



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Dr hab. Ewa Słomińska
Katedra i Zakład Biochemii
ul. Dębinki 1
80-211 Gdańsk

TEL: +48 58 349 1464
FAX: +48 58 349 1460
email: eslom@gumed.edu.pl
www.gumed.edu.pl

Gdańsk, 5 grudzień 2017

Dr hab. Dariusz Skarzyński, prof. nadzw. UW
Dziekan Wydziału Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Wrocławskiego

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Janusza Wiśniewskiego** pt. „Strukturalne podstawy niemetabolicznych funkcji mięśniowych izoenzymów fruktozo-1,6-bisfosfatazy, fosfogliceromutazy i aldolazy”

Temat przesłanej do oceny rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny ze względów poznawczych. Dotyczy bowiem poznania związku pomiędzy strukturą mięśniowych izoform: aldolazy, fosfogliceromutazy oraz fruktozo-1,6-bisfosfatazy, a ich funkcją niezwiązaną z metabolizmem. Jest to zagadnienie niezmiernie aktualne w świetle licznych doniesień o nowych funkcjach znanych białek, niezwiązanych z ich działaniem jako enzymów, co nierozzerwalnie związane jest ze szczegółowym zbadaniem struktury tych białek. Jest to szczególnie ważne w patologii chorób człowieka, gdzie coraz większe znaczenie przypisuje się zmianom konformacji białek. Prezentowane w tej rozprawie wyniki są kontynuacją i rozwinięciem badań zespołu prof. Dariusza Rakusa, promotora rozprawy.

Wyniki uzyskane w czasie realizacji rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, *Oncotarget* i *Acta Crystallogr D Struct Biol.*, których doktorant jest współautorem.

W toku prowadzonych badań doktorant wykazał, że mięśniowy izoenzym fruktozo-1,6-bisfosfatazy w stanie T jest bardziej odporny na denaturację termiczną niż w stanie R, czego nie zaobserwowano dla izoformy wątrobowej tego białka. Niezwykle interesujące są wyniki Doktoranta dotyczące form oligomerycznych mięśniowego białka fruktozo-1,6-bisfosfatazy. Pod nieobecność efektorów allosterycznych i substratów w roztworze wodnym białko to występuje zarówno w formie monomerycznej, dimerycznej, ale także tetramerycznej i oktamerycznej. Obecność efektora allosterycznego – AMP – powoduje, że izoenzym ten występuje prawie wyłącznie w formie tetramerycznej, a marginalny jest udział pozostałych form oligomerycznych. Do przejścia izoenzymu mięśniowego w obecności AMP w formę tetrameryczną niezbędną jest obecność reszty leucyny w pozycji 190. Doktorant dokonał badań pozwalających na stwierdzenie, że w jadrach komórkowych akumulowana jest forma tetrameryczna izoenzymu

mięśniowego fruktozo-1,6-bisfosfatazy. Przejście w formę dimeryczną powoduje eksport tego białka z jądra komórkowego. Z kolei forma dimeryczna mięśniowego izoenzymu fruktozo-1,6-bisfosfatazy odpowiedzialna jest za oddziaływanie z mitochondriami, a także chroni te organelle przed stresem wywołanym zwiększonym stężeniem wapnia.

Przeprowadzone przez mgr Janusz Wiśniewskiego badania wykazały, że pomimo dużego podobieństwa strukturalnego do izoformy I (PGAM1) fosfogliceromutaza 2 (PGAM2) nie posiada reszty tyrozyny ulegającej fosforylacji, co wpływa na odmienne właściwości tego białka. Wydaje się, że PGAM2 jest przede wszystkim białkiem regulatorowym pełniącym swoją rolę dzięki specyficznym oddziaływaniom białko-białko. W komórkach nowotworowych (linia KLN-205) fosfogliceromutaza tworzy stabilne kompleksy z RNA lub rybonukleoproteinami w jąderkach. Stosunkowo najmniej uwagi Doktorant poświęcił badaniom struktury aldolazy A i jej nieametabolicznej funkcji. Wykazał jedynie, że struktura drugo-, trzecio- i czwartorzędowa rekombinowanej ludzkiej aldolazy A wykazuje bardzo duże podobieństwo do modelu struktury z organizmu człowieka i królika.

Rozprawę doktorską rozpoczyna obok *Streszczenia*, *Wykazu skrótów*, *Spisu treści*, rozdział *Cele naukowe pracy*. W mojej ocenie jest to bardziej forma streszczenia niż wyznaczenie celów badawczych. Niemniej jednak po zapoznaniu się z przedłożoną rozprawą doktorską uważam, że założone cele podjętych badań zostały w pełni zrealizowane przez Doktoranta przy zastosowaniu odpowiednich i nowoczesnych metod badawczych.

Następnym rozdziałem jest *Wprowadzenie* obejmujące 27 stron. Przedstawiono w nim wyczerpujące kompendium wiedzy o najważniejszych właściwościach badanych enzymów (fruktozo-1,6-bisfosfatazy, fosfogliceromutazy i aldolazy), a także znaczeniu tych białek w kardiomiocytach i komórkach nowotworowych. W mojej ocenie ta część rozprawy doktorskiej napisana jest dobrze i wyczerpująco. Muszę jednak, ze względu na rolę recenzenta, zwrócić uwagę na parę drobnych błędów i nieścisłości, które znalazły się w tym fragmencie rozprawy doktorskiej. Doktorant na rysunku 2.4 - schemacie glikolizy - błędnie zaznaczył reakcję katalizowaną przez fruktozo-1,6-bisfosfatazę (zamienione są strzałki z fosfofruktokinazą).

Ponadto zamiast pojęcia „glikogenogeneza” w kilku miejscach rozprawy używa sformułowania „glikoneogeneza”. Muszę zwrócić też uwagę na niektóre mało precyzyjne biochemicznie określenia: - str. 21 napisano: „ W czasie stresu wywołanego intensywnym wysiłkiem lub niedokrwieniem serce zwiększa swoją zależność od innych substratów energetycznych, takich jak: glukoza, ciała ketonowe, aminokwasy...”. Tymczasem w takich warunkach ważniejszym od wymienionych substratów energetycznych dla kardiomiocytów jest mleczan.

- str. 23 - reakcja przekształcenia pirogronianu do acetylo-CoA jest katalizowana przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej, a nie przez dehydrogenazę pirogronianową, która jest tylko częścią tego kompleksu.

Biorąc pod uwagę metodykę pracy, to doktorant może pochwalić się znajomością najnowszych technik badawczych zarówno z zakresu biologii molekularnej, oczyszczania białek jak i krystalografii. Opis metodyczny jest wyczerpujący i poprawny. Doktorant jednak charakterystykę linii komórkowych – kardiomiocytów, czy nowotworowych powinien umieścić w rozdziale *Materiały i Metody*, a nie we *Wprowadzeniu*.

Wyniki badań, zarówno ryciny jak i ich opis są przedstawione poprawnie i czytelnie. Sposób przeprowadzenia doświadczeń jest poprawny i nie nasuwa uwag krytycznych.

Z analizy publikacji załączonych na końcu rozprawy doktorskiej wynika, że większość uzyskanych przez doktoranta wyników została już opublikowana i to w prestiżowych czasopismach. W ocenie recenzenta jest to duże osiągnięcie doktoranta i powinno być podkreślone i wyraźnie zaznaczone przy prezentowanych wynikach.

Równocześnie z przedstawionymi rezultatami badań przeprowadzona jest dyskusja wyników. Jest ona ciekawa i dobrze napisana. Oceniając dyskusję mogę stwierdzić, że otrzymane wyniki zostały przez doktoranta dobrze przedyskutowane i skonfrontowane z danymi z piśmiennictwa, a ich interpretacja jest wnikliwa i ostrożna. Świadczy to o dobrej znajomości poruszanej w pracy problematyki oraz dobrej znajomości piśmiennictwa w zakresie prowadzonych badań.

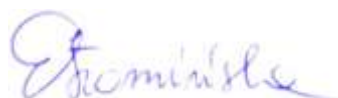
Na zakończenie zostały przedstawione najważniejsze wnioski z uzyskanych wyników. Wnioski są prawidłowo sformułowane i oprócz ostatniego w całej pełni udokumentowane wynikami przeprowadzonych doświadczeń. Na ostatni wniosek „Acetylacja reszty K12 w ALDOA może być czynnikiem aktywującym aldolazę A” w części *Wyniki* nie znalazłam potwierdzenia doświadczalnego, a w *Dyskusji* przeprowadzono dywagację teoretyczną na ten temat, co więcej zamieszczono tam informację, że „w chwili ukończenia tej pracy eksperymenty te znajdowały się w początkowej fazie realizacji”.

Niemniej jednak te drobne niedociągnięcia nie umniejszają wartości uzyskanych interesujących wyników dotyczących wpływu struktury na niemetaboliczne funkcje mięśniowych izoenzymów kluczowych etapów przemian węglowodanów - fruktozo-1,6-bisfosfatazy, fosfogliceromutazy. Kończąc jeszcze raz chciałabym podkreślić doskonały warsztat doświadczalny Doktoranta, co jest szczególnie wartościowe i unikalne na tym etapie rozwoju naukowego.

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Janusz Wiśniewski jest w pełni ukształtowanym pracownikiem naukowym, posługującym się wieloma technikami badawczymi, zdolnym do rozwiązywania skomplikowanych problemów. Jego rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej, bardzo dobrej pracy doświadczalnej spełniającej wszelkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Janusza Wiśniewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Janusza Wiśniewskiego.

Z poważaniem



Dr hab. n. med. Ewa Słomińska