

Dr hab. Dorota Dymkowska
Pracownia Metabolizmu Komórki
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Warszawa, dn. 20.09.2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Pawła Pabisza „Zależny od białek transportu cholesterolu StAR mitochondrialny import wodoronadtlenków cholesterolu w komórkach Leydyga i jego biologiczne konsekwencje”.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Pawła Pabisza została wykonana w Zakładzie Biofizyki Wydziału Chemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Witolda Korytowskiego. Tematyka pracy dotyczy biologicznych konsekwencji importu wodorotlenków cholesterolu do mitochondriów. Cholesterol jest kluczowym lipidem w strukturze błon biologicznych, między innymi stanowi istotny składnik tratw lipidowych, których istotna rola w endocytozie i transmisji sygnałów komórkowych została udokumentowana. Poza funkcją strukturalną, cholesterol jest prekursorem hormonów steroidowych wytwarzanych przez gonady i korę nadnerczy. Koniecznym etapem steroidogenezy jest transport zakumulowanych w wewnątrzkomórkowych kroplach lipidowych estrów cholesterolu do mitochondriów, głównie z udziałem białka StAR. W warunkach zwiększonego stresu oksydacyjnego powstają produkty peroksydacji cholesterolu, w tym wodoronadtlenki cholesterolu, które również mogą być transportowane do mitochondriów za pośrednictwem białek z rodziny StAR. Nagromadzanie oksysteroli może prowadzić do dysfunkcji tkanek steroidogennych, w tym komórek Leydyga, które są przedmiotem zainteresowań mgr. Pabisza. Doktorant skupił się na roli białka StAR i konsekwencji nagromadzania w mitochondriach wodoronadtlenków cholesterolu. Wiadomo, że mutacje w tym białku prowadzą do poważnego upośledzenia steroidogenezy i funkcji gonad.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma klasyczny układ, typowy dla prac doświadczalnych. Stanowi opracowanie przygotowane w języku polskim liczące 90 stron, 23 ryciny i 7 tabel. Tytuł pracy odpowiada przedstawionym wynikom badań, a streszczenia zamieszczone na początku wprowadzają w zagadnienia zawarte w pracy i opisują najbardziej istotne osiągnięcia, przy czym dwie wersje językowe nie są do końca tożsame (wersja polskojęzyczna jest bardziej szczegółowa).

Zasadnicza część pracy została podzielona i zawiera Wstęp teoretyczny (23 strony), Cele pracy (1 strona), Materiały (1 strona), Metody (14 stron), Wyniki (20 stron) i Dyskusję (8 stron). Pracę kończy Bibliografia licząca 195 pozycji literaturowych, z których większość (około 80%) jest starsza niż 10 lat. Następnie zamieszczono Wykaz Publikacji własnych opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej, w których mgr Pabisz jest współautorem w siedmiu, a w jednej pierwszym autorem. W tej ostatniej pracy opublikowano część wyników zawartych w rozprawie (BBRC; 2022). Wstęp teoretyczny jest poprzedzony obszernym, jednak nie w pełni kompletnym, wykazem skrótów (3 strony). Zabrakło rozwinięcia dla takich skrótów, jak: białka StAR i START, natomiast skrót LH ma dwa różne rozwinięcia.

W części teoretycznej, poprzedzonej krótkim wstępem dotyczącym udziału białek z domeną START w transporcie nie tylko cholesterolu, ale również jego wodoronadtlenków, Doktorant opisuje zagadnienia związane z transportem i metabolizmem cholesterolu w organizmie, co doskonale ilustruje rycina I (str. 15), oraz znaczeniem tych procesów dla prawidłowej steroidogenezy. Na schemacie steroidogenezy w komórkach H295R (Rycina II, str. 18) zabrakło informacji na temat kompleksu enzymów (CYP17), które przekształcają Progesteron w 17- α -OH-progesteron oraz dalej, 17- α -OH-progesteron w Androstendion. W treści podrozdziału 2.1.2 nie

znalazłam również odniesienia do tego schematu. Zabrakło mi tutaj krótkiego opisu wspomnianych kluczowych funkcji i szlaków, w których odgrywa rolę cholesterol, innych niż steroidogeneza.

W kolejnym podrozdziale części teoretycznej Autor wprowadza czytelnika w tematykę związaną z białkami z domeną START oraz ich rolą w regulacji syntezy hormonów steroidowych. Ta część jest napisana mało precyzyjnie. Autor nie wymienia białek, które mogą mieć kluczowe znaczenie w steroidogenezie, czy też tych, które są zaangażowane w biosyntezę steroidów. W tym miejscu chcę również zapytać, na czym polega „rozszczepianie” białka StAR po wejściu do mitochondriów? Proszę również o doprecyzowanie, czym jest „kompleks importowy powierzchni mitochondriów”, który ma być powiązany z transportem cholesterolu. Następnie, Autor opisuje procesy związane z peroksydacją lipidów i powstawaniem wodoronadtlenków cholesterolu, prezentując dosyć szczegółowo reakcje łańcuchowe, jakie temu towarzyszą, oraz ilustrując enzymatyczne i nieenzymatyczne ścieżki powstawania utlenionych form cholesterolu (Rycina IV ze str. 25). W podrozdziale 2.2.1 Autor nawiązuje do pro-oksydacyjnych właściwości ceruloplazminy, powołując się na prace z lat 90-tych. Nasuwa się pytanie, na ile te informacje mają znaczenie w obecnie prowadzonych badaniach? Przedostatni rozdział części teoretycznej poświęcony został redukcji 7-OOH z uwzględnieniem roli selenoprotein, w tym GPx4, w cytoprotekcji. W tabeli I autor zestawiał informacje o GPx4, które w mojej opinii nie są czytelne. Dodatkowo w wierszu „Lokalizacja komórkowa” znalazło się osocze, co jest prawdopodobnie przeoczeniem. Z kolei w części poświęconej „znaczeniu biologicznemu” wymieniono choroby SSMD, czy nowotwory CCC i TNBC, przy czym żaden ze skrótów nie został rozwinięty. Zakończenie tej części pracy dostarcza kilku informacji na temat translokacji wodoronadtlenków cholesterolu do przestrzeni wewnątrzkomórkowych i potencjalnej roli mało specyficznego transportera steroli (SCP-2), w porównaniu do specyficznych białek z rodziny StAR.

W kolejnej części Doktorant przedstawił cele pracy. Składają się na nie dwa główne zadania obejmujące wykazanie następstw nagromadzenia 7-OOH w mitochondriach, ich efektów cytotoksycznych i zaburzenia syntezy hormonów steroidowych oraz roli GPx4 w detoksykacji tego wodoronadtlenku. Należy podkreślić, że zadania szczegółowe byłyby zdecydowanie bardziej zrozumiałe i zasadne (na przykład zastosowanie PCOOH), gdyby w części teoretycznej znalazłyby się precyzyjne informacje, które znajdujemy dopiero we wprowadzeniu do dyskusji.

Dobrym pomysłem było zestawienie wykorzystywanych materiałów w tabeli (tabela II, strona 34). Niestety zabrakło bardziej szczegółowych objaśnień skrótów, które dla czytelnika nieprowadzącego tego rodzaju doświadczeń mogą być niejasne (Opti-MEM, DPBS, EGF itd.). Jednocześnie, niektóre skróty są błędne (np. TIS to według informacji na stronie Merck ITS – czyli z ang. Insulin-Transferin-Selenium).

Rozdział Metody jest w mojej ocenie najsłabszym ogniwem tej rozprawy. Procedury, które miały pomóc w osiągnięciu założonych celów badawczych są opisane mało precyzyjnie, często niespójnie, a ich strona edytorska budzi wiele zastrzeżeń. Szczegółowo opisana synteza i oznaczanie stężenia wodoronadtlenków nie zawiera istotnych informacji na temat stężeń poszczególnych składników (np., jakie było stężenie cholesterolu użyte do syntezy 7-OOH (str. 35) oraz czy dodawany róż bengalski był rzeczywiście w stężeniu 100 μ M). W opisie prowadzenia hodowli komórkowych również brak precyzyjnego objaśnienia sposobu postępowania i ostatecznego składu pożywki hodowlanej (np. nie wiadomo czy w środowisku obecne były antybiotyki), opisu procedury pasażu, jego częstotliwości oraz czasu utrzymywania komórek w hodowli. W tym miejscu proszę o uściślenie, czym jest STI dodawane do pożywki M-199 przy izolacji pierwotnych komórek Leydyga. Czym różni się DME/F12 od DMEM/F12, gdyż obydwa skróty konsekwentnie pojawiają się w pracy. W przypadku podrozdziału 5.3.3.1 Zabrakło zakończenia zdania. Bardzo ogólny opis procedury optymalizacji transfekcji nie pozawala na ocenę przebiegu doświadczenia. Proszę wobec tego o wyjaśnienie, w jaki sposób znormalizowano



„wizualną ocenę kondycji hodowli” po transfekcji. Nie rozumiem również zdania, cytuję „w drugim etapie optymalizacji transfekcji poddano hodowle na szalkach fi 35mm, w wybranym zakresie warunków”, o jakich warunkach mowa? Poza tym, proszę o doprecyzowanie składu medium transfekcyjnego i medium LC. W opisie protokołów doświadczalnych zabrakło szczegółów dotyczących traktowania komórek (czas podawania i stężenia wodoronadtlenków).

W rozdziale 5.6 zestawiono w tabeli IV bufony wykorzystywane do rozdzielania białek w żelu poliakrylamidowym oraz do transferu na membranę PVDF. Zabrakło informacji o stężeniach składników buforów (Laemmli – czyli roztwór obciążający, TGS – bufor TRIS-Glicyna, itd.). Nie wyjaśniono również powodu, dla którego stosowano różne stężenia metanolu w buforze do transferu. Autor nie ustrzegł się niezręcznych sformułowań typu „analiza białka całkowitego” w odniesieniu do pomiaru stężenia białka w lizatach czy „próbki załadowano na żel”, co prawdopodobnie jest niefortunną kalką z języka angielskiego (gel loading), itp. Ponadto Autor stosuje termin ekspresja dla poziomu białka, w przypadku analizy Western blot. Rzeczywiście nomenklatura angielskojęzyczna pozwala na użycie „gene and protein expression”. W języku polskim ekspresji ulegają wyłącznie geny, a w przypadku białka mówimy o poziomie bądź ilości.

W rozdziale 5.7.1 nie sprecyzowano typu homogenizatora wykorzystywanego do izolacji mitochondriów (czy szklany oznacza typ szkło-szkło?). W opisie analizy mikroskopowej zabrakło informacji o stężeniu barwników fluorescencyjnych stosowanych do znakowania mitochondriów. Podrozdziały od 5.9 do 5.11 stanowią dosyć długie opisy przedstawiające zasady i założenia dla poszczególnych metod, które niestety nie stanowią faktycznych protokołów doświadczalnych pozwalających czytelnikowi na powtórzenie procedury.

Szczegółowe zadania badawcze zostały opisane w rozdziale 6. Wyniki. Rozdział ten został podzielony na 3 zasadnicze części, ze względu na rodzaj badanych komórek: linia MA-10 (podrozdziały 6.1-6.6); linia TM3 (podrozdziały 6.7 – 6.9) i pierwotne komórki Leydyga (6.10-6.13). Uzyskane wyniki zaprezentowano w postaci tabel, wykresów, zdjęć mikroskopowych oraz reprezentatywnych wyników analizy Western Blot. Podsumowanie Autor zestawił w tabeli 2.

Pierwsza część wyników opisuje badania prowadzone z wykorzystaniem komórek linii MA-10. Te wyniki niemal w całości zostały opublikowane w Biochemical and Biophysical Research Communications, gdzie Doktorant jest pierwszym autorem. W rozprawie zamieszczono ryciny z tej publikacji, jednak brak legendy zdecydowanie utrudnia śledzenie tych wykresów (Ryciny 1, 2 i 4-7). Ponadto na zdjęciach mikroskopowych (Rycina 3 oraz Rycina 15) nie zamieszczono skali, o której Autor pisze w legendzie obu figur, mimo że w publikacji skala została zaznaczona. Ze względu na niezgodności w podpisach do figur z treścią rozdziałów, proszę o uściślenie, w jakim zakresie stężeń podawano wodoronadtlenki lipidów (mili – czy mikromolowe). W podpisach pod rycinami i do tabel Autor zamieścił szczegółowe opisy przeprowadzenia doświadczeń, które powinny raczej zostać zamieszczone w rozdziale Metody. W tabeli 1 kolumny opisane zostały NS i S, niestety nie ma informacji, czego one dotyczą, a wyjaśnienie znajdujemy dopiero czytając część rozdziału poświęconą analizie komórek pierwotnych. Na stronie 52 czytamy, że Mitotracker Deep Red jest markerem mitochondriów, podczas gdy ta sonda fluorescencyjna preferencyjnie wchodzi do mitochondriów w sposób zależny od potencjału mitochondrialnego. Czy wiadomo, że warunki eksperymentu nie wpływają na $\Delta\Psi_m$? Jak wyglądały mitochondria komórek nietraktowanych 7-OOH, gdyż w pracy pokazano tylko zdjęcia komórek po ekspozycji na ten wodoronadtlenek? W przypadku zastosowania inhibitora GPx4, Autor napisał, że utrzymywano jego stężenie przez cały czas? Czy jest sposób monitorowania stężenia tej substancji, czy inhibitor dodany był tylko raz czy też uzupełniany w trakcie inkubacji? Nie rozumiem również opisu do ryciny 6 – co znaczy stwierdzenie „całkowity lipid SUV wynosił 0,5 mM”?

W rozdziale 6.11 Autor pisze o niewielkim, 35% wzroście poziomu białka GPx4. Należy jednak pamiętać, że taka zmiana może mieć istotne znaczenie dla funkcjonowania komórki. W kolejnym rozdziale nieco niefortunnie opisano zmiany syntezy testosteronu (czytamy o „spadku 40%, który się zwiększał do 70 %”).

Po lekturze rozdziału wyniki nasunęły mi się jeszcze następujące pytania:

1. Dlaczego do różnego typu analiz wykorzystywano komórki w różnej gęstości stosując różny czas traktowania wodoronadtlenkami? Czy w tej sytuacji można korelować ze sobą takie wyniki? Na ile miarodajne są wnioski wyciągnięte z testu cytotoksyczności, kiedy stosowano jeden czas traktowania? Jest to szczególnie istotne w przypadku badania odpowiedzi mitochondriów, które ze względu na swą dynamikę i ogromną plastyczność mogą kompensować uszkodzenia, a aktywacja procesów związanych z kontrolą jakości może niwelować uszkodzenia powstałe na skutek traktowania badanymi substancjami.
2. Czy SDH jest dobrym białkiem referencyjnym, czy warunki eksperymentu (traktowanie komórek) nie wpływa na poziom tego białka? Zwłaszcza, że w dalszych badaniach stosowano beta-aktynę jako białko referencyjne.
3. Z czego wynika różnica zastosowanych stężeń 7-OOH przy traktowaniu komórek MA-10 w porównaniu z komórkami pierwotnymi? Czy linia komórek MA-10, która jest linią pochodzenia nowotworowego, ma większą tolerancję na czynniki szkodliwe?
4. Proszę o przedstawienie analizy statystycznej wyników przedstawionych na wykresach słupkowych. W opisie analizy statystycznej w rozdziale Metody była informacja o wykorzystaniu testu t-Studenta, ale nie umieszczono takich wyników na wykresach. Czy test t-studenta jest odpowiednim testem statystycznym do analizy wyników z tego rodzaju badań?

Ostatni rozdział stanowi zwięzła dyskusja uzyskanych wyników, które Doktorant skonfrontował z dostępną literaturą oraz zilustrował czytelnym schematem (Rycina 16). Dyskusję poprzedza tabela w podrozdziale 6.14, która doskonale podsumowuje uzyskane wyniki i porządkuje wnioski, które z nich płyną. Ta część rozprawy została przygotowana starannie. Pierwsze akapity tego rozdziału ponownie wprowadzają czytelnika w tematykę rozprawy, niekiedy zdecydowanie bardziej rzeczowo niż wstęp teoretyczny. Muszę podkreślić, że dopiero przeczytanie wprowadzenia do dyskusji wyjaśnia w pełni zasadność postawionych celów, a użycie PCOOH jako związku referencyjnego do działania 7-OOH zostaje uzasadnione. W kilku kwestiach poproszę Autora o wyjaśnienie. Po pierwsze na stronie 71 Autor pisze, że 7-OOH dostarczany do mitochondriów powoduje utratę potencjału mitochondrialnego (jak rozumiem chodzi o obniżenie, ze względu na zależny od potencjału transport). Czy jest to wniosek z własnych badań (brak wyników w rozprawie) czy informacja z literatury (proszę o dodanie referencji). Ponadto, na kolejnej stronie dyskutowana jest sprawa powszechnego występowania peroksydazy glutationowej 1. Autor sugeruje brak zaangażowania tego enzymu w detoksykację CHOOH. Proszę o podanie stosownych referencji lub pokazanie wyników, które temu dowodzą. Zaskakującym stwierdzeniem było, że „hodowle linii komórkowych pochodzenia nowotworowego są przewidywalne”. Proszę o komentarz, na czym owa przewidywalność ma polegać. Następnie, Autor pisze o roli białka STARD1 w utrzymaniu struktury, funkcji i bioenergetyki mitochondriów. Proszę o bardziej szczegółowe rozwinięcie, o jakie funkcje mitochondriów chodzi. Następnie, Autor wspomina o możliwości wykorzystania elektroforezy dwukierunkowej w połączeniu z metodą immuno-spin trapping w analizie szlaku biosyntezy testosteronu na etapie post-mitochondrialnym. Proszę o wyjaśnienie, jakie możliwości daje takie podejście.

Z obowiązku recenzenta, konieczna jest również ocena edytorskiej i językowej strony pracy. Niestety, Autor nie uniknął licznych literówek, błędów językowych i gramatycznych (włączając nieprawidłowości w

odmianie wyrazów, liczne błędy interpunkcyjne, a także błędy ortograficzne (conajmniej; spożądać etc.). Dodatkowo niejednokrotnie wykorzystywane są niefortunne spolszczenia angielskojęzycznych zwrotów (np. mediowany transport – po polsku raczej, transport, w którym pośredniczy, blank, czyli „ślepa próba”, media hodowlane – to po polsku pożywki, itp.). Powszechnie stosowane są również sformułowania wykorzystywane w żargonie laboratoryjnym, jak „niestymulowane kontrole, czy pracuje się z „hodowlą” zamiast z komórkami w hodowli, które raczej nie funkcjonują w tekstach naukowych. Kolejna kwestia dotyczy niekonsekwentnego stosowania spacji przy zapisie jednostek. W wielu miejscach symbol „μ” został zastąpiona literą „u”. Dodatkowo Autor niekonsekwentnie stosuje pewne pojęcia. Pożywki hodowlane są zamiennie nazywane medium, roztworem, bądź pożywką, zaś cholesterol może być „dostarczany w diecie”, a nie „spożywany”, zaś retikulum endoplazmatyczne zastępowane jest zamiennie skrótem ER (z j. ang.) bądź RE (z j. pol.). Ryciny i tabele mają niejednolity sposób numerowania (wykorzystywane są zamiennie cyfry rzymskie i arabskie), wspólną numerację zastosowano dla Wstępu teoretycznego i Metod oraz Wyników i Dyskusji, jednak zdecydowanie łatwiej byłoby śledzić ryciny i tabele przy zastosowaniu ciągłej numeracji dla całej pracy.

Najważniejszymi osiągnięciami recenzowanej rozprawy są:

- potwierdzenie kluczowej roli białka STARD1 w transporcie 7-OOH do mitochondriów;
- wykazanie kluczowej roli GPx4 w detoksykacji tego wodoronadtlenku;
- wykazanie negatywnego efektu 7-OOH na przebieg procesu steroidogenezy;
- wykorzystanie komórek pierwotnych do potwierdzenia wyników uzyskanych na liniach komórkowych.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Pawła Pabisza jest oryginalnym opracowaniem naukowym opisującym uszkodzenia wytwarzania testosteronu w komórkach Leydyga, które są spowodowane nagromadzeniem wodoronadtlenków cholesterolu, a selenoproteinaza GPx4 odgrywa istotną rolę w usuwaniu tego produktu peroksydacji cholesterolu. Ze względu na szereg zastosowanych metod badawczych i wnikliwą analizę uzyskanych wartościowych wyników oraz umiejętność ich interpretacji, pozytywnie oceniam przedstawioną mi do oceny dysertację, a wymienione uwagi krytyczne nie zmniejszają w mojej opinii wartości naukowej rozprawy. Niewątpliwie jednak, praca mogła być przygotowana z większą starannością.

A zatem, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Pawła Pabisza do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z poważaniem,
Dorota Dymkowska

