PAN - Instytut Immunologii
Wpl. dnia 2-1-10-2016
L. dz. 44676

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Zakład Farmakodynamiki

90-151 Łódź, ul. Muszynskiego 1

Kierownik: prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Makuch**
**pt. „Wpływ fosfodiesterazy 2 na regulację ekspresji genu hydroksylazy tyrozyny w komórkach szczurzego guza chromochłonnego PC12"**

Rdzeń nadnerczy produkuje i uwalnia do krwi aminy katecholowe: noradrenalinę, adrenalinę i dopaminę. U człowieka większość amin katecholowych uwalnianych do żyły nadnerczowej stanowi adrenalina. Zwiększone wydzielanie amin katecholowych z rdzenia nadnerczy wynika z pobudzenia układu współczulnego i jest fizjologiczną odpowiedzią na różnorodne sytuacje stresogenne. Jednakże długotrwałe utrzymujący się wysoki poziom adrenaliny i noradrenaliny w krwiobiegu może skutkować poważnymi, a nawet zagrażającymi życiu zaburzeniami w pracy układu krążenia. Wydaje się zatem, że szczegółowe poznanie mechanizmów, w tym neurobiochemicznych, leżących u podłoża kompleksowej regulacji syntezy amin katecholowych przez rdzeń nadnerczy może stanowić podstawę do modyfikacji bądź projektowania nowych tarczy farmakologicznych w leczeniu chorób układu krążenia.

W torze biosyntezy amin katecholowych kluczową rolę odgrywa hydroksylaza tyrozynowa (TH). Pomimo wieloletnich badań molekularne mechanizmy leżące u podłoża zmian ekspresji tego enzymu, szczególnie w warunkach patofizjologicznych, nie zostały do końca wyjaśnione. Nieliczne dane sugerowały udział przedsionkowego peptydu natriuretycznego, o którym wiadomo, że przeciwdziała efektom wywoływanym przez aminy katecholowe, w regulacji ekspresji genu *TH*.

**W świetle powyższych informacji uważam, że badania mgr inż. Edyty Makuch nad rolą fosfodiesterazy 2, enzymu aktywowanego przez cGMP, w regulacji ekspresji genu *TH* w komórkach linii PC12 guza chromochłonnego nadnerczy szczura za w pełni uzasadnione**.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa liczy 116 stron i ma charakter typowy dla tego typu prac. Składa się z wykazu stosowanych skrótów, wstępu, opisu założeń i celu pracy, materiałów i metod wykorzystanych w realizacji badań, uzyskanych wyników oraz ich podsumowania, dyskusji, wniosków, wykazu piśmiennictwa, suplementu i jednostronicowych streszczeń w języku polskim i angielskim.

W wykazie skrótów brakuje IBMX i ICER. W przypadku EGTA zamiast synonimu, kwas wersenowy, należało podać nazwę chemiczną - kwas etylenobis(oksyetylenonitrylo)tetraoctowy. Prawidłowa pełna nazwa PACAP to polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylową (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide). $PAC_1$ to receptor dla PACAP, a $VPAC_1$ i $VPAC_2$ to receptory dla VIP i PACAP. Zarówno PACAP jak i VIP nie są białkami, a peptydami. Ponadto, do receptora wiążą się zarówno ligandy o działaniu agonistycznym jak i antagonistycznym. Prawidłowe rozwinięcie skrótu $IP_3$ to inozytolo-1,4,5-trisfosforan.

Obszerny, 23-stronicowy Wstęp wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy doktorskiej. Doktoranta opisuje w nim biosyntezę amin katecholowych ze szczególnym uwzględnieniem roli hydroksylazy tyrozynowej i czynników wpływających na ekspresję genu kodującego ten enzym, przedstawia charakterystykę PACAP i adenozyny, receptorów dla tych neuroprzekaźników oraz ich udział w regulacji syntezy i sekrecji amin katecholowych przez komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy. Ostatnia część Wstępu poświęcona jest fosfodiesterazom cyklicznych nukleotydów (PDE), z których PDE2 jako czynnik uczestniczący w łączeniu wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych uruchamianych przez zmiany stężeń cyklicznych nukleotydów, stanowi przedmiot badań prowadzonych przez mgr inż. Makuch.

Wstęp został opracowany w oparciu o starannie dobrane piśmiennictwo i dowodzi dużej wiedzy Doktorantki. Pewien wyłom w tym zakresie stanowi opis fizjologicznej regulacji uwalniania amin katecholowych z rdzenia nadnerczy. Do rdzenia nadnerczy docierają przedzwojowe włókna układu współczulnego, z których zakończeń uwalniana jest acetylocholina (nie tylko w odpowiedzi na stres). Neuroprzekaźnik ten pobudzając postsynaptyczne receptory nikotynowe zlokalizowane na komórkach chromochłonnych, uruchamia kaskadę procesów prowadzących do sekrecji adrenaliny, noradrenaliny i dopaminy. Termin „nerwy

trzewiowe" nie istnieje. Należy pamiętać o tym, że w rdzeniu nadnerczy człowieka dopamina służy głównie jako prekursor w biosyntezie noradrenaliny (i dalej adrenaliny), a sekrecja tego związku do krwiobiegu jest marginalna. Noradrenalina jest ważnym neuroprzekaźnikiem nie tylko w ośrodkowym układzie nerwowym, ale także w części współczulnej układu wegetatywnego.

Nie bardzo rozumiem co oznacza sformułowanie „Katecholaminy wydzielone do przestrzeni międzykomórkowej..... „. Zapewne Doktorantce chodziło o noradrenalinę uwolnioną z zakończeń zazwojowych włókien współczulnych do przestrzeni synaptycznej.

W tej części Wstępu należało wyraźnie zaznaczyć, że wzrost ciśnienia tętniczego krwi oraz rozszerzenie oskrzeli są w dużym stopniu wynikiem działania noradrenaliny uwolnionej z zazwojowych włókien współczulnych.

Strona 8 - Receptory wiążące PACAP. Piąte zdanie w tym podrozdziale jest zbyt daleko idącym uogólnieniem. Sądzę, że Doktorantka miała na myśli warianty receptora $PAC_1$ powstałe w wyniku alternatywnego składania mRNA.

Założenia i cel pracy zostały opisane w przejrzysty sposób. Głównym celem badań prowadzonych przez mgr inż. Makuch było wyjaśnienie mechanizmu leżącego u podstaw hamowania przez szczurzy przedsionkowy peptyd natriuretyczny (rANP) transkrypcji genu *TH* indukowanej przez adenozynę, a także PACAP, w komórkach szczurzego guza chromochłonnego nadnerczy linii PC12.

Aby uzyskać kompleksową odpowiedź, Doktorantka przeprowadziła dobrze zaplanowane serie doświadczeń, które miały na celu:

(1) Określenie, w jaki sposób rANP hamuje ekspresję *TH* pod wpływem ekspozycji komórek na adenozynę lub PACAP.

(2) Określenie, w którym miejscu dochodzi do łączenia się wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału uruchamianych przez rANP i adenozynę oraz rANP i PACAP.

(3) Wytypowanie tarczy biochemicznej (enzym, białko nieenzymatyczne, inne), która odgrywa kluczową rolę w procesie hamowania transkrypcji *TH* w odpowiedzi na adenozynę i PACAP.

(4) Opisanie negatywnie regulowanej ścieżki sygnałowej odpowiedzialnej za transkrypcję genu *TH*.

Bardzo obszerny, 30-stronnicowy rozdział Materiały i Metody został napisany w sposób bardzo kompetentny. Dowodzi on, iż Doktorantka jest niewątpliwie specjalistką w zakresie zaawansowanych technik biologii molekularnej. Do rozdziału tego mam drobne uwagi, głównie natury edytorskiej.

- Brak informacji o źródle zakupu PACAP, adenozyny, H-89 i odczynnika Bradforda.
- Który PACAP był stosowany w badaniach: PACAP-38 czy PACAP-27? Zwracam uwagę na fakt, że zastosowanie uogólnionego terminu PACAP jest niepoprawne również i z tego względu, że skrócone formy peptydu, PACAP6-38 i PACAP6-27, są antagonistami receptorów $PAC_1$.
- W przypadku Bay 60-7550 i U0126 należało podać pełne nazwy chemiczne związków.
- PMSF – powinno być fluorek fenylometylosulfonylu
- W jakich doświadczeniach stosowano forskolinę, która jest wymieniona w wykazie odczynników?
- Opisy źródła odczynników i innych materiałów powinny być ujednolicone: nazwa firmy, miejscowość, kraj.
- Str. 31 – pCRE-Luc. Powinno być: otrzymany od dr. inicjał imienia Hetmana.

Uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane na 33 stronach i przedstawione na 19 starannie przygotowanych wykresach. Z punktu widzenia czytelnika dużą zaletą tej części rozprawy jest forma narracji utrzymana w logicznej sekwencji – po krótkiej informacji, dlaczego zastosowano dany model doświadczalny/narzędzia badawcze, następuje opis wyników, a po nim bardzo zwięzły cząstkowy wniosek/hipoteza wyjaśniająca. Doktorantka w logiczny i konsekwentny sposób, krok

po kroku, przechodzi od jednej serii badań do drugiej, która jest oparta o wyniki uzyskane wcześniej. Podsumowanie wyników, przedstawione na stronie 80, pozwala na całościowe objęcie ogromu danych doświadczalnych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

W żmudnych i pracochłonnych badaniach mgr Makuch wykazała, że ekspozycja komórek chromochłonnych szczura linii PC12 na adenozynę oraz PACAP prowadzi do wzrostu poziomu cAMP i aktywacji ekspresji genu kodującego TH. Proces ten hamuje rANP, który podnosi wewnątrzkomórkowe stężenie cGMP. Działanie rANP znosi nieselektywny inhibitor PDE – IBMX oraz wybiórcze inhibitory PDE2 – EHNA i Bay 60-7550. H89 (inhibitor PKA) i U0126 (inhibitor kinaz MAPK) hamują wywołaną przez adenozynę aktywację genu *TH* w komórkach linii PC12. Pod wpływem adenozyny dochodzi do aktywacji (fosforylacji) czynnika transkrypcyjnego CREB i kinaz ERK1/2, a pierwszy z tych procesów jest hamowany przez rANP. W wyniku zaburzeń w prawidłowym działaniu białka CREB dochodzi do silnego obniżenia stopnia aktywacji promotora genu *TH* pod wpływem adenozyny oraz zniesienia hamującego działania rANP i 5,6-DM-cBIMP (wybiórczego aktywatora PDE2) na ten proces. Zarówno rANP jak i 5,6-DM-cBIMP zmniejszały poziom mRNA-TH indukowany przez adenozynę.

Do rozdziały Wyniki mam następujące pytania:

(1) Rycina 6.5. Dlaczego w obecności IBMX dochodzi do redukcji wzrostu stężenia cAMP wywołanego przez adenozynę, natomiast nie obserwuje się zmian w odpowiedzi na PACAP?

(2) Strona 64, trzecia linijka od góry – zapewne chodziło o PDE3A?

(3) Strona 66. Czy wywołane przez rANP i 5,6-DM-cBIMP obniżenie wzrostu stężenia cAMP pod wpływem PACAP było znamienne statystycznie?

(4) Strona 67. Czy efekt działania inhibitorów PDE2 na hamowanie przez rANP wzrostu stężenia cAMP pod wpływem PACAP był znamienny statystycznie?

W kolejnym rozdziale rozprawy Doktorantka dyskutuje uzyskane przez siebie wyniki na tle dostępnych danych piśmiennictwa podejmując się niewątpliwie trudnego zadania jakim było wyjaśnienie hamującego działania rANP ma transkrypcję genu *TH*

indukowaną przez dwa ważne neuroprzekaźniki, które uczestniczą w regulacji syntezy amin katecholowych przez komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy. W Dyskusji szczególny nacisk został położony na cross-talk pomiędzy ścieżkami sygnalizacyjnymi zależnymi od cAMP i cGMP. Doktorantka udowadnia, że w wymianie informacji pomiędzy tymi ścieżkami kluczową rolę odgrywa PDE2, dwusubstratowa fosfodiesteraza występująca w komórkach linii PC12. Aktywacja tego enzymu przez cGMP prowadzi do zwiększenia jego aktywności hydrolitycznej wobec cAMP. Przedstawiony na końcu rozdziału schemat proponowanego mechanizmu negatywnej regulacji transkrypcji genu *TH* przez PDE2 pozwala na zrozumienie tego kompleksowego procesu. Sposób i forma przeprowadzenia dyskusji świadczą o dużej wiedzy Doktorantki, krytycznym podejściu do całości uzyskanych wyników, a także o jej dojrzałości naukowej.

Uzyskane wyniki i dyskusja nad nimi pozwoliły na sformułowanie adekwatnych wniosków: jednego głównego i sześciu uzupełniających.

Całość rozprawy kończy imponujący wykaz cytowanych anglojęzycznych pozycji piśmiennictwa w liczbie 263, z których większość pochodzi z okresu ostatnich 15 lat.

W podsumowaniu, rozprawę doktorską mgr inż. Edyty Makuch oceniam wysoko. Przeprowadzone doświadczenia zostały starannie zaplanowane w oparciu o nowoczesną wiedzę z zakresu biochemii i biologii molekularnej, a uzyskane wyniki są oryginalne i bardzo interesujące. Rozprawa stanowi samodzielny dorobek naukowy, a Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą i umiejętnością prowadzenia badań naukowych.

W mojej ocenie rozprawa spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki oraz Rozporządzeniu Ministra Edukacji Naukowej i Sportu z dnia 15.01.2004 r. **Uważam zatem, że powyższe stwierdzenie upoważnia mnie do przedstawienia wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN wniosku o dopuszczenie mgr inż. Edyty Makuch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Ponadto, biorąc pod uwagę kompleksowość prowadzonych badań, obszerność i wartość merytoryczną uzyskanych wyników oraz fakt, że część z nich została opublikowana w czasopiśmie o IF 3,974 wnioskuję o wyróżnienie pracy.**

Łódź, 17 października, 2016 r.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakodynamiki
Katedry Biofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

*prof. dr hab. n. farm. Joanna B. Zawilska*