



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 10.05.2019 r.

dr hab. Halina Małgorzata Żbikowska
prof. UŁ
Katedra Biochemii Ogólnej
Instytut Biochemii UŁ
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

OCENA
pracy doktorskiej mgr. Tomasza Radzika
„Wpływ zaburzeń homeostazy wapniowej na procesy sygnalizacji indukowane
chemokiną CCL5 w różnicowanych komórkach PC12”

Promotor pracy: prof. dr hab. Ludmiła Żylińska

Komórkowy system homeostazy wapniowej jest sprawnym narzędziem wykorzystującym jony wapnia w mechanizmach przekazywania sygnałów. W warunkach normy, w niepobudzonej komórce, stężenie wapnia w cytozolu jest utrzymywane na bezpiecznym, niskim poziomie ok. 100 nmol/L, co porównując ze stężeniem 1-2 mmol/L, panującym w przestrzeni pozakomórkowej, stanowi różnicę 4 rzędów wielkości. W neuronach, komórkach pobudliwych, charakteryzujących się intensywnymi przepływami jonów wapnia, znane są różnorodne mechanizmy kontrolowanego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i ich usuwania z cytozolu. Do najważniejszych transporterów jonów wapnia, odpowiedzialnych za ich usuwanie z cytozolu, należy pompa wapniowa błony plazmatycznej (PMCA), występująca w postaci czterech izoform 1-4, z czego specyficznymi dla komórek pobudliwych są izoformy 2 i 3. Wg obecnych poglądów zaburzenia homeostazy wapnia i jego funkcji sygnałowych są ważnym czynnikiem uszkodzenia i śmierci neuronów zarówno w ostrych stanach patologicznych mózgu (m.in. w ischemii mózgu), jak i w patogenezie wielu wolno rozwijających się schorzeń neurodegeneracyjnych, często związanych z podeszłym wiekiem. Jedną z przyczyn zaburzenia homeostazy wapnia w tych procesach jest dysfunkcja pompy wapniowej błony plazmatycznej. Wykazano, że komórki nerwowe z zaburzoną homeostazą wapniową są bardziej podatne na działanie czynników stresowych, takich jak stres oksydacyjny czy stany zapalne. Dodatkowo postępujące z wiekiem zwiększenie przepuszczalności bariery krew-mózg prowadzi do infiltracji tkanki nerwowej przez czynniki prozapalne, m.in. cytokiny i chemokiny, a także przez komórki układu immunologicznego. Mimo licznych dowodów świadczących o obniżonej aktywności pompy wapniowej w starzejącym się mózgu i w chorobach neurodegeneracyjnych, jej wpływ na funkcjonowanie neuronów, jak i udział innych czynników w mechanizmie patogenezy tych schorzeń, nie są dobrze poznane.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Tomasza Radzika wpisuje się bardzo dobrze w ten kontekst badawczy, stanowiąc oryginalny wkład w zagadnienia związane z

tel.: 0 48 42 635-44-83
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: halina.zbikowska@biol.uni.lodz.pl

poznaniem mechanizmów regulacji homeostazy wapnia podczas starzenia się mózgu i określeniem roli izoform PMCA2 i 3 w tych procesach. W mojej opinii jest to tematyka, jak najbardziej uzasadniona, aktualna, a biorąc pod uwagę złożoność problemu także bardzo ambitna.

Rozprawę doktorską mgr. Tomasza Radzika stanowi, liczące łącznie 92 strony, opracowanie zawierające 22 ryciny, 3 tabele oraz 266 starannie wybranych pozycji literaturowych. Praca ma układ i strukturę typową dla tego rodzaju dysertacji. Składa się z sześciu zasadniczych części, obejmujących opracowanie literaturowe wprowadzające w tematykę rozprawy, cele pracy, opis stosowanych metod badawczych, prezentację wyników, dyskusję oraz wnioski. Autor zamieścił także na początku pracy alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów i symboli, a na końcu streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz piśmiennictwa, spis rycin i tabel oraz listę swoich publikacji i komunikatów. Z punktu widzenia formalnego i edytorskiego praca przygotowana jest z dużą starannością i napisana poprawną polszczyzną.

W liczącym 18 stron wstępie teoretycznym Autor w sposób przejrzysty, zwięzły i rzeczowy przedstawia budowę i mechanizmy działania najważniejszych białek transportujących i buforujących wapń oraz ich rolę w homeostazie jonów wapnia w komórkach nerwowych, a także opisuje zaburzenia homeostazy wapniowej w starzejącym się mózgu. Ostatni podrozdział jest przeglądem literatury na temat chemokin i ich receptorów, ze szczególnym uwzględnieniem ścieżek sygnałowych dla prozapalnej chemokiny CCL5. Wstęp teoretyczny zawiera wszystkie dane niezbędne do zrozumienia celu pracy i wybranej metodyki badawczej. W kolejnym rozdziale Doktorant formułuje główny cel pracy, którym było określenie wpływu zaburzenia homeostazy wapniowej, wywołanej obniżeniem ekspresji izoform 2 i 3 pompy wapniowej błony plazmatycznej (PMCA), na odpowiedź komórek PC12 na stymulację chemokiną CCL5, a także formułuje cztery szczegółowe cele pracy, obejmujące:

1. Określenie wpływu blokowania ekspresji izoform 2 i 3 PMCA na poziom i lokalizację komórkową receptorów chemokiny CCL5
2. Określenie zależności pomiędzy blokowaniem ekspresji izoform 2 i 3 PMCA, a zmianą intensywności sygnału wapniowego wywołanego przez chemokinę CCL5
3. Analizę ścieżki sygnałowej rozpoczynającej się od aktywacji receptorów CCL5
4. Określenie wpływu zaburzeń homeostazy wapniowej na ekspresję receptorów IP₃

Jako model badawczy wykorzystano komórki PC12, linii wyprowadzonej z guza chromochłonnego nadnercza szczura, które są standardowo używane jako model komórek neuronalnych oraz w badaniach nad różnicowaniem komórek nerwowych. Doktorant w rozdziale Materiały i metody szczegółowo opisuje technikę interferencji RNA, którą wykorzystał w celu uzyskania stabilnie transfekowanych linii komórek PC12 ze zmniejszoną ekspresją izoform 2 lub 3 pompy wapniowej. Następnie zapoznaje czytelnika z metodologią badań, znakomicie dobraną dla realizacji postawionych celów pracy, m.in. do analizy ekspresji izoform 2 i 3 pompy wapniowej oraz receptorów chemokinowych i receptorów IP₃, na poziomie RNA i na poziomie białka, Doktorant wykorzystał, odpowiednio, reakcje odwrotnej transkrypcji oraz PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym i immunodetekcję metodą Western blotting, natomiast lokalizację receptorów chemokinowych w komórkach PC12 określił metodą mikroskopii konfokalnej po wybarwieniu immunofluorescencyjnym.

Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowane zostały w formie złożonych 15 rycin, prawidłowych pod względem merytorycznym i graficznym. Poza czytelnym sposobem prezentacji wyników, uderza duża dojrzałość i dociekliwość w ich interpretacji oraz wyciąganiu

wniosków. W obszernej i bardzo ciekawie napisanej dyskusji, zakończonej wyważonymi wnioskami, Autor w sposób kompetentny skonfrontował wyniki swoich badań z wynikami innych autorów. Potwierdził tym samym bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu i właściwą ocenę wyników badań. Graficzne, zbiorcze przedstawienie zaobserwowanych zmian wywołanych działaniem cytokiny CCL5 w badanych liniach komórkowych (Ryc. 22) stanowi dobre podsumowanie i znacznie ułatwia interpretację wyników.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki wykazały, że zaburzona homeostaza wapniowa spowodowana obniżeniem charakterystycznych dla komórek pobudliwych izoform 2 lub 3 pompy wapniowej błony plazmatycznej istotnie zmienia odpowiedź komórek PC12 na chemokinę CCL5. Zmianom ulega ekspresja receptorów dla chemokiny CCL5 (CCR1, CCR3 i CCR5) oraz izoform receptora IP₃, co może być swego rodzaju procesem adaptacyjnym, warunkującym większą odporność komórek z zaburzoną homeostazą wapniową na sygnalizację powodującą opróżnienie magazynów jonów wapniowych w siateczce śródplazmatycznej. Na podstawie analizy uzyskanych wyników wywnioskowano również, że w warunkach fizjologicznych przede wszystkim izoforma 2 pompy wapniowej najszybciej i najskuteczniej redukuje wzrosty stężenia jonów wapniowych w cytozolu. A zatem upośledzenie działania tej izoformy i związane z tym zaburzenia homeostazy wapniowej mogą być destrukcyjne dla komórek nerwowych. Przedstawione oryginalne wyniki oferują nowe spojrzenie na wyjaśnienie zmian biologicznych zachodzących w neuronach, związanych ze starzeniem się, jak i podłoża zaburzeń neurodegeneracyjnych. W stanach patologicznych, w tym związanych z prozapalnym działaniem cytokiny CCL5 i chroniczną dyshomeostazą jonów wapnia, przy braku skutecznych mechanizmów ochronnych, może dochodzić do postępującej degeneracji i śmierci neuronów. Postulowana hipoteza, logicznie wynikająca z analizy wyników, nie została potwierdzona w trakcie przeprowadzonych badań. Sądzę, że analiza zmian apoptotycznych/nekrotycznych w badanych liniach komórkowych byłaby znakomitym uzupełnieniem realizowanego projektu badawczego. Czy Doktorant rozważał podjęcie takich badań?

Jak przy każdym obszernym opracowaniu, również i w tej przedstawionej do recenzji pracy zdarzają się drobne błędy edytorskie, czy też uchybienia językowe. Są one nieliczne i nie obniżają bardzo dobrego pod względem merytorycznym poziomu pracy. Chciałabym z obowiązku recenzenta przekazać Autorowi niektóre z nich:

- Str. 11. cyt. „Oba końce cząsteczki (aminowy i kwasowy)...” – nie zgodziłabym się z określeniem „kwasowy”, w przypadku cząsteczki białka/peptydu wyróżnia się koniec karboksylowy, albo region C-końca.
- Str 17. cyt „przejściowy wzrost Ca⁺² odnotowano” – powinno być przejściowy wzrost stężenia Ca⁺² odnotowano”
- Str. 27 - tytuł podrozdziału „Plazmidy transfekcyjne” – jest określeniem pochodzącym z dosłownego tłumaczenia z języka angielskiego, funkcjonującym raczej w żargonie laboratoryjnym, poprawniej w języku polskim będzie „Plazmidy do transfekcji”
- Str 29 – domyślam się, że do izolacji plazmidowego DNA Doktorant stosował gotowy zestaw i postępował zgodnie z procedurą podaną przez producenta, jednak przy opisie metody nie podano nazwy zestawu ani producenta
- W tabeli 2 (str. 33) zatytułowanej Sekwencje starterów, skróty znajdujące się w pierwszej kolumnie nie oznaczają nazwy genu, jak głosi nagłówek tabeli – prosiłabym o wprowadzenie stosownych nazw
- Niepoprawne jest używanie, w tytułach podrozdziałów, w tekście oraz w podpisach pod rycinami, określenia „analiza immunologiczna” - metody stosowane przez Doktoranta, z zastosowaniem przeciwciał i znaczników enzymatycznych, czy też fluorescencyjnych, należą do metod immunochemicznych, a zatem np. podrozdział 3.8.

(str. 33) powinien być zatytułowany Analiza immunochemiczna, a podrozdział 4.1.3. dotyczący analizy ekspresji izoform PMCA metodą Western blotting, np. „Immunodetekcja izoform PMCA”

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr. Tomasza Radzika jest tematycznie spójna, nowatorska i stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego, wnosząc istotne wartości przede wszystkim poznawcze. Uzyskane wyniki mogą mieć też wymiar praktyczny, wskazując ochronę pompy wapniowej błony plazmatycznej jako nowy cel terapeutyczny w prewencji degeneracji neuronów. W trakcie realizacji pracy Doktorant wykazał się znajomością szeregu technik badawczych, umiejętnością stawiania i weryfikacji hipotez badawczych oraz krytycznej analizy i interpretacji wyników. W efekcie, w czasie krótkiego stażu Doktorant zgromadził niezły dorobek publikacyjny w postaci 4 artykułów oryginalnych (piąta praca znajduje się w recenzji), w tym 1 eksperymentalny i 3 przeglądowe, z których jeden został opublikowany w renomowanym czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu (IF=4,048), a także pięciu komunikatów zjazdowych z konferencji krajowych i międzynarodowych, co świadczy o Jego dużej aktywności naukowej.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny **rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm).** Wnoszę, zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr. Tomasza Radzika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną pracy, potwierdzoną opublikowaniem jej wyników w oryginalnym artykule w międzynarodowym czasopiśmie indeksowanym przez Journal Citation Reports, wnoszę do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.



.....
dr hab. Halina M. Żbikowska, prof. UŁ