

Warszawa, 27.11.2023

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Darii Hajki
pt. „Rola fruktozo 1,6-bisfosfatazy w sprzężeniu (crosstalk) astrocytarno-neuronalnym”**

Rozprawa doktorska mgr Darii Hajki pod tytułem „Rola fruktozo 1,6-bisfosfatazy w sprzężeniu (crosstalk) astrocytarno-neuronalnym” została wykonana w Katedrze Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, pod promotorską opieką dr hab. Agnieszki Gizak, prof. Uniwersytetu Wrocławskiego. Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania dotyczą wielofunkcyjnego białka, które charakteryzuje się tym, iż jego funkcja może zmieniać się w zależności od jego lokalizacji wewnątrzkomórkowej regulowanej m.in. przez stan oligomeryczny białka. To zjawisko, wciąż nie w pełni poznane w kontekście komunikacji neuronalno-astrocytarnej, jest bardzo ważnym i aktualnym tematem we współczesnej neurobiologii.

Przedmiotem recenzowanej rozprawy jest enzym fruktozo-1,6-bisfosfataza 2 (Fbp2). Podstawową funkcją tego enzymu jest regulacja syntezy glukozy i glikogenu z prekursorów niecukrowych. Co ciekawe, proces ten nie występuje w komórkach nerwowych. Ponieważ Fbp2 jest białkiem obecnym w neuronach i astrocytach, celem prezentowanej tu rozprawy doktorskiej było poznanie roli jaką Fbp2 pełni w komórkach nerwowych i glejowych w odpowiedzi na sprzężenie neuronalno-astrocytarne. W szczególności założeniem pracy było wskazanie szlaków sygnałowych i mechanizmów zaangażowanych w regulację ekspresji i lokalizacji Fbp2.

Pani mgr Daria Hajka wykazała, że neuronalne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe obniżają ilość Fbp2 w astrocytach, natomiast astrocytarne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zwiększają poziom białka Fbp2 w neuronach. Przy użyciu fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wykazała, że zmiany na poziomie białka korelowały ze spadkiem ilości mRNA dla Fbp2 w astrocytach oraz wzrostem ilości mRNA dla Fbp2 w komórkach nerwowych. Dodatkowo, Doktorantka zaobserwowała wzrost kolokalizacji Fbp2 z mitochondriami oraz spadek stosunku jądrowo-cytoplazmatycznego Fbp2 w astrocytach. Wykazała także wpływ neuronalnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na ilość wybranych enzymów glikolizy oraz wzrost poziomu mleczanu wydzielanego do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zaobserwowała wzrost poziomu wapnia wewnątrzkomórkowego oraz depolaryzację mitochondriów w wyniku działania

neuronalnych pęcherzyków. Doktorantka wyjaśniła rolę szlaków sygnałowych PI3K/Akt i cAMP/PKA w regulacji lokalizacji Fbp2 w astrocytach. Ponadto dowiodła, że stan oligomeryczny Fbp2 reguluje potencjał błonowy i rozmieszczenie mitochondriów. Wykazała, że stan oligomeryczny astrocytarnej Fbp2 wpływa na plastyczność synaptyczną, sygnalizację wapniową i oddziaływanie Fbp2 z mitochondriami. Zidentyfikowała zmiany w mRNA komórek poddanych działaniu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a także białka zawarte w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych oraz czynniki wpływające na ekspresję genów.

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim, liczy aż 189 strony (plus załączniki w formie elektronicznej), a jej układ jest typowy dla oryginalnych publikacji naukowych o charakterze doświadczalnym. Praca została bardzo dobrze napisana i jest ilustrowana 47 kolorowymi rycinami, które doskonale wprowadzają czytelnika w tematykę rozprawy, ułatwiają zrozumienie i interpretację wyników. Na końcu umieszczona jest lista publikacji, wystąpień konferencyjnych i pozostałych aktywności Doktorantki. Rozprawa poprzedzona jest streszczeniem w językach polskim i angielskim, spisem treści oraz listą skrótów. Cel pracy jest jasno sformułowany. Rozdział Wstęp liczy 30 stron i zestawia wszystkie ważne informacje potrzebne do zrozumienia rozprawy. Obejmuje on opis badanego enzymu oraz budowy i genetyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Znaczną część Wstępu stanowi doskonały opis roli komunikacji międzykomórkowej w regulacji metabolizmu komórkowego, procesów pamięciowych, sygnalizacji wapniowej i rozwoju mózgu, ze szczególnym uwzględnieniem funkcji Fbp2 w tych procesach. Zawarte w nim treści świadczą o doskonałej znajomości tematu badań oraz aktualnego piśmiennictwa. Wstęp jest dobrze napisany pod względem zarówno językowym jak i merytorycznym. Sugerowałbym jedynie używanie polskiego odpowiednika na zbyt często używane słowo „crosstalk”. Ponieważ rozprawa dotyczy komunikacji neuronalno-astrocytarnej Doktorantka mogłaby w rozprawie pokusić się o zaproponowanie adekwatnego polskiego określenia.

Rozdział Materiały i Metody jest obszerny (21 stron), co jest usprawiedliwione potrzebą wprowadzenia do szeregu stosowanych przez Doktorantkę metod doświadczalnych. Jestem pod wrażeniem różnorodności technik wykorzystywanych przez mgr. Darię Hajkę w celu weryfikacji stawianych w pracy hipotez. Spośród szerokiego wachlarza metod doświadczalnych stosowanych przez Doktorantkę warto nadmienić m.in. sekwencjonowanie nowej generacji, spektrometrię mas czy nowoczesne obrazowanie fluorescencyjne. Najważniejszym elementem rozprawy jest 77 stronicowy rozdział Wyniki i Wnioski. Składa się on z sześciu części. W pierwszej Doktorantka pokazała zmiany w mRNA, poziomie białka i komórkowej lokalizacji Fbp2 w komórkach nerwowych i astrocytach, wywołane wpływem pęcherzyków

zewnątrzkomórkowych. Zastrzeżenia moje budzi sposób prezentacji wyników analiz statystycznych, wartość parametru p – prawdopodobieństwa testowego. Precyzja, z jaką Doktorantka podaje wartość tego parametru jest nie tylko nieprawdopodobna, ale i nicosięgalna. Przykładowo wartości, gdzie znacząca cyfra znajduje się na 6 miejscu po przecinku $p = 0,024293$ czy p osięgające wartość $p < 0,000000$ powinny być zastąpione przez adekwatne do eksperymentu oszacowanie. Bardziej poprawne byłoby podanie: $p < 0,025$ czy $p < 0,001$, odpowiednio dla powyższych przykładów. Zarzut ten tyczy się prawie wszystkich wyników prezentowanych w pracy. W kolejnym podrozdziale pokazany został wpływ Fbp2 na enzymy glikolizy. Proszę Doktorantkę o doprecyzowanie co oznacza poziom intensywności fluorescencji na Rycinach 20-22 i w jakich jednostkach jest podawana. Czy mierzona mikroskopem fluorescencyjnym wartość została następnie znormalizowana? Przykładowo, dla 8-bitowych obrazów wartość ta powinna być w zakresie 0-256. Czy wartość mierzonej intensywności fluorescencji w obszarze zainteresowania została skorygowana o tło? Następny rozdział poświęcony jest nieenzymatycznym funkcjom Fbp2. Chciałem zapytać panią mgr Hajkę czym podyktowany był wybór współczynnika korelacji Mandersa do analizy kolokalizacji Fbp2 z mitochondriami. Czy nie lepszym wyborem byłby współczynnik Pearsona, niezależny od poziomu sygnału i tła? Kolejne podrozdziały Wyników i Wniosków dotyczące identyfikacji ścieżek sygnałowych oraz mRNA komórek pod wpływem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych nie budzą moich zastrzeżeń. Ostatni podrozdział dotyczący analizy proteomicznej zawartości pęcherzyków nasuwa pytanie o powtarzalność uzyskanych wyników.

W rozdziale Dyskusja (8 stron) Doktorantka dobrze opisała i przedyskutowała otrzymane wyniki. Pozwoliło to na zaproponowanie mechanizmów molekularnych prowadzących do zmian w ilości i lokalizacji Fbp2 oraz ich roli w ośrodkowym układzie nerwowym. Doskonałym podsumowaniem Dyskusji jest schemat ilustrujący poznane przez Doktorantkę mechanizmy przedstawiony na Rycinie 46.

Podsumowując, pomimo wymienionych powyżej uwag, które w dużej mierze są natury technicznej, rozprawę doktorską Pani mgr. Darii Hajki oceniam niezwykle wysoko. Praca jest doskonale napisana. Co moim zdaniem ważne, badania prezentowane w rozprawie oparte są na dobrze ugruntowanych hipotezach, które Doktorantka wprowadza w prawie każdym rozdziale Wyników i Wniosków uzasadniając prowadzenie badań w proponowanym przez siebie kierunku. Zawarte w pracy wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat funkcji Fbp2 w komunikacji neuronalno-astrocytarnej. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy, szeroki wachlarz technik eksperymentalnych użytych w celu weryfikacji stawianych hipotez oraz imponujący zakres przeprowadzonych badań, wnioskuję o jej wyróżnienie. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.

Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zmianami). Wnoszę więc do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Darii Hajki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jakub Włodarczyk

