

Warszawa, 19.04.2019

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Dudy  
pt. „Rola mięśniowej izoformy fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanu- FBP2 -  
w indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego”**

Rozprawa doktorska mgr. Przemysława Dudy pod tytułem „Rola mięśniowej izoformy fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanu- FBP2 - w indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego” wykonana została w Katedrze Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, pod promotorską opieką prof. Dariusza Rakusa. Badania prowadzone w ramach doktoratu były częściowo finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu badawczego nr UMO-2015/19/B/NZ1/00332.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania dotyczą białka zaliczanego do tzw. „moonlight proteins”, które charakteryzują się tym, iż ich funkcja komórkowa może zmieniać się w zależności od ich lokalizacji w ogoniźmie. To zjawisko, mimo iż wydaje się być powszechnym, wciąż nie jest dokładnie poznane i jest bardzo aktualnym tematem we współczesnej biologii. Z roku na rok pojawiają się coraz liczniejsze doniesienia na temat tych białek. Okazało się, że wiele klasycznych enzymów metabolicznych, np. enzymy szlaku glikolizy, których dotyczy niniejsza rozprawa, należą do klasy „moonlights proteins” i mogą pełnić inne funkcje zamiast funkcji metabolicznych.

Przedmiotem recenzowanej rozprawy jest mięśniowy izoenzym fruktozo-1,6-bisfosfatazy 2 (FBP2). Podstawową funkcją tego enzymu jest regulacja resyntezy glukozy z prekursorów niewęglowodanowych. Co ciekawe, proces ten nie występuje w komórkach nerwowych. Ponieważ FBP2 jest obecny w neuronach, celem prezentowanej tu rozprawy doktorskiej było określenie roli, jaką FBP2 pełni w tych komórkach. W szczególności założeniem pracy było pokazanie roli FBP2 w indukowaniu i podtrzymywaniu zjawiska długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP).

Pan mgr Przemysław Duda wykazał, że podobnie jak w innych komórkach, również w neuronach FBP2 może translokować do mitochondriów. Pokazał, że asocjacja ta jest zależna od LTP, a doświadczenia prowadzone w warunkach kontrolowanego stężenia wapnia wykazały, że zjawisko to dobrze koreluje z kinetyką stresu wapniowego w mitochondriach i cytozolu. Doktorant zaproponował

Uniwersytet Wrocławski Wydział Nauk Biologicznych (3)		
Wpłynęło do WNB	29-04-2019	Załączniki
Wpł. do jedn. org.	Data	Symbol
Znak sprawy		

model, wg. którego FBP2 chroni mitochondria w trakcie stresu wapniowego oraz pomaga utrzymać różnicę potencjałów w poprzek błony mitochondrialnej. Pan Przemysław Duda pokazał związek pomiędzy nieenzymatyczną funkcją białka FBP2 oraz jego strukturą czwartorzędową oraz wytypował nowych białkowych partnerów FBP2. Następnie przeprowadził analizę oddziaływania FBP2 z wybranym białkiem CaMK2 zarówno w modelach *in vitro*, jak i w żywej komórce. Całość rozprawy uzupełniają elegancko przeprowadzone, we współpracy z dr. Tomaszem Wojtowiczem, doświadczenia elektrofizjologiczne.

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim, liczy 123 strony (plus errata), a jej układ jest typowy dla oryginalnych publikacji naukowych o charakterze doświadczalnym. Praca została dobrze napisana, bardzo ładnym językiem, i jest ilustrowana 34 kolorowymi rycinami, które ułatwiają zrozumienie i interpretację wyników. Na końcu umieszczona jest lista publikacji i wystąpień konferencyjnych. Rozprawa poprzedzona jest streszczeniem w j. polskim i angielskim, spisem treści oraz listą skrótów. *Cel pracy* jest jasno sformułowany. Rozdział *Wstęp* jest bardzo obszerny (37 stron) i zestawia wszystkie ważne wiadomości potrzebne do zrozumienia rozprawy. Obejmuje on opis glikolizy oraz enzymów biorących udział w metabolizmie węglowodanów, a także opis struktury i funkcji mitochondriów. Znaczną część *Wstępu* stanowi doskonale wyjaśnienie neurofizjologicznych i molekularnych podstaw pamięci i uczenia, a zawarte w nim treści świadczą o znajomości aktualnego piśmiennictwa. Mimo, że wstęp jest dobrze napisany pod względem zarówno językowym jak i merytorycznym, to można w nim znaleźć niezręczne sformułowania, np. określenia „proteina” zamiast białko.

Rozdział *Materiały i metody* jest także obszerny (15 stron), co jest usprawiedliwione potrzebą wprowadzenia do szeregu stosowanych przez Doktoranta metod doświadczalnych. Jestem pod wrażeniem różnorodności technik wykorzystywanych przez mgr. Dudę w celu weryfikacji stawianych w pracy hipotez.

Najważniejszym elementem rozprawy jest 16 stronicowy rozdział *Wyniki*. Składa się on z pięciu części. W pierwszej Doktorant pokazał subkomórkową lokalizację FBP2 w komórkach nerwowych. Brakuje tu jednak wykazania, że stosowane przez Doktoranta przeciwciała rzeczywiście znakują FBP2 w neuronach w hodowli pierwotnej. Wątpliwość, co do specyficzności stosowanego przeciwciała dotyczy wszystkich wyników z rozdziału 4.1 oraz części wyników z rozdziału 4.5 (Rycina 19). W kolejnym podrozdziale pokazany został wpływ FBP2 na pęcznienie mitochondriów. W tym doświadczeniu stosowano ludzkie FBP2 natomiast mitochondria izolowano z mysich hodowli hipokampalnych. W przypadku takiego mieszania gatunków należałoby przedyskutować, dlaczego zakłada się, że w tym



przypadku białko będzie funkcjonalne. W kolejnym rozdziale Doktorant pokazał efekt oddziaływania FBP2 na mitochondria w funkcjonalnej analizie *in vitro*. W ilościowej analizie i interpretacji wyników zmian polarności mitochondriów z czasem trwania LTP zastanawia mnie dlaczego w chwili czasu  $t=0$  wszystkie z analizowanych prób nie przyjmują jednakowej wartości, skoro w chwili czasu  $t=0$  wszystkie neurony są neuronami kontrolnymi (Rycina 13). W kolejnym rozdziale mgr Duda przedstawił wynik analizy białek oddziałujących z FBP2, a następnie skupił się na wykazaniu, że FBP2 oddziałuje z białkiem CaMK2 co pokazał przy użyciu dwóch niezależnych metod. Obydwie z użytych metod (koimmunoprecypitacja i FRET) często prowadzą do artefaktów, i tym samym, wymagają wielu kontroli. Niestety, takie kontrole nie znalazły się w doktoracie. W przypadku eksperymentów FRET brakuje np. kontroli z białkiem, o którym wiadomo, że nie oddziałuje z FBP2. Dodatkowo nie wiadomo, jak liczona była odległość pomiędzy chromoforami. W ostatnim, najobszerniejszym, podrozdziale *Wyników*, Doktorant pokazał bezpośredni wpływ FBP2 na indukcję LTP. Zgodnie z przedstawionymi danymi brak FBP2 w układzie doświadczalnym (wyciszenie przy użyciu shRNA FBP2) prowadzi do braku ekspresji genów wczesnej odpowiedzi komórkowej, a tym samym do braku powstania śladu pamięciowego. Dzieje się tak, ponieważ brak FBP2 skutkuje brakiem translokacji CaMK4 do jądra komórkowego po wzbudzeniu. Doktorant, we współpracy z dr. Tomaszem Wójtowiczem, pokazał, że zarówno wyciszenie ekspresji białka FBP2, jak i jego inhibicja, prowadzą do upośledzenia LTP (braku wzrostu elektrofizjologicznych wyznaczników LTP) (Rycina 27). Następnie Doktorant dowodzi bezpośredniego wpływu FBP2 na katalizę autofosforylacji CaMK2, głównego czynnika odpowiedzialnego za indukcję LTP, oraz na CaMK2-zależną fosforylację GSK3 $\beta$ . Niestety, wyniki te nie są przekonujące. Phospho T286 CaMK2 $\alpha$  powinna pojawiać się na żelu SDS-PAGE na wysokości odpowiadającej 50 kDa, a nie 37 kDa, jak to ma miejsce na Rycinie 28. Na kolejnych Rycinach (29-31) prezentujących wyniki uzyskane w mysich hodowlach hipokampalnych Doktorant stosuje produkowane w myszy przeciwciało anti-phosphoT286-CaMK2 $\alpha$ , co może generować potencjalne artefakty. Taka konstrukcja tego eksperymentu wymaga przedyskutowania. Podobny problem pojawia się na Rycinach 32-34, gdzie mysie anti-phospho S9 GSK3 $\beta$  używane jest w mysiej hodowli. Należałoby pokazać kontrolę negatywną do reakcji immunocytochemicznych, w której nie zastosowano przeciwciała I-rzędowego.

W rozdziale *Dyskusja* (8 stron) Doktorant dobrze opisał i przedyskutował wyniki, które otrzymał, co pozwoliło mu na zaproponowanie modelu oddziaływania FBP2 z mitochondriami w stresie wapniowym. Nieliczne uwagi do tego rozdziału rozprawy dotyczą przede wszystkim braku propozycji mechanizmu w jaki sposób FBP2 reguluje aktywację CaMK4 po indukcji LTP czy podkreślenia faktu, że

---

inhibitor FBP2 nie wpływa na bazową transmisję pobudzającą co dodatkowo przemawia za brakiem metabolicznych funkcji FBP2 w neuronach.

Podsumowując, pomimo wymienionych powyżej szczegółowych uwag krytycznych, rozprawę doktorską Pana mgr. Przemysława Dudy oceniam bardzo wysoko. Praca jest doskonale napisana. Zawarte w pracy wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat mechanizmów rządzących pamięcią i uczeniem się. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy, szeroki wachlarz niezależnych technik eksperymentalnych użytych w celu weryfikacji stawianych hipotez oraz imponujący zakres przeprowadzonych badań, wnioskuję o jej wyróżnienie. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Wnoszę, więc do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr. Przemysława Dudy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jakub Włodarczyk

