



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOLOGII KOMÓRKI
KIEROWNIK ZAKŁADU
PROF. DR HAB. ZBIGNIEW MADEJA

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Podkalickiej

pt. „Wpływ białka MPP1 na organizację tratw spoczynkowych w błonach komórkowych”

Błona komórkowa nie jest jedynie prostą barierą oddzielającą wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego. Od wielu lat wiemy, że jest to niezwykle skomplikowana struktura odpowiedzialna za wiele procesów kluczowych dla funkcjonowania komórki. Odbiciem tej złożoności jest między innymi występowanie niezwyklej dynamiki powstawania i zanikania nano- i mikrodomen lipidowo-białkowych mających wpływ na wiele funkcji błony komórkowej.⁴ Domeny te zwane tratwami błonowymi powstają w wyniku oddziaływań pomiędzy niektórymi lipidami i białkami obecnymi w błonie. Obecnie nie budzi już wątpliwości twierdzenie, że specyficzne warunki generowane w obrębie tych struktur mają istotne znaczenie dla przebiegu wielu procesów biologicznych. Jednak największe zainteresowanie budzi rola tratw błonowych w procesach związanych z transdukcją sygnału do wnętrza komórki. Liczne badania jednoznacznie wskazują na ich istotną rolę w procesach transdukcji i propagacji przesyłanego sygnału w komórce. Model ten jest niezwykle atrakcyjny ponieważ opisuje i wyjaśnia mechanizmy umożliwiające powstawanie często bardzo skomplikowanych i wieloskładnikowych kompleksów koniecznych dla poprawnego przesyłania sygnałów. Badania tych mechanizmów doprowadziły do powstania koncepcji, że rozpoczęte w błonie komórkowej procesy przesyłania sygnału nie zależą jedynie od związania przez receptor liganda lecz ich charakter i przebieg jest mocno uzależniony od mikrośrodowiska w jakim znajduje się aktywowany receptor. Model ten wprowadza możliwość dodatkowej regulacji procesu przesyłania sygnału poprzez oddziaływanie receptora z określonymi białkami i lipidami obecnymi w tratwach błonowych i może, chociaż w części, tłumaczyć olbrzymią różnorodność sygnałów

biologicznych indukowanych przez bardzo zbliżone ścieżki sygnałowe. Jednym z najslabiej poznanych aspektów funkcjonowania tratw błonowych jest mechanizm leżący u podstaw inicjowania i powstawania spoczynkowych tratw błonowych. Tego właśnie zagadnienia dotyczy przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Joanny Podkalickiej. Celem pracy było opracowanie modelu pozwalającego na wykazanie, że białko MPP1 odpowiada za organizację stabilnych tratw spoczynkowych a przez to wpływa na przebieg procesów transdukcji sygnału w komórce. Badania tego aspektu przesyłania sygnału w komórce są jak najbardziej uzasadnione i bez wątplenia wpisują się w najbardziej współczesne kierunki badań tych zjawisk. Przedstawiona do oceny praca jest rozwinięciem i kontynuacją wcześniejszych badań prowadzonych przez grupę prof. dr hab. Aleksandra F. Sikorskiego w Zakładzie Cytobiochemii Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Tematyka pracy wynika zatem z wieloletnich doświadczeń zespołu w badaniach rozmaitych aspektów funkcjonowania błony komórkowej.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 126 stron. W tekście zamieszczono 34 ryciny, 4 tabelę i cytowano 213 pozycji literaturowych. Rozprawa doktorska Pani Joanny Podkalickiej nie odbiega pod względem kompozycyjnym od ogólnie akceptowanego układu tego typu opracowań. Po przedstawieniu wykazu skrótów i obszernym streszczeniu rozprawy w języku polskim i angielskim, Doktorantka w bogato ilustrowanym wstępie, przedstawia ogólną charakterystykę struktury błon biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem budowy i funkcji tratw błonowych. Na szczególne podkreślenie zasługuje dokładne omówienie plusów i minusów stosowanych obecnie metod badania tratw błonowych. Jest to o tyle istotne, że ze względu na małe rozmiary i dużą dynamikę, są to struktury dość trudne do izolacji i badania. Bardzo zatem istotna dla prawidłowej interpretacji otrzymanych wyników jest orientacja w ograniczeniach stosowanej metodologii. Wstęp kończy omówienie struktury i funkcji białka MPP1 oraz roli palmitoilacji jako regulatora funkcji białek. Trochę szkoda, że Autorka nie poświęciła więcej miejsca omawianiu roli mikrodomen błonowych w takich procesach jak choćby migracja komórek, gdzie znaczenie płynności błon pojawiało się już wielokrotnie. Rozumiem jednak, że nie to było tematyką pracy doktorskiej i zapewne jedynie wspomnienie o takiej zależności jest wystarczające z punktu widzenia poprawności konstrukcji pracy. Z drobnych

nieścisłości wydaje mi się, że skrót TGF- α oryginalnie wywodzi się od nazwy transforming growth factor a nie tumor growth factor. Podsumowując, sposób napisania wprowadzenia do rozprawy doktorskiej świadczy o bardzo dobrej orientacji Autorki w zagadnieniach będących przedmiotem recenzowanej pracy. Wstęp napisany jest przejrzysto i bardzo dobrze uzasadnia celowość podjęcia badań będących przedmiotem pracy doktorskiej a konstrukcja tego rozdziału w naturalny sposób prowadzi do sformułowania jasnego i dobrze umotywowanego celu pracy.

W rozdziale „Materiały i metody” autorka zawiera wyczerpujące informacje dotyczące stosowanych metod eksperymentalnych. Opis stosowanych metod jest jasny i obszerny, stwarzający przez to możliwość powtórzenia opisanych doświadczeń. Zastosowane w pracy metody doświadczalne są bez wątpienia właściwe do rozwiązania problemu będącego tematem pracy doktorskiej. Autorka obok metod biologii molekularnej, zastosowała całą paletę metod biochemicznych i biofizycznych, a także mikroskopowych, pozwalających na badania procesów na poziomie pojedynczej komórki. Nie do końca jest jedynie jasne dla recenzenta co Autorka rozumie pod pojęciem % konfluencji komórek. O ile dobrze zrozumiałem, praca została wykonana na komórkach nieadherujących zatem określanie obszaru naczynia pokrytego przez komórki, a tak zwykle rozumiemy % konfluencji, musiało być dość kłopotliwe i niejednoznaczne.

Główne osiągnięcia swoich badań Pani mgr Joanna Podkalicka przedstawiła w rozdziale „Wyniki”. Punktem wyjścia pracy były wcześniejsze badania Zespołu Prof. Sikorskiego wskazujące, że białko MPP1 odpowiada za powstawanie tratw lipidowych w błonach komórkowych erytrocytów. Jednakże, jak zauważa sama Autorka, wyniki tych badań ze względów metodycznych wymagały dalszej weryfikacji. W związku z tym pierwszym celem pracy było opracowanie modelu umożliwiającego przeprowadzenie takich badań. Za taki model uznano błony komórkowe pęcherzyków GPMVs otrzymanych z nieadherujących komórek HEL, zarówno kontrolnych jak i z obniżonym poziomem białka MPP1. Badania te Autorka rozpoczęła od charakterystyki wykorzystywanych komórek, stwierdzając, że rzeczywiście w komórkach MPP1KnD można zaobserwować stabilne obniżenie poziomu zarówno mRNA jak i białka MPP1. Obserwacje te zostały uzupełnione obrazowaniem lokalizacji białka MPP1 w błonie komórkowej metodami mikroskopowymi. Wydaje mi się jednak, że Rys. 13 byłby

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UJ

znacznie bardziej pogładowy gdyby zamieszono w nim wynik z komórek MPP1KnD nawet, a może zwłaszcza dlatego, że był negatywny. Kolejnym krokiem było opracowanie metody otrzymywania pęcherzyków GPMV z komórek HEL a następnie ich charakteryzacja. W tych doświadczeniach wykazano, że otrzymane pęcherzyki GPMVs wykazują obecność MPP1 i dodatkowo pewna ilość tego białka wykazuje lokalizację błonową. Ponadto badania lokalizacji aktyny w pęcherzykach pozwoliły na stwierdzenie, że szkielet aktynowy nie jest zaangażowany w powstawanie indukowanych chemicznie pęcherzyków a część białka MPP1 bezpośrednio może wiązać się z błoną komórkową. Po wstępnych badaniach charakteryzujących pęcherzyki GPMVs Autorka mogła przejść do głównej tematyki pracy przeprowadzając badania dotyczące wpływu obecności białka MPP1 na płynność błony pęcherzyków GPMVs. Doświadczenia te jednoznacznie wykazały znaczące zmiany stopnia uporządkowania błon pęcherzyków pochodzących z komórek z obniżonym poziomem białka MPP1. Przeprowadzone dwoma niezależnymi metodami doświadczenia pokazały, że błony tych pęcherzyków cechowały się wyższą płynnością w stosunku do błon kontrolnych. Warto tu podkreślić, że wynik ten otrzymano metodami analizy pojedynczych komórek/pęcherzyków i jest on przedstawiony bardzo elegancko i przekonywująco. Co ciekawe, badania z zastosowaniem sondy laurdan-C wykazały również występowanie wyraźnej separacji faz lipidowych w błonach pęcherzyków. Separacja ta nie była co prawda widoczna przy zastosowaniu drugiej sondy di-4, ale jak rozumiem było to związane z różnymi warunkami temperaturowymi w tych eksperymentach?

Przedstawione rezultaty dość wyraźnie sugerowały, że rzeczywiście białko MPP1 może mieć znaczenie w formowaniu tratw lipidowych w błonie. Aby jednak wykluczyć inne możliwości Autorka przeprowadziła szereg eksperymentów kontrolnych. Między innymi wykazała, że obserwowane zmiany płynności błon nie były spowodowane zmianami składu lipidowego, czyli powinny wynikać właśnie ze zmian w organizacji błony. Co więcej Autorka zdając sobie sprawę, że wyciszenie ekspresji genów może prowadzić do różnych niespecyficznych efektów potwierdziła swoje wnioski w układzie, którym przywróciła ekspresję białka MPP1 w komórkach MPP1 KnD.

Kolejne eksperymenty pozwoliły wykazać, że w wyniku wyciszenia ekspresji białka MPP1 mają miejsce zmiany właściwości fizykochemicznych błony polegające na obniżeniu temperatury, w której dochodziło do zaniku widocznych faz lipidowych w pęcherzykach GPMVs.

Pierwsza część pracy kończy się bardzo dobrze udokumentowanym wnioskiem, że białko MPP1 wpływa na płynność błony bez zmian w jej składzie lipidowym co mogło sugerować, że rzeczywiście może brać udział w organizacji tratw błonowych. Jeśli jednak taki wniosek był słuszny to należało spodziewać się, że zmiany spowodowane brakiem tego białka powinny mieć odbicie w procesach transdukcji sygnału przez receptory zależne od funkcjonowania tratw. W serii bardzo ładnych i jednoznacznych interpretacyjnie eksperymentów Doktorantce udało się wykazać, że komórki pozbawione MPP1 mają wyraźne zaburzenia w przesyłaniu sygnału przez receptor insulinowy i receptor c-kit. Co ciekawe, różnice nie były obserwowane na poziomie fosforylacji receptora ale dopiero na poziomie aktywacji kinazy Erk1/2. Kolejne doświadczenia wykazały, że kluczowe dla tego zjawiska były różnice w aktywacji białka H-Ras, która dla komórek pozbawionych MPP1 było bardzo obniżona. Obserwacja ta doskonale wpisywała się we wcześniejsze doniesienia wskazujące, że białko H-Ras wymaga dla swojego działania obecności funkcjonalnych tratw lipidowych.

Recenzowaną pracę kończy rozdział „Dyskusja”, w którym autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych. Być może należało jednak w tym rozdziale ograniczyć nieco powtarzanie opisu otrzymanych wyników co mogłoby skutkować większą spójnością tej części rozprawy

Podsumowując, Pani mgr Joanna Podkalicka jednoznacznie wykazała, że białko MPP1 jest odpowiedzialne za formowanie spoczynkowych tratw lipidowych. Wyniki te są oryginalne i niezwykle interesujące. W sposób znaczący przyczyniają się do lepszego zrozumienia funkcjonowania i powstawania w komórce tratw błonowych. Wyniki te pozwalają również na weryfikację hipotez przedstawionych we wcześniejszych pracach zespołu oraz otwierają wiele interesujących możliwości kontynuacji prac dotyczących tej tematyki. Czytając pracę nasuwały mi się liczne możliwości kontynuacji tych ciekawych badań. Po pierwsze, rola tratw lipidowych w modyfikacji sygnału

przesyłanego do komórki wykazuje pewne podobieństwa do roli pęcherzyków endocytarnych w procesach modyfikacji transdukcji, propagacji i wzmacnianiu sygnału w komórce. Co więcej tratwy błonowe są również ściśle związane z procesem endocytozy. Czy zdaniem Doktorantki istnieje możliwość, że niektóre obserwowane efekty zaburzenia przesyłania sygnału w wyniku dysfunkcji tratw błonowych mogą być związane z zaburzeniami przebiegu endocytozy a przez to zmianami w sposobie przesyłania sygnału? Drugie pytanie dotyczy wspomnianej we wstępie roli tratw w procesie migracji komórek. Czy znane są jakieś dane wskazujące na odmienną organizację tratw błonowych w tak zwanych komórkach blebujących w stosunku do komórek poruszających się dzięki wytwarzaniu lamelipodium?

Oprócz wyników przedstawionych w pracy doktorskiej Pani mgr Joanna Podkalicka jest współautorką 5 prac naukowych opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach takich jak m.in. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (IF=2), *BBA Reviews on Cancer* (IF= 7,5), *BBA Molecular Cell Research* (IF=5,3) oraz *JBC* (IF=4,6). Prace te były już cytowane 20 krotnie w literaturze światowej. Wyniki pracy doktorskiej zostało już częściowo opublikowane lub przygotowywane na podstawie otrzymanych wyników prace są już wysłane do redakcji.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską mgr Joanny Podkalickiej oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi ustawowe i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Uważam również, że praca zasługuje na wyróżnienie. Wnoszę zatem o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego Pani mgr Joanny Podkalickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego


(Zbigniew Madeja)