



Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz
Kierownik Zakładu Biochemii
i Pracowni Molekularnych Podstaw
Ruchów Komórkowych

Warszawa, 11 września 2013 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Bartosza J. Zięby

pt. "Role of exchange protein activated by cAMP - Epac1 and its immediate effector Rap1 in vascular smooth muscle relaxation" (*Rola aktywowanego przez cAMP czynnika wymiany nukleotydu guaniny Epac1 oraz jego bezpośredniego efektora Rap1 w rozkurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych*) wykonanej pod kierunkiem: dr Avril V. Somlyo z Department of Molecular Physiology and Biological Physics w University of Virginia i dr hab. Ewy Zuba-Surmy z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Mimo iż od poznania mechanizmu regulacji oddziaływania w mięśniach gładkich miozyny i aktyny poprzez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny minęły blisko cztery dekady, wciąż wiele ścieżek regulujących oddziaływanie tych głównych białek generujących skurcz mięśni gładkich pozostaje niezbadanych. Badania wielu zespołów na całym świecie, w tym kierowanego przez dr Avril Somlyo wykazały, że w regulacji skurczu mięśni gładkich zaangażowane są małe białka G z rodziny Rho oraz szlak przekazywania sygnału z cAMP. Poszukiwanie ścieżek sygnałowych regulujących skurcz (i rozkurcz) mięśni gładkich oraz wzajemnych ich oddziaływań ma olbrzymie znaczenie nie tylko dla rozwoju wiedzy o funkcjonowaniu mięśni, ale także dla rozwoju farmakoterapii chorób związanych z nadciśnieniem tętniczym, które stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów w populacji światowej. Doktorant w przedstawionej mi do recenzji rozprawie scharakteryzował - na poziomie tkankowym, komórkowym i molekularnym - nowo odkryty mechanizm zależnego od cAMP rozkurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych, niezwiązany z kinazą białkową A (PKA) natomiast związany z białkiem Epac1, czynnikiem GEF dla białka Rap1, małego białka wiążącego GTP z nadrodziny Ras. Rozprawa mgr. Bartosza Zięby doskonale wpisuje się w nurt badań nad zrozumieniem mechanizmów regulujących skurcz mięśni gładkich i wnosi nowe (i ważne) obserwacje, już zauważone przez innych badaczy (publikacja z 2011 r. zawierająca część wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej doczekała się blisko 20 cytowań).

Formalny opis rozprawy

Rozprawa została napisana w języku angielskim, co wynika z faktu, że kopromotorem rozprawy jest dr A.V. Somlyo z University of Virginia w USA. Licząca 126 stron praca posiada w zasadzie układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się listą rycin, trzypięciowym wykazem stosowanych skrótów, po którym następują streszczenia (w języku angielskim i polskim). Wstęp liczy 29 stron i zawiera 5 rycin (w tym jedna zawierająca wzory chemiczne analogów cAMP). Po krótkim sprecyzowaniu celów pracy znajduje się liczący 15 stron rozdział materiały i metody zawierający dwie ryciny i tabelę z sekwencjami stosowanych starterów oraz wzór do obliczeń w analizie statystycznej. Wyniki liczą 26 stron i zawierają 20 złożonych rycin i tabelę; po nich następuje 13-stronicowa dyskusja wraz ze wskazaniem kierunku badań wynikających z obserwacji uzyskanych przez Doktoranta i wnioskami końcowymi (zawiera jedną rycinę).

Rozprawa kończy się 24-stronicowym piśmiennictwem, na które składa się 247 pozycji literatury, w tym znaczna ich część to prace z ostatnich kilku lat.

Ocena merytoryczna

Wykaz skrótów jest wyczerpujący, podane nazwy są w zasadzie prawidłowe, aczkolwiek przy oznaczeniu stężenia jonów wapnia zabrakło informacji, że dotyczy to stężenia jonów właśnie. Poza tym, mam zastrzeżenie do wyjaśnienia skrótu ROK, to nie jest Rho kinase (nie fosforyluje przecież białka Rho), a Rho-associated (bądź Rho-dependent kinase), gdyż jest ona aktywowana przez związanie aktywnego białka Rho.

Wstęp to podsumowanie dotychczasowej wiedzy o dziedzinie, której poświęcona jest rozprawa, a więc o poznanych dotychczas mechanizmach skurczu i relaksacji mięśni gładkich, o białkach Rap, Epac1 oraz o ścieżce sygnałowej cAMP-Epac-Rap1 w funkcjonowaniu mięśniówki naczyń krwionośnych. Nie mam w zasadzie uwag do tej części pracy, jest ona napisana w sposób czytelny i zrozumiały. Z punktu widzenia czytelnika rozprawy można by jednak zamieścić więcej rycin, jak np. schemat ilustrujący złożoność nadrodziny Ras czy też budowę małych białek wiążących GTP, z zaznaczeniem regionów szczególnie istotnych dla aktywności tych białek (Autor o nich wspomina w tekście).

Cel pracy to poznanie roli ścieżki sygnałowej cAMP-Epac-Rap1 w regulacji funkcjonowania mięśni gładkich, a zwłaszcza rozkurczu. Cel główny Autor realizował poprzez stosowanie celi szczegółowych: określenie roli ścieżki Epac-Rap1 w rozkurczu, a zwłaszcza w desensytyzacji mięśnia na jony Ca^{2+} , poznanie wzajemnych zależności pomiędzy szlakiem związanym z PKA i badaną ścieżką, a także próba określenia roli izoform białka Rap1 (1A i 1B) w procesie relaksacji mięśni. Przyznam, że to bardzo ambitne plany.

Dla realizacji zamierzeń Doktorant zastosował wiele technik badawczych, opisanych w rozdziale materiały i metody. Zawiera on spis użytych w toku badań odczynników, starterów i konstruktów/plazmidów oraz opis zastosowanych w toku pracy metod, w tym także sposób otrzymania linii komórek z obniżoną syntezą białka Epac1, metody określenia aktywności Rap1 i Rho, określenia poziomu fosforylacji białek w komórkach hodwli pierwotnej uzyskanych z mięśni gładkich aorty oraz i w wyizolowanych mięśniach gładkich (m.in. naczyń krwionośnych i macicy). Autor przeprowadził badania na poziomie białek rekombinowanych - otrzymanych poprzez ekspresję w bakteriach (oddziaływania pomiędzy białkami), komórek (pomiar aktywności białek w lizatach, immunocytochemia) i tkanek (pomiar siły skurczu izometrycznego). Opis metod jest moim zdaniem wyczerpujący i klarowny, co nie było łatwe do osiągnięcia zważywszy na bogactwo zastosowanych metod i technik. Doktorant nie ustrzegł się jednak od niezamierzonego błędu - lapsusu, a mianowicie - wg opisu na stronie 50- myszy, które wykorzystywał do pomiaru siły skurczu mięśni gładkich ważyły 6-8 funtów (lb.), czyli ok. 3-4 kg! Sądzę jednak, że chodziło mu o myszy, które ważyły od 6-8 uncji (oz.), czyli ok. 170-220 g (też duże). Błędu można było uniknąć stosując jednostki wagi w systemie SI, powszechnie przyjętym w środowisku naukowym, również i w USA. *Notabene*, wagę szczurów użytych do wyprowadzenia linii komórkowej podał już w gramach. Można było również trochę więcej miejsca poświęcić na tkankowo-specyficzne transgeny izoform białka Rap1, ale rozumiem, że tak skrótowe ujęcie było spowodowane tym, że doktorant uzyskał zwierzęta od innej grupy badawczej.

W rozdziale wyniki Doktorant przejrzysto opisuje uzyskane przez siebie dane, a jest ich niemało. W zasadzie to można by nimi obdzielić co najmniej dwie rozprawy doktorskie. Imponujący jest również jego warsztat badawczy, sposób przedstawienia wyników, w zasadzie wszystkie dane są poddane analizie statystycznej, wykonano możliwe do wykonania kontrole. Myślę jednak, że dla przejrzystości pracy na początku rozdziału Autor mógł przedstawić tabelę bądź schemat, w której wymieniono by wykorzystane związki farmakologiczne, ich mechanizm działania i zastosowane w toku pracy skróty.

Pracę rozpoczął Doktorant od wyprowadzenia linii pierwotnej komórek mięśni gładkich aorty i potwierdzenia ich fenotypu, stosując technikę RT-PCR i immunofluorescencję. Tu mam pytanie do Doktoranta - czy na rycinie 9 zamieszczone w układzie poziomym obrazy przedstawiają przykłady trzech komórek? Nie wynika to z opisu ryciny. Doktorant wykazał, że białko Epac1, aktywator białek Rap1 jest obecne w różnych mięśni gładkich i myszy, jednak poziom ekspresji genu kodującego to białko jest bardzo mały w mięśniówce pęcherza moczowego i dwunastnicy, przy czym poziom ekspresji Rap1 w tych tkankach nie różni się znacznie w stosunku do innych mięśni gładkich. Ciekawa jestem, jak Autor interpretuje tę obserwację, bo nie znalazłam odniesienia w dyskusji.

W toku żmudnych i pracochłonnych badań Doktorant zastosował specyficzny aktywator białka Epac - związek nazwany 007, będący analogiem cAMP. Dla porównania stosował również związki farmakologiczne stymulujące skurcz mięśni gładkich i obserwował ich efekt na parametry skurczu mięśni gładkich i ich związek ze stężeniem jonów Ca^{2+} (mięśnie uzyskiwano od zwierząt nie modyfikowanych genetycznie, jak i z wyłączonymi genami kodującymi Epac1 i Rap1B). Wykazał m.in., że 007 indukował rozkurcz (relaksację) mięśni gładkich, stymulowanych do skurczu poprzez fenylefrynę lub pochodną tromboksanu U46619. Działanie to było sprzężone ze spadkiem poziomu aktywnego białka RhoA i fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny. Autor zaobserwował również, że rozkurcz mięśni gładkich wskutek działania analogu prostacykliny PGI₂ (*Cicaprost*) - podobnie jak w przypadku działania 007 - powodował wzrost poziomu aktywnego białka Rap1 i spadek poziomu aktywnego RhoA, i w konsekwencji prowadził do inaktywacji miozyny. Kolejne badania wykonane na skrawkach naczyń krwionośnych w obecności 007 i innych pochodnych cAMP wykazały, że 007 "rozdziela" ścieżkę sygnałową związaną z Epac i białkami Rap od ścieżek związanych z kinazami zależnymi od cAMP i cGMP. Badania uzyskane na tkankach zostały następnie potwierdzone na linii komórek mięśni gładkich aorty, w których wyciszano ekspresję Rap1 bądź Epac1. W komórkach z obniżonym poziomem Rap1 nie zaobserwowano wpływu 007 na spadek poziomu aktywnego RhoA, również obniżenie poziomu Epac1 wpływało na aktywność białek Rap1 (brak aktywacji) i RhoA (wzrost aktywności). Co więcej, aktywacja Epac przez 007 wpływała na poziom ekspresji typowych dla mięśni gładkich: izoformy aktyny, łańcucha ciężkiego miozyny i białka SM22, co Doktorant - w oparciu o dane uzyskane w grupie dr Somlyo - wiąże ze spadkiem aktywności RhoA i związanym z tym wpływem na różnicowanie mięśni gładkich. Doktorant wykazał również, że 007 hamował indukowaną przez S1P (aktywator RhoA) aktywację fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny oraz indukował wzrost ufosforylowania fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny, co prowadziło do inaktywacji tego motoru.

Doktorant przeprowadził także badania na skrawkach aorty brzusznej myszy transgenicznych, w których wyłączono gen kodujący Rap1B (zwierzęta uzyskano we współpracy z dr Magdaleną Chrzanowską-Wodnicką z Blood Research Institute w Milwaukee). Brak tego białka manifestował się wzrostem odpowiedzi skurczowej tkanki na działanie lub wysokie stężenie jonów potasu lub U46619; co było skorelowane ze wzrostem poziomu fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny. Doktorant zaobserwował również, że efekt 007 był tu dużo słabszy w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi i wywołany - jak sam Doktorant tłumaczy - obecnością izoformy Rap1A. Jest to zdaniem Autora ciekawa obserwacja, gdyż po raz pierwszy wykazał, że ta izoforma może uczestniczyć w regulacji skurczu mięśni gładkich. Postanowił kontynuować ten watek badań wykorzystując tzw. knockouty celowane, czyli w tym przypadku modyfikacje genów ekspresjonowanych w mięśniówce aorty. Uzyskane wyniki można zapewne traktować jako wstęp do dalszych badań, wskazują jednak, że obie izoformy Rap1 biorą udział w regulacji skurczu mięśni poprzez ścieżkę związaną z białkiem Epac1.

Dyskusja jest bardzo dobrze napisana i wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta. Umiejętnie dyskutuje on swoje wyniki i przemyślenia w oparciu o dane literaturowe. Na podstawie uzyskanych wyników przedstawia również schemat porównujący działanie cAMP poprzez szlak kinazy PKA z tym aktywowanym przez białka Epac i Rac1. Jak sam wskazuje w podrozdziale opisującym kierunek przyszłych badań (*Future directions*) jego obserwacje są jedynie wstępem do dalszych badań. W związku z tym jestem wyreęczona z podawania sugestii dalszych badań, gdyż

Doktorant sam wskazuje, co i jak powinno być dalej badane, a lista postulowanych działań jest imponująca i dotyczy nie tylko mięśni gładkich naczyń krwionośnych, ale i nierozłącznie z nimi związanego śródbłonna. Można mieć tylko nadzieję, że Autor będzie mógł w nich uczestniczyć.

W rozprawie brak tradycyjnych wniosków, Doktorant zamieszcza w Dyskusji podrozdział *Concluding remarks*, w którym krótko - w jednym zdaniu podsumowuje swoje obserwacje i wyraża nadzieję, że rozpoczęte przez niego badania będą mogły być wykorzystane do rozwoju skutecznej i bezpiecznej terapii chorób naczyniowo-krażeńiowych.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest zredagowana w sposób bardzo staranny, napisana w zasadzie poprawnym językiem angielskim, który nie jest przecież macierzystym językiem Doktoranta. Stąd zapewne szereg drobnych błędów gramatycznych i stylistycznych czy literówek, które nie wpływały jednak na zrozumienie tekstu. Te najważniejsze omówione zostaną z Doktorantem osobiście. Ponadto, nie zawsze wyczerpujący był opis rycin, jak choćby wspomniana rycina 9. Myślę też, że można by na rycinach zaznaczyć moment podawania substancji w sposób bardziej tradycyjny, czyli strzałkami.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr. Bartosza J. Zięby ma dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę o biologicznej ścieżki sygnałowej związanej z białkami Epac1 i Rap1 w regulacji funkcjonowania mięśni gładkich. Praca jest spójna tematycznie, z wyraźnie postawionym celem i kolejno weryfikowanymi hipotezami. Poszczególne rozdziały są zwarte, a główny problem badawczy znajduje w każdym z nich właściwe miejsce. Trudny i wyjątkowo obszerny materiał doświadczalny, niezwykle bogaty warsztat metodyczny oraz dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki badań świadczą o doskonałym przygotowaniu Autora do samodzielnej pracy naukowej, o umiejętności zdefiniowania problemu badawczego i jego rozwiązania, a także o znajomości rozległego piśmiennictwa w badanej dziedzinie i zdolności krytycznej dyskusji własnych wyników badań w oparciu o dane literaturowe. Uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią podstawę do dalszych badań, zaś wyciągnięte wnioski oraz wysnute hipotezy są uzasadnione. Przedstawione w recenzji drobne uwagi i komentarze, nie umniejszają bardzo wysokiej oceny rozprawy.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Zięby do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez niego stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową recenzowanej rozprawy doktorskiej, wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną dla Rady Wydziału nagrodą.