



**nencki institute**  
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES  
**NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY**

EU Centre of Excellence in Neurobiology, *BRAINS*

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland

Phone: (48-22) 659 85 71; Fax: (48-22) 822 53 42

E-mail: sekretariat@nencki.gov.pl; <http://www.nencki.gov.pl>

**prof. dr hab. Mariusz R. Więckowski**  
Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych  
Zakład Biochemii  
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN  
im. M. Nenckiego w Warszawie

Warszawa, 25 października 2016 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr **Agnieszki Koziel**

**p.t.: "Aerobic metabolism of human endothelial cell under physiological and pathological conditions"**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesławy Jarmuszkiewicz

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pani mgr Agnieszki Koziel dotyczy niezwykle interesującego zagadnienia, a mianowicie wpływu warunków zewnątrzkomórkowych na bioenergetykę mitochondriów komórek śródbłonna. Mitochondria biorą udział w niezwykle ważnych dla komórki procesach, dlatego też jakiegokolwiek zaburzenie ich funkcjonowania może prowadzić do wielu stanów patologicznych, a nawet do śmierci komórki. Kontakt komórek śródbłonna wyściełających naczynia krwionośne z krwią sprawia, że ich mitochondria mogą pełnić rolę czujnika zmian zachodzących we krwi. W swojej rozprawie doktorskiej pani mgr Agnieszka Koziel podjęła się zbadania wpływu wysokiego stężenia glukozy oraz warunków hipoksji na bioenergetykę mitochondriów komórek śródbłonna EA.hy926, a w szczególności na działanie poszczególnych kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Dużą uwagę poświęciła także produkcji reaktywnych form tlenu i roli białka UCP2 w ochronie komórek śródbłonna przed stresem oksydacyjnym wywołanym stresem.

## Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca jest napisana w języku angielskim, liczy 149 stron, zawiera 33 rysunki i 4 tabele. Układ pracy jest typowy i zawiera: 3 stronicowe streszczenie, spis treści, 41 stronicowy wstęp (zawierający 10 rycin), zwięźle ujęte cele pracy, materiały i metody (zawierające 2 ryciny i 1 tabelę). Połączony z dyskusją opis wyników (liczący 57 stron) zawierający 18 rycin i 3 tabele prezentuje uzyskane przez Doktorantkę rezultaty. Rozprawę podsumowuje 4 stronicowa ogólna dyskusja, zawierająca 3 ryciny. Rozprawa doktorska zawiera także 4 stronicowe streszczenie w języku polskim, oraz rozbudowane piśmiennictwo.

## Ocena poszczególnych rozdziałów pracy

We **Wstępie** Doktorantka w przystępny sposób przedstawiła ogólną charakterystykę i funkcję mitochondriów. Sporo miejsca poświęciła także takim zagadnieniom jak produkcja reaktywnych form tlenu, białkom rozprzegającym UCP, ogólnej charakterystyce mitochondriów śródbłonna, oraz wpływie hipoksji na metabolizm mitochondriów. Uważam, że Doktorantkę powinien charakteryzować staranniejszy i bardziej przemyślany dobór źródeł literaturowych wykorzystanych do napisania wstępu. Do tej części pracy mam także kilka innych uwag.

Na stronie 14 (*pkt. 1.2.1 Struktura Mitochondriów*) Doktorantka pisze, że mitochondria zawierają **co najmniej** sześć przedziałów. Czy doktorantka może je wymienić? Jeżeli może być więcej niż 6 to czy Doktorantka może je także wymienić?

Na stronie 15 Doktorantka pisze, że zewnętrzna błona mitochondrialna jest całkowicie przepuszczalna dla substratów, jonów oraz ATP i ADP. Nie mogę zgodzić się do końca z tym stwierdzeniem. Np. białka z rodziny Bcl-2 mogą kontrolować przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej, m.in. przez regulację otwierania lub zamykania kanału VDAC.

Nie mogę się też zgodzić ze stwierdzeniem (z tej samej strony), że „uszkodzenie zewnętrznej błony mitochondrialnej umożliwia wydostanie się białek z przestrzeni międzymbłonowej do cytozolu wywołując określony rodzaj śmierci komórek”. Proces

apoptozy jest bowiem ściśle regulowany a mechanizm „uwalniania” białek proapoptotycznych nie polega przecież na uszkodzeniu błony.

Na stronie 16 (*pkt. 1.2.3 Funkcja Mitochondriów*) Doktorantka wymienia poszczególne funkcje mitochondriów i procesy w których biorą udział. Doktorantka wymienia takie funkcje jak dostarczanie produktów pośrednich do cyklu mocznikowego i syntezy kwasów tłuszczowych oraz hemu. Należało by zaznaczyć, że dostarczanie produktów pośrednich do cyklu mocznikowego dotyczy praktycznie głównie hepatocytów i enterocytów.

Na stronie 18 zdanie opisujące budowę kompleksu I: *„The genes that encode the individual proteins are contained in both the cell nucleus and the mitochondrial genome, as is the case for many enzymes present in the mitochondria.”* jest niepoprawne.

Na stronie 17 Doktorantka pisze, że *„cytochrom c jest białkiem nie związanym z błoną mitochondrialną”*. Zadziwiające jest zatem przedstawienie na Rycinie 1.3, przez Doktorantkę, cytochromu c jako białka znajdującego się wewnątrz wewnętrznej błony mitochondrialnej. Takie samo umiejscowienie cytochromu c przedstawia Rycina 1.4 oraz 1.8 . Gwoli ścisłości, cytochrom c jest białkiem, które ze względu na swój „ładunek” ma zdolność wiązania się z zewnętrzną stroną wewnętrznej błony mitochondrialnej poprzez oddziaływanie z kardiolipiną.

**Cele pracy** Doktorantka przedstawiła jasno i czytelnie.

Rozdziały **Materiały** oraz **Metody** Doktorantka opracowała starannie. Do tej części rozprawy mam kilka pytań:

- W jakim celu w buforze hipertonicznym (rozdział 3.5) obecny jest 100mM  $Ca^{2+}$ ?
- Na stronie 59 Doktorantka pisze, że stan IV był mierzony w obecności karboksyatraktyloydu (CAT) i oligomycyny. Co ważne, kiedy bursztynian był wykorzystywany jako substrat, Doktorantka dodawała także ATP w celu aktywacji dehydrogenazy bursztynianowej (SDH). Mam więc pytanie: jak w przypadku obecności CAT (inhibitora translokazy nukleotydów adeninowych), ATP może dostać się do macierzy mitochondrialnej, aby aktywować SDH podczas pomiaru stanu IV?

- Mam także pytanie dotyczące pomiaru poziomu anionorodnika ponadtlenkowego z wykorzystaniem NBT. Czy uzasadnione jest stwierdzenie, że po zahamowaniu oksydazy NADPH pozostały poziom anionorodnika ponadtlenkowego jest pochodzenia mitochondrialnego? Nie zastosowano przecież inhibitora oksydazy ksantynowej (oxypurinol).

- Czy na pewno w przypadku oznaczania poziomu podjednostek kompleksów łańcucha oddechowego próbki podgrzewano? (tak jak opisano w sekcji "Materiały i metody")? W niektórych przypadkach producent przeciwnie nie poleca grzania próbek powyżej 50°C, bowiem niektóre z prążków mogą nie być wystarczająco widoczne. Może to być powodem gorszej jakości sygnału widocznego na Rycinie 4.28 w górnym panelu.

**Wyniki.** Zapoznawszy się z tą częścią rozprawy doktorskiej nie mam wątpliwości, że cele pracy zostały w pełni osiągnięte. Doktorantka dokładnie i w sposób usystematyzowany na początku scharakteryzowała wpływ długotrwałego wysokiego (25mM) stężenia glukozy na bioenergetykę mitochondriów komórek śródbłonna. Następnie doktorantka zbadała udział białka UCP2 w obniżaniu stresu oksydacyjnego w komórkach hodowanych w pożywce z wysokim stężeniem glukozy. Badania te przeprowadzono zarówno na izolowanych mitochondriach komórek śródbłonna jak i z wykorzystaniem całych nienaruszonych komórek śródbłonna. Następna część wyników poświęcona jest badaniom wpływu niskiego stężenia tlenu w hodowli na bioenergetykę mitochondriów, a w szczególności na poziom i aktywność poszczególnych kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Ostatnia część wyników przedstawia dowody na obecność w wewnętrznej błonie mitochondriów komórek śródbłonna podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego jonami wapnia.

Do tej części rozprawy doktorskiej mam następujące uwagi:

- mam wrażenie, że podpisy pod Ryciną 4.3 są trochę mylące. Jeżeli szary słupek oznacza komórki hodowane w obecności 5.5mM glukozy, a czarny 25mM, to co oznacza w takim razie podpis na osi rzędnych nG i hG. Domyślam się, że pomiar oddychania dokonywany był w obecności niskiego i wysokiego stężenia glukozy. Jeżeli tak, to oczywiście wydaje się, że dodanie 25mM glukozy spowoduje obniżenie oddychania (efekt Crabtree), nie

rozumiem natomiast dlaczego taki sam efekt obserwuje się w przypadku komórek rosnących w obecności wysokiego stężenia glukozy?

- czy wyniki przedstawione na Rycinie 4.6 (prawy panel) pochodzą z wartości wyliczonych dla 40 czy 80  $\mu\text{g}$  białka?

- Rycina 4.7 – czy uzasadnione jest stwierdzenie, że redukcja NBT po dodaniu inhibitora oksydazy NADPH jest pochodzenia mitochondrialnego (jak pisze Doktorantka, pozostała część to RFT powstałe w łańcuchu oddechowym)? Jeszcze raz powtórzę, że nie zastosowano inhibitora oksydazy ksantynowej (oxypurinol). Dodatkowo, NBT może być redukowany przez dehydrogenazy obecne w komórce, dlatego np. bardzo ciężko z pomocą tego związku zmierzyć aktywność kompleksu I łańcucha oddechowego, gdyż sygnał pochodzący od innych dehydrogenaz jest bardzo wysoki.

- Rycina 4.9 – Czy Doktorantka może wytłumaczyć, dlaczego oddychanie mierzone w obecności jabłczanu i glutaminianu jest wolniejsze od tego, mierzonego w obecności samego jabłczanu? Dlaczego szybkość oddychania w obecności bursztynianu jest wolniejsza, niż w przypadku samego jabłczanu? Spodziewałbym się, że będzie odwrotnie.

- Rycina 4.11 – dlaczego normalizację wyników przeprowadzono do podjednostki kompleksu IV, a nie “markera mitochondrialnego” jak w przypadku danych przedstawionych np. na Rycinie 4.12 ?

- jak Doktorantka wyjaśni różnice w szybkości oddychania z bursztynianem przedstawionej na Rycinie 4.9 (około 55  $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mg}$  białka), a Rycinami 4.13 i 4.18 (około 20-25  $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mg}$  białka)?

- Paragraf 4.2.2. (opis Ryciny 4.17 B) – nigdzie nie znalazłem informacji, jakie stężenia cyjanku były wykorzystywane do miareczkowania.

- w legendzie Ryciny 4.18 brakuje informacji z jakim substratem oddechowym były dokonywane pomiary. Z opisu na stronie 89 wynika, że jest to bursztynian, jednakże taka informacja powinna się znaleźć w legendzie do ryciny, bardzo ułatwia to analizę wyników.

- Dane przedstawione na Rycinie 4.21 wskazują na to, że bardziej miarodajne jest wykorzystanie sondy MitoSox, niż NBT do określenia mitochondrialnej produkcji/poziomu anionorodnika ponadtlenkowego (oczywiście nadal pamiętając o ograniczeniach sondy MitoSox).

- Rozdział 4.2.6 – Doktorantka w części poświęconej dyskusji dokładnie analizuje powiązania pomiędzy zwiększoną aktywnością UCP2, a obserwowanymi zmianami w parametrach opisujących funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha oddechowego w komórkach rosnących w pożywce z wysokim stężeniem glukozy. Brakuje mi to rozważań/dyskusji, czy obserwowana zwiększona aktywność UCP2 i jej wpływ np. na szybkość oddychania, „proton leak”, czy też poziom reaktywnych form tlenu nie jest po prostu efektem zwiększonego poziomu tego białka. Doktorantka przecież wykazała, że hodowla komórek w obecności 25mM glukozy powoduje zwiększenie poziomu białka UCP2. Uważam, że Doktorantka powinna, w tej części dyskusji, zamiast często powtarzanego zwrotu, że jakiś parametr uległ zmianie „w związku z wyższą aktywnością UCP2”, bądź, że „większa aktywność UCP2 sprawia, że...” uszczegóławiać, czy chodzi wyłącznie o zwiększoną aktywność UCP2, czy też o wzrost aktywności, będący efektem wyłącznie większego poziomu tego białka.
- Strona 100 – w zdaniu „However, high-glucose cells were significantly more resistant to peroxide independent of UCP2 expression” powinno być chyba “hydrogen peroxide” a nie “peroxide”, testowany był przecież nadtlenek wodoru.
- Konkluzja ze strony 100. Z wcześniejszych doświadczeń wynika, że hodowanie komórek z wysokim stężeniem glukozy oprócz wzrostu poziomu UCP2 powoduje także wzrost dysmutazy ponadtlenkowej (SOD2) zlokalizowanej w macierzy mitochondrialnej, co może wskazywać na obecność stresu oksydacyjnego. Zatem, czy Doktorantka oznaczyła poziom enzymów antyoksydacyjnych (SOD2, a także innych) w komórkach z wyciszonym genem UCP2? Według mnie, dopiero poznanie poziomu enzymów antyoksydacyjnych w badanych układach doświadczalnych, upoważnia do rozważań o roli UCP2 w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym.
- Figura 4.23. Dlaczego do normalizacji poziomu badanych białek wykorzystano jako marker równego nałożenia próbki na żel SDS białko GAPDH. Przecież w dostępnej literaturze są dane opisujące wpływ hipoksji na poziom tego białka. W związku z tym może to częściowo wypaczać otrzymane wyniki.
- Czym spowodowana jest różnica w szybkości oddychania mitochondriów w obecności bursztynianu i rotenonu w warunkach normoksji przedstawiona na Rycinie 4.27 (około 50 nmol O<sub>2</sub>/min/mg białka), a wynikami przedstawionymi na Rycinie 4.8 (drugi wykres), gdzie także mierzono oddychanie z bursztynianem i rotenonem, a szybkość oddychania wynosiła około 24 nmol O<sub>2</sub>/min/mg białka?

- Ryciny 4.26, 4.27, Tabela 4.1, Ryciny 4.28, 4.29, 4.30 – brakuje mi w legendzie pod rycinami informacji z jakim stężeniem glukozy hodowane były komórki rosnące w warunkach normoksji i chronicznej hipoksji.

- W jakim celu panel drugi Ryciny 4.28 (poziom poszczególnych podjednostek łańcucha oddechowego) przedstawia wyniki normalizowane na poziom podjednostki II COX? Powyżej na tej samej Rycinie poziom białek normalizowano na marker mitochondrialny. Niefortunnie dobrano także czas naświetlania kliszy dla podjednostki II COX dla górnego panelu przedstawiającego przykładowy wynik Western Blot. Bardzo się różni od tego umieszczonego poniżej.

**Dyskusja** oraz **Streszczenie** polskojęzyczne napisane są z dużą znajomością przedmiotu, przez co czyta się je z przyjemnością i zainteresowaniem. Do tej części mam jedną uwagę. Doktorantka podsumowuje w streszczeniu *„Ekspozycja komórek śródbłonna na niedotlenienie prowadzi do znaczącej re-aranżacji mitochondrialnego łańcucha oddechowego z przeciwstawną regulacją dwóch najważniejszych dehydrogenaz (zwiększona aktywność kompleksu II, zmniejszona aktywność kompleksu I)”* Moim zdaniem powinno się zaznaczyć/podkreślić, że wynika to z odpowiednio zwiększonego i zmniejszonego poziomu zmierzonych podjednostek i prawdopodobnie całych kompleksów łańcucha oddechowego. Dalej Doktorantka pisze: *„Zwiększonej aktywności kompleksu II towarzyszy zwiększona produkcja mROS, głównie poprzez odwrócony transport elektronów.”* Czy Doktorantka może mi wyjaśnić, jak można obserwować zwiększoną produkcję RFT (dzięki bardziej aktywnemu odwrotnemu transportowi elektronów), w przypadku gdy poziom kompleksu I jest przecież obniżony.

- Dodatkowo, Doktorantka w streszczeniu napisanym w języku polskim, powinna stosować dla reaktywnych form tlenu skrót RFT a nie ROS. Skrót dla białek rozprzęgających powinien być (UCP), a nie (UCPs).

- Trochę niefortunne wydaje się stwierdzenie (strona 131, akapit pierwszy), że *„białka rozprzęgające (UCPs) katalizują przeciek protonów”* powinno być umożliwiającą.

**Podsumowując**, po zapoznaniu się z całą rozprawą, nie mam wątpliwości, że ma ona nowatorski charakter. Przedstawione przeze mnie powyżej komentarze i uwagi dotyczące rozprawy mgr Agnieszki Kozieł w większości mają charakter drugorzędny i w

żadnym stopniu nie obniżają jej jakości a jedynie prowokują do dalszej dyskusji. Uważam, że wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań zostały przez Autorkę właściwie uzasadnione. Należy dodatkowo podkreślić, że zaprezentowane w niniejszej rozprawie wyniki mgr. Agnieszki Kozieł były podstawą powstania czterech publikacji (mgr Kozieł w trzech jest pierwszym autorem, a w jednej drugim). Oprócz tego mgr Agnieszka Kozieł jest współautorem sześciu innych publikacji, co świadczy o jej ogromnym zaangażowaniu w prowadzone w pracowni Prof. Jarmuszkiewicz badania. Dlatego też, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pani mgr Agnieszki Kozieł w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Kozieł do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Agnieszki Kozieł.



Mariusz R. Więckowski