



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

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Trybus

pt. „Białko EFR3A jako potencjalny partner flotyliny 2 oraz możliwy organizator tratw spoczynkowych”

Błona komórkowa należy do tych struktur komórkowych bez których komórka nie może w żadnym stopniu funkcjonować. Nie bez powodu większość tak zwanych testów żywotności komórkowej oparta jest na określeniu integralności błony komórkowej. Początkowo błona komórkowa postrzegana była nie bez racji jako przede wszystkim bariera oddzielająca wewnątrz komórki od środowiska zewnętrznego. Obecnie doskonale widzimy, że jest to nie tylko bariera a również w pewnym sensie „okno na świat” komórki, które w bardzo precyzyjny sposób pozwala na wymianę ze środowiskiem zarówno informacji jak i materii. Ponieważ właśnie wymiana informacji od wielu lat jest w centrum zainteresowania biologów komórkowych nic dziwnego, że badania ostatnich lat dotyczące dynamiki powstawania i zanikania nano- i mikrodomen lipidowo-białkowych mających wpływ na wiele funkcji błony komórkowej, w tym na sposób odbierania informacji, przykuwa uwagę wielu badaczy na całym świecie. Domeny te zwane tratwami błonowymi powstają w wyniku oddziaływań pomiędzy niektórymi lipidami i białkami obecnymi w błonie i mają istotne znaczenie dla przebiegu wielu procesów biologicznych. Jednak największe zainteresowanie budzi rola tratw błonowych w procesach związanych z transdukcją sygnału do wnętrza komórki. Model tratw błonowych jest niezwykle atrakcyjny ponieważ opisuje i wyjaśnia mechanizmy umożliwiające powstawanie często bardzo skomplikowanych i wieloskładnikowych kompleksów koniecznych dla poprawnego przesyłania sygnału i wskazuje, że natura sygnału nie zależy jedynie od związanego przez receptor liganda lecz jego charakter i przebieg jest mocno uzależniony od mikrośrodowiska w jakim znajduje się aktywowany receptor. Istnienie możliwości dodatkowej regulacji procesu

przesyłania sygnału poprzez oddziaływanie receptora z określonymi białkami i lipidami obecnymi w tratwach błonowych może również tłumaczyć olbrzymią różnorodność sygnałów biologicznych indukowanych przez bardzo zbliżone ścieżki sygnałowe. Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Magdaleny Trybus dotyczy jednego z najslabiej poznanych aspektów funkcjonowania tratw błonowych jakim jest mechanizm inicjowania ich powstawania. Praca ta jest kontynuacją prowadzonych wcześniej w Zespole Promotora Doktorantki, Prof. dr hab. Aleksandra F. Sikorskiego, badań, w których wykazano między innymi istotną rolę w tym procesie białka MPP1, które odpowiadało za organizację stabilnych tratw spoczynkowych. Ponieważ jednak niektóre typy komórek nie wykazują ekspresji tego białka pojawiło się zasadne pytanie jaki w tym przypadku może być mechanizm tego zjawiska. W szczególności praca doktorska Pani mgr Magdaleny Trybus miała na celu odpowiedź na pytanie czy białko EFR3A może być w tym przypadku partnerem flotyliny 2 i brać udział w organizacji tratw spoczynkowych. Badania tego aspektu powstawania tratw błonowych w komórce są jak najbardziej uzasadnione i bez wątplenia wpisują się w najbardziej współczesne kierunki badań tych zjawisk. Warto również podkreślić, że praca powstała w Zespole mającym wieloletnie doświadczenia w badaniach funkcji tratw błonowych w komórce.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 127 stron. W tekście zamieszczono 47 rycin, 4 tabele i cytowano 151 pozycji literaturowych. Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Trybus nie odbiega pod względem kompozycyjnym od ogólnie akceptowanego układu tego typu opracowań i składa się z następujących rozdziałów: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis używanych skrótów, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i literatura. W zwięzłym, bogato ilustrowanym, 20-stronicowym wstępie Autorka interesująco przedstawiła zestaw informacji umożliwiający czytelnikowi zrozumienie całości pracy. W przedstawionym wstępie Doktorantka przedstawia ogólną koncepcję tratw błonowych w komórce, ich rolę w procesach patologicznych oraz mechanizmy regulacji powstawania tratw błonowych. Szczególną uwagę Autorka poświęca roli w tych procesach markera tratw błonowych – flotyliny. W ostatniej części Wstępu przedstawiono czytelnikowi najważniejsze informacje dotyczące białka EFR3A. Jakkolwiek wstęp bardzo dobrze i bez niepotrzebnych dłużyzn wprowadza czytelnika w tematykę pracy prosiłbym Doktorantkę o rozwinięcie bardzo interesującej tezy, która

została w skrótovej formie zasygnalizowana na stronie 23. Autorka wspomina, że tratwy błonowe są atrakcyjnym celem terapeutycznym w różnych procesach patologicznych. Jako jeden z leków, który mógłby wpływać na funkcjonalność tratw błonowych wymieniona jest tu simwastatyna. Ponieważ jest to doskonale znany lek na obniżenie poziomu cholesterolu nie dziwi, że może wpływać na funkcjonowanie tratw błonowych i modyfikowanie przesyłanie sygnału w komórce. Statyny są jednak również inhibitorem izoprenylacji istotnej dla prawidłowego funkcjonowania na przykład małych białek G z rodzi Rho. Czy obecnie stan wiedzy pozwala rozstrzygnąć, który z tych mechanizmów działania statyn jest bardziej istotny z punktu widzenia wydajności przesyłania sygnału za pośrednictwem małych białek G?

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. Prosiłbym jedynie o wyjaśnienie czy w badaniach odpowiedzi wapniowej po stymulacji EGF z zastosowaniem barwnika Flou 4 wykonano jakąś kontrolę pozytywną np. pomiar sygnału po dodaniu jonoforu (np. jonomycyny)?

Główne osiągnięcia swoich badań Pani mgr Magdalena Trybus przedstawiła w rozdziale „Wyniki”. Punktem wyjścia pracy były wcześniejsze obserwacje Zespołu Prof. Sikorskiego wskazujące, że białko MPP1 wchodzi w interakcję z białkami z rodziny flotylin odpowiada za powstawanie tratw lipidowych w komórkach erytroidalnych. Jednakże, białko MPP 1 ulega ekspresji na wysokim poziomie jedynie

w niektórych typach komórek człowieka. Obserwacja ta nasunęła zatem pytanie jakie białko pełni funkcję MPP1 w tych typach komórek, w których nie ma jego ekspresji. W serii dobrze zaplanowanych eksperymentów Autorka jednoznacznie wykazała, które białko może pełnić taką funkcję w komórkach raka szyjki macicy HeLa i komórkach raka sutka MCF7 czyli w liniach komórkowych charakteryzujących się słabą ekspresją białka MPP1. W szczególności, eksperymenty w których rekombinowaną flotylinę 2 unieruchamiano w złożu pozwoliły na zidentyfikowanie za pomocą techniki MS/MS i chromatografii powinowactwa białka EFR3A jako potencjalnego partnera flotyliny 2. Występowanie oddziaływań pomiędzy flotyliną 2 i EFR3A potwierdzono metodą koimmunoprecypitacji. Należy podkreślić, że interakcja pomiędzy tymi dwoma białkami nie była do tej pory przez nikogo opisana w literaturze i nie ma takich informacji w żadnej bazie danych dotyczącej takich oddziaływań. Kolejnym ważnym odkryciem Doktorantki było stwierdzenie, że białko EFR3A lokalizuje się we frakcjach DRM i lokalizacja ta jest wrażliwa na usunięcie z błony komórkowej cholesterolu. Obserwacje te sugerowały, że EFR3A może być poszukiwanym organizatorem spoczynkowych tratw błonowych. Z tego względu w kolejnych eksperymentach Doktorantka sprawdziła jak obniżenie ekspresji tego białka w badanych komórkach przekłada się na parametry fizykochemiczne błony komórkowej charakteryzujące tratwy błonowe. W komórkach z obniżonym poziomem EFR3A stwierdzono zmniejszone uporządkowanie błony plazmatycznej zarówno całych komórek jak i indukowanych pęcherzyków GPMV. Również spektroskopia korelacji fluorescencji wykazała zwiększoną ruchliwość sondy tratwowej w komórkach KnD EFR3A. Bardzo istotnym uzupełnieniem tych badań było wykazanie, że transfekcja komórek KnD EFR3A wektorem „rescue” kodującym EFR3A powoduje powrót wartości parametrów fizykochemicznych błony plazmatycznej do stanu wyjściowego. Co więcej, w kolejnych doświadczeniach Doktorantka przedstawiła przekonujące dane wskazujące, że obniżenie ekspresji EFR3A, a więc zapewne również zaburzenie powstawania stabilnych tratw błonowych, powoduje zmiany w sygnalizacji wapniowej w komórce oraz zmiany w przebiegu cyklu komórkowego.

Reasumując, Autorka otrzymała ciekawe i oryginalne wyniki, po raz pierwszy wskazujące, że białko EFR3A może pełnić podobne funkcje jak MPP1, wchodząc w

interakcję z flotyliną 2 i odgrywając kluczową rolę w organizacji tratw błonowych w stanie spoczynku.

Lektura tej części pracy nasunęła mi kilka uwag i pytań o ustosunkowanie się do których chciałbym poprosić Doktorantkę:

1/ Pierwsze pytanie ma charakter bardzo ogólny. Czy można w tej chwili przedstawić jakąś hipotezę łączącą rodzaj białka będącego partnerem flotyliny w organizacji tratw błonowych z pochodzeniem tkankowym komórki? Wydaje się, że białko MPP1 jest charakterystyczne dla komórek erytroidalnych. Być może białko EFR3A występuje głównie w komórkach pochodzenia epitelialnego. A jak sytuacja wygląda na przykład w przypadku fibroblastów?

2/ Czym różnią się od siebie dwa rzędy dot blotów prezentowane na rycinie 13 B?

3/ Na rycinie 17 jako kontrole pokazano tzw „input” będący pełnym lizatem komórkowym. Na ryc. 17A jest on jednak oznaczony mianem input 10% podczas gdy na ryc. 17B jest to sam input. Na czy polega różnica? Na rozcieńczeniu próbki?

4/ W rozdziale VI.2.1 Autorka przedstawia bardzo ciekawe i sugestywne wyniki wpływu obniżenia poziomu cholesterolu na lokalizację białka EFR3A i EGFR we frakcji DRM. Nawiązując do jednego z moich poprzednich pytań, czy Autorka zastanawiała się nad możliwością zrobienia analogicznego eksperymentu na komórkach hodowanych przez dłuższy czas w obecności którejś ze statyn?

5/ Wydaje mi się, że interpretację wyników wpływu poziomu białka EFR3A na przebieg cyklu komórkowego znacznie ułatwiłby pomiar aktywności proliferacyjnej poszczególnych linii komórkowych. Czy próbowano przeprowadzić takie doświadczenie?

6/ Po jakim czasie od stymulacji EGF zrobiono zdjęcia prezentowane na ryc. 43? Czy wykonano analizę intensywności fluorescencji w funkcji czasu? To znaczy czy po dodaniu EGF można było zobaczyć wzrost poziomu wapnia w cytoplazmie w jakimś konkretnym punkcie czasowym po stymulacji?

W 11 stronicowym rozdziale „Dyskusja” Autorka krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki na tle danych literaturowych a w kolejnym rozdziale pt. „Wnioski” przedstawia główne osiągnięcia badawcze i konkluzje płynące z przeprowadzonych badań.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani Magdaleny Trybus ma klasyczny kształt przygotowanego specjalnie na tę okazję manuskryptu. Warto jednak wspomnieć, że materiały przedstawione w tej pracy zostały równie wykorzystane w dwóch publikacjach, w których Doktorantka jest pierwszą autorką. Jedna z tych prac jest artykułem przeglądowym i była już pięciokrotnie cytowana w literaturze światowej. Natomiast druga jest klasyczną pracą doświadczalną, która jest już dostępna w formie elektronicznej i zawiera większość wyników zaprezentowanych w pracy doktorskiej.

Podsumowując, zarówno dorobek naukowy jak i rozprawę doktorską Pani mgr Magdaleny Trybus oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu Autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki, które otwierają perspektywy badawcze na przyszłość. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789 ze zm.) w związku z art.179 ust.1 i 2 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz.1669). Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Trybus przez Wysoką Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wszystkie poczynione wcześniej uwagi, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o rozważenie możliwości wyróżnienia ocenianej pracy.

*(Zbigniew Madeja)*