



Gdańsk, 1 czerwca 2021

Prof. dr hab. Teresa Zalewska
Przewodnicząca Komisji
ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich
Rady Naukowej MDK im. M. Mossakowskiego PAN
02-106 Warszawa, ul. A. Pawińskiego 5

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marii Szrejder pt. „Rola kinazy białkowej AMP w regulacji funkcji kłębuszkowej bariery filtracyjnej i cytoszkieletu komórek podocytarnych” przedstawionej mi do oceny w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Praca doktorska mgr Marii Szrejder powstała w oparciu publikacje wydrukowane w recenzowanych czasopismach międzynarodowych i zawiera rozdziały: Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, Wykaz skrótów, Streszczenie polskojęzyczne i anglojęzyczne, Innowacyjność rozprawy, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Omówienie wyników, Podsumowanie wyników, Wnioski, Bibliografia, Kopie publikacji wchodzących w skład zbioru, Pisemne oświadczenia autorów prac tworzących zbiór. Opracowanie liczy 101 stron w tym 65 nienumerowanych stron zawierających kopie publikacji i oświadczenia.

Praca doktorska została przygotowana na podstawie trzech publikacji:

1. Szrejder M, Rachubik P, Rogacka D, Audzeyenka I, Rychłowski M, Kreft E, Angielski S, Piwkowska A, Metformin reduces TRPC6 expression through AMPK activation and modulates cytoskeleton dynamics in podocytes under diabetic conditions, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020 1;1866(3):165610, pięcioletni IF 5,386
2. Szrejder M, Rachubik P, Rogacka D, Audzeyenka I, Rychłowski M, Angielski S, Piwkowska A, Extracellular ATP modulates podocyte function through P2Y purinergic receptors and pleiotropic effects on AMPK and cAMP/PKA signaling pathways, *Arch Biochem Biophys*, 2020;695:108649. doi: 10.1016/j.abb.2020.108649. Epub 2020 Oct 22., pięcioletni IF 3,480
3. Szrejder M, Piwkowska A, AMPK signalling: Implications for podocyte biology in diabetic nephropathy, *Biol Cell*, 2019, 111(5):109-120., Review, pięcioletni IF 3,333

W dwóch publikacjach oryginalnych i jednej przeglądowej mgr Szrejder jest pierwszym autorem. Wszystkie prace zostały opublikowane w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach międzynarodowych. Publikacje te są tematycznie powiązane ze sobą. Jakość materiału stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej znacząco przekracza oczekiwania w odniesieniu do prac doktorskich.



Głównym tematem którego dotyczy rozprawa doktorska jest wyjaśnienie roli kinazy proteinowej zależnej od AMP oraz receptorów purynergicznego typu P2 w regulacji funkcji podocytów, szczególnie w kontekście ich wpływu na przepuszczalność. Podocyty stanowią kluczowy element kłębuszkowej bariery filtracyjnej. AMP-zależna kinaza białkowa jest z kolei bardzo ważnym enzymem odpowiedzialnym przede wszystkim za utrzymanie energetycznej homeostazy w różnych typach komórek. Podocyty są szczególnie wrażliwe na działanie czynników takich jak wysokie stężenie glukozy czy stres mechaniczny, a uszkodzenie tych komórek jest podstawowym elementem patomechanizmu glomerulopatii. Nukleotydy pełnią fundamentalne funkcje w bioenergetyce i przekazywaniu informacji genetycznej jako metabolity wewnątrzkomórkowe. Związki te i ich pochodne są też bardzo ważne w przestrzeni pozakomórkowej gdzie pełnią funkcje regulacyjne poprzez system receptorów klasyfikowanych jako purynergiczne (P1 lub P2). Uwalnianie nukleotydów do przestrzeni pozakomórkowej fizjologicznie zachodzi w sposób kontrolowany i w bardzo niewielkich ilościach. W patologii często dochodzi do nadmiernego uwalniania nukleotydów z komórek i znaczącego wzrostu ich stężenia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Powoduje to wzmożoną aktywację kaskad sygnałowych związanych z receptorami typu P2 które w zależności od typu receptorów mogą powodować skurcz lub rozkurcz naczyń przyczyniając się do modulacji tempa filtracji kłębuszkowej.

Molekularne mechanizmy regulujące funkcjonowanie podocytów i przepuszczalność bariery filtracyjnej, a w szczególności rola AMPK w tym procesie oraz możliwości farmakologicznego wpływu na te procesy nie są dokładnie poznane. Z tych względów temat pracy uważam za bardzo ciekawy i ważny zarówno dla badań podstawowych jak i szczególnie ze względów praktycznych.

Podstawowym celem badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej było zbadanie wpływu aktywacji kinazy AMP w warunkach hiperglikemii oraz stymulacji receptorów P2 na białka związane z cytoszkieletem aktynowym komórek podocytarnych oraz funkcję kłębuszkowej bariery filtracyjnej.

Metodyka badań obejmowała izolację i hodowlę szczurzych podocytów oraz kłębuszków nerkowych, analizy zawartości białek techniką Western Blot, badania lokalizacji białek techniką immunofluorescencyjną, analizy zawartości mRNA techniką PCR w czasie rzeczywistym, metody immunoenzymatyczne oceny ilości i aktywności białek oraz związków drobnocząsteczkowych, oznaczenia poziomu reaktywnych form tlenu przy użyciu sondy fluorescencyjnej, badania przepuszczalności kłębuszków nerkowych dla albuminy. Przeprowadzono również badania z zastosowaniem procedur *in vivo* związanych z indukcją cukrzycy przez podanie streptozotocyny. Procedury te są bardzo wymagające. Podkreślić też należy bardzo szeroki zakres stosowanych metod. Opanowanie tak unikalnego i



kompleksowego warsztatu badawczego stanowi gwarancję dalszego szybkiego rozwoju naukowego i świadczy o możliwości prowadzenia przez doktorantkę zaawansowanych projektów badawczych.

Głównym wnioskiem płynącym z badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej jest stwierdzenie, że AMP-kinaza, jak i zewnątrzkomórkowe nukleotydy za pośrednictwem receptorów P2 regulują funkcję, a także modyfikują organizację cytoszkieletu aktynowego podocytów oraz przepuszczalność kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Wniosek ten był oparty o następujące obserwacje:

1. Analizy immunoenzymatyczne w podocytach hodowanych w obecności wysokich stężeń glukozy wykazały zmniejszenie poziomu fosforylacji AMPK - efekt ten odwracało zastosowanie metforminy.
2. W środowisku hiperglikemicznym zaobserwowano wzrost ilości białka TRPC6 oraz zmniejszenie ilości kompleksu złożonego z TRPC6 oraz podjednostki AMPK α 1, która była przywracana do wartości kontrolnych w obecności metforminy.
3. W warunkach wysokiego stężenia glukozy dochodziło do zmniejszenia ilości nefryny, a także zmian w wewnątrzkomórkowej lokalizacji aktyny oraz aktywności białek modulujących cytoszkielet aktynowy. Zastosowanie metforminy skutkowało odwróceniem zmian związanych z organizacją włókien aktynowych.
4. W doświadczeniach na izolowanych kłębuszkach nerkowych i podocytach stwierdzono wzrost przepuszczalności dla albuminy w warunkach hiperglikemii oraz jej znaczny spadek w obecności metforminy, co potwierdza protekcyjne działanie metforminy na kłębuszkową barierę filtracyjną w hiperglikemii.
5. Wykazano, że aktywacja receptorów nukleotydowych w komórkach podocytarnych wpływa na równowagę metaboliczną poprzez zwiększenie poziomu fosforylacji AMPK, a także równowagę oksydoredukcyjną poprzez zahamowanie produkcji reaktywnych form tlenu.
6. Stymulacja purynergiczna wpływała na wielkość syntezy cyklicznych nukleotydów (cAMP i cGMP) regulujących skurcz naczyń krwionośnych.
7. Aktywacja receptorów P2, a w szczególności receptora P2Y4, prowadziła do przebudowy cytoszkieletu aktynowego, czemu towarzyszył spadek aktywności białka RhoA oraz wzrost przepuszczalności dla albuminy przez warstwę podocytów. Proces ten wydaje się być sprzężony z działaniem kinazy białkowej A, której hamowanie aktywności zapobiegało zmianom indukowanym przez stymulację purynergiczną.



Badania te mają fundamentalne znaczenie poznawcze wyjaśniając szereg szczegółów dotyczących regulacji funkcji nerki. W szczególności mają też znaczenie praktyczne wykazując że bardzo ważnym celem terapii przeciwcukrzycowej powinno być zabezpieczenie funkcji nerek przez ochronę funkcji podocytów. Wiele nowych terapii przeciwcukrzycowych powinno być badane w tym kontekście.

Praca doktorska inspiruje wiele pytań. Jednym jest wpływ wprowadzonych z sukcesem do leczenia cukrzycy inhibitorów kotransportera glukozy-sodowego 2 (SGLT2) na aspekty funkcji podocytów badane w niniejszej pracy. Interesująca też jest rola deaminazy AMP w podocytach. Zmiany aktywności tego enzymu mogą mieć wpływ zarówno na aktywność AMPK poprzez modulację stężenia AMP jak i zewnątrzkomórkową sygnalizację purynergiczną poprzez regulację puli nukleotydów w komórce. Również analiza zmian aktywności enzymów zewnątrzkomórkowej kaskady degradacji ATP do adenozyliny i dalej do inozyny pod wpływem wysokiego stężenia glukozy była by bardzo ciekawa. Zmiany aktywności tego szlaku modyfikowały by efekty purynergiczne badane w niniejszej pracy doktorskiej

Praca przygotowana jest bardzo starannie i stanowi bardzo istotny wkład w zrozumienie mechanizmów patologicznych przyczyniających się do dysfunkcji nerki w cukrzycy. Badania te mogą pomóc w opracowaniu nowych terapii i przyczynić się do lepszego zrozumienia działania leków już stosowanych. Trudno jest wnieść jakiegokolwiek uwagi, w sytuacji gdy badania zostały przeprowadzone w tak dobrym ośrodku i pod tak dobrą opieką, a publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej poddane były recenzji w redakcjach bardzo wymagających czasopism. Trudno oczekiwać odpowiedzi na wszystkie pytania w ramach pracy doktorskiej która i tak jest bardzo obszerna, ale wyzwaniem zawsze pozostaje kwestia odniesienia uzyskanych wyników do sytuacji *in vivo* i czy wyniki te mają odniesienie do nerki człowieka. Na pewno cennym by była szersza dyskusja w pracy doktorskiej dotycząca wniosków praktycznych. Jak badania przeprowadzone w ramach pracy mogą pomóc w lepszej diagnostyce i terapii cukrzycy i chorób nerek.

Oceniana praca spełnia z nawiązką wszystkie wymagania stawiane rozprawie doktorskiej dlatego wnoszę do Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej MDK im. M. Mossakowskiego PAN o dopuszczenie mgr Marii Szejder do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową wyników uzyskanych z zastosowaniem unikalnych i bardzo wymagających modeli eksperymentalnych, a także publikacje tych wyników w bardzo dobrych czasopismach składam dodatkowy wniosek o wyróżnienie.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński