



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Zoologii Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko



Warszawa, 1 maja 2019

Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej: „Dimeryzacja receptora bradykininy B2 z receptorem dopaminergicznym D2 oraz wpływ oddziaływań pomiędzy nimi na wybrane funkcje śródbłónka” autorstwa Pani mgr Anny Niewiarowskiej-Sendo

Praca doktorska Pani mgr Anny Niewiarowskiej-Sendo powstała w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, a jej promotorem była dr hab. Ibeth Guevara-Lora.

Podczas realizacji badań opisanych w pracy doktorskiej analizowane były wzajemne zależności między dwoma receptorami – bradykininy B2 (B2R) oraz dopaminergicznym D2 (D2R). Założenie przeprowadzenia analiz takich oddziaływań miało podłoże w dostępnych danych świadczących o tym, że tego rodzaju receptory mogą nie tylko działać niezależnie, ale także tworzyć dimery czy też większe kompleksy. Co istotne, utworzenie kompleksu może modulować przekazywanie sygnału. Zanim zrealizowano opisane w pracy doktorskiej badania nie było wiadomo czy B2R i D2R dimeryzują i jakie mogą być tego skutki. W efekcie przeprowadzonych doświadczeń uzyskano dane potwierdzające takie oddziaływania i opisujące ich skutki dla funkcjonowania śródbłónka. Realizacja projektu doprowadziła do powstania wielowątkowej rozprawy doktorskiej. Co istotne otrzymane wyniki zostały włączone do trzech oryginalnych publikacji, których pierwszą autorką jest Doktorantka.

Celem pracy było: 1) stwierdzenie czy B2R i D2R dimeryzują i czy ich oddziaływanie prowadzi do modulacji przekazywania sygnału, 2) wykazanie jaki wpływ ma aktywacja obu receptorów na szereg procesów od nich zależnych – zmian poziomu przekaźników jakimi są jony wapnia i cAMP, NO czy reaktywne formy tlenu, a także w oddziaływaniach między komórkami śródbłónka a granulocytami, 3) wskazanie jaką rolę mają szlaki przekazywania sygnału mediowane przez badane receptory w odpowiedzi komórek śródbłónka na czynniki prozapalne czy proapoptyczne. Postawione cele mgr Niewiarowska-Sendo zrealizowała przeprowadzając szereg dobrze zaplanowanych badań, w których wykorzystała liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej czy inżynierii

genetycznej. Do szerokiego spektrum zastosowanych metod zaliczają się m.in.: uzyskiwanie konstruktów kodujących badane receptory w połączeniu ze znacznikami fluorescencyjnymi pozwalających śledzić losy tych białek, hodowle komórkowe, transfekcja komórek, qPCR, cytometria przepływowa, western blotting, różnego rodzaju mikroskopia, w tym analizy FILM-FRET. Dane otrzymane z wykorzystaniem tych technik poddane zostały odpowiednim analizom statystycznym. W badaniach wykorzystano dwa rodzaje komórek HEK293 oraz HUVEC.

Wstęp do rozprawy doktorskiej wprowadza czytelnika w tematykę funkcjonowania śródbłonna, przedstawia opis mechanizmów odbioru i przekazywania sygnałów, które są reakcją na stres oksydacyjny czy stan zapalny. Doktorantka precyzyjnie charakteryzuje te szlaki a także opisuje oddziaływanie śródbłonna z innymi komórkami. Charakteryzuje także receptory bradykininy i dopaminy, koncentrując się na danych świadczących o tym, że takiego rodzaju receptory mogą ze sobą oddziaływać tworząc kompleksy, co moduluje odpowiedź na sygnały docierające do komórki. **Wstęp** jest ilustrowany dobrymi schematami oraz tabelami podsumowującymi dostępne dane dotyczące szlaków przekazywania sygnałów czy oligomeryzacji receptorów. Tylko czy na pewno fosfolipaza C katalizuje syntezę IP₃ i DAG? I czy p53 jest faktycznie głównym regulatorem cyklu komórkowego? Takich ogólnikowych stwierdzeń jest we **Wstępie** (i także w **Dyskusji**) kilka. Należy starać się ich unikać - niestety zbytnia ogólnikowość może doprowadzić do minięcia się z prawdą. Końcowy fragment **Wstępu** przedstawia przesłanki świadczące o tym, że B₂R i D₂R również mogą być zdolne do tworzenia kompleksów. Z całą pewnością **Wstęp** zawiera wszystkie istotne dla zrozumienia pracy wiadomości i świadczy o rozległej wiedzy Doktorantki.

Materiały i Metody obszernie prezentują wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki. Nie mam zastrzeżeń do tej części pracy. **Wyniki** zawierają uporządkowany opis przeprowadzonych analiz i doświadczeń oraz uzyskanych rezultatów. Muszę jednak przyznać, że opis ten nie zawsze jest bardzo przejrzysty. Zabrakło krótkich podsumowań zwracających uwagę na najważniejsze rezultaty. W obliczu tego ogromną zaletą są ilustracje oraz ich precyzyjne opisy, ułatwiają one lekturę i pozwalają na samodzielną analizę danych. Nota bene, Autorka stosuje błędne określenie – Rysunek – no cóż żaden fragment żadnego „rysunku” nie został moim zdaniem przez nią narysowany.

Część pierwsza **Wyników** to opis projektu poświęconego uzyskaniu odpowiednich konstruktów umożliwiających analizę tworzenia kompleksów przez B₂R i D₂R. Obecność endogennych receptorów nieco zaburzała „obraz” oddziaływań, ale nie na tyle, aby poddawać w wątpliwość uzyskane wyniki. W prowadzonej analizie Doktorantka porównywała efekty aktywacji każdego z receptorów oddzielnie oraz obu jednocześnie, stosowała także ich inhibitory pozwalające na uwypuklenie działania każdego z receptorów. Wykazała także, jaki wpływ na poziom jonów wapnia oraz cAMP ma stymulacja jednego lub obu badanych białek. Etap ten zakończył się sukcesem, w efekcie czego udało się wykazać, że oba

nadeksprymowane receptory są funkcjonalne, ko-lokalizują i prawdopodobnie są w stanie tworzyć kompleksy. Dalsze etapy pracy dotyczyły komórek śródbłonka – HUVEC. W tym przypadku określono jedynie poziom endogennych receptorów zakładając, że podobnie jak w komórkach HEK293 będą one kolokalizować. Wykorzystanie HUVEC pozwoliło na przeprowadzenie szeregu istotnych badań polegających na określeniu roli B2R i D2R w modulacji reakcji zapalnej, „wywoływanej” in vitro działaniem TNF alfa. Skupiono się na określeniu wpływu stymulacji receptorów na adhezję granulocytów do HUVEC, syntezę białek odpowiedzialnych za adhezję, sekrecję IL-8 i IL-6, produkcję NO czy reaktywnych form tlenu. Prześlędzono szlaki przekazywania sygnału takie jak np. szlak MAPK, oraz te zaangażowane w apoptozę. W każdym z przypadków Doktorantce udało się uzyskać odpowiedź jak stymulacja obu receptorów moduluje wybrany typ reakcji a co najistotniejsze wykazać, że „pojedyncze” pobudzenie przynosi efekty odmienne od pobudzenia „podwójnego”. Nie chciałabym streszczać tutaj uzyskanych wyników. Wszystkie obserwowane zmiany zostały przejrzysto podsumowane na Rycinie 31 (str. 122). Chciałabym jedynie podkreślić, że mgr Niewiarowska-Sendo przeprowadziła bardzo skrupulatne badania kompleksowo analizując efekty pobudzenia dwóch receptorów, których oddziaływania nie były wcześniej badane. Wielowątkowość podejścia pozwoliła ujawnić, w jakich sytuacjach efekt takiego pobudzenia jest synergistyczny, a w których jest on charakterystyczny dla tylko dla jednego receptora. Lektura pracy pozostawiła mnie jednak z pewnym niedosytem. Być może wynika on z tego, że analizując ogrom danych przegapiłam istotne wnioski? Czy rzeczywiście obserwowana „wpadkowa” reakcja na oba bodźce wymaga fizycznych oddziaływań między B2R i D2R? Czy możliwe jest, że przy zablokowaniu oddziaływania między tymi białkami efekt jednoczesnego pobudzenia byłby taki sam? Podsumowując, ocenę tej części pracy chciałabym stwierdzić, że wnosi ona wiele nowych danych dotyczących przekazywania sygnału w komórkach śródbłonka. Wyniki są nowatorskie i wartościowe. Zostały już opublikowane.

W **Dyskusji** wyniki własne zostały skrupulatnie podsumowane i zestawione z istniejącą literaturą dotyczącą różnych aspektów przekazywania sygnału przez badane i inne receptory. Część z dywagacji zawartych w tej części pracy (te podsumowujące wyniki) mogłaby znaleźć się na końcu każdego z podrozdziałów **Wyników**. Ułatwiłoby to lekturę i nieco rozjaśniło niektóre fragmenty tamtej części pracy. Nie mniej jednak Autorka wykazała się doskonałą znajomością tematu i z całą pewnością jest ekspertem w dziedzinie prowadzonych przez siebie badań. Przedstawiła także perspektywy dalszych analiz, które przyczyniłyby się do poznania roli oddziaływań receptorów nie tylko w śródbłonku, ale także w innych komórkach.

Praca doktorska została napisana w zasadzie poprawnym językiem. Zawiera jedynie nieliczne usterki. Autorka, jak wiele innych piszących osób nie ustrzegła się żargonu czy niezręcznych

sformułowań. Przykładem niezręczności są określenia takie jak: „cząsteczki biorące udział w cyklu komórkowym” (str. 20), „receptor ten ma właściwości przeciwzapalne” (str. 27), „prolifracja w komórkach” (str. 32), „izolowanych z żyły krwi pępowinowej” (str. 40), „przeprowadzono na mikroskopie konfokalnym” (str. 53), „kozie-anty mysie lub anty-królicze” (str. 57) – no cóż przeciwnie nie są skierowane przeciwko myszy czy królikowi ale określonym białkom, „test oparty na technice” (str. 58), „roztwór trawiony przez enzym” (str. 67), „stopień związanych granulocytów” (np. str. 84, 87), „udział receptorów w powyższych obserwacjach” (str. 85) czy „w kolejnym kroku sprawdzano” (np. str. 94), a także używanie rzeczownika „ilość” tam gdzie powinna pojawić się „liczba”. Nie są to jednak usterki utrudniające lekturę i zrozumienie tekstu.

Podsumowując, pani mgr Anna Niewiarowska-Sendo zrealizowała wszystkie postawione cele pracy doktorskiej. Otrzymane wyniki dostarczają obszernej i co istotne nowej wiedzy na temat efektów jednoczesnej stymulacji receptora bradykininy i B2 i receptora dopaminergicznego D2 oraz oddziaływań między tymi receptorami. Wnioski końcowe znajdują poparcie w przedstawionych wynikach. Z całą pewnością można uznać pracę za nowatorską a wyniki za bardzo dobrze udokumentowane. Część z nich, jak już wspomniałam, została opublikowana. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Anny Niewiarowskiej-Sendo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

