



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej
kierownik: prof. dr hab. Andrzej Gamian

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

tel. (071)7841370, 7840084, fax: 7840085

e-mail: andrzej.gamian@umed.wroc.pl; <http://www.am.wroc.pl>

Wrocław, 29.06.2015r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Michała Piróga pt. „Fizjologiczna rola i regulacja asocjacji 1-fosfohydrolazy D-fruktozo 1,6-bisfosforanu z mitochondriami” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Gizak

Praca dotyczy badania jednego z enzymów szlaku glikolizy, fruktozo 1,6-bisfosfatazy (FBPazy), w zakresie oddziaływań wielofunkcyjnego białka z mitochondriami, sposobów regulacji tej asocjacji i wyjaśnienia roli fizjologicznej tych procesów. Podjęty problem jest ważny, gdyż obejmuje podstawowe procesy komórkowe związane z proliferacją, różnicowaniem i programowaną śmiercią komórki. Przedmiotem badań były komórki linii kardiomiocytów ludzkich. Wiedza na temat przyczyn uszkodzenia mięśnia sercowego w warunkach stresu oksydacyjnego lub niedotlenienia, na temat regeneracji mięśnia sercowego, to istotne zagadnienia biologii eksperymentalnej i medycyny mające na celu ograniczenie zgonów w krajach rozwiniętych. Białko to, podobnie do wielofunkcyjnej enolazy, jest intensywnie badane w ostatniej dekadzie, jednak wciąż pojawiają się publikacje i nowe pytania w tym zakresie. Praca ma szerokie znaczenie biologiczne, a wyniki mogą znaleźć wykorzystanie praktyczne w poszukiwaniu nowych leków. Problem podjęty w tej pracy jest kontynuacją programu realizowanego w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Komórki, Instytutu Biologii Eksperymentalnej na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, jest złożona z kilku rozdziałów, na początku umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim, następnie cel pracy, dopiero potem wstęp, część metodyczną, wyniki i dyskusję z podsumowaniem oraz spis piśmiennictwa. Brak spisu skrótów z ich wyjaśnieniami znacznie utrudnia czytelnikowi śledzenie treści. Praca

zawiera 149 stron maszynopisu wraz z 43 rysunkami i 15 tabelami, cytowanymi 247 pozycjami piśmiennictwa głównie (65%) z ostatniej dekady. We wprowadzeniu do rozprawy autor omawia budowę i funkcje mitochondrium, import białek, pory i sieć mitochondrialną i jej rolę w apoptozie, podział i fuzję tych organelli, następnie omawia apoptozę, jej szlak mitochondrialny i profil genów, rolę wapnia w apoptozie, śmierć komórki niezależną od kaspaz. Osobny rozdział poświęcono enzymom szlaku glikolizy w odniesieniu do mitochondriów, w tym heksokinazie, dehydrogenazie 3-fosfogliceraldehydu, by przejść do omawiania FBPazy, w szczególności izoformy mięśniowej. Charakteryzuje resweratrol i etopozyd, użyte w pracy celem monitorowania ich wpływu na stres oksydacyjny i hipoksję. Przybliża też czytelnikowi kardiomiocytarną linię komórkową HL-1 będącą głównym modelem badawczym.

W części metodycznej opisano procedury postępowania z komórkami, kilka metod lokalizacji oraz izolowania mitochondriów, lokalizowania i izolowania FBPazy, otrzymywania rekombinowanego białka, analizy aktywności enzymatycznej, elektroforezy oraz immunoblotingu, chromatografii powinowactwa, sieciowania białek, techniki spektrometrii masowej, oznaczania ATP, analizy pęcznienia mitochondriów w obecności wapnia, reakcji PCR, znakowania znacznikami fluorescencyjnymi, transfekcji komórek białkiem, analizy polaryzacji błon mitochondriów, oznaczania wolnych rodników, detekcji fragmentacji DNA, by w końcu opisać używane programy i metody statystyczne. Zestaw metod jest szeroki, stosunkowo dobrze opisanych i stosowanych, przy czym przydałoby się przy opisie wyników podawanie odnośników do numeru zastosowanej metody, co znacznie ułatwiłoby czytanie i korzystanie z pracy. Przy opisie otrzymanych wyników autor opiera się na wcześniejszych doświadczeniach wykonanych w tym zespole i klarownie oddziela wyniki prezentowane w pracy od poprzednio uzyskanych, wyraźnie również podkreśla te dane, które zostały opublikowane w pracy z jego autorstwem, co tutaj dobrze oddaje tok pracy.

Autor wykazał na modelu linii kardiomiocytów ludzkich, że FBPaza mięśniowa asocjuje z białkami wszystkich kompartmentów mitochondrium, poza ośmioma białkami rozpoznanymi w dwóch różnych doświadczeniach zaobserwowano oddziaływanie z histonami, przez co potwierdza obecność tych histonów w mitochondrium. Wykazano że FBPaza wzmacnia produkcję ATP, także w warunkach stresu wapniowego (występującego przy wzmożonym wysiłku fizycznym) działając ochronnie, też wobec czynników pro-apoptotycznych. W warunkach stresu oksydacyjnego asocjacja FBPazy z mitochondriami chroni organella przed depolaryzacją błon i aktywacją apoptozy. Brak asocjacji przy hipoksji z kolei inicjuje apoptozę,

co świadczy o udziale w komórkowej odpowiedzi na niedotlenienie. Wykazano, że FBPaza mięśniowa chroni mitochondria przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu. Te obserwacje przemawiają za udziałem tego białka w zapobieganiu skutkom niedokrwienia serca. Resweratrol powoduje asocjację FBPazy z mitochondriami, co wskazuje na typ mechanizmu ochronnego. Kolejny cykl doświadczeń dotyczył lokalizacji miejsca w białku biorącego udział w asocjacji z mitochondriami, gdzie wykazano rolę N-końcowej części białka, co nie występuje w izoformie wątrobowej.

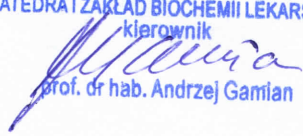
W dyskusji autor umiejętnie podsumowuje uzyskane wyniki, w odniesieniu do piśmiennictwa, stawia hipotezy odnośnie transportu FBPazy do i z mitochondriów, a według autora możliwość relokacji między jądrem i mitochondriami sugeruje możliwy udział w regulacji transkrypcji. Niezwykle interesujące jest powiązanie FBPazy z deacetylazami sirtuinami i wyniki doświadczeń z resweratrolem, stąd nasuwa się pytanie o możliwą deacetylazową funkcję FBPazy, czy bliższą rolę FBPazy w tak ważnych procesach acetylacji/deacetylacji.

Odnosnie uwag krytycznych dotyczą one strony redakcyjnej i stylu. Autor nie ustrzegł się od żargonu laboratoryjnego, pisząc na przykład cząstek zamiast cząsteczek na str. 11, nie jest jasne zdanie na str. 15 ...Koduje ..., trzynaście polipeptydów (osiem na nici H i jedna na nici L)..., na str. 17 ...zgodnie z gradientem elektrochemicznym do przestrzeni międzykomórkowej... Cytowanej pozycji na str. 18 Haynes i wsp., 2010, nie mogłem znaleźć w spisie piśmiennictwa. Na rys. 2-6, nie zaznaczono które z obrazów sieci są A-F. Powszechnie autor nieprawidłowo zapisuje myślnik i łącznik. Niektóre z rysunków mają napisy po angielsku podczas gdy większość jest po polsku. Styl zdania na str. 42 ...Ponadto inne inozytolo 1-monofosfatazy (IMPazy), powszechnie występują w królestwie *Procaryota*... należy poprawić. Na str. 46 należy poprawić zdanie ...Z kolei wrażliwość izoenzymu wątrobowego na jony wapniowe jest ok. tysiąckrotnie wyższa niż izoenzymu wątrobowego... Również styl zdania na str. 54 należy poprawić ...Etopozyd jest syntetyczną trucizną..., lepiej powiedzieć związkem lub cytostatykiem. W części metodycznej na str. 58 należy używać nazwy bibuła zamiast papier, blotting a nie blotting, metoda 3.8.21 to immunoblotting, a nie immunoblot, na str. 59 w tabeli 3.3 wobec jakiej FBP-2 przeciwciała królicze stosowano, ludzkiej?, przeciwciała pozostałe pochodziły z gatunku koza, należy wyraźnie określać w metodach, stężenie danego związku, gdyż dla przykładu bufor z dodatkiem 250 mM sacharozy nie wskazuje ile dodano roztworu sacharozy o stężeniu 250 mM, lub jakie było stężenie końcowe sacharozy. Lepiej seryjne płukanie, niż seria płukań także dwóm płukaniom w metodzie 3.8.19, podczas gdy dwie

linijki poniżej jest mowa o dwukrotnym płukaniu, na str.66/67 powinno być ...a następnie gwałtownie schłodzono w łaźni lodowej. Tak otrzymaną zawieszinę wirowano... W metodzie 3.8.14 powinno być osad zamiast pelet, w 3.8.16 lepiej rozpoczynać reakcję niż startować. W kilku metodach należałoby uzupełnić odnośniki literaturowe, np. 3.8.15. W opisie metod od 3.8.22 należy podawać nazwę handlową Sepharose oraz aktywowaną bromocyjanem jako CNBr-Sepharose, a nie sefarozę związaną z bromocyjanem. Nie jest jasny opis w metodzie 3.8.25 ...100% kwasu trichlorooctowego dodawanego do frakcji białkowej w stosunku objętościowym 1:4. Niepotrzebnie płukano 100% acetonem, wystarczyłoby płukać osad acetonem. W metodzie 3.8.33 analizowano masę cząsteczkową, a nie masę. W metodzie 3.8.37 stosowano raczej pożywkę bez surowicy? W rozdziale opisującym wyniki należy poprawić na rys. 4-3 ...IgG przeciw IgG króliczym znakowane złotem... W tabeli 4-1 w pozycji 17 chodzi o enzym syntetazę asparaginylo-tRNA. Na rys. 4-19 podpis powinien być skorygowany ...Średnie odsetki komórek martwych (niebieski) lub apoptotycznych (czerwony).

Podsumowując, należy podkreślić że nie mam zasadniczych uwag krytycznych poza wyżej wymienionymi, które nie obniżają dużej wartości pracy, dobrze zaplanowanej i wykonanej. Wyniki przedstawiają cenne dane, które inicjują kierunek dalszych badań. Praca jest oryginalnym wkładem w zakresie nauki podstawowej o potencjalnym znaczeniu praktycznym na polu biomedycznym, przyczynia się do istotnego poszerzenia wiedzy o procesach komórkowych z udziałem FBPazy i mitochondriów. Autor wykazał się znajomością właściwie wykorzystanego piśmiennictwa, na uwagę zasługuje też umiejętna praca w zespole.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Michała Piróga spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnioskuje do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Michała Piróga do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pozwalam sobie również złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej oraz napisanie całej rozprawy.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII LEKARSKIEJ
kierownik

Prof. dr hab. Andrzej Gamian