



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszczycki

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Aliny Zawiślak „Neuronalne czynniki regulujące glikolizę w astrocytach”.

Rozprawa doktorska mgr inż. Aliny Zawiślak „Neuronalne czynniki regulujące glikolizę w astrocytach” jest monografią przedstawiającą niezwykle interesujące badania enzymów glikolitycznych w komórkach nerwowych i astrocytach. Okazuje się, że neurony mają duży wpływ na regulację tego szlaku w astrocytach. W pracy pokazano, że w odpowiednich mediach hodowlanych, znacząco zwiększa się ekspresja wybranych enzymów w astrocytach. Wyniki sugerują, że neurony wydzielają do środowiska zewnątrzkomórkowego substancje, które są potrzebne astrocytom w regulacji procesów metabolicznych. Praca przygotowana w pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Rakusa, jest napisana zwięźle (88 stron), ale przejrzysta i niezwykle starannie, co świadczy o znawstwie badanych obiektów, problemów metodycznych, profesjonalnej realizacji eksperymentów, a także krytycznej analizie wyników i tekstu pracy.

Rozprawa składa się z czterech głównych rozdziałów (Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja). Znaczną część wyników opublikowano, w prestiżowym *Oncotarget* (IF 5.168), w publikacji, w której Doktorantka jest pierwszą autorką. W notce o udziale poszczególnych autorów (łącznie czterech) można przeczytać, że p. Zawiślak przeprowadziła prawie wszystkie eksperymenty (wyjątek stanowią pomiary MS) i współuczestniczyła w przygotowaniu manuskryptu. W związku z powyższym, zwalnia mnie z bardzo szczegółowej oceny wyników w odniesieniu roli transtyretyny w regulacji glikolizy w astrocytach.

Cel pracy został jasno sformułowany i skupia się na poznaniu mechanizmów neuronalnej regulacji glikolizy w astrocytach, w tym identyfikację cząsteczek lub jonów wydzielanych przez neurony podczas transmisji bazalnej oraz ich wpływu na ekspresję enzymów glikolizy w astrocytach.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszewski

W dość długim, jak na objętość pracy, Wstępie na 26-ciu stronach Autorka jasno, w zakresie nawiązującym do dalszej treści, przedstawiła podstawowe informacje dotyczące budowy, funkcjonowania układu nerwowego i przekazywania sygnału nerwowego. W szczególności opisała morfologię i fizjologię astroglię, rolę astrocytów w biologii układu nerwowego, kontrolę przepływu krwi przez astroglię, utrzymania równowagi wodno-elektrolitowej tkanki nerwowej. Na kolejnych stronach opisała metabolizm energetyczny mózgu, skupiając się na szlakach metabolizmu glukozy. W tym kontekście doktorantka zwróciła uwagę na związek między aktywnością synaptyczną, przepływem krwi i metabolizmem ośrodkowego układu nerwowego, w tym na czółenko astrocytarno-neuronalne będące bezpośrednim przedmiotem eksperymentów i rolę glutaminianu stymulacji glikolizy w astrocytach. Co interesujące, Autorka zwróciła uwagę na różnice poglądów dotyczących molekularnych podstaw regulacji krzyżowej między astrocytami i neuronami w odniesieniu do metabolizmu energetycznego. Próba rozstrzygnięcia czy dochodzi do kontaktu komórka-komórka w ścieżce sygnałowej Notch i w konsekwencji ekspresji odpowiednich genów w astrocytach czy raczej stymulacja ekspresji genów kodujących enzymy glikolizy poprzez niezidentyfikowane czynniki regulatorowe była przedmiotem recenzowanej pracy. W związku z powyższym Doktorantka opisała wybrane czynniki sygnałowe regulujące metabolizm energetyczny tkanki nerwowej tj. insulinę i insulinopodobne czynniki wzrostu, a w kolejnych podrozdziałach, logicznie, odpowiednie ścieżki sygnałowe. Bardzo dobrym pomysłem było zamykanie poszczególnych fragmentów odniesieniami do własnych wyników jak np. w opisie roli kinaz AKT, PI3K, MAPK, FAK czy GSK-3, m.in. Autorka zwraca uwagę na kontrowersje literaturowe odnoszące się do udziału kinaz mTOR i p38 MAPK w regulacji metabolizmu energetycznego tkanki nerwowej na etapie glikolizy, sygnalizując, że wyniki pracy nie potwierdzają dotychczas przyjętych poglądów. Z kolei w odniesieniu do kinazy FAK pisze o jej słabo poznanej roli w funkcjonowaniu astroglię, w szczególności w metabolizmie tkanki nerwowej. Wątpliwości dotyczą funkcji FAK w tkance nerwowej. Dotychczas uważano, że nieaktywna kinaza lub jej brak podwyższają wchłanianie glukozy, w odróżnieniu do mięśni, w których dochodzi do stymulacji poboru glukozy wobec aktywacji FAK. Doktorantka podkreśla, że nie



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszyski

zgadza się z ostatnim stwierdzeniem i sygnalizuje swoje wyniki pokazujące stymulujący wpływ FAK na metabolizm glukozy w tkance nerwowej. W ostatnich podrozdziałach Wstępu opisano interakcje między różnymi szlakami sygnalizacji komórkowej, rolę cAMP i białka CREB w regulacji metabolizmu i wreszcie transtyretynę i jej nietypową rolę w aktywacji czynnika transkrypcji NF- κ B i receptora IGF-1R. Ponownie Doktorantka przeczy dotychczas przyjętym poglądom o synergistycznym działaniu IGF-1 i TTR w odniesieniu do metabolizmu energetycznego tkanki nerwowej.

Jako recenzent niezwykle cenię zawartość merytoryczną Wstępu i bardzo staranną korektę językową, a parę drobnych uwag przekazuję z obowiązku. Znalazłem raptem kilka „literówek” i dyskusyjnych niezręczności językowych, jednak przyznaję, często używanych jak „kompartimentacja metabolizmu” czy „konserwatywny ewolucyjnie” (raczej zachowany w ewolucji, konserwowany). Aktywacja PKA zachodzi po przyłączeniu 4 cząsteczek cAMP, a nie 2 (str. 33).

Na kolejnych 13 stronach (5 - Materiały + 8 - Metody) zostały opisane używane materiały i techniki badawcze wykorzystane w pracy. Nie mam zastrzeżeń, do dobrze merytorycznie napisanych rozdziałów, a jedynie kilka uwag „natury technicznej”. Jednocześnie doceniam ogrom pracy włożonej w opanowanie technik i prowadzenie eksperymentów z zakresu biochemii i biologii molekularnej od izolacji hodowli komórkowych, przez prace z komórkami i białkami, aż po statystyczną ocenę wyników. Wśród drobnych uwag wymienilibym poniższe. Na str. 46 pojawia się informacja o „ultrawiirowaniu” w kolumnienkach filtracyjnych – powinno być „wirowanie”, „suplementowanie” (kilka razy), „worteksowanie” (str. 49), „medium sprecypitowane” (str. 50) i kilka literówek (do wglądu w egzemplarzu recenzenta). Na str. 47 pojawia się informacja o pomiarach stężenia ATP „...w RT”. Okazuje się, że chodzi o temperaturę pokojową. Nadużywanie skrótów utrudnia czytanie. Stosowany bufor opisano w rozdziale 3.1.7, a nie 3.1.6 (str. 47). „Wyświetlanie” (str. 52) to nie to samo co „wyświecanie” ew. „fotozanik” czy „fotobłaknięcie” w odniesieniu do zaniku fluorescencji znacznika. Przy opisie oznaczania enzymów glikolitycznych wypadałoby podać używane współczynniki ekstynkcji.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszewski

Wyniki badań przedstawiono 13 stronach. Autorka w pierwszej kolejności informuje o eksperymentach kontrolnych (powtórzenie eksperymentów opublikowanych przez uczonych z macierzystej katedry) związanych m.in. ekspresją i lokalizacją komórkową w astrocytach wybranych enzymów glikolitycznych. W wyniku kolejnych eksperymentów okazało się, że w medium neuronalnym ekspresjonowane są enzymy regulatorowe (PFK, PK i w najmniejszym stopniu HK), jak również, na pierwszy rzut oka, mało interesująca – aldolaza. Nie zgadzam się ze zdaniem (str. 55), z którego wynika, że ponieważ kinaza pirogronianowa (?) jest najważniejszym enzymem glikolizy, to można było oczekiwać, że kondycjonowane medium, oprócz stymulacji ekspresji i aktywności enzymu będzie pobudzać syntezę ATP. A co z kinazą fosfoglicerynianową, fosfofruktokinazą i innymi enzymami szlaku. Jak można wyjaśnić (Rys. 4.1.4) bardzo duży skok aktywności tylko PK. Doktorantka wywodzi, że w kondycjonowanym medium niezidentyfikowane czynniki stymulują ekspresję enzymów glikolitycznych i w konsekwencji syntezę ATP. Chciałbym w związku z tym dowiedzieć się co Doktorantka sądzi o zmianach zachodzących w cyklu Krebsa i fosforylacji oksydacyjnej. Proszę wyjaśnić jaki był cel badań wpływu temperatury (45/65°C) na potencjalne czynniki regulatorowe. Logiczną kontynuacją poszukiwań tych czynników było ich frakcjonowanie i analiza MS. Dobrze zaplanowana kolejność eksperymentów doprowadziła do transtyretyny jako kluczowego białka regulującego metabolizm astrocytów. Wyjaśnienie o braku „trafień” wśród czynników małocząsteczkowych z powodów aparaturowych brzmi mało poważnie.

TTR jest białkiem o wielu funkcjach, nie tylko jako transporter retinolu i tyroksyny, więc może nie dziwi kolejna funkcja, ale odkrycie wpływu TTR na glikolizę w tkance nerwowej uważam za bardzo ważny wynik naukowy i największe osiągnięcie pracy. Ostatnie eksperymenty miały wpasować hormon w odpowiednie szlaki sygnałowe i ewentualnie wskazać kolejną cząsteczkę regulującą ekspresję aldolazy w astrocytach, co nie do końca się udało, chociaż Doktorantka udowodniła, że mamy do czynienia ze ścieżką indukowaną przez insulinopodobny czynnik wzrostu.

Ostatnim rozdziałem jest czterostronicowa Dyskusja. Do pewnego stopnia jest podsumowaniem pracy, ale zwraca uwagę na najistotniejsze wnioski z pracy. Być



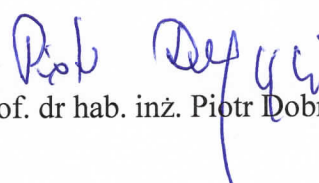
Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszcki

może ciągle wiedza dotycząca poszczególnych elementów układanki jest zbyt mała, żeby precyzyjnie włączyć transtyretynę w poszczególne ścieżki sygnałowe, to bez wątplenia Doktorantka wykazała powiązania TTR z aktywacją białka CREB, syntezą cAMP, zmianami aktywności kinazy PKA, fosfofruktokinazy i zmianami w poziomie kinazy pirogronianowej w astrocytach, ale także sensownie spróbowała wyjaśnić brak podobnego wpływu na heksokinazę. Przedyskutowała również problem braku synergii działania TTR i IGF-1. Jako recenzent niezwykle cenię odwagę młodej uczoney w podważaniu dotychczas głoszonych poglądów jak w tym przypadku, wiarę w swoje wyniki, jak również przyznanie się do porażki w odniesieniu do małocząsteczkowego czynnika stymulującego ekspresję aldolazy. O profesjonalnym podejściu do badań świadczy końcowy podrozdział dotyczący kierunków dalszych badań w niezwykle interesującej tematyce metabolizmu energetycznego mózgu, w szczególności poszukiwania kolejnych czynników regulatorowych, konieczności zajęcia się enzymami związanymi z rozkładem glikogenu i w końcu wpisanie ich w odpowiednie ścieżki sygnałowe.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Aliny Zawiślak spełnia wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi poprawkami, o stopniach naukowych i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej tym samym uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr inż. Alinę Zawiślak do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorąc pod uwagę ogrom materiału eksperymentalnego, dorobek naukowy, oryginalność tematyki i niezwykle interesujące wyniki zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.


prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszcki