

dr hab. Małgorzata Kajta
Pracownia Neuroendokrynologii Molekularnej
Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytut Farmakologii PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
e-mail: kajta@if-pan.krakow.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Anny Niewiarowskiej-Sendo

*„Dimeryzacja receptora bradykininy B2 z receptorem dopaminergicznym D2
oraz wpływ oddziaływań pomiędzy nimi na wybrane funkcje
komórek śródbłonna”*

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Niewiarowskiej-Sendo została wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Funkcję opiekuna naukowego i promotora pełniła dr hab. Ibeth Guevara-Lora.

Rozprawę stanowią 154 strony maszynopisu z wyodrębnionymi rozdziałami, jakimi są: Wykaz Najważniejszych Skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel Pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, a także Podsumowanie, Dodatki i Bibliografia. W tym miejscu nasuwa się sugestia, by nazwę „Dodatki” zastąpić bardziej precyzyjnymi określeniami: „Informacje dodatkowe/uzupełniające” lub, jak to się praktykuje w przypadku dodatkowych tomów, „Suplement”. Spis piśmiennictwa zacytowanego w rozprawie zawiera 212 publikacji, głównie anglojęzycznych. Struktura pracy odpowiada obowiązującym standardom, a Streszczenie przedstawia wyniki badań w zwięzły sposób.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w 3 artykułach: Niewiarowska-Sendo i wsp. (2017) *Biochim Biophys Acta* 1864:1855-66, Niewiarowska-Sendo i wsp. (2018) *Acta Biochim Pol* 65:367-75, Niewiarowska-Sendo i wsp. (2018) *PLOS One* 12:e0206443. Łączny współczynnik wpływu (*Impact Factor*) wymienionych prac oryginalnych wynosi 7,684

(IF z roku wydania). Jak łatwo zauważyć, w każdej publikacji Autorka rozprawy jest pierwszym autorem.

Badania stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały częściowo sfinansowane ze środków dotacji projakościowej KNOW nr BMN 8/2015 i BMN 11/2016.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

WSTĘP liczy 24 strony i jest obszernym, a równocześnie uporządkowanym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. W tym rozdziale Doktorantka opisuje mechanizmy regulujące funkcjonowanie śródbłonka, zwłaszcza stres oksydacyjny, stan zapalny i apoptozę, a także charakteryzuje receptory bradykininy B2 i dopaminy D2 oraz zjawisko oligomeryzacji receptorów GPCR. Autorka rozprawy podaje przykłady oligomeryzacji receptorów B2 i D2, jak również przytacza argumenty, które wskazują na możliwość oddziaływań pomiędzy receptorami. Tekst został zilustrowany klarownymi schematami: 1. Procesu adhezji leukocytów do komórek śródbłonka, 2. Głównych szlaków sygnałowych receptora bradykininy B2, 3. Wybranych szlaków sygnałowych receptora dopaminergicznego D2, 4. Oligomeryzacji w kontekście biosyntezy i regulacji działania receptorów GPCR. Ponadto, tekst został uzupełniony o 2 tabele, które systematyzują wiedzę na temat funkcjonalnych kompleksów receptorów GPCR tworzonych z udziałem receptorów B2 względnie D2. W przypadku receptora B2 są to oligomery z receptorami bradykininy B1 i B2, receptorami angiotensyny AT1 i AT2, receptorem β 2-adrenergicznym β 2AR czy receptorem κ -opiodowym KOR. W przypadku receptora D2 są to oligomery tworzone z receptorami dopaminergicznymi D2, D3, D4 i D5, receptorem serotoniny 5HT2A, receptorem adenozynowym A2A, receptorem angiotensyny AT1 oraz receptorem kanabinoidowym CB1. Trochę szkoda, że Autorka rozprawy nie wykorzystała schematu lub tabeli do syntetycznego przedstawienia przesłanek/argumentów wskazujących na możliwe interakcje między receptorami B2 i D2.

Następnym rozdziałem jest CEL PRACY, który został nakreślony jako zbadanie interakcji pomiędzy receptorem bradykininy B2 i receptorem dopaminy D2 oraz ustalenie znaczenia tych interakcji w upośledzaniu funkcji śródbłonka. Szczegółowe cele obejmowały: **i.** Analizę tworzenia heterodimerów B2R-D2R, **ii.** Wpływ heterodimerów B2R-D2R na stężenie Ca^{2+} i cAMP w komórce, **iii.** Weryfikację udziału receptorów B2 i D2 w regulacji adhezji granulocytów do komórek śródbłonka, **iv.** Weryfikację udziału receptorów B2 i D2 w regulacji odpowiedzi komórek śródbłonka na stres oksydacyjny, stan zapalny i apoptozę. Wyznaczone cele pracy doktorskiej dotyczą fundamentalnego zjawiska, jakim jest

oligomeryzacja receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR; ang. *G protein-coupled receptors*), w tym przypadku receptorów B2 i D2. Odkrycie oligomeryzacji uzmysłowiło naukowcom różnorodność i złożoność procesów zachodzących z udziałem kompleksów GPCR. Co więcej, stworzyło szansę na opracowanie nowych leków, których mechanizm działania będzie oparty na oddziaływaniu na kompleksy receptorów, a nie tylko na pojedyncze receptory. Cel przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest zasadny i aktualny, a podjęte przez Doktorantkę badania stanowią istotny element poszukiwań, zarówno w obszarze badań podstawowych, jak i potencjalnie klinicznych.

Kolejnych 6 stron rozprawy obejmuje MATERIAŁY, na co składa się opis aparatury, materiału biologicznego, przeciwciał, jak również odczynników do biologii molekularnej czy hodowli komórek. Szczegóły pochodzenia aparatury, materiału biologicznego i odczynników zostały podane z dokładnością do producenta, a w przypadku przeciwciał - z dokładnością do numeru katalogowego, co wskazuje na rzetelne przygotowanie Doktorantki do prowadzenia badań. Autorka rozprawy wykonywała doświadczenia głównie na komórkach linii HEK293 i HUVEC (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Sądzę że określenie pochodzenia ludzkich komórek śródbłonna jako komórek „izolowanych z żyły krwi pępowinowej” jest nadmiarowe. Powinno być – „izolowanych z żyły pępowinowej”.

W rozdziale METODY Doktorantka przedstawia na 22 stronach naukowe metody, które umożliwiły: 1. Uzyskanie białek fuzyjnych receptora bradykininy B2 z białkami fluorescencyjnymi, 2. Badanie oddziaływań między receptorami B2 i D2, 3. Badanie wpływu agonistów receptorów B2 i D2 na adhezję granulocytów do komórek śródbłonna oraz produkcję białek adhezyjnych, 4. Badanie wpływu agonistów receptorów B2 i D2 na funkcje śródbłonna. Doktorantka opisuje szczegółowo, w jaki sposób stosowała wyrafinowane techniki i metody z zakresu: biologii molekularnej (m.in. projektowanie starterów, *overlap extension* PCR, analiza restrykcyjna i sekwencjonowanie plazmidowego DNA), biologii komórki (m.in. transfekcja i kotransfekcja komórek, pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+}) oraz mikroskopii konfokalnej (obrazowanie konfokalne, FLIM-FRET). Wszystkie analizy i pomiary posiadały właściwe układy odniesienia i kontrole. Z uwag krytycznych nasuwa się pytanie o czas trwania transfekcji oraz czas, jaki upływał od zakończeniu transfekcji komórek HEK293 do wykonania pomiarów np. obrazowania z użyciem mikroskopu konfokalnego czy FLIM-FRET. Informacja na ten temat jest niejasna (str. 52, wiersze 28-29). Na stronie 49 Autorka rozprawy przywołuje Tabelę 3 w kontekście reakcji PCR. Jest to przypuszczalnie pomyłka, ponieważ Tabela 3 dotyczy przeciwciał, a nie starterów użytych w reakcji PCR. Odnośnie

komórek śródbłonna linii HUVEC, brak jest informacji o stężeniu/liczbie wysiewanych komórek oraz średniego czasu potrzebnego do uzyskania konfluencji. Mam również pytanie, czy Doktorantka zauważyła zmiany w intensywności sygnału fluorescencyjnego związanego z DCFH-DA w pożywce hodowlanej (bez komórek), do której dodała agonistów receptorów B2 i/lub D2? W pracy Szychowski i Wójtowicz (2016) *Pharmacol Rep*, autorzy zauważyli, że znacznik wykorzystywany do pomiaru stężenia reaktywnych form tlenu (ROS) wchodził w reakcję z tetrabromobisfenolem A, co prowadziło do fałszywego wyniku tj. wzrostu poziomu ROS w samej pożywce, bez udziału komórek.

WYNIKI badań zostały opisane na 38 stronach i zilustrowane 25 rysunkami, w tym 6 zdjęciami z mikroskopu konfokalnego (Rys. 8-12, 15), 6 zdjęciami membran z analizy western blot (Rys. 20, 24, 26-27, 29-30), 3 zdjęciami z elektroforezy DNA/mRNA (Rys. 6, 12, 15), 1 schematem (Rys. 7) oraz licznymi wykresami. Opis wyników jest bardzo szczegółowy, a uzyskane dane są każdorazowo poddawane dogłębnej analizie. Doktorantka konsekwentnie realizuje szczegółowe cele pracy, które przybliżają odpowiedź na zasadnicze pytanie: Czy istnieją funkcjonalne heterodimery receptora bradykininy B2 z receptorem dopaminy D2, a jeśli tak, to jaki jest ich wpływ na funkcje śródbłonna? Autorka rozprawy krok po kroku dostarcza dowodów na: 1. Kolokalizację/współwystępowanie receptorów B2 i D2 w błonie cytoplazmatycznej komórek HEK293 i HUVEC, 2. Heterodimeryzację receptorów B2 i D2 w komórkach HEK293, 3. Związany z aktywacją receptorów wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w komórkach HEK293 (agonista B2 zwiększa, agonista D2 nie wpływa, agoniści B2 i D2 podani równocześnie zwiększają poziom Ca^{2+} , ale słabiej niż sam agonista B2), 4. Związane z aktywacją receptorów zmiany w poziomie cAMP w komórkach HEK293 (agonista B2 zwiększa, agonista D2 obniża, agoniści B2 i D2 podani równocześnie zwiększają poziom cAMP, podobnie jak sam agonista B2), 5. Zależną od aktywacji receptorów adhezję granulocytów do komórek śródbłonna/HUVEC (agonista B2 stymuluje, agonista D2 nie wpływa, agoniści B2 i D2 podani równocześnie hamują adhezję granulocytów obniżając jej poziom podstawowy po 6 godz. inkubacji, w kolejnych przedziałach czasowych agoniści B2 i D2 podani równocześnie stymulują adhezję granulocytów), 6. Zależną od TNF- α i aktywacji receptorów adhezję granulocytów do komórek śródbłonna/HUVEC (agonista B2 stymuluje, agonista D2 nie wpływa, agoniści B2 i D2 podani równocześnie hamują adhezję granulocytów do komórek śródbłonna preinkubowanych z TNF- α), 7. Związane z aktywacją receptorów zmiany w poziomie białek adhezyjnych w komórkach śródbłonna/HUVEC (agonista B2 zwiększa, agonista D2 nie wpływa, agoniści B2 i D2 podani równocześnie obniżają poziomy białek adhezyjnych E-selektyny i ICAM-1, ale nie VCAM-1), 8. Zależne od TNF- α i aktywacji

receptorów zmiany w poziomie IL-8, IL-6 i endoteliny-1 w komórkach śródbłonka/HUVEC (agonista B2 zwiększa, agonista D2 obniża, agoniści B2 i D2 podani równocześnie nie zmieniają poziomu IL-8 lecz obniżają poziomy IL-6 i endoteliny-1), **9**. Związany z aktywacją receptorów wzrost aktywności eNOS i poziomu NO w komórkach śródbłonka/HUVEC (agoniści B2 i D2, zastosowani pojedynczo lub równocześnie, zwiększają aktywność eNOS i poziom NO), **10**. Zależny od aktywacji receptorów wzrost produkcji reaktywnych form tlenu ROS przez komórki śródbłonka/HUVEC (agonista B2 zwiększa, agonista D2 nie wpływa, agoniści B2 i D2 podani równocześnie zwiększają produkcję ROS), **11**. Zależne od aktywacji receptorów zmiany aktywności dysmutazy nadadtlenkowej MnSOD/Cu/ZnSOD i katalazy (agonista B2 zwiększa, agonista D2 zwiększa, agoniści B2 i D2 podani równocześnie zwiększają aktywność katalazy i Cu/ZnSOD, ale obniżają aktywność MnSOD), **12**. Zależne od aktywacji receptorów nasilenie lub osłabienie procesów apoptotycznych w komórkach śródbłonka/HUVEC, czego miarą jest relacja między poziomem białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xL a poziomem białka proapoptotycznego Bax (agonista B2 nasila, agonista D2 osłabia, agoniści B2 i D2 podani równocześnie hamują procesy apoptotyczne), **13**. Zależne od aktywacji receptorów zmiany w poziomie fosforylacji białek STAT3, Akt i p44/42 MAPK w komórkach śródbłonka/HUVEC (agonista B2 stymuluje, agonista D2 nie wpływa, agoniści B2 i D2 podani równocześnie hamują fosforylację).

Odnośnie rozdziału WYNIKI, mam wrażenie, że na Rys. 24 i 27 poziom białka referencyjnego β -aktyny nie jest taki sam w obrębie jednego przedziału czasowego. Na Rys. 26C nie zaznaczono niektórych wartości jako statystycznie istotne. Ponadto, interesuje mnie, w jaki sposób można wytłumaczyć spadek aktywności kaspazy-3 i -7 poniżej poziomu aktywności spontanicznej, co Doktorantka zaobserwowała w komórkach HUVEC w odpowiedzi na równoczesne podanie agonistów B2 i D2.

Rozdziały DYSKUSJA, PODSUMOWANIE i DODATKI obejmują łącznie 33 strony rozprawy. Nie ukrywam, że trochę zabrakło odrębnego rozdziału WNIOSKI, choć jego rolę w pewnej mierze pełni schemat – Rys. 21. Dyskusja wyników pracy badawczej została poprowadzona przez Doktorantkę w sposób kompetentny i przemyślany, z nawiązaniem do najnowszej literatury dotyczącej przedmiotu badań. Każda omawiana część wyników oraz ich interpretacja została zakończona podsumowaniem, dzięki czemu czytelnik może przejść przez lekturę tego zazwyczaj trudnego rozdziału z przekonaniem o oryginalności i nowatorskim charakterze badań prowadzonych przez Doktorantkę. Podobnie jak to zostało przedstawione w PODSUMOWANIU, za najważniejsze osiągnięcie Doktorantki uważam wykazanie, że:

- I. Receptory B2 i D2 tworzą funkcjonalne heterodimery.
- II. Aktywacja receptora B2 przez bradykininę:
 - a. prowadzi do wzrostu poziomu Ca^{2+} i cAMP w komórkach HEK293,
 - b. stymuluje adhezję granulocytów do komórek śródbłonka/HUVEC oraz zwiększa poziom białek adhezyjnych E-selektyny i ICAM-1,
 - c. zwiększa poziom cytokin IL-8 i IL-6, endoteliny-1, NO, ROS,
 - d. stymuluje aktywność eNOS, dysmutazy nadadtlenkowej MnSOD/Cu/ZnSOD, katalazy
 - e. stymuluje fosforylację STAT3, Akt i p44/42 MAPK,
 - f. nasila apoptozę poprzez wzrost poziomu proapoptotycznego białka Bax i/lub spadek poziomu białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xL.
- III. Aktywacja receptora D2 przez sumanirol wywołuje efekty przeciwstawne do efektów wywołanych przez agonistę B2, co polega na:
 - a. obniżeniu poziomu cAMP w komórkach HEK293,
 - b. obniżeniu poziomu IL-8, IL-6 i endoteliny-1
 - g. hamowaniu apoptozy poprzez obniżenie poziomu proapoptotycznego białka Bax i/lub wzrost poziomu białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xL.
- IV. Równoczesna aktywacja receptora B2 i D2 przez selektywnych agonistów wywołuje efekty zbliżone do efektów wywołanych przez agonistę B2, co dotyczy:
 - a. wzrostu poziomu Ca^{2+} i cAMP w komórkach HEK293, ———
 - b. zwiększonej produkcji ROS,
 - c. zwiększonej aktywności eNOS, dysmutazy nadadtlenkowej Cu/ZnSOD i katalazy.
- V. Równoczesna aktywacja receptora B2 i D2 przez selektywnych agonistów wywołuje efekty przeciwstawne do efektów wywołanych przez agonistę B2, co dotyczy:
 - a. hamowania adhezji granulocytów do komórek śródbłonka/HUVEC i obniżenia poziomu białek adhezyjnych E-selektyny i ICAM-1,
 - b. obniżenia poziomu IL-6 i endoteliny-1,
 - c. hamowania fosforylacji STAT3, Akt i p44/42 MAPK,
 - d. hamowania apoptozy.

Powyższe wyniki skłaniają zatem do wniosku, w myśl którego niekorzystnym skutkiem aktywacji receptora B2, jakimi są m.in. podwyższony poziom cytokin IL-8 i IL-6 oraz apoptoza, może przeciwdziałać aktywacja receptora D2. Co więcej, niekorzystnym skutkiem aktywacji receptora B2 jak np. adhezji granulocytów do komórek śródbłonka, zwiększonej sekrecji IL-6 czy nasilonej apoptozie może zapobiegać równoczesna aktywacja receptorów B2 i D2. Te obserwacje można wykorzystać w projektowaniu leków poprawiających

funkcjonowanie śródbłonka poprzez oddziaływanie na pojedyncze receptory i/lub kompleksy receptorów B2 i D2.

PODSUMOWANIE i WNIOSEK KOŃCOWY

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w rozwój dziedziny nauki poświęconej receptorom GPCR i ich roli w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania śródbłonka. Identyfikacja funkcjonalnych heterodimerów B2R-D2R oraz szczegółowa charakterystyka ich oddziaływania na procesy zapalne, stres oksydacyjny i apoptozę może się przyczynić do pełniejszego zrozumienia molekularnych mechanizmów towarzyszących tworzeniu kompleksów receptorów GPCR. Te odkrycia mogą dać asumpt do podjęcia prób nad wykorzystaniem nowej wiedzy we wczesnej diagnostyce i/lub leczeniu. Dla przykładu, kompleksy receptora dopaminowego D2 z receptorem adenozynowym A_{2A} i receptorem kanabinoidowym CB₁ występują w prądkowiu zdrowych zwierząt. Natomiast tych kompleksów brakuje u zwierząt z dyskinezją wywołaną długotrwałym stosowaniem L-DOPA, a więc w warunkach patologicznych. Szereg najnowszych badań wskazuje na potencjalne wykorzystanie heterodimerów receptorów GPCR, jako celów/"targetów" terapeutycznych wykorzystywanych w leczeniu depresji czy schizofrenii.

Rozprawę doktorską Pani mgr Anny Niewiarowskiej-Sendo oceniam bardzo wysoko, a nieliczne uwagi krytyczne nie umniejszają merytorycznej wartości pracy. Zważywszy na wysoce oryginalne wyniki i nowatorski charakter badań, jak również zastosowanie nowoczesnych metod i technik badawczych z zakresu biologii molekularnej i komórkowej oraz mikroskopii konfokalnej, co przewyższa zwyczajowe wymogi prac doktorskich, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy. Rozprawa doktorska mgr Anny Niewiarowskiej-Sendo pt. *„Dimeryzacja receptora bradykininy B2 z receptorem dopaminergicznym D2 oraz wpływ oddziaływań pomiędzy nimi na wybrane funkcje komórek śródbłonka”* spełnia wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r., Nr 65 poz. 595., Dz. Ustaw z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. Ustaw z 2011 r., Nr 84, poz.455). Wniosuję o dopuszczenie mgr Anny Niewiarowskiej-Sendo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 8 maja 2019



Małgorzata Kajta