



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Michała Piróga „Fizjologiczna rola i regulacja asocjacji 1-fosfohydrolazy D-fruktozo 1,6-bisfosforanu z mitochondriami”.

Rozprawa doktorska mgr Michała Piróga „Fizjologiczna rola i regulacja asocjacji 1-fosfohydrolazy D-fruktozo 1,6-bisfosforanu z mitochondriami” jest monografią przedstawiającą niezwykle interesujące badania mięśniowej FBPazy, nie jako kluczowego enzymu glukoneogenezy, a białka regulującego procesy takie jak cykl komórkowy i apoptoza. Przygotowana została w pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Gizak od lat zajmującej się lokalizacją komórkową i rolą FBPazy, a stanowi kontynuację badań profesorów Andrzeja Dżugaja i Dariusza Rakusa. Napisana jest przejrzysto i świadczy o znanstwie zarówno problemów metodycznych, jak i badanych obiektów, chociaż nie jest wolna od potknięć językowych, edytorskich i zwykłych „literówek”.

Praca, licząca 149 stron, składa się z czterech głównych rozdziałów (Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja). Znaczną część wyników opublikowano, w prestiżowych *The International J. of Biochem. & Cell Biol.* (IF 4.24), w której doktorant jest pierwszym autorem, a część w *FEBS Lett.* (IF 3.34) - drugim. W związku z powyższym, zwalnia mnie z bardzo szczegółowej oceny przedstawionych wyników szczególnie w odniesieniu do analizy zmian struktury FBPazy podczas interakcji z mitochondriami. Uwagi, które nasunęły mi się po lekturze pracy przedstawiam poniżej.

Cel pracy został jasno sformułowany i skupiał się na: 1) poznaniu mechanizmu asocjacji FBPazy z mitochondriami, 2) wytypowaniu białek zaangażowanych w interakcję i regionów/sekwencji FBPazy objętych oddziaływaniem i 3) poznaniu szlaków sygnałowych kierujących białko do mitochondriów.

We długim Wstępie na 47-miu stronach Autor jasno i szczegółowo, może czasem zbyt podręcznikowo, przedstawił podstawowe informacje dotyczące budowy i biologii mitochondriów w tym opis genomu mitochondrialnego, drogi i sygnały



kierowania białek do i z mitochondriów, rolę sieci mitochondrialnej, biochemii apoptozy, tworzenia kompleksu porowego, roli jonów wapnia w apoptozie, enzymy glikolizy i glukoneogenezy w oddziaływaniach z mitochondriami, w szczególności niemetaboliczną rolę FBPaz - wątrobowej i mięśniowej w komórce, a w końcu wybrane czynniki sygnałowe takie jak kinazy MAPK p38 i GSK3, resweratrol, stres tlenowy, etopozyd, których wpływ badano w pracy. Na koniec opisano mysie kardiomiocyty HL-1 tj. modelową linię komórkową wraz z przekonującym uzasadnieniem wyboru, chociaż uwaga (str. 57) dotycząca wysokich kosztów hodowli była zbędna.

Doceniając zawartość merytoryczną Wstępu, parę uwag dotyczących niezręczności językowych: bakterie wywołujące tyfus to *Rickettsia prowazekii* (a nie *prowanzekii*) – str. 9; używane w tekście wielokrotnie słowo „lokalizować” (np. str. 13, 15, 23 itd.; „DNA lokalizuje w błonie ...”) oznacza umiejscawiać, a właściwą formą jest „lokalizować się” w znaczeniu „być usytuowanym w miejscu” (Słownik PWN), rysunki, nawet „skany” nie powinny zawierać anglojęzycznych opisów, tym bardziej, że są bardzo nieczytelne; określenia „efektory realizujące efekty CR” (str. 50) (chodzi zapewne o wpływ), „ludzki genom człowieka” (str. 15), „genomy kodują geny” (str. 15), „czwartorzędowy stan konformacyjny” (str. 43) czy „kondycja mitochondriów” też nie brzmią najlepiej.

Reakcja katalizowana przez FBPazę przedstawiona na rys. 2-14 nie jest uwodornieniem FDP tylko hydrolizą.

Nie jest dla mnie jasne stwierdzenie (str. 40) „Tunelowanie substratu nie jest jednak jedyną przyczyną wiązania enzymów gospodarki energetycznej z mitochondriami”. Czy oznacza, że opisane przez Rakusa i wsp. (Biochemistry, 2004) po raz pierwszy dla FBPazy zjawisko w odniesieniu do interakcji enzym-substrat dotyczy innych enzymów i ma bezpośredni związek z oddziaływaniem enzymów z mitochondriami.

Na kolejnych 23 stronach zostały opisane używane materiały i techniki badawcze wykorzystane w pracy. Nie mam większych zastrzeżeń, do dobrze merytorycznie napisanego rozdziału, a jedynie kilka uwag „natury technicznej”, a jednocześnie doceniam ogrom pracy włożonej w opanowanie technik biochemii i



biologii molekularnej od izolacji i oczyszczania FBPazy z mięśni królika poprzez otrzymywanie białek rekombinowanych, izolację i oczyszczanie mitochondriów, do pracy z linią komórkową z wykorzystaniem zaawansowanych technik mikroskopowych po statystyczną analizę wyników. Szczególnie interesujący wydał mi się eksperyment dotyczący analizy ekspresji genów związanych z apoptozą i cyklem komórkowym z wykorzystaniem ilościowego PCR, chociaż trochę szkoda, że wśród genów referencyjnych znalazł się tylko jeden (GAPDH) glikolizy/glukoneogenezy. Z kolei dość enigmatyczny jest opis na str. 77 znakowania fluorescencyjnego białka (FBPazy?). W szczególności brak informacji o sposobie wyznaczania stężenia białka (współczynniki ekstynkcji), oznaczaniu stopnia znakowania. Nie wiadomo też o jaki odrzucany osad chodzi.

Poza „literówkami” (do wglądu w egzemplarzu recenzenta), zwróciłbym uwagę, że nie należy mieszać nazw polskich i angielskich tych samych odczynników (np. rezw(-sv)eratrolu, etopoz(-s)ydu, ortów(-v)anadanu), odczynnik Bradforda (nie Bradford, mimo kobieco brzmiąco imienia Marion) (str. 58), a nazwisko znanej nam osoby prawidłowo tj. prof. Dżugaj, chociaż w publikacjach występuje w zmienionej wersji (str. 66). W przypadku worków dializacyjnych istotna jest nie średnica, a zakres mas cząsteczkowych (tzw. *cut-off*). Proszę wyjaśnić co oznacza określenie „komórki oglądano przeżyciowo pod mikroskopem”. W opisie metodyki nie powinno stosować się zamiennie trybu „poddano, przepłukano itd.”, a „poddawano i przepłukiwano” chyba, że procedura była wykonywana tylko raz (np. str. 62, 65). Wreszcie wzory chemiczne mają swoje konwencje i zapis CaCl_2 , KH_2PO_4 (str. 73), CnBr (str. 71), zamiennie NAD lub NAD^+ (str. 42 i 50), NH_4^+ (str. 41) wymagałyby korekty, a rysunku 4-27 (str. 119) brak w tekście.

Wyniki badań przedstawiono 38 stronach. Autor w pierwszej kolejności informuje o eksperymentach kontrolnych związanych m.in. z transfekcją komórek HL-1 plazmidami ekspresyjnymi FBP2, a następnie przechodzi do właściwych eksperymentów dotyczących mitochondrialnej lokalizacji FBPazy wobec inhibitorów kinazy GSK3. Wyniki eksperymentów TEM nie budzą zastrzeżeń, a analizy strukturalne połączone z analizą statystyczną są bardzo oryginalne. Być może warto



było nieco więcej miejsca we Wstępie lub Metodach poświęcić nietypowym technikom analizy statystycznej używanych w pracy co ułatwiłoby analizę wyników. W kolejnych badaniach wytypowano kilkadziesiąt potencjalnych mitochondrialnych partnerów białkowych FBPazy. Dobrym pomysłem było połączenie technik chromatografii powinowactwa, elektroforezy z sieciowaniem chemicznym i spektrometrią mas, co oczywiście jest świetnym wstępem do dalszych badań, w których pokazano by stechiometrię oddziaływań, siłę interakcji i przede wszystkim określiło ich rolę fizjologiczną. Już przeprowadzone eksperymenty pokazały ochronną rolę FBPazy wobec stresu wapniowego i przystosowaniu kardiomiocytów do warunków stresu oksydacyjnego. Osobiście wolałbym, żeby wyniki wpływu FBP2 i jonów wapnia na syntezę ATP i pęczniecie mitochondriów (rys. 4-8; 4-9) przedstawiano nie w % zmiany syntezy ATP i % spadku absorbancji, a w wartościach bezwzględnych zmian stężenia ATP i jednostkach absorbancji. Niezwykle interesująca jest teza o roli FBPazy jako regulatora transkrypcji wybranych genów kodujących białka apoptozy i cyklu komórkowego. Oczywiście obserwowane zmiany ekspresji niektórych genów, szczególnie proapoptotycznych, należałoby zweryfikować w dalszych badaniach np. przez poszukiwanie odpowiednich elementów regulatorowych, z którymi FBPaza bezpośrednio lub pośrednio oddziałuje. Pewne wątpliwości budzą wyniki badań zmian w strukturze FBPazy np. niejasne jest stwierdzenie (str. 116) dotyczące 50-krotnego obniżenia wrażliwości FBPazy na jony wapnia w mutancie Trp57Tyr. W Materiałach i Metodach brak informacji o usuwaniu wapnia z buforów i oznaczaniu stechiometrii i siły wiązania wapnia do poszczególnych mutantów. Wobec tytułu podrozdziału 4.5.3. *Rola struktury czwartorzędowej FBPazy mięśniowej* wypadałoby przedstawić odpowiedni wniosek wynikający z eksperymentów. Wyniki (rys. 4-23; 4-24) przedstawiono w postaci % obniżki absorbancji przy 540 nm co jest mało czytelne chociaż wnioski dotyczące roli N-końca białka w jego interakcji z mitochondriami interesujące.

Ostatnim rozdziałem jest dobrze napisana Dyskusja licząca 17 stron. Zwraca uwagę omówienie transportu FBPazy do mitochondriów przez zewnętrzną błonę, chociaż nieco pozbawiona oparcia w eksperymentach. Transporter powinien



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

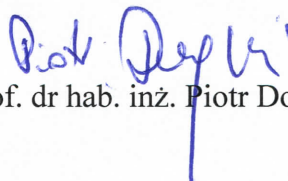
prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

znajdować się wśród partnerów białkowych. Kolejno dyskutowana jest hipoteza o roli FBPazy jako regulatora transkrypcji w apoptozie i przeciwstawienie do jej podstawowej roli enzymatycznej. Omawiane są także wyniki pokazujące wzrost produkcji ATP jako odpowiedź na stres wapniowy. Nie stanowi to jednak dowodu na interakcję FBPaza – syntaza ATP. Wydaje się, że niezwykle interesujące byłyby badania oddziaływań białko-białko w trójkącie „FBPaza - syntaza ATP - kinaza GSK3”, a także ich wpływ na cykl komórkowy. Tu nasuwa się kolejne pytanie o ewentualną synchronizację komórek, która pozwoliłaby odnieść się do problemu. Niezwykle ciekawe wydają się dalsze badania dotyczące roli pozostałych białek zasocjowanych z FBPazą.

Pracę zamyka 3-stronicowe podsumowanie i 247 pozycji literaturowych, w znacznej większości z ostatnich kilku lat.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Michała Piróga 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 Autora 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 Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr. Michała Piróga 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 Dobryczycki