

Prof. dr hab. Katarzyna Kwiatkowska
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

Warszawa, 30 sierpnia 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marii Czarnek
pt. „Badanie proteolizy i aktywności biologicznej domeny zewnątrzkomórkowej
mysiej neureguliny 2”**

Rozprawa powstała w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Berety i podejmuje temat proteolizy neureguliny 2. Jest to ligand należący do rodziny naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) aktywujący dwa spośród czterech typów receptorów ERBB, z których bodaj najlepiej poznany jest receptor ERBB1 aktywowany przez EGF. Aktywność biologiczna neureguliny, w tym neureguliny 2 jest słabiej poznana i badania Pani mgr Czarnek zmierzały do wypełnienia tej luki. Rozprawa ma klasyczny układ, jej Wstęp przynosi wyczerpujący przegląd literatury na temat struktury receptorów z rodziny ERBB i mechanizmów molekularnych, które sprawiają, że ich aktywność leży u podstaw kluczowych procesów życiowych komórki. Z tych też powodów dysfunkcja receptorów tej rodziny prowadzi do zaburzeń rozwoju embrionalnego, funkcjonowania m.in. układu nerwowego i mięśni oraz jest istotna w nowotworzeniu. Ten ostatni wątek jest potraktowany z dużą uwagą. Doktorantka dokonała m.in. krytycznego przeglądu leków – przeciwciał i inhibitorów aktywności receptorów ERBB stosowanych w terapii nowotworów jelita grubego, płuc, piersi, jajników, łącznie z analizą ich skuteczności. Z równą dokładnością scharakteryzowała ligandy receptorów ERBB, w tym neureguliny, a na koniec enzymy katalizujące kontrolowaną proteolizę form prekursorowych tych białek.

Sposób prezentacji wymienianych zagadnień we Wstępie budzi podziw. Pomimo szerokiego zakresu danych (w samym Wstępie cytowanych jest ponad 200 publikacji), informacje zaprezentowane są w sposób przejrzysty i usystematyzowany. Zakres tematyczny Wstępu jest umiejętnie sprowadzony do przejrzystego kompendium wiedzy na wymienione wyżej tematy i dobitnie wskazuje, że Doktorantka porusza się swobodnie w omawianym temacie i jest obdarzona umiejętnością syntezy danych. Wstęp jest dobrym wprowadzaniem do rozprawy, uzasadnia celowość podjętych badań, które zmierzały do wykrycia enzymów katalizujących proteolizę neureguliny 2 i zbadania wpływu tego ligandu na komórki nowotworowe i komórki śródbłonna. Dodatkowo Doktorantka zmierzała do identyfikacji proteaz odpowiedzialnych za proteolizę receptora EGF, która jak się okazało z Jej badań, towarzyszy aktywacji komórek przez neuregulinę 2.

Obszerną część pracy doświadczalnej zajmuje identyfikacja enzymów, tzw. szedaz, dokonujących proteolizy wyjściowej transbłonowej formy neureguliny 2 i uwolnienie jej zewnątrzkomórkowego, aktywnego biologicznie fragmentu. W tym celu Doktorantka uzyskała trzy linie komórek modelowych: unieśmiertelnione mysie fibroblasty embrionalne MEF, komórki mysiego czerniaka B16F10 i komórki mysiego nowotworu jelita grubego MC38CEA, które na skutek transdukcji wektorem lentiwirusowym nadprodukowały neuregulinę 2, najpierw w formie pozbawionej niewielkiego fragmentu z jej C końca, a w dalszej części badań - pełnego białka. W identyfikacji proteaz neureguliny 2 Doktorantka posłużyła się szeregiem inhibitorów różnych klas proteaz, wyciszaniem kodujących je genów przy użyciu interferującego RNA (siRNA), a także nadprodukcją proteaz BACE1 i BACE2 oraz kombinacją niektórych z tych czynników. Dodatkowo, do komórek MEF pozbawionych metaloproteazy ADAM10, umiejętnie wprowadzała gen neureguliny 2 i obniżała ekspresję genu kodującego proteazę ADAM17, a także wprowadziła ponownie do tych komórek proteazy ADAM10, BACE1 lub BACE2. W otrzymanych komórkach analizowała poziom formy transbłonowej neureguliny 2 i uwalnianego fragmentu zewnątrzkomórkowego (dla porównania w niektórych wariantach badała też proteolizę lepiej poznanej neureguliny 1) oraz określała poziom mRNA badanych białek. Takie wszechstronne podejście pozwoliło jej ustalić, że w układzie modelowym za uwalnianie zewnątrzkomórkowej, aktywnej formy neureguliny 2 odpowiadają proteazy ADAM10, BACE2, z potencjalnym udziałem BACE1.

Z uwagi na mózgową lokalizację endogennej neureguliny 2 i ADAM10 Doktorantka dążyła do ustalenia, czy wykryte enzymy odpowiadają za proteolizę tego białka w neuronach. Indukowała zatem syntezę neureguliny 2 wyposażonej w odpowiednie metki w neuronach pierwotnych i potwierdziła wrażliwość jej proteolizy na inhibitory wytypowanych proteaz. Wykazała też obecność transkryptu *Bace2* (obok spodziewanej obecności mRNA neureguliny 2 i ADAM10) w wybranych strukturach mózgu myszy oraz współwystępowanie proteazy BACE2 i neureguliny 2 wykonując barwienia immunohistochemiczne skrawków tych mózgow. Na koniec Doktorantka powróciła do badań komórek nowotworowych, aby wykazać, że neuregulina 2 po odcięciu fragmentu zewnątrzkomórkowego ulega proteolizie w obrębie fragmentu transbłonowego przez γ -sekretazę, analogicznie do neureguliny 1. Wykazała też, że obie funkcjonalne pochodne pro-neureguliny 2, zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowa, ulegają modyfikacjom potranslacyjnym.

Powyższy skrótowy opis badań bardzo wyraźnie pokazuje, że prowadzone przez Doktorantkę analizy wyróżniały się dociekliwością i wielostronną weryfikacją uzyskiwanych danych. Wszystko to pozwoliło Doktorantce na uzyskanie rzetelnych wyników w większości opublikowanych w autorskiej pracy w *Molecular Neurobiology*.

Doktorantka dyskutuje w rozprawie uzyskane wyniki na temat proteolizy neureguliny 2 konfrontując je z dostępną literaturą i osadzając je jednocześnie w kontekście aktywacji neuronalnych receptorów dla glutaminianu (które indukują proteolizę neureguliny 2 przez ADAM10), a także dojrzewania synaps glutaminergiczych. Jest świadoma ograniczeń własnych badań (np. praca z nadprodukowaną, a nie endogenną neureguliną 2), ale potrafi też wykazać ograniczenia cytowanych prac i zaproponować na tej podstawie doświadczenia, które mogłyby przynieść rozstrzygnięcie diskutowanych wątków.

Dopełnieniem zaprezentowanych badań są wyniki wstępnych doświadczeń nad proteolitycznym źródłem powstawania skróconych ufosforylowanych form receptora EGF w komórkach linii MDA-MB-468 ludzkiego raka sutka stymulowanych przez neureguliny. Takie skrócone formy receptora EGF nie są rozpoznawane przez przeciwciała stosowane w terapii niektórych nowotworów, na co Doktorantka zwraca uwagę w Dyskusji, i co daje dodatkowy asumpt do badań nad ich genezą i aktywnością biologiczną.

Omawiane badania oceniam wysoko, niemniej jednak mam do nich kilka pytań:

1. Z jakiego powodu wyniki badań nad proteolizą neureguliny 2 nie są opatrzone analizą istotności statystycznej różnic? Taka analiza pojawia się w dalszej części rozprawy.

2. Na prezentowanych ilustracjach blotów brakuje markerów masy cząsteczkowej. Opisy umieszczone pod Rycinami tylko w pewnym stopniu kompensują ten brak. Z uwagi na wykryte przez Doktorantkę modyfikacje potranslacyjne badane białka migrowały w żelu poliakryloamidowym inaczej niż wynikałoby z ich realnej masy cząsteczkowej, ale to raczej nie jest powód decyzji o rezygnacji z opisu pozycji markerów, które z resztą pojawiają się w niektórych częściach rozprawy.

3. Udział BACE, najprawdopodobniej BACE2 w proteolizie neureguliny 2 w komórkach BF16F10 udało się wykryć dopiero po jednoczesnym podaniu inhibitorów proteaz BACE i metaloproteaz. Sam inhibitor BACE nie był w stanie powstrzymać proteolizy neureguliny 2 (np. Rycina 10), pomimo relatywnie wysokiej ekspresji w tych komórkach genu kodującego BACE2. Jaki może być powód tego zjawiska? W neuronach pierwotnych inhibitor proteaz BACE (PF-06649282) efektywnie powstrzymywał proteolizę neureguliny 2 (Ryc. 20), chociaż nadal widzimy w tym przypadku synergii działania obu typów inhibitorów.

4. Jednoczesne hamowanie aktywności metaloproteaz i γ -sekretazy zatrzymywało neuregulinę 2 w formie transbłonowej w komórkach MC38CEA, podczas gdy w komórkach B16F10 gromadził się fragment C-końcowy CTF (Rycina 25). Jak można interpretować to zjawisko?

Dalsza część rozprawy skupia się na analizie potencjalnej funkcji neureguliny 2 w nowotworzeniu. W tym celu doktorantka otrzymała domenę EGF neureguliny 1 β i dwóch izoform neureguliny 2 (α i β) transformując bakterie odpowiednimi genami i oczyszczając białka z ciałek inkluzyjnych, w których mimo przemyślanego doboru szczepów *E. coli* białka te się odkładały. Doktorantka wykorzystała otrzymane białka do stymulacji komórek nowotworowych i komórek śródbłonna. Okazało się, że wybrane do badań typy komórek nowotworowych mysich i ludzkich - komórki raka sutka i jądra - reagują na stymulację neuregulina 1 β (a z reguły nie neuregulina 2), odpowiadając fosforylacją receptorów ERBB, przyspieszoną proliferacją i zwiększoną żywotnością, a także ekspresją genów kodujących czynniki proangiogenne i zmianami aktywności MMP9. Przeciwnie, pierwotne komórki śródbłonna naczyń włosowatych mózgu myszy linii MBE reagowały na stymulację izoformą α neureguliny 2 (a nie neuregulina 1 β). Warto ponownie podkreślić wielostronność badań obu typów komórek. Ponadto, równoległe badania Doktorantki przeprowadzone na komórkach linii szpiczaka z nadprodukowanymi receptorami ERBB wykazały, że neuregulina 2 β także w tych komórkach indukuje fosforylację receptorów ERBB3 i ERBB4, a ujawnienie tego zjawiska

ułatwiała immunoprecypitacja ufosforylowanych receptorów. Biorąc pod uwagę te ostatnie dane, czy można byłoby uzyskać podobny wynik wzbogacając endogenne ufosforylowane receptory ERBB z komórek nowotworowych poprzez ich immunoprecypitację lub badając fosforylację receptorów w czasie (a nie w jednym punkcie czasowym aktywacji)?

W dyskusji tej części wyników Doktorantka wnikliwie analizuje przyczyny rozbieżności wyników prac różnych grup oraz własnych nad receptorami ERBB, które są fosforylowane i aktywowane w wyniku stymulacji komórek przez neuregulinę 2. Zwraca uwagę na heterogenność używanych w tych doświadczeniach rekombinowanych form neureguliny 2 i proponuje, że ostateczny efekt aktywacji receptorów ERBB przez ten ligand może zależeć od ekspresji kodujących je genów, ale też od mniej oczywistego udziału białek tworzących kompleksy z receptorami ERBB i wpływających na interakcję ligand-receptor. Doktorantka poświęca też uwagę obserwowanej przez siebie aktywacji komórek śródbłonna linii MBE przez neuregulinę 2 α punktując celnie podobieństwa i różnice dostępnych danych i proponując rozwiązania, które pozwoliłyby na uzyskanie pełniejszego obrazu aktywności neuregulin wobec tego typu komórek.

Biorąc pod uwagę fakt, że aktywność śródbłonna jest ważnym elementem repertuaru wrodzonej odpowiedzi odpornościowej jestem ciekawa zdania Doktorantki na temat potencjalnego wpływu neuregulin na ten aspekt funkcjonowania śródbłonna.

W tym miejscu chcę podkreślić wszechstronny i doskonały warsztat badawczy, którym posługiwała się Doktorantka. Samodzielnie sklonowała gen neureguliny 2, a także neureguliny 1 (typ I i III) na matrycy cDNA otrzymanej z RNA wyizolowanego z mózgu młodych myszy. Otrzymała wektory lentiwirusowe kodujące wspomniane białka wyposażone w dwie odmienne metki, które pozwoliły na wykrywanie formy wyjściowej i zewnątrzkomórkowej białek uwalnianej do nadsącza hodowlanego. Konstrukty te posłużyły Jej do transdukcji komórek HEK293, a otrzymane w ten sposób cząstki wirusowe użyte zostały do transdukcji komórek docelowych. Podobnie, Doktorantka przygotowała wektory lentiwirusowe z sekwencjami kodującymi enzymy ADAM10, BACE1 i BACE2. Z uwagi na fakt, że komórki linii MEF pozbawione proteazy ADAM 10 nie pozwalały na nadprodukcję neureguliny 2, w opisany powyżej sposób Doktorantka otrzymała wektory transpozonowe z sekwencją kodującą neuregulinę 2 i użyła ich do transfekcji komórek MEF. Przygotowała też wektory transpozonowe kodujące ludzkie receptory ERBB, które posłużyły Jej do transfekcji komórek szpiczaka. Ponadto, otrzymała wektory pozwalające na transkrypcję *in vitro* Cas9 i sgRNA i użyła otrzymane mRNA do elektroporacji komórek w celu wykluczenia/obniżenia ekspresji genu kodującego ADAM17 w komórkach MEF.

Ten imponujący warsztat biologa molekularnego uzupełnia szeroka paleta innych umiejętności, takich jak izolacja pierwotnych neuronów, badanie żywotności i proliferacji komórek (trzema metodami), preparatyka neuregulin do badań ich wpływu na komórki nowotworowe i śródbłonna, badanie glikozylacji białek, zymografia żelatynowa, barwienia immunofluorescencyjne białek w neuronach pierwotnych i immunohistochemiczne skrawków mózgu.

Roprawa jest obszerna, pod względem językowym praktycznie nie ma w niej uchybień. Mam tylko pewne zastrzeżenia do „targetowania”, „ilości komórek”, „centralnego” układu nerwowego i dominacji „eksperymentów” nad doświadczeniami. Szczegółowy opis plazmidu, warunków hodowli bakterii i oczyszczania neuregulin (strony 121-127) mógłby znaleźć się w części metodycznej, a nie w opisie wyników. Chcę jednak podkreślić, że praca jest przejrzysta, napisana bardzo ładną polszczyzną i starannie przygotowana.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa spełnia warunki ustawowe „Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce” stawiane rozprawom doktorskim. Wobec powyższego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Marii Czarnek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie, mając na względzie oryginalność i wartość uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Katarzyna Kwiatkowska

