



CENTRUM MEDYCZNE  
KSZTAŁCENIA  
PODYPLOMOWEGO

Uniwersytet Wrocławski Wydział Nauk Biologicznych (3)		
Wpłynęło do WNB	29-04-2019	Załączniki
Wzrost do jedn. org.	Data	Symbol
ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOLOGI MOLEKULARNEJ		

Kierownik Zakładu:

Dr hab. Agnieszka Piekietko-Witkowska, prof. CMKP

ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa, Tel.: +48 22 56 93 810, e-mail: [apiekielko@cmkp.edu.pl](mailto:apiekielko@cmkp.edu.pl)

Warszawa, dnia 25 kwietnia 2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Dudy  
pt. „Rola mięśniowej izoformy fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanu - FBP2 –  
w indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego”,  
wykonanej pod kierunkiem Promotora, prof. dr. hab. Dariusza Rakusa.**

Rozprawa doktorska mgr. Przemysława Dudy dotyczy molekularnych mechanizmów indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, ang. *long-term potentiation*), kluczowego procesu umożliwiającego formowanie się pamięci. Autor rozprawy skupił się na tzw. mięśniowej izoformie fruktozo-1,6-bisfosfatazy (FBP2), enzymu katalizującego hydrolizę fruktozo-1,6-bisfosforanu do fruktozo-6-fosforanu i fosforanu nieorganicznego. Na poziomie subkomórkowym, kluczowymi organellami biorącym udział w indukcji LTP są mitochondria, działające jako czynniki buforujące jony wapniowe, napływające do neuronów podczas stymulacji. Na poziomie molekularnym, jednym z głównych regulatorów LTP jest aktywność zależnej od wapnia/kalmoduliny białkowej kinazy II (CaMK2), która reguluje działanie jonotropowych receptorów NMDAR i AMPAR, odgrywających główną rolę we wczesnej fazie indukcji LTP. Wykorzystując pierwotne linie komórkowe wyprowadzone z hipokampów myszy oraz szerokie spektrum metod biologii molekularnej i komórkowej mgr Przemysław Duda wykazał, że FBP2 wspomaga proces LTP wpływając zarówno na funkcjonowanie mitochondriów, jak i na działanie CaMK2. Oddziałując z mitochondriami, FBP2 pełni wobec nich rolę ochronną, przeciwdziałając ich pęcznieniu powodowanemu przez stres wapniowy. Z kolei oddziaływanie z CaMK2 ułatwia jej aktywację, co w rezultacie umożliwia indukcję LTP.

Rozprawa ma układ typowy dla prac doktorskich i składa się ze 124 stron, podzielonych na główne rozdziały (Cel pracy, Wstęp, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Bibliografia). Pracę otwiera Streszczenie, przedstawione w dwóch wersjach językowych, polskiej i angielskiej, a zamykają dwa rozdziały dodatkowe, zawierające spis publikacji i wystąpień konferencyjnych Autora, a także Errata, korygująca błędnie w rozprawie opisaną i przedstawioną Rycinę 28.

W Streszczeniu Autor zwięźle opisuje przedmiot swoich badań, FBP2 i przedstawia rolę tego enzymu w procesie ochrony mitochondriów przed stresem wapniowym. Opisuje też rolę wapnia w procesach neuroplastyczności. W ostatnim akapicie Streszczenia Autor przedstawia uzyskane wyniki oraz wyciągnięte na ich podstawie wnioski dotyczące roli FBP2 w molekularnych procesach formowania pamięci i uczenia się.

We Wstępie wyczerpująco przedstawiono informacje dotyczące metabolizmu węglowodanów w tkance nerwowej, w tym roli wielofunkcyjnych białek z grupy „*moonlighting*”, ze szczególnym uwzględnieniem FBP2. Autor szczegółowo opisuje również budowę i funkcję mitochondriów, ich rolę w sygnalizacji z udziałem jonów wapniowych, apoptozie i aktywności neuronów. W końcowych podrozdziałach Wstępu przedstawiono neurofizjologiczne podstawy uczenia się i pamięci, w tym szczegółowy opis budowy anatomicznej hipokampa. Rozdział kończy opis roli LTP w procesie

formowania się pamięci. Informacje przedstawione we Wstępie są opatrzone starannie opracowanymi rycinami, ułatwiającymi zrozumienie opisywanych reakcji biochemicznych i szlaków sygnałowych.

Rozdział Materiały i Metody zawiera skrupulatny opis wykorzystanych przez Autora technik biologii molekularnej i komórkowej, pozwalający na odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów w niezależnym laboratorium. Przygotowując rozprawę Doktorant wykorzystał zarówno techniki tradycyjne (SDS-PAGE, Western blot, barwienia immunocytochemiczne), jak i wielkoskalowe (spektrometria mas) i fizykochemiczne (analiza transferu energii rezonansem Foerстера (FRET)).

Wyniki przedstawiono w postaci starannie zredagowanych rycin przedstawiających zdjęcia mikroskopowe, wykresy, fotografie żeli elektroforetycznych i hybrydyzacji Western blot. Rycinom towarzyszy rozbudowany komentarz, ułatwiający czytelnikowi zorientowanie się w znaczeniu przedstawionych wyników.

W rozdziale Dyskusja Doktorant komentuje uzyskane wyniki w szerszym kontekście znaczenia sygnalizacji wapniowej w LTP, skupiając się głównie na roli FBP2 jako czynnika chroniącego mitochondria przed stresem wapniowym, a także jej decydującej roli w aktywacji CaMK2 podczas indukcji LTP. O dojrzałości naukowej Doktoranta świadczy fakt, że opierając się na uzyskanych wynikach, proponuje nowe, wymagające zbadania zagadnienia: postuluje między innymi potrzebę scharakteryzowania miejsc oddziaływania między FBP2 a CaMK2, a także poszukiwania odpowiedzi na pytanie która frakcja FBP2 (cytozolowa czy mitochondrialna) bierze udział w aktywacji CaMK2.

Autor zna i biegle cytuje najnowsze piśmiennictwo dotyczące tematyki rozprawy: na 180 pozycji Bibliografii, 58 (ponad 30%) pochodzi z ostatnich 10 lat. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że w rozprawie cytowane są pozycje źródłowe w języku angielskim i francuskim: przedstawiając historię odkryć dotyczących hipokampa Doktorant sięgnął do prac Hebba i Cajala opublikowanych w pierwszej połowie XX w.

Funkcja recenzenta nakłada na mnie obowiązek krytycznego komentarza odnośnie konstrukcji pracy. Poniżej zamieszczam uwagi dotyczące poszczególnych rozdziałów rozprawy.

- W rozdziale Streszczenie zabrakło niestety jasno sformułowanej hipotezy i celu badań; nie zdefiniowano również pojęcia LTP, co utrudnia czytelnikowi uchwycenie znaczenia odkryć dokonanych przez autora. Rozwinięcie skrótu LTP pojawia się dopiero na 10 stronie rozprawy, w Wykazie skrótów, a jego definicja – na stronie 44, pod koniec Wstępu. Nie wyjaśniono również znaczenia CaMK2 w LTP, co powoduje, że dla czytelnika nie jest jasne, dlaczego fakt zwiększania aktywności CaMK2 przez oddziaływanie z FBP2 czyni ten ostatni enzym „nowym czynnikiem regulatorowym LTP”.
- Wstęp, jakkolwiek interesujący i świadczący o doskonałym przygotowaniu Autora do podejmowanych w rozprawie badań, jest niestety za długi: liczy 36 stron, co stanowi prawie połowę głównego tekstu rozprawy. Zrozumienia tekstu nie ułatwiają liczne zdania wielokrotnie złożone, zajmujące niejednokrotnie 6 (np. str. 28: cały podrozdział o wewnętrznej błonie mitochondrialnej to jedno długie zdanie) do 8 wierszy (np. ostatnie zdanie na str. 37, kontynuowane na str. 38). Z przykrością stwierdziłam, że Autor popełnił błąd, przypisując płć męską Constance Jeffery, autorce terminu „*moonlighting proteins*” (str. 18).
- W opisie Metod nie do końca jest jasne, co miał na myśli Autor pisząc o „żelach lustrzanych” (str. 62) i „elektroforezie lustrzanej” (str. 78). Czy były to po prostu dwie prowadzone równocześnie elektroforezy? W rozprawie nie zdefiniowano też pojęcia „współczynnika Mandersa” (str. 59, 67).
- Analizę statystyczną prowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta. Test t służy do porównania dwóch grup danych. W rozprawie porównywano jednak więcej niż dwie grupy

danych (np. Ryc. 7, 12, 25, 27, 31, 34), co sugeruje, że właściwym rozwiązaniem byłoby wykorzystanie testu ANOVA w powiązaniu z analizą post-hoc (np. testu Dunnetta, dla układu składającego się z 1 grupy kontrolnej, do której porównujemy kilka grup badanych, lub testu Tukeya, w przypadku porównywania wszystkich grup ze sobą). Test t został prawidłowo wykorzystany do analizy danych zaprezentowanych na rycinie 28.

- W rozdziale Wyniki interpretację obrazu żelu przedstawiającego wyniki koimmunoprecypitacji FBP2 i CaMK2 (Ryc. 16) ułatwiłoby wskazanie na rycinie, który prążek przedstawia które białko (FBP2 czy CaMK2a). Przedstawiony na panelu C Ryciny 19 skan obrazu hybrydyzacji Western blot jest słabo czytelny i trudno na jego podstawie wnioskować o wyciszeniu FBP2. W rozprawie nie wyjaśniono skrótu MAP2; nie podano też informacji, dlaczego sygnał fluorescencyjny pochodzący od MAP2 był wykorzystany do normalizacji wyników pomiaru stopnia wyciszenia FBP2 (str. 82). Opisy osi Y na Rycinie 27 są słabo czytelne.
- W obszernym opracowaniu naukowym jakim jest rozprawa doktorska trudno jest uniknąć pewnych niedociągnięć bądź niewłaściwych sformułowań. Należy jednak podkreślić, że rozprawa zawiera bardzo niewielką liczbę błędów typograficznych (np. „bisforforanu” zamiast „bisfosforanu” (str. 20), „Ponad to” „zamiast „Ponadto” (str. 21), „od półtora- do dwukrotnego wzrost pola powierzchni...” zamiast „od półtora- dwukrotnego wzrostu pola powierzchni...” (str. 91), „dystrybuuję” zamiast „dystrybucję” (str. 100), brak kropki przed „Jony wapniowe...” (str. 101)). W kilku miejscach Autor popełnił błędy gramatyczne, wynikające zapewne z zasugerowania się angielską składnią (np. str. 42. „...model (...), który spekulował już sam Ramon Cajal...” (w języku polskim spekuluje się na jakiś temat, a nie „coś”), str. 63: „z obecnością” zamiast „w obecności”, „dla precypitacji (...) użyto...” zamiast „do precypitacji (...) użyto...”). Kilka wyrażen to ewidentne zapożyczenia z języka angielskiego bądź kolokwializmy powszechnie używane przez osoby pracujące w laboratorium, np. „ekspresjonowane” (m.in. str. 14, 19, 20) zamiast „wyrażane”, „sensytyzowano” zamiast „uwrażliwiano” (str. 61), „Hodowle komórkowe utrwalano...”, zamiast „Komórki utrwalano...” (str. 57), czy „...podwyższone stężenie jonów wapniowych (...) jest przedłużone...” (str. 100), (przedłużony może być czas utrzymywania się podwyższonego stężenia jonów wapniowych).

Wymienione wyżej uwagi krytyczne w niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Dudy; są jedynie wskazówką do tego, by w przyszłych opracowaniach naukowych Doktorant starał się unikać tego typu niedociągnięć.

Każda dobra praca naukowa pobudza czytelnika do stawiania pytań. Nie inaczej stało się w trakcie czytania tej interesującej rozprawy. W związku z tym chciałabym prosić, by Doktorant odniósł w trakcie obrony do następujących zagadnień:

1. Fruktozo-1,6-bisfosforan, substrat FBP2, działa neuroprotektoryjne, wpływając m.in. na ekspresję genów kodujących cząsteczki adhezyjne, aktywację szlaków indukowanych przez czynniki transkrypcyjne (NFkB) i receptory błonowe (TLR4) (*Seok i wsp., Int Immunopharmacol. 2015 May;26(1):203-11*). Wykazano również wpływ fruktozo-1,6-bisfosforanu na ekspresję ko-transporterów sodowo-potasowo-chlorkowych i potasowo-chlorkowych, kontrolujących elektrochemiczny gradient jonów chlorkowych w błonach neuronów hipokamalnych (*Ding i wsp., Brain Res. 2013 Nov 20;1539:87-94*). Można założyć, że zmiany w poziomie ekspresji/aktywności FBP2 mogą przekładać się na zmiany w stężeniu fruktozo-1,6-bisfosforanu, a te z kolei na ekspresję genów. Czy zdaniem Autora rozprawy, indukowane przez FBP2

- wewnątrzkomórkowe zmiany w stężeniu fruktozo-1,6-bisfosforanu mogą mieć jakieś znaczenie w mechanizmie indukcji LTP?
2. Odnosnie analizy metodą spektrometrii mas: z Tabeli przedstawionej na str. 79 wynika, że białkami o największym pokryciu sekwencji były Mózgowe kwaśne rozpuszczalne białko 1 i Białko związane z MARCKS. Jak należy to interpretować z punktu widzenia roli FBP2 w LTP?
  3. Dyskusja str. 101: Autor wnioskuje, że „*podwyższone stężenie jonów wapniowych w cytozolu powoduje oddysocjowanie FBP2 od mitochondriów, zaś podwyższone [Ca<sup>2+</sup>] w mitochondriach stymuluje ponowną asocjację FBP2 z tymi organellami*”. Jaki może być mechanizm tych indukowanych przez Ca<sup>2+</sup> zmian w oddziaływaniu FBP2 z mitochondriami?
  4. Autor zaobserwował, że wyciszenie ekspresji FBP2 lub zahamowanie jej aktywności powoduje hamowanie jądrowej lokalizacji CaMK4 (Rycina 26). Jaki może być mechanizm tego zjawiska?

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr. Przemysława Dudy oceniam bardzo wysoko. Opierając się na danych literaturowych Doktorant sformułował oryginalną hipotezę badawczą, którą następnie zweryfikował przeprowadzając szereg prawidłowo zaplanowanych eksperymentów. Umiejętnie wykorzystując szerokie spektrum metod, Doktorant po raz pierwszy wykazał udział FBP2 w molekularnym mechanizmie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, w tym zdolność FBP2 do regulacji aktywności CaMK2, białka niezbędnego do procedowania LTP. Można oczekiwać, że wyniki te są dopiero początkiem fascynujących odkryć dotyczących roli FBP2 w procesach formowania się pamięci. Jak słusznie podkreślono w zdaniach kończących rozprawę, odkrycia te mogą posłużyć do opracowania nowych strategii terapeutycznych chorób neurodegeneracyjnych.

Stwierdzam, że rozprawa mgr. Przemysława Dudy spełnia wymogi określone w art. 13. ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuje do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuje o wyróżnienie rozprawy.



Kierownik  
Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej  
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

*dr hab. n. med. Agnieszka Piekietko-Witkowska, prof. CMKP*