



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

EU Centre of Excellence in Neurobiology, *BRAINS*

**nencki institute**  
of experimental biology

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland  
Phone: (48-22) 58 92 000; Fax: (48-22) 822 53 42  
E-mail: [dyrekcja@nencki.gov.pl](mailto:dyrekcja@nencki.gov.pl); <http://www.nencki.gov.pl>

---

dr hab. Joanna Bandorowicz-Pikuła, prof. nadzw.  
Zakład Biochemii,  
e-mail: [j.bandorowicz-pikula@nencki.gov.pl](mailto:j.bandorowicz-pikula@nencki.gov.pl)

*Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Podkalickiej,  
wykonanej w Zakładzie Cytobiochemii  
na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego  
pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra F. Sikorskiego*

Rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Podkalickiej, pod trochę enigmatycznym tytułem „Wpływ białka MPP1 na organizację tratw spoczynkowych w błonach komórkowych”, jest poświęcona wyjaśnieniu mechanizmu stabilizacji mikrodomen błonowych wzbogaconych w cząsteczki cholesterolu przez białko MPP1 (ang. *membrane protein, palmitoylated 1*, o m.cz. 55 kDa). Pewne kontrowersje związane z tytułem pracy wynikają z braku definicji terminu „tratwa spoczynkowa”. Recenzent oczekuje, że w trakcie obrony rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanna Podkalicka wyjaśni znaczenie tego terminu, co jest bardzo ważne dla zrozumienia wagi otrzymanych przez Doktorantkę wyników.

Nie ulega jednak wątpliwości, że problem organizacji błon biologicznych w płaszczyźnie lateralnej, ich budowy domenowej i związanego z tym podziału funkcjonalnego błon na rejony mające znaczenie regulatorowe i strukturalne, oraz mechanizmów regulacji organizacji błon, jest jednym z największych wyzwań współczesnej biologii molekularnej, biochemii i biologii komórki. Wzrastająca liczba publikacji na temat białka MPP1 z rodziny białek MAGUK i jego roli w kompleksie dokującym szkielet spektrynowy błony komórek erytroidalnych, w pełni uzasadnia podjęcie przez mgr Joannę Podkalicką badań dotyczących funkcji białka MPP1 w komórce. Tym bardziej, że zgromadzone od momentu identyfikacji białka MPP1<sup>1</sup> informacje na temat jego budowy i funkcji (m.in. na temat obecnej w cząsteczce białka zachowanej w ewolucji domeny SH3) skłoniły badaczy do wysunięcia przypuszczenia, że białko MPP1 oddziałuje ze szkieletem komórki, uczestniczy w regulacji proliferacji, jest elementem szlaków przekazywania sygnałów oraz połączeń międzykomórkowych.

---

<sup>1</sup> Bryant PJ, Woods DF (1992) A major palmitoylated membrane protein of human erythrocytes shows homology to yeast guanylate kinase and to the product of a *Drosophila* tumor suppressor gene. *Cell* **68**: 621–622.

Należy podkreślić, że zagadnienia domenowej budowy błon biologicznych są od kilku lat przedmiotem zainteresowań naukowych zespołu badaczy, kierowanego przez promotora rozprawy, Pana prof. Aleksandra F. Sikorskiego. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka podjęła w trakcie realizacji swojej rozprawy doktorskiej nowy temat badawczy związany w wyjaśnieniem udziału białka MPP1 w organizacji błon biologicznych komórek erytroidalnych. W bazie danych Pub-Med można znaleźć na ten temat tylko kilka artykułów, z czego większość stanowią prace członków zespołu kierowanego przez Pana prof. Sikorskiego, w tym prace, których współautorką jest Pani mgr Joanna Podkalicka.

Układ rozprawy doktorskiej mgr Joanny Podkalickiej nie odbiega od przyjętych powszechnie reguł. Praca liczy ponad 120 stron i dzieli się na pięć podstawowych podrozdziałów: 22-stronicowy wstęp teoretyczny, 5-stronicowy cel pracy, 14-stronicowy rozdział opisujący użyte w doświadczeniach materiały i zastosowane metody, 34-stronicowy rozdział zawierający opis uzyskanych wyników i 29-stronicową dyskusję (wraz z wnioskami końcowymi). Wymienione rozdziały poprzedzają wykaz skrótów oraz rozbudowane streszczenie w języku polskim i angielskim. Spis zacytowanej w pracy literatury liczy 213 pozycji (z czego zdecydowana większość pochodzi z XXI wieku). Na końcu pracy zamieszczono spis publikacji Doktorantki (jakkolwiek trzeba się tego domyślać, bo w tytule rozdziału nie wymieniono nazwiska Doktorantki i w trakcie wykonywania pracy nazwisko zostało zmienione) oraz Jej doniesień konferencyjnych.

Wstęp pracy, liczący 22 strony, jest bardzo ciekawą częścią rozprawy doktorskiej Pani mgr Podkalickiej. Jest napisany jasno, zwięźle i zrozumiale, i daje możliwość zapoznania się z tematem osobom nie związanym z tą dziedziną badań. Zawiera informacje na temat struktury błony i współczesne poglądy na temat jej budowy, ze szczególnym naciskiem na właściwości mikrodomen wzbogaconych w cząsteczki cholesterolu. Doktorantka omawia także znaczenie palmitoilacji białek dla ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji oraz właściwości i funkcje białka MPP1. Rozdział wstępny pracy jest nie tylko interesujący, ale zawiera wiele poglądowych schematów ułatwiających lekturę pracy. Obowiązkiem recenzenta jest wyliczenie pewnych potknięć językowych i/lub nomenklaturowych, których nie ustrzegła się Doktorantka w tej części rozprawy. Na przykład na str. 17 pracy można było uniknąć wyrażenia „kompozycja lipidów” na rzecz „skład lipidowy błony”, na str. 20 „limitu rozdzielczości mikroskopii optycznej” na rzecz „ograniczenia rozdzielczości mikroskopu optycznego”, na str. 21 „asocjacji i dyspersji domen” na rzecz bardziej opisowego „łączenia się w większe domeny i ich rozpadu”, a na str. 23 „sfingomielina posiada wysoce nasycone reszty” na rzecz wyrażenia „sfingomielina zawiera reszty nasyconych kwasów tłuszczowych”. W trakcie lektury Wstępu rodzi się pytanie na temat mikrodomen lipidowych i ich rzeczywistego istnienia w błonie komórkowej. W związku z tym uprzejmie proszę o zaprezentowanie swojej opinii na ten temat oraz w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Mimo zgłoszonych powyżej drobnych zastrzeżeń, nie mam wątpliwości, że z informacji zawartych w części wstępnej rozprawy doktorskiej jasno wynikają założenia i cele pracy. Materiał zawarty w we wstępnej części rozprawy pozwala dobrze zrozumieć założenia projektu i zawiera praktycznie wszystkie elementy, na podstawie których Doktorantka formułuje cele pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt, że rozdział „Cele i założenia pracy” zawiera także wcześniej opublikowane dane doświadczenia, które podkreślają zasadność podjętych w trakcie

pracy doświadczeń. A były to doświadczenia prowadzące do: 1) określenia zmian zawartości białka MPP1 na właściwości pęcherzyków GPMVs odpowiadających składem błonie komórkowej komórek linii erytroidalnych; 2) identyfikacja szlaków sygnałowych, w których mogłoby być zaangażowane białko MPP1. W tej części pracy można było uniknąć określeń żargonowych takich jak: komórki zawieszinowe, właściwości separujących ciekłych faz lipidowych, trawno-zależne receptory błonowe, transdukcja sygnału do wnętrza komórki. W całej pracy nie znalazłam także wyjaśnienia skrótu GPMVs. Nie jest też właściwe stosowanie w skrótach w tekście polskim końcówek liczby mnogiej z języka angielskiego, a więc właśnie GPMVs czy PIPs.

Wyliczenie zagadnień opisanych we wstępie wskazuje jak ambitnego i trudnego zadania podjęła się Doktorantka i należy przyznać, że z tego zadania wywiązała się dobrze. Szczególnie cenne są informacje zawarte w podrozdziale 6 „Wpływ determinowanych przez MPP1 zmian struktury błony komórkowej na aktywację „trawnozależnych” receptorów błonowych – znaczenie fizjologiczne”, które pokazują dlaczego badania Doktorantki są cennym wkładem dla zrozumienia znaczenia, jakie mają mikrodomeny błonowe w organizacji elementów szlaków sygnałowych w komórce.

Część metodyczna rozprawy jest napisana jasno, a co najważniejsze zawiera wystarczające szczegóły, które pozwoliłyby na powtórzenie doświadczeń przeprowadzonych przez Doktorantkę. Ta część bezsprzecznie stanowi prawdziwe źródło wiedzy dla nowych adeptów biochemii i biologii komórki. Zawiera także szereg szczegółów, które powinny na stałe wejść do kanonu prac doktorskich z biochemii i dziedzin pokrewnych. Nie ma wątpliwości, że zaproponowany przez Doktorantkę bogaty zestaw metod jest adekwatny do celu i zakresu zaplanowanych przez Doktoranta badań. Ich opis jest wyczerpujący. Zawiera także szereg tabel, które pozwalają na lepsze zrozumienie podjętej strategii badawczej.

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wielu, prawidłowo przygotowanych fotografii i wykresów. Konstrukcja logiczna tej części pracy jest bardzo jasna i pozwala na ocenę wartości uzyskanych obserwacji. Rozdział wyniki dzieli się na dwie główne części: określenie wpływu białka MPP1 na właściwości fizykochemiczne błony komórkowej w układzie modelowym oraz próbę wykazania, że zależne od białka MPP1 zmiany w lateralnej organizacji błony komórkowej spowodowane są zaburzeniem powstawania funkcjonalnych tratw spoczynkowych. Badania prowadzone przez Doktorantkę zaowocowały szeregiem interesujących, dobrze udokumentowanych wyników opisanych w bogato ilustrowanym rozdziale rozprawy doktorskiej (39 stron, 22 rozbudowane ryciny zawierające wiele kolorowych fotografii). Stanowią one przykład ciekawego powiązania wyników doświadczeń prowadzonych na liniach komórkowych z wynikami doświadczeń *in vitro*.

Najważniejsze wyniki uzyskane przez Panią mgr Joannę Podkalicką można streścić następująco: 1) wykazano, że białko MPP1 jest niezbędne dla prawidłowej organizacji funkcjonalnych tratw spoczynkowych w błonie komórek erytroidalnych; 2) wyniki uzyskane *in vitro* świadczą o znaczących zmianach stopnia uporządkowania błony pęcherzyków otrzymanywanych z komórek z obniżonym poziomem białka MPP1 (błony tych pęcherzyków cechowały się znacznie wyższą płynnością w stosunku do błon uzyskanych z komórek kontrolnych); 3) brak białka MPP1 pociąga za sobą zmiany właściwości fizykochemicznych błon, co może świadczyć o zaniku stabilizacji istniejących w błonie nanokompleksów

białkowo-lipidowych, a przede wszystkim zahamowaniu procesu składania nanokompleksów w większe struktury przypominające tratwy spoczynkowe; 4) wyniki badań z zastosowaniem komórek z wyciszoną ekspresją genu kodującego białko MPP1 mogą sugerować udział białka MPP1 w powstawaniu funkcjonalnych tratw spoczynkowych i pośrednio w szlakach przekazywania sygnałów biegnących od receptorów błonowych IR oraz c-kit. Stwierdzono, że zahamowanie szlaku sygnałowego następuje na poziomie aktywacji białka H-Ras, którego aktywność jest ściśle skorelowana z jego lokalizacją w tratwach spoczynkowych. A zatem po raz pierwszy wykazano związek pomiędzy zawartością białka MPP1, a zdolnością białka H-Ras do aktywacji.

Bardzo pozytywną ocenę tej części rozprawy tylko w niewielkim stopniu zaburzają nieliczne niedociągnięcia (często natury edytorskiej), których wyliczenie jest obowiązkiem recenzenta. Niektóre z użytych przez Doktorantkę wyrażeń, niosą znamiona żargonu naukowego: nadekspresja białek (str. 60 i następne), transdukcja (transdukowana) (str. 60 i następne), błona natywna (str. 60 i następne), obserwacja preparatów w osi z (str. 62), czysta błona (str. 63), większe skupiska o charakterze fazy ciekłej (str. 63), znacznik fluorescencyjny wykazujący powinowactwo błonowe (str. 64), odseparowanie pęcherzyków (str. 64 i następne), detekcja białek (str. 65 i następne), markery kompartmentów (str. 65 i następne), lokalizując się do frakcji (str. 66), przeklonować (str. 67), czas życia fluorescencji (str. 72), separacja faz (str. 81), rozproszenie widocznych faz lipidowych (str. 83), tratwozależne (str. 83 i następne), rezultaty (str. 90, ale w całej pracy). Pragnę podkreślić, że powyższe uwagi mają charakter raczej edytorski.

Szczególne zainteresowanie recenzenta wzbudził podrozdział 6 rozdziału Wyniki, w którym mgr Joanna Podkalicka zebrała uzyskane przez siebie wyniki na temat możliwych szlaków przekazywania sygnałów mających swój początek na terenie tratw spoczynkowych oraz mechanizmów aktywacji białka Ras. Bardzo proszę o zaproponowanie doświadczeń, które mogłyby w pełni udowodnić związek pomiędzy aktywacją białka H-Ras a białkiem MPP1 i jego zdolnością do regulacji organizacji tratw spoczynkowych w błonie.

W rozdziale „Dyskusja”, który wraz z wnioskami końcowymi obejmuje aż 24 strony, Doktorantka krytycznie ocenia najważniejsze wyniki swojej pracy, konfrontując je z poglądami reprezentowanymi przez czołowych badaczy krajowych i zagranicznych. Bardzo dobre wrażenie na czytelniku rozprawy wywołuje ostrożność Doktorantki w interpretacji uzyskanych wyników, świadcząca o dojrzałości naukowej Pani mgr Joanny Podkalickiej. Ta część rozprawy świadczy także o Jej bardzo dobrej orientacji w obowiązujących na świecie poglądach dotyczących budowy błon biologicznych i funkcji mikrodomen błonowych wzbogaconych w cholesterol, które doktorantka nazywa w pracy tratwami spoczynkowymi.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Podkalickiej znacząco zwiększa naszą wiedzę na temat funkcji mikrodomen błon komórek erytroidalnych wzbogaconych w cholesterol oraz udziału białka MPP1 z rodziny kinaz guanylanowych związanych z błonami (MAGUK) w regulacji powstawania tych mikrodomen. Rozprawa zawiera szereg interesujących, nowych obserwacji. Uzyskane przez Panią mgr Joannę Podkalicką wyniki pozwoliły scharakteryzować mechanizm tworzenia się tratw spoczynkowych w błonach komórek erytroidalnych zależny od białka MPP1, przyczyniając się tym samym do rozwoju wiedzy na temat regulacji struktury i funkcji błony

komórkowej. Przedstawione wyniki mogą stać się zarzewiem dalszych badań nad udziałem białek z rodziny MAGUK w regulacji powstawania domen błonowych oraz stwarzają możliwości opracowania nowych terapii chorób, w których udział tratw błonowych jest niekwestionowany.

Drobne zastrzeżenia zgłoszone w niniejszej recenzji nie rzutują na bardzo pozytywną ocenę pracy. Zgłaszam zatem wniosek o uznanie rozprawy doktorskiej Pani Joanny Podkalickiej za spełniającą warunki określone w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Podkalickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na znaczenie poznawcze uzyskanych wyników, ich nowatorstwo i zakres stosowanych metod oraz biorąc pod uwagę dorobek publikacyjny Doktorantki (Pani mgr Joanna Podkalicka jest współautorka trzech prac doświadczalnych i dwóch prac przeglądowych, które ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych, to jest w *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* w 2014 roku, *Advances in Experimental Medicine and Biology* w 2014 roku, *Bioenergetics Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* w 2013 roku, w *Journal of Biological Chemistry* w 2012 i 2011 roku), wnoszę o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.



Warszawa, 15 września, 2014 roku

Joanna Bandorowicz-Pikuła