

Dr hab. Joanna Bandorowicz-Pikuła, profesor IBD PAN
Pracownia Metabolizmu Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN, 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
tel.: 22 5892262; e-mail: j.bandorowicz-pikula@nencki.edu.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Trybus, p.t.: „BIAŁKO EFR3A JAKO POTENCJALNY PARTNER FLOTYLINY 2 ORAZ MOŻLIWY ORGANIZATOR TRATW SPOCZYNKOWYCH”, wykonanej w Zakładzie Cytobiochemii Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra F. Sikorskiego oraz promotora pomocniczego dr Anity Hryniewicz-Jankowskiej

Tematyka badań i cele rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Trybus to opracowanie naukowe, którego tematyka dotyczy próby określenia organizacji i mechanizmów regulacji spoczynkowych domen - tratw w błonie plazmatycznej komórek zwierzęcych. Wyniki wcześniej prowadzonych przez zespół prof. Aleksandra F. Sikorskiego badań wskazują na to, że specyficzne oddziaływania białek z rodziny flotylin i białka MPP1 są prawdopodobnie odpowiedzialne za organizację i rozmieszczenie tratw błonowych w komórkach erytroidalnych. W związku z powyższym mgr Magdalena Trybus w rozprawie doktorskiej założyła, że tworzenie sieci białkowej opartej na flotylinie, oddziałującej ze specyficznymi lipidami, leży u podstaw mechanizmu tworzenia domen - tratw w komórkach, w których poziom białka MPP1 jest niski; postanowiła zatem zidentyfikować białka oddziałujące z flotyliną.

Trzeba już na wstępie stwierdzić, że ten cel został zrealizowany. Zastosowanie przez Doktorantkę chromatografii powinowactwa pozwoliło zidentyfikować EFR3A jako białko, które potencjalnie oddziałuje z flotyliną 2. Wykazano, że białko EFR3A jest stabilnym składnikiem frakcji otrzymanej z komórek HeLa wzbogaconej w tratwy lipidowe, a jego obecność w tej frakcji okazała się wrażliwa na usunięcie cholesterolu z błony. Wyciszenie ekspresji genu kodującego białko EFR3A w komórkach HeLa KnD spowodowało zmniejszenie uporządkowania błony plazmatycznej komórek, a także wpłynęło na zależne od EGF wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia.

Należy podkreślić, że wyniki uzyskane przez mgr Magdalenę Trybus pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że flotylina 2 i białko EFR3A wzajemnie oddziałują ze sobą, o czym jak dotąd nie było żadnych informacji w literaturze przedmiotu i dostępnych bazach danych. Ponadto,

oddziaływania pomiędzy flotyliną 2 a białkiem EFR3A wydają się odpowiedzialne za organizację i regulację funkcjonowania tratw błonowych, a także procesy związane z kontrolą cyklu komórkowego.

Formalny opis rozprawy

Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska mgr Magdaleny Trybus podsumowuje wyniki badań przeprowadzonych w Zakładzie Cytobiochemii Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, w pracowni kierowanej przez prof. Aleksandra F. Sikorskiego. Praca została napisana zrozumiałym językiem, jakkolwiek można dyskutować z niektórymi stwierdzeniami lub użytymi terminami. Praca zawiera wszystkie niezbędne elementy, które powinny być zawarte w rozprawie doktorskiej. Część doświadczalna poświęcona jest oddziaływaniom białka EPR3A z flotyliną 2 i możliwym udziałem tego kompleksu w tworzeniu i stabilizacji wyspecjalizowanych domen błony plazmatycznej – domen spoczynkowych – tratw.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Trybus liczy łącznie 127 stron, a jej układ jest typowy dla takich opracowań. Pracę rozpoczyna szczegółowy spis treści, **streszczenia** w polskiej i angielskiej wersji językowej oraz wykaz stosowanych skrótów. W części literaturowej pracy – **Wstęp** – Doktorantka zaprezentowała koncepcję tratw błonowych, opisując w oparciu o najnowszą literaturę przedmiotu ich składniki, funkcje, potencjalny udział w patogenezie oraz mechanizmy regulacji tratw błonowych. Zebrała także informacje na temat markerów tratw błonowych – flotylin i białka EFR3. Wstęp został wzbogacony w poglądowe ryciny i schematy ułatwiające zrozumienie przedstawionych zagadnień.

W liczącym 4 strony rozdziale **Założenia i cele pracy** Doktorantka uzasadniła zakres prowadzonych badań. Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej dotyczy części metodycznej, szczegółowo opisującej zastosowane w pracy **Materialy i metody** badawcze. Najobszerniejszy z rozdziałów, liczący 38 stron, to opis uzyskanych **Wyników**, po którym następuje **Dyskusja** wyników z danymi otrzymanymi przez innych badaczy, **Wnioski** końcowe oraz **Bibliografia** zawierająca w kolejności cytowań 151 pozycje literaturowych, w większości z ostatnich 5 lat.

Ocena merytoryczna rozprawy

Część literaturowa – **Wstęp** – to obszerne i solidne kompendium wiedzy wprowadzające czytelnika w zagadnienia rozprawy. Według obecnie przyjmowanych teorii, których zwolennikiem jest również mgr Magdalena Trybus, w błonie plazmatycznej komórek zwierzęcych występują dynamiczne struktury – nanodomeny, takie jak kompleksy białkowo-lipidowe (prekursory tratw o średnicy < 10 nm i czasie życia < 0,1 ms), tratwy spoczynkowe, domeny o średnicy > 10 nm i czasie życia 1 sek. oraz stabilne platformy sygnałowe – mikrodomeny – o średnicy kilku mikrometrów, powstające w wyniku

łączenia się wielu tratw spoczynkowych. Tratwy zbudowane są z lipidów i charakterystycznych białek, takich jak flotyliny i białka MPP1. Wszechobecnie występujące w organizmach eukariotycznych flotyliny są jednymi z głównych białek tratw błonowych. Należą do rodziny białek, które charakteryzują się występowaniem w ich cząsteczkach domeny SPFH (stomatyna/prohibityna/flotyliny oraz HflK/C).

Zarówno tratwy spoczynkowe, jak i mikrodomeny/platformy sygnalizacyjne poprzez wpływ na zmiany ruchliwości oraz zmiany konformacyjne wynikające z asocjacji/dysocjacji białek z tymi domenami wpływają na ich aktywność, pełniąc kluczową rolę w regulacji wielu ważnych procesów biologicznych, takich np. jak przekazywanie sygnałów pochodzących z receptorów czynników wzrostu związanych z proliferacją i kontrolą ruchliwości komórek. Uczestniczą też w transporcie lipidów i białek. Wszystkie te procesy sprawiają, że tratwy błonowe odgrywają ważną rolę w procesach związanych z odpornością, oddziaływaniami patogen-gospodarz, w rozwoju stanu przedrakowego i innych.

Chcę jeszcze raz podkreślić, że bardzo wysoko oceniam część literaturową rozprawy, która zawiera wszystkie niezbędne informacje potrzebne do zrozumienia podstaw teoretycznych i założeń podjętych badań. Informacje te podane są w sposób czytelny i konkretny, a ich dobór jest właściwy. Część literaturowa niewątpliwie świadczy o bardzo dużej wiedzy Doktorantki oraz sprawności w przedstawianiu tej wiedzy. Ten interesujący rozdział nasuwa szereg pytań, na których odpowiedź prosiłabym w trakcie publicznej obrony rozprawy.

- 1) W rozprawie mgr Magdalena Trybus przedstawia mechanizmy molekularne prowadzące do wytworzenia wyspecjalizowanych domen w błonie plazmatycznej komórek erytroidalnych. Czy te mechanizmy mogą dotyczyć także innych typów komórek?
- 2) Czy można poprosić o szersze wyjaśnienie udziału tratw błonowych w regulacji stężenia jonów wapnia w komórkach erytroidalnych?
- 3) Jaka jest prawidłowa nazwa białka EFR3A czy Efr3a, bo obie formy funkcjonują w literaturze przedmiotu. Ta sama uwaga dotyczy nazwy genu.
- 4) W pracy zastosowano skrót ASD, który został przetłumaczony jako spektrum autyzmu. Czy to prawidłowy termin?
- 5) Nie tylko we wstępie, ale w innych rozdziałach rozprawy Doktorantka używa terminów „interakcje”, „ekspresja białka”, „wysoco konserwatywny region białka”. Dlaczego, skoro istnieją polskie odpowiedniki powszechnie stosowane w literaturze naukowej: w kolejności „oddziaływania”, „ekspresja genu kodującego białko” lub po prostu „synteza białka”, „fragment sekwencji zachowany w ewolucji”.

Cele i założenia pracy zostały poprawnie i jasno sformułowane, a część doświadczalna została starannie zaprojektowana. Doktorantka nie tylko uzasadniła rodzaj i zakres prowadzonych badań, ale

przedstawiła dane pozwalające na lepsze zrozumienie przez czytelników założeń pracy. Należy podkreślić, że tego typu praktyka nie jest często spotykana.

Materiały i metody, przedstawione w kolejnym rozdziale, zostały dobrane właściwie do założonych celów. Warsztat doświadczalny Doktorantki zasługuje na szczególnie wysoką ocenę ze względu na swoje bogactwo i różnorodność. Obejmował badania morfologii komórek, biochemii białek i proteoliposomów, mikroskopię fluorescencyjną, mikroanalizy z wykorzystaniem metod proteomicznych i wiele innych. Opis zastosowanych materiałów i większości metod jest niezwykle szczegółowy, bogato ilustrowany rycinami i schematami. Taka szczegółowość umożliwi przyszłym kontynuatorom badań powtórzenie wykonanych doświadczeń. W badaniach tratw błonowych Doktorantka posłużyła się liniami komórkowymi HeLa i MCF7 wywodzącymi się z ludzkich komórek raka szyjki macicy oraz raka piersi, zakupionymi w American Type Culture Collection. Ponadto zaprojektowano i wyhodowano linie komórkowe z obniżoną zawartością białka EFR3A i komórki z sekwencją „rescue”. W tym celu mgr Magdalena Trybus wprowadziła do komórek HeLa wektor lentiwirusowy zawierający sekwencję shRNA przypadkową dla „scrambled” i komplementarną do sekwencji kodującej białko EFR3A. Podobnie uzyskała linie MCF7 KnD EFR3A i „scrambled”. Dodatkowo, aby sprawdzić, czy otrzymane wyniki dotyczące organizacji błony w komórkach KnD EFR3A nie są przypadkowym efektem, Doktorantka przeprowadziła transfekcje komórek KnD EFR3A wektorem ratunkowym. tzw. „rescue”. W sekwencji mRNA EFR3A wprowadziła cztery ciche mutacje w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez shRNA obecne w komórkach KnD, tak aby komórki KnD mogły syntetyzować EFR3A. Pozwoliło to na przeprowadzenie badań kontrolnych, co jest bardzo ważne i podnosi wartość uzyskanych wyników. Dodatkowo, mgr Magdalena Trybus wykorzystwała metody biologii molekularnej, biochemiczne i biofizyczne, co pozwoliło uzyskać dodatkowe dowody na oddziaływanie flotyliny 2 z białkiem EFR3A.

W rozdziale **Wyniki** uzyskane dane doświadczalne zostały przedstawione na 34 rozbudowanych rycinach i w 4 tabelach. Generalnie, doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane, zawierają niezbędne próby kontrolne i są jasno opisane, a uzyskane wyniki są przekonujące. Co bardzo ważne, znaczna część wyników będących podstawą pracy doktorskiej została wysłana do redakcji czasopisma o zasięgu międzynarodowym *Cellular and Molecular Biology Letters* w postaci pracy doświadczalnej, której Doktorantka jest pierwszym autorem. Czasopismo charakteryzuje się wysokim współczynnikiem oddziaływania IF, ale praca nie została jeszcze poddana opiniowaniu recenzentów (<https://www.researchsquare.com/article/rs-2294219/v1>).

W **Dyskusji** Doktorantka ponownie omawia uzyskane wyniki, zestawiając je z dostępną wiedzą literaturową. Rozważa też możliwe mechanizmy molekularne powstawania tratw błonowych i udziału w tym procesie białek z rodziny flotylin i białka EFR3A. Doktorantka jest świadoma ograniczeń swoich badań prowadzonych *ex vivo* i *in vitro* i konieczności ich dalszej weryfikacji w modelach lepiej odzwierciedlających warunki *in vivo*.

Rozprawę kończą **Wnioski** końcowe, będące w dużym stopniu ponownym streszczeniem wykonanych badań i uzyskanych wyników. Nie mam do tego rozdziału zastrzeżeń.

Wniosek końcowy

Mimo zgłoszonych przeze mnie drobnych uwag krytycznych, rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Magdalenę Trybus prezentuje wysoki poziom naukowy. Jest to autorskie opracowanie naukowe, które spełnia wszystkie standardy stawiane opracowaniom tego typu. Jednoznacznie stwierdzam, że przeprowadzone prace badawcze, analiza danych doświadczalnych i przeprowadzona dyskusja naukowa zrealizowane zostały przez Doktorantkę w sposób nie budzący zastrzeżeń. Opracowanie zostało bardzo dobrze przygotowane pod względem metodycznym i merytorycznym, z wykorzystaniem profesjonalnej analizy otrzymanych danych naukowych, wnosząc istotny wkład poznawczy w mechanizmy organizacji i regulacji funkcji domen spoczynkowych komórek zwierzęcych. Należy także dodać, że mgr Magdalena Trybus jest współautorką 1 artykułu przeglądowego i 1 pracy doświadczalnej zgłoszonej do druku w *Cellular and Molecular Biology Letters*, powstałej na podstawie wyników badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Trybus do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.



dr hab. Joanna Bandorowicz-Pikuła
profesor Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN