

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR. JANUSZA WIŚNIEWSKIEGO
p.t. „STRUKTURALNE PODSTAWY NIEMATOBOLICZNYCH FUNKCJI
MIĘŚNIOWYCH IZOENZYMÓW FRUKTOZA-1,6-BISFOSFATAZY,
FOSFOGLICEROMUTAZY I ALDOLAZY”

Przedłożona mi do recenzji dysertacja wpisuje się w jeden z podstawowych nurtów badań prowadzonych przez promotora prof. dr hab. Dariusza Rakusa, który od szeregu lat przedmiotem swojego szczególnego zainteresowania uczynił takie enzymy przemiany cukrowej jak fruktozo-1,6-bisfosfataza, fosfogliceromutaza i aldolaza. Mgr Janusz Wiśniewski poszerzył te badania o analizę krystalograficzną tych białek, której celem było i jest poznanie ich struktury i co niezwykle istotne, powiązanie tej wiedzy z ich funkcjami biologicznymi. Jest to szczególnie interesujące, w kontekście ostatnich badań grupy prof. Rakusa, które jednoznacznie wskazują, że klasyczne enzymy metaboliczne, w tym przypadku enzymu szlaku glikolizy, posiadają w zależności od izoformy całkowicie odmienne niemetaboliczne funkcje w komórkach. Takie wielofunkcyjne białka (*moonlighting proteins*) budzą powszechne zainteresowanie, o czym świadczy rosnąca liczba publikacji na ten temat, a co jednoznacznie wskazuje, że podjęta przez Doktoranta tematyka nawiązuje do jednego z bardzo aktualnych tematów współczesnej Biochemii.

Recenzowana praca posiada układ właściwy dla tego typu opracowań. Rozpoczyna się od rozdziału poświęconego celowi pracy, który przedstawiłem we wcześniejszym akapicie. Kolejny rozdział „Wprowadzenie” został napisany jasno i przystępnie, dobrze świadcząc o znajomości piśmiennictwa przez Doktoranta i jego wiedzy dotyczącej zagadnień związanych z tematem dysertacji. W kolejnych podrozdziałach omówiono: strukturę i właściwości fruktozo-1,6-bisfosfatazy, fosfogliceromutazy i aldolazy, rolę takich szlaków metabolicznych jak glikoliza, szlak pentozofosforanowy, cykl kwasu cytrynowego i glutaminoliza w biologii kardiomiocytów i komórek nowotworowych, funkcje metaboliczne i niemetaboliczne wyżej wymienionych enzymów przemiany cukrowej, oraz właściwości mysich kardiomiocytów HL-1 i mysich komórek raka płuc KLN-205. Biorąc pod uwagę tytuł i tematykę pracy, które dotyczą niemetabolicznych funkcji FBPazy2, PGAM2 i ALD A, podrozdział „*Wybrane aspekty metabolizmu kardiomiocytów i komórek nowotworowych*” jest stanowczo zbyt obszerny i ”grzeszy” nadmiarem wiadomości, szczególnie tych typowo podręcznikowych. W

mojej opinii, część tych informacji można było z powodzeniem włączyć do odpowiednich podrozdziałów poświęconych roli biologicznej poszczególnych enzymów. Również informacje z podrozdziału „*Charakterystyka linii komórkowych HL-1 i KLN-205*” powinny się znaleźć w tej części pracy, która dotyczy materiałów i metod. Pomijając drobne błędy i nieścisłości językowe (np. nazywanie komórek zdrowymi zamiast prawidłowymi), chciałem zwrócić uwagę jeszcze tylko na jedną rzecz. Chodzi mi o stosowanie nazwy „nowotwór” tam gdzie powinniśmy pisać o komórkach nowotworowych. Przykładowo, tytuł podrozdziału „*Glikoliza w kardiomiocytach i nowotworach*” sugeruje, że mowa będzie o glikolizie zachodzącej w różnych typach komórek tworzących tkankę nowotworową, kiedy tak naprawdę chodzi wyłącznie o komórki nowotworowe. Pozostałe, podkreślam nieliczne, uwagi zaznaczyłem na marginesach egzemplarza pracy, który dostałem do recenzji.

O bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do pracy badawczej świadczy rozdział „Materiały i metody”. Jestem pod wrażeniem różnorodności technik badawczych wykorzystywanych przez mgr Wiśniewskiego podczas wykonywania części eksperymentalnej pracy. Z jednej strony poznał fizyko-chemiczne metody wykorzystywane w klasycznych badaniach biochemicznych dotyczących białek jak dichroizm kołowy, ultrawierowanie analityczne, dyfrakcja rentgenowska, z drugiej opanował techniki z zakresu biologii molekularnej i biologii komórki, jak klonowanie i mutageniza, PCR, otrzymywanie białek rekombinowanych, cytometria przepływowa, czy mikroskopia konfokalna. Ten rozdział, pozornie najłatwiejszy do napisania, kryje w sobie niebezpieczeństwo zarówno używania wyrażeń żargonowych, jak i zbyt skrótowych, i tym samym mało zrozumiałych, opisów stosowanych metod, czego nie unikną i Doktorant. I tak, w przypadku części metod, zamiast ich opisu, mamy podany schemat postępowania. Na pierwszy rzut oka wydaje się to być trafnym rozwiązaniem, ale przy bliższym zapoznaniu się z takim tekstem widać, że skrótowy sposób podawania informacji, zwłaszcza w przypadku osób nie znających opisywanej metodyki, jest momentami nie do końca jasny i jednoznaczny. Moim zdaniem, praca doktorska to również sprawdzian umiejętności posługiwania się rodzimym językiem, dlatego schemat schematem, ale nie zastąpi on umiejętności konstruowania kilku, powiązanych ze sobą logicznie, zdań. Muszę również zwrócić Doktorantowi uwagę na brak pewnej logiki w zaproponowanej kolejności podrozdziałów. Rozpoczęto od przedstawienia metod biologii molekularnej łącznie z ekspresją i oczyszczaniem białek rekombinowanych, aby przejść do metodyki stosowanej w badaniach enzymatycznych, a następnie metod fizyko-chemicznych i wreszcie technik wykorzystywanych w badaniach z zakresu biologii komórki. W takim razie, dlaczego, pytam, opisy krystalizacji białek i dyfrakcji rentgenowskiej znalazły się po tych

ostatnich, a „odwrotna transkrypcja” zamyka ten rozdział? Chciałem jeszcze zwrócić uwagę, że w języku polskim pomiędzy jednostką miary a jej wartością liczbową powinien zawsze występować odstęp, o czym zapomniał Autor dysertacji. I jeszcze jedna uwaga. Przy podawaniu parametrów wirowania powinniśmy używać wartości „g”. Jeżeli już chcemy posługiwać się obr/min (rpm), to musimy, obok typu wirówki, podać również szczegóły dotyczące stosowanego rotora i ewentualnie próbówki wirówkowej. Pozostałe, niestety liczne tym razem, uwagi redakcyjne, podobnie jak w przypadku wstępu zamieściłem na marginesach pracy.

Najważniejsze wyniki (o ich wartości jednoznacznie świadczą czasopisma, w których zostały opublikowane) uzyskane przez mgr Wiśniewskiego w trakcie realizacji pracy doktorskiej przedstawiają się następująco. W przypadku FBPazy2, większość z nich została otrzymana dzięki eksperymentom, w których wykorzystano, uzyskane przez Doktoranta w postaci białek rekombinowanych, zmutowane formy enzymu. Jeżeli chodzi o badania kinetyczne, to użycie zmutowanych form FBPazy2 pozwoliło na stwierdzenie, że zarówno reszta aspartylowa w pozycji 187 jak i reszta leucytowa w pozycji 190 są przede wszystkim niezbędne dla allosterycznego hamowania aktywności enzymatycznej FBPazy2 przez AMP. Z kolei, badania strukturalne w których wykorzystano pomiary sedymentacji przez ultrawirowanie analityczne, wykazały, że w nieobecności AMP, enzym występuje jako mieszanina monomerów, dimerów, tetrametrów i oktamerów, natomiast w obecności AMP występuje on głównie jako tetrametr. Utworzenie zmutowanych form FBPazy2 pozwoliło również stwierdzić, że w tworzeniu takich tetrametrów kluczową rolę odgrywa reszta leucylowa w pozycji 190. Wykorzystując metodę dichroizmu optycznego oraz turbidymetrycznego pomiaru temperatury topnienia wykazano z kolei, że po pierwsze wiązanie AMP zwiększa oporność na denaturację termiczną tylko FBPazy2, czego nie obserwuje się w przypadku FBPazy1 i po drugie, stan T FBPazy2 odznacza się znacznie większą stabilnością termiczną w porównaniu ze stabilnością w stanie R.

Natomiast, wyniki dotyczące niemetabolicznych funkcji FBPazy2 dają się streścić następująco:

1. Dla zwiększenia przeżywalności kardiomiocytów zależnej od ekspresji FBPazy2, którą obserwuje się w warunkach normoksji, w cząsteczce enzymu konieczna jest obecność zarówno reszty aspartylowej w pozycji 187, jak i reszty leucylowej w pozycji 190. Natomiast w warunkach hipoksji zarówno FBPaza typu dzikiego (natywna), jak i jej mutanty D87L i L190G zmniejszają przeżywalność kardiomiocytów, a podczas reoksygenacji pozostają bez wpływu na ich żywotność.

2. Wykorzystując mutanty D87L i L190G wykazano, że w kardiomiocytach transportowi do jądra ulegają zarówno tetrameryczne jak i dimeryczne formy FBPazy2, ale tylko tetrametr nie podlega transportowi zwrotnemu i akumuluje się w tym kompartmentcie komórkowym
3. Natomiast z mitochondriami oddziałują głównie dimery FBPazy2, które mają zdolność ochrony mitochondriów przed depolaryzacją spowodowaną wysokimi stężeniami jonów wapnia.

W przypadku fosfogliceromutazy 2 (PGAM2) potwierdzono, wykorzystując do tego celu fluorescencyjny mikroskop konfokalny, że w komórkach mysiego raka płuc enzym ten ulega transportowi do jądra, gdzie lokalizuje się w jąderku.

Uwagi merytoryczne dotyczące rozdziału „Wyniki”. W badaniach nad stabilnością termiczną fruktozo-1,6-bisfosfatazy wykorzystywano, obok opisanej rekombinowanej formy FBPazy2, również FBPazę1, której pochodzenie nie zostało podane we wcześniejszych rozdziałach. Brak mi uzasadnienia dlaczego w przypadku PGAM2 wykorzystywano w badaniach własnych enzym izolowany z mięśni, a nie jego formę rekombinowaną, jak to miało miejsce w przypadku fruktozo-1,6-bisfosfatazy i aldolazy? Brak mi również stosownego wyjaśnienia po co wykorzystywano RNAzę A w eksperymencie, którego celem było określenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji PGAM2. Nie widzę także sensu zamieszczenia w pracy wyników eksperymentu dotyczącego wyciszania ekspresji PGAM2 w komórkach, zamieszczonego na stronie 96, które nie wiążą się z tematem pracy. Podobna uwaga dotyczy także podrozdziału 5.3 „Aldolaza A”. Przedstawione w nim wyłącznie wyniki analizy krystalograficznej nie łączą się bezpośrednio z tytułem pracy, o czym zresztą świadczy wniosek końcowy zamieszczony na stronie 108.

Uwagi redakcyjne dotyczące rozdziału „Wyniki”. Tytuły części podrozdziałów są zbyt ogólnikowe, niewiele mówiące o ich treści. Na przykład tytuł podrozdziału 4.1. „Mutageneza” jest nazwaniem stosowanej metody, co zresztą zostało uwzględnione w tytule podrozdziału 3.3. Mutageneza”, w części poświęconej technikom badawczym, a nie tytułem, który wyjaśniał by czytelnikowi, czego dotyczy ten podrozdział. Dlatego też powinien on brzmieć na przykład w ten sposób: ‘Otrzymanie zmutowanych form fruktozo-1,6-bisfosfatazy i fosfogliceromutazy’, bez podziału na kolejne podrozdziały. Podobnie jak w przypadku rozdziału „Materiały i Metody” Doktorant nie ustrzegł się przed używaniem wyrażeń żargonowych, co szczególnie „rzuca się w oczy” przy opisach rysunków, które co więcej, są często zbyt skrótowe/ogólne i zawierają błędy. Uwagi te dotyczą na przykład ryciny 4.1, a

konkretnie jej tytułu „Oddziaływania reszt D187L i L190G FBPazy2 w stanie R i T”, który powinien brzmieć „Oddziaływania reszt D187 i L190 FBPazy2 w stanie R i T”, czy rysunku 4.2, gdzie w jego opisie zamiast nazwy ludzkiej FBPazy1, podano nazwę ludzkiej FBPazy2. Z kolei, w opisie do rysunku 4.17 nie wyjaśniono, co przedstawiają kolejne panele. Mogę się tylko domyślać, że panel pierwszy przedstawia fluorescencję pochodzącą od FBPazy2 znakowanej FITC, panel drugi – fluorescencję pochodzącą od mitochondriów znakowanych barwnikiem MitoTracker Deep Red, panel trzeci – nakładanie się fluorescencji pochodzącej z obu źródeł. Pozostałe uwagi zamieściłem, jak poprzednio, na marginesach pracy. I wreszcie, co dotyczy całego rozdziału, niektóre informacje w nim zamieszczone powinny się znaleźć albo w rozdziale „Materiały i metody”, albo „Dyskusja”.

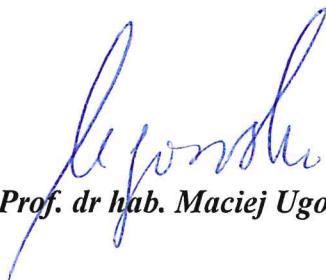
Podobnie jak pozostałe rozdziały tej dysertacji, również rozdział „Dyskusja” świadczy o bardzo dobrej znajomości przez Doktoranta problematyki, której dotyczy temat jego pracy doktorskiej. Co ważne, nie ma w nim zbędnego powtarzania informacji podanych we wstępie, co często zdarza się w tego typu opracowaniach. Mam jedynie wątpliwości, jak już wspomniałem powyżej, co do zamieszczenia w tym i pozostałych rozdziałach informacji poświęconych aldolazie A, jako że jej funkcje niemiatoboliczne, w kontekście przedstawionych wyników, są wyłącznie spekulatywne.

Zamieszczone w rozdziale 6. wnioski są w mojej ocenie zbyt szczegółowe i bardziej przypominają streszczenie uzyskanych wyników. Niektóre z nich można było z powodzeniem połączyć, np. wniosek 7 i 8. Wniosek szósty został sformułowany błędnie, ponieważ w warunkach normoksji oba mutanty FBPazy2 (p.D187L i p.L190G) nie wpływają na żywotność kardiomiocytów, w odróżnieniu od formy natywnej enzymu. I według mnie powinien on być sformułowany w sposób jaki podałem powyżej (str. 3, wiersze 5 – 10 od dołu strony).

Zamieszczone uwagi, podkreślam głównie o charakterze redakcyjnym, a także pytania skierowane do Doktoranta, nie zmieniają mojej wysoce pozytywnej oceny końcowej recenzowanej pracy. Mam nadzieję, że przydadzą się one w pisaniu kolejnych prac i będą mu pomocne w przyszłych dokonaniach. Uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Janusza Wiśniewskiego, tak ze względu na prezentowany temat, jak uzyskane wyniki i warsztat badawczy, w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki. Stąd wnoszę wniosek do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie magistra Janusza Wiśniewskiego do dalszych

etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wyróżniający się poziom naukowy recenzowanej dysertacji zwracam się również o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Wrocław, dnia 15 grudnia, 2017 roku


Prof. dr hab. Maciej Ugorski