



Warszawa, 11 sierpnia 2018r

**Ocena rozprawy doktorskiej**

**mgr Aliny Zawiślak**

**pt. „Neuronalne czynniki regulujące glikolizę w astrocytach”**

Mózg jest niezwykle kosztownym energetycznie organem. Wiadomo, że neurony stanowiące zaledwie 10% wszystkich komórek mózgu zużywają około 80% całkowitej ilości dostarczanych składników energetycznych. Mimo że komórki nerwowe nie mają zdolności magazynowania związków wysokoenergetycznych, to utrzymanie prawidłowego metabolizmu energetycznego jest niezbędne do regulacji aktywności mózgu i plastyczności synaptycznej towarzyszącej procesom uczenia się i zapamiętywania. Chociaż metabolizm energetyczny od wielu lat jest przedmiotem intensywnych badań, to nadal nie wyjaśniono całkowicie molekularnego podłoża tego procesu. Poznanie mechanizmu utrzymania homeostazy energetycznej mózgu jest niezwykle istotne w obliczu danych wskazujących na występowanie zaburzeń w metabolizmie energetycznym w przebiegu wielu chorób ośrodkowego układu nerwowego. Ostatnio w badaniach nad mechanizmem tego procesu szczególnie interesująca wydaje się hipoteza neuronalno-astrocytarnej regulacji krzyżowej ekspresji białek zaangażowanych w metabolizm energetyczny.

Mgr Alina Zawiślak w swojej pracy doktorskiej postawiła sobie za cel wyjaśnienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw neuronalnej regulacji glikolizy zachodzącej w astrocytach. Fakt, iż zjawisko takie zachodzi znany był wcześniej m.in. z badań prowadzonych przez zespół Katedry Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem prof. Dariusza Rakusa – promotora tej pracy. Jednak dotychczas nie były znane czynniki wydzielane przez neurony oraz czynniki stymulujące ekspresję enzymów glikolitycznych w astrocytach, jak również szlaki sygnalizacji komórkowej zaangażowane w ten proces.

Pani mgr Alina Zawiślak, w przeprowadzonych przez siebie badaniach opisanych w pracy doktorskiej, zidentyfikowała białko transtyretynę (TTR), jako jeden z (dwóch postulowanych) neuronalnych regulatorów metabolicznych, używając do tego celu spektrometrii mas. Następnie wykorzystując techniki z zakresu biochemii i obrazowania mikroskopowego, takie jak



immunofluorescencja czy fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* wykazała, że transtyrektyna indukuje ekspresję dwóch enzymów ze szlaku glikolizy tj. izoformy P fosfofruktokinazy (PFK) oraz izoformy M1/2 kinazy pirogronianowej (PK), a efekt ten poprzedzony jest obserwowanym wzrostem poziomu kodujących je mRNA. Pani mgr Alina Zawisłak pokazała, że efekt transtyrektyny jest specyficzny dla tkanki nerwowej i niezależny od znanej dotychczas roli tego białka w transporcie retinolu i tyroksyny. Udowodniła również, że zmianom poziomu ekspresji wspomnianych enzymów towarzyszy dwukrotny wzrost syntezy ATP. Następnie pani mgr Zawisłak badała szlaki sygnałowe regulujące zależną od transtyrektyny glikolizę w astrocytach. Przy użyciu specyficznych aktywatorów i inhibitorów kinaz białkowych należących do badanych przez siebie ścieżek sygnałowych wykazała, że mechanizm działania transtyrektyny wymaga udziału ścieżki sygnałowej zależnej od cAMP, kinazy białkowej A (PKA) oraz kinazy syntazy glikogenu (GSK3).

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i liczy 88 stron. Praca została przygotowana starannie, zawiera 21 kolorowych rycin, które ułatwiają interpretację wyników. Rozprawa ma typowy układ i składa się z następujących części: *Cel pracy* (1 str.), *Wstęp* (27 str.), *Materiały i metody* (14 str.), *Wyniki* (14 str.), *Dyskusja* (4 str.), *Publikacje i wystąpienia konferencyjne* (1 str.), *Literatura* (387 pozycji, 22 str.). Rozprawa poprzedzona jest streszczeniem w j. polskim i angielskim, spisem treści oraz listą skrótów.

We wstępie Doktorantka opisuje budowę i rolę astrocytów w biologii układu nerwowego, przedstawia szlaki metabolizmu glukozy, dyskutuje wpływ metabolizmu na aktywność i plastyczność synaptyczną. Wprowadza także hipotezę astrocytarno-neuronalnego czółenka mleczanowego oraz regulacji krzyżowej między neuronami i astrocytami oraz jej roli w metabolizmie energetycznym. Następnie opisuje wybrane białkowe komponenty ścieżek sygnałowych regulujących metabolizm energetyczny tkanki nerwowej. Wstęp dobrze wprowadza w tematykę pracy i zawiera odpowiednią ilość informacji. Cel pracy jest jasno sformułowany. Ryciny zamieszczone we wstępie dobrze ilustrują opisywane treści. Mimo że wstęp jest dobrze napisany pod względem zarówno językowym jak i merytorycznym, to można w nim znaleźć niezręczne sformułowania. Używane są zwroty „fosforylacja reszty **serylowej**” czy „fosforylacja reszty **tyrozylowej**”. Raczej stosuje się określenie fosforylacja reszty **serynowej** i reszty **tyrozynowej**.

Rozdział „*Materiały i metody*” rozpoczyna się od wykazu użytych odczynników i roztworów, a następnie opisane są zastosowane metody doświadczalne. Opis zastosowanych metod jest zrozumiały.

W rozdziale „*Wyniki*” Doktorantka opisała wpływ kondycjonowanego medium neuronów (CM) na ekspresję i aktywność enzymów glikolitycznych w astrocytach. Na Ryc. 4.1.3 obserwowany jest



dwukrotny wzrost zarówno ekspresji PFKP oraz PKM1/2 w astrocytach po 48 godzinach hodowli w kondycjonowanym medium. Natomiast na rycinie 4.1.4. obserwujemy wzrost aktywności enzymatycznej, ale jedynie jednego z nich, tj. kinazy pirogronianowej (PK). Stąd moje pytanie: jakie znaczenie i interpretację może mieć ten ciekawy wynik wzrostu ekspresji obu enzymów przy jednoczesnym wielokrotnym wzroście aktywności tylko jednego z nich. Jak można wytłumaczyć jedynie dwukrotny wzrost syntezy ATP przy tak znaczącym wzroście aktywności PK? Czy może być tak, że czynnik znajdujący się w CM podnosi aktywność PK, a wzrost ekspresji enzymów glikolitycznych jest jedynie efektem wtórnym w odpowiedzi na ten masywny wzrost aktywności? To z kolei przemawiałoby za hipotezą istnienia tylko jednego neuronalnego regulatora glikolizy w astrocytach. W dalszej części pracy nie znalazłem żadnego odniesienia ani dyskusji tego mocnego i ciekawego wyniku. Chciałem również zapytać czy i jak sprawdzana była czystość hodowli neuronalnych (tj. procentowy udział astrocytów), z których pobierane było medium kondycjonowane? W dalszej części rezultatów (rozdział 4.2.2) Doktorantka powołując się na Ryc. 4.2.3 pisze „Co ciekawe, frakcja CM zawierająca molekuly niskocząsteczkowe (0-10kDa) podwyższała również ekspresję aldolazy (ALDO), ale nie wpływała na ekspresję PKM1/2”. Na tej rycinie nie znalazłem jednak istotnie statystycznych różnic świadczących o wpływie frakcji zawierającej molekuly niskocząsteczkowe na podwyższenie ekspresji ALDO. Czy informacja o istotności statystycznej nie znalazła się na rycinie omyłkowo czy rzeczywiście ten efekt nie jest istotny statystycznie, a obserwowany jest jedynie trend? Dla pełniejszego wsparcia hipotezy wydzielania przez neurony dwóch regulatorów różniących się masą molową zabrakło mi na Ryc. 4.2.2 wpływu frakcji CM zawierającej cząsteczki o masie powyżej 30kDa na poziom mRNA bądź poziom ekspresji ALDO. Dodatkowo na Ryc. 4.2.2 zabrakło informacji świadczącej o istotności statystycznej dla wsparcia stwierdzenia „Frakcja CM zawierająca molekuly o masie poniżej 100kDa podwyższała ekspresję PKM1/2 i poziom ATP w komórkach, podobnie jak miało to miejsce dla pełnego CM”. Analizując wykresy i umieszczone na nich odchylenia standardowe wnioskuję, że tylko omyłkowo ta informacja nie została podana. Podobnie na rycinie 4.4.5, gdzie badano wpływ wysycenia TTR ligandami na ekspresję PKM1/2 zabrakło porównania i informacji o istotnej statystycznie różnicy między badanymi grupami. Dla porównania istotności statystycznych bardziej adekwatna w tym ostatnim przypadku wydaje się analiza ANOVA. Dalsze pytania nasuwają się po analizie tabeli 4.3.1 „Białka zidentyfikowane we frakcji 30-100 kDa mediów FM i CM”. Jakie jest pochodzenie białek w próbce FM (świeże medium neuronalne) oraz jakie znaczenie ma występowanie białek typu „odwrócone”? Szkoda, że Doktorantka nie pokazała rozdziału elektroforetycznego białek, co ułatwiłoby analizę tych danych. Zgadzam się z

Doktorantką, że zaskakujące jest występowanie białek o masie poniżej 30kDa we frakcji 30-100 kDa.

Pozostałe wyniki nie budzą moich wątpliwości, a jedynie mam kilka drobnych komentarzy.

Konsekwentnie na wykresach w rozdziale „Wyniki” Doktorantka dla oznaczenia różnic istotnie statystycznych używa oznaczenia asterysk (\*) niezależnie od poziomu istotności tych różnic. Często jest to mylące i lepiej byłoby używać przyjętego w literaturze oznaczenia (\*) dla  $p < 0.05$ , (\*\*) dla  $p < 0.01$  i (\*\*\*) dla  $p < 0.001$ . Przykładowo na Ryc. 4.5.1 gołym okiem widać, że różnice zaznaczone na panelu B i C oznaczone (\*) nie mogą mieć tej samej istotności statystycznej na poziomie  $p < 0.001$  jak napisano w legendzie. Bardzo często pojawia się również w rozdziale „Wyniki” mylne określenie o wpływie jakiegoś badanego czynnika na ekspresję białka, gdy badany był jedynie poziom mRNA kodującego to białko. Tu przykładem jest znowu rycina 4.5.1 czy 4.5.2, gdzie badany jest poziom mRNA enzymów glikolitycznych, a podpisy obu rycin informują, że są to badania poziomu ekspresji tych enzymów. Szkoda również, że Doktorantka nie zilustrowała dużej części swoich wyników zdjęciami z mikroskopii fluorescencyjnej czy zdjęciami rozdzielców elektroforetycznych, a jedynie pokazała analizę ilościową tych wyników.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka dobrze opisała wyniki otrzymane z przeprowadzonych doświadczeń, które pozwoliły na poznanie mechanizmu regulacji krzyżowej w metabolizmie energetycznym astrocytów. Nieliczne uwagi do tego rozdziału rozprawy dotyczą jedynie wspomnianego wcześniej braku dyskusji efektu CM na aktywność PK oraz użycia zbyt mocnego (moim zdaniem) stwierdzenia: „Eksperymenty z zastosowaniem filtrowanego medium potwierdziły hipotezę zakładającą istnienie dwóch typów neuronalnych regulatorów metabolicznych. Wykazano, że czynniki te różnią się masą molową: pierwszy typ (stymulujący ekspresję ALDOA) ma masę poniżej 10kDa” w sytuacji, gdy czynnik ten nie został jednak zidentyfikowany, a sam efekt filtrowanego medium na ekspresję ALDO nie jest, jak się wydaje, istotny statystycznie. Szkoda również, że w dyskusji nie omówiono ograniczeń stosowanych metod.

Podsumowując, pomimo powyższych uwag, rozprawę doktorską Pani mgr Aliny Zawiślak oceniam jako bardzo ważną i wartościową. Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań stanowią znaczący wkład w zrozumienie roli neuronalno-astrocytarnej regulacji krzyżowej w metabolizmie energetycznym mózgu.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzenia oraz aspekt poznawczy pracy, przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr Aliny Zawiślak oceniam wysoko i 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



instytut biologii doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

Dr hab. Jakub Włodarczyk, prof. nadzw.  
Kierownik Pracowni Biofizyki Komórki  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
tel. (22) 589 23 60

<http://www.nencki.gov.pl/pracownia-biofizyki-komorki>

z 2015 r. poz. 249 i 1767). Wnoszę więc do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Aliny Zawisłak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jakub Włodarczyk