materiały i metody** zasługuje na bardzo pozytywną ocenę mimo, że Autor wybrał nieoczywisty porządek opisywanych metod, a mianowicie kolejność ich wykorzystywania w części doświadczalnej. W rozdziale tym Autor bardzo szczegółowo opisał zastosowane metody, umożliwiając innym autorom łatwe ich wykorzystanie. Tym samym rozwinięta przez niego „platforma badawcza” będzie mogła być zastosowana w przyszłości. Główne metody to badania przesiewowe z użyciem mikroskalowej termoforezy kapilarnej, hodowla linii komórkowych, w tym komórek SH-SY5Y różnicowanych do neuronów, pomiar aktywności receptora TrkB metodą ELFI i analiza ścieżek sygnałowych, natywna elektroforeza białek i w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS, Western blotting i ocena właściwości cytoprotekcyjnych związków. Autor opisał też przebieg eksperymentu *in vivo* z wykorzystaniem myszy, w tym oznaczanie stężenia związków w pobranym materiale i ich analizę farmakokinetyczną, wyjaśnił jak oceniał selektywność działania związków oraz przedstawił metody zastosowanej analizy statystycznej. Opis metod przekonuje czytelnika, iż uzyskane przez Autora tymi metodami wyniki są nie tylko przekonujące, ale i rzetelne.

Kluczowe **Wyniki** ocenianej pracy pokazują, że żaden z prawie 1000 przebadanych związków nie wykazywał właściwości agonistów TrkB zarówno na poziomie interakcji z receptorem, jak i na poziomie funkcjonalnym. Już pierwsza metoda przesiewowa, tj. mikroskalowa termoforeza kapilarna w układzie *single-point* radykalnie ograniczyła liczbę potencjalnych agonistów do 181. Kolejny etap selekcji, czyli określenie stałej dysocjacji (K_d) dla wyselekcjonowanych związków ograniczyło liczbę cząsteczek do 59, gdyż część wykazywała zbyt niską rozpuszczalność, dla części nie udało się wyznaczyć stałej dysocjacji, albo nie mieściła się ona w przedziale 0,1–450 μM . Wśród badanych cząsteczek znalazły się związki referencyjne oraz BDNF. Część związków, która okazała się w tych badaniach nierozpuszczalna prawdopodobnie mogła być już wcześniej wyeliminowana, jeśli trzeba je było rozpuszczać w DMSO. Natomiast to, że dla niektórych tzw. związków referencyjnych nie udało się zmierzyć

K_d wskazuje na problem z jakością prac, które były punktem wyjścia ocenianej pracy doktorskiej.

Oceniając zdolność związków do aktywacji receptora TrkB w układzie ortosterycznego agonisty, identyfikowaną jego ufosforylowaniem, okazało się, że tylko 4 związki są w stanie aktywować TrkB i niestety żaden z nich nie był z puli „innovacyjnych”. Były to bowiem związki referencyjne. W tej sytuacji Autor słusznie uznał, że główny cel pracy nie może zostać zrealizowany i przystąpił do drugiego zadania, czyli scharakteryzowania aktywności związków referencyjnych.

Stosując model allosterycznej modulacji TrkB okazało się, że żadna z testowanych cząsteczek referencyjnych nie moduluje aktywności receptora TrkB, czyli nie może być uznana za ortosterycznego agonistę. Następnie Autor zbadał zdolność BDNF i tych związków do indukowania dimeryzacji domeny exTrkB. Zauważył, że chociaż niektóre z nich wywoływały fosforylację TrkB w modelu komórkowym linii SN56 T48, to jednak nie wykazywały zdolności do indukowania dimeryzacji exTrkB. Otrzymane wyniki wskazywały na niespecyficzny efekt działania cząsteczek, powodujący niezależną od receptora TrkB aktywację białek efektorowych w komórkach tej linii. Świadczy to o tym, że postulowane przez innych autorów pozytywne właściwości tych związków nie zostały potwierdzone. Można uznać, iż wynika to z innej metodyki zastosowanej przez Autora, a nawet jego błędów. Jednak przy użyciu BDNF został uzyskany pozytywny wynik co pokazuje, że doświadczenia były wykonane metodycznie poprawnie. Natomiast biorąc pod uwagę, iż żaden z tych związków nie wszedł nawet do pierwszej fazy badań klinicznych trzeba przyjąć do wiadomości, że to Autor ocenianej pracy doktorskiej ma rację – opisane w literaturze związki referencyjne nie działają. Tak ważne jest zatem, aby wszystkie wyniki tej pracy doktorskiej zostały opublikowane, co uchroni innych autorów przed niepotrzebnymi pracami i wydatkami. Duża część wyników tej pracy już się ukazała: **Piotr Pankiewicz**, **Marcin Szybiński**, **Katarzyna Kisielewska**, **Filip Gołębiowski**, **Patryk Krzemiński**, **Izabela Rutkowska-Włodarczyk**, **Rafał Moszczyński-Pętkowski**, **Lidia Gurba-Bryśkiewicz**, **Monika Delis**, **Krzysztof Mulewski**, **Damian Smuga**, **Jakub Dominowski**, **Artur Janusz**, **Michał Górka**, **Krzysztof Abramski**, **Agnieszka Napiórkowska**, **Marcin Nowotny**, **Krzysztof Dubiel**, **Katarzyna Kalita**, **Maciej Wleczorek**, **Jerzy Pieczykołan**, **Mikołaj Matłoka** (2021). *Do small molecules activate the TrkB receptor in the same manner as BDNF? Limitations of published TrkB low molecular agonists and screening for novel TrkB orthosteric agonists. Pharmaceuticals*, 14(8), 704.

Trzecim zadaniem omawianej pracy doktorskiej była szczegółowa charakterystyka związku 7,8-dihydroksyflawonu (7,8-DHF), który był opisywany jako agonista TrkB przez różne grupy badaczy. Prace tych autorów były wykonywane z wykorzystaniem myszy, szczurów lub hodowli komórkowych. Autor przeprowadził badania selektywności tego związku *in vitro* oraz farmakologiczne badania *in vivo*. Uzyskane wyniki ujawniły niekorzystny profil farmakokinetyczny tego związku i brak jego aktywności zarówno wobec TrkB, jak i innych ścieżek molekularnych w mózgu u myszy. Ponadto, okazało się, że *in vitro* 7,8-DHF wchodzi w interakcje z wieloma białkami, co świadczy o niskiej selektywności tego związku względem TrkB.

Ostateczną próbą znalezienia pozytywnych cech związków referencyjnych było sprawdzenie, czy mają one, podobnie jak TrkB, aktywność neuroprotekcijną. Niestety, Autor nie zaobserwował efektu cytoprotekcyjnego dla żadnego z testowanych związków w hodowli zróżnicowanych do neuronów komórek SH-SY5Y.

W rozdziale **Dyskusja** Autor szczegółowo i przekonująco zinterpretował uzyskane wyniki, omawiając prace doświadczalne w kolejnych zadaniach. Można jedynie dyskutować, czy koniecznie musiał to robić aż na ponad 15 stronach, gdyż niektóre fragmenty są w istocie ponownym opisem wyników.

W pierwszym akapicie krótko wyjaśnił cele i sposób ich realizacji. Stwierdził też m.in., że „*Powyższe założenia badawcze zrealizowano poprzez zastosowanie innowacyjnej platformy badawczej ...*” oraz, że „*Opracowana platforma badawcza stanowi dodatkową, aplikacyjną wartość projektu*”. Gdyby ktoś zaczął czytać tę rozprawę od tego miejsca, mógłby odnieść błędne wrażenie, że praca zakończyła się wynikami pozytywnymi. Kolejne pięć akapitów to opis wyników i ich interpretacja z bardzo małym odniesieniem do literatury. Dopiero w akapicie szóstym Autor przyznaje, że ta praca jest kolejną próbą identyfikacji niskocząsteczkowych związków, które miałyby aktywować receptor TrkB i w tym miejscu ponownie przywołuje prace Todd i wsp. (2014) oraz Boltaev i wsp. (2017), którzy podejmowali takie próby i które zakończyły się porażką. Co więcej, w obu z nich kwestionowano aktywność agonisty 7,8-DHF i jego potencjał kliniczny. W tej sytuacji nie do końca zrozumiałe staje się podjęcie przez Autora kolejnej próby i to z użyciem związków z dostępnej biblioteki lub zsyntetyzowanych jako niektóre ich modyfikacje. Trudno te chemiczne zmiany uznać za innowacyjne podejście do tematu. Tym bardziej trudno zrozumieć motywację, że należy te związki, o których wiadomo, że nie działają, zbadać „holistycznie”. Jeśli wyniki takiego badania mają mieć wartość poznawczą i ewentualnie skierować przyszłe badania na bardziej obiecujące ścieżki, to warto je było w dyskusji podać. Dalsza jej część to taka właśnie próba wyjaśniania i interpretacji wyników negatywnych. Interesująca jest w dyskusji sugestia, że być może niektóre związki referencyjne mogą aktywować TrkB inaczej niż określa to kanoniczny mechanizm jego aktywacji i że kluczem do wyjaśnienia tej kwestii jest ich wpływ na monomer, a nie dimeryzacja receptora. Jednak wyniki Autora pokazały, że nawet jeśli ma miejsce aktywacja TrkB, to nie jest ona specyficzna i dotyczy innych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych. Autor wskazuje też, iż najnowsze odkrycia w literaturze sugerują, że allosteryczna modulacja TrkB oferuje nowe możliwości rozwoju potencjalnych leków. Dyskusję rozprawy czyta się z zaciekawieniem, mimo jej długości i powtórzenia opisu wyników.

Podsumowując, pod względem metodycznym, opisów metod i wyników pracę uznaję za wzorową. Dobra jest też dyskusja, ale nie jest to rozprawa idealna. Nie chodzi tu jednak o uzyskanie negatywnych wyników badań, ale o to, że w założeniach pracy nie wzięto pod uwagę wyników innych autorów, w tym, zignorowano wątpliwości z dwóch prac co do związku 7,8-DHF. Być może wpłynęłoby to na zastosowanie innego podejścia, np. zostałyby sprawdzone różne peptydy będące fragmentami BDNF albo przeciwciała. Zastosowanie