



UNIwersytet
OPolski

Prof.dr hab. inż. Tadeusz Janas
PRACOWNIA LIPOSOMÓW I EGZOSOMÓW
INSTYTUT BIOTECHNOLOGII
ul. Kominka 6, 6a ; 45-032 Opole
tel. +48 77 401 60 50
fax. +48 77 401 60 51
tadeusz.janas@uni.opole.pl

18.10.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Mohameda Elderdfi
„Interaction of MPP1 with membrane lipids with respect to the regulation of lateral
membrane organization”

wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Sikorskiego
na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
i przedstawiona Radzie Wydziału Biotechnologii na tym Uniwersytecie.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór: dwóch artykułów naukowo-badawczych opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (General Physiology and Biophysics, IF = 1.48) oraz jednego artykułu przeglądowego opublikowanego w czasopiśmie Chemistry and Physics of Lipids (IF = 2.77). W dorobku naukowym (który nie jest uwzględniony w rozprawie) Doktoranta, znajduje się też współautorstwo artykułu w czasopiśmie Langmuir (IF = 3.79).

W artykułach uwzględnionych w rozprawie mgr Elderdfi jest pierwszym współautorem. Doktorant określił swój wkład w ich powstanie odpowiednio na 80%, 95% i 85%. Doktorant wykonał większość prac doświadczalnych, oraz miał znaczący udział w analizie wyników i w przygotowaniu manuskryptów do publikacji. Oświadczenia współautorów potwierdzają istotny wkład mgra Elderdfi w powstanie prac składających się na jego rozprawę doktorską.

Rozprawa jest napisana w języku angielskim, zawiera 82 strony, w tym streszczenie, wstęp, cel badań, trzy artykuły, streszczenie wyników, wnioski, spis literatury zawierający 24 pozycje, a także streszczenie w języku polskim. Rozprawa nie zawiera jednak tytułu w języku polskim. Spisy literatury w przedstawionych trzech publikacjach zawierają łącznie ponad 200 różnych pozycji. Drobną uwagę edytorską: gdyby artykuł przeglądowy (nr 1) był umieszczony jako nr „3”, rozdział „Cel badań” („Aim of the study”) byłby na początku rozprawy (a nie pomiędzy publikacją nr 1 a publikacją nr 2), co ułatwiłoby osobom czytającym jego znalezienie.

Tematem wiodącym badań w artykułach składających się na rozprawę doktorską jest zastosowanie wybranych technik biofizycznych w badaniach oddziaływania białka MPP1 z błonami modelowymi (monowarstwami lipidowymi oraz liposomami). Doktorant przeprowadził też obliczenia stałej dysocjacji K_D dla kompleksu białko MPP1 – błona liposomowa. Białko MPP1 jest białkiem membranowym błony erythrocytarnej, posiada masę ok 55 kDa i pełni istotną funkcję w powstawaniu tratw w błonie erythrocytów oraz w tworzeniu szkieletu błonowego erythrocytu. Dotychczasowe badania wykazały, iż palmitoilacja białka MPP1 jest procesem niezbędnym do prawidłowej organizacji błony komórkowej erythrocytów oraz komórek linii erytroidalnych. Badania te skupiały się na oddziaływaniu białka MPP1 z innymi białkami błony plazmatycznej i cytoszkieletu erythrocytów, dlatego podjęte przez Doktoranta badania bezpośrednich oddziaływań białka MPP1 z lipidami błonowymi są nowe i oryginalne.

Pierwsza praca składająca się na rozprawę doktorską [Elderdfi M., Zegarlińska J., Jones W., Sikorski A.F. (2017): MPP1 interacts with DOPC/SM/Cholesterol in an artificial membrane system using Langmuir-Blodgett monolayer. General Physiology and Biophysics. 36, 443–454] zawiera opis badań oddziaływań białka MPP1 z monowarstwą lipidową (z wykorzystaniem techniki monowarstw Langmuira) oraz z błonami liposomowych (z użyciem metody flotacji liposomów).

Błony modelowe utworzono z mieszaniny lipidów tworzących w błonach obszary ciekło-uporządkowane, o podobnej organizacji jak lipidy tratwowe w błonie plazmatycznej. W przypadku monowarstw lipidowych Doktorant rejestrował izotermy, przedstawiające zależność napięcia powierzchniowego monowarstwy od pola jej powierzchni, w trakcie procesu sprężania monowarstwy. Izotermy te rejestrował zarówno bez białka MPP1, jak i w obecności białka w roztworze wodnym pod monowarstwą. Obecność białka wywoływała modulację przebiegu izoterm, co wskazuje na wbudowywanie się cząsteczek białka do monowarstwy lipidowej. W przypadku badań oddziaływań białka MPP1 z liposomami, inkubowano białko z zawiesiną liposomów, a następnie ultrawirowano tą mieszaninę w gradiencie sacharozy. W przypadku braku wiązania białka do liposomów, liposomy i białko znajdowałyby się w różnych frakcjach. Obserwowano obecność białka we frakcji liposomowej (lub blisko frakcji liposomowej) co wskazuje na oddziaływanie białka z błoną liposomową. Do badań Doktorant używał białka rekombinowanego otrzymanego poprzez ekspresję w komórkach bakteryjnych.

Recenzent ma następujące pytania w związku z powyższymi badaniami:

- w jakich frakcjach gradientu sacharozy znajdują się liposomy? Jeżeli nie przeprowadzono tej analizy, to jakie są dane literaturowe w przypadku liposomów o składzie podobnym do używanych?
- jakie mogą być różnice w budowie/modyfikacjach pomiędzy białkiem MPP1 znajdującym się w erytrocytach, a białkiem używanym przez Doktoranta?
- czy Doktorant przeprowadził badania przy użyciu błon modelowych w fazie ciekłej-nieuporządkowanej? Słabsze oddziaływania białka z takimi błonami, w porównaniu z błonami zawierającymi zarówno obszary ciekło-nieuporządkowane jak i ciekło-uporządkowane, wskazywałyby na preferencyjne oddziaływania białka MPP1 z fazą ciekło-uporządkowaną dwuwarstwy lipidowej w błonie plazmatycznej.

Kolejna praca doświadczalna [Elderdfi M. and Sikorski A.F. (2018): Interaction of MPP1 with model lipid membranes. *General Physiology and Biophysics*. (Accepted)] przynosi kontynuację badań oddziaływań białka MPP1 z błonami modelowymi. Doktorant użył w badaniach zarówno mutantu MPP1 naśladującego palmitoilowany MPP1 (mutant C242F), jak i używanego we wcześniejszej pracy białka zrekombinowanego. W pracy jest stosowanych kilka technik pomiarowych:

- badania spektrofluorescencyjne techniką FRET, z wykorzystaniem występującego w cząsteczce białka naturalnej fluorescencji tryptofanu (jako donora) oraz występującej na powierzchni liposomów grupy dansylowej (jako akceptora), przyłączonej do błony liposomowej poprzez fosfolipid. Wyznaczone wartości stałej dysocjacji K_D były podobne dla obu białek, co wskazuje, iż palmitoilacja białka może mieć niewielki wpływ na powinowactwo białka MPP1 do dwuwarstwy lipidowej. Doktorant doszedł do podobnych wniosków w przypadku pomiarów napięcia powierzchniowego monowarstw.
- badania zmian napięcia powierzchniowego monowarstw lipidowych w czasie, pod wpływem białka MPP1. Badania te wykazały adsorpcję białka MPP1 do powierzchni monowarstwy, inhibicję adsorpcji w wyniku pre-inkubacji białka MPP1 z cholesterolem, a także wpływ heterogenności błony na adsorpcję białka.
- badania spektrofluorescencyjne zmian parametru uogólnionej polaryzacji światła przy użyciu sondy Laurdan wbudowanej do liposomów. Badania te wykazały, że białko MPP1 wpływa na organizację błony liposomowej w przypadku, gdy zawiera ona zarówno obszary ciekło-uporządkowane jak i ciekło-nieuporządkowane.
- badania wpływu flotyliny (charakterystyczne białko tratw membranowych) na oddziaływanie białka MPP1 z błonami liposomowymi (przy użyciu metody flotacji liposomów) oraz z monowarstwą lipidową. Badania te wykazały, że obecność flotyliny nie wpływa na wiązanie się białka MPP1 ani do dwuwarstwy ani do monowarstwy lipidowej.

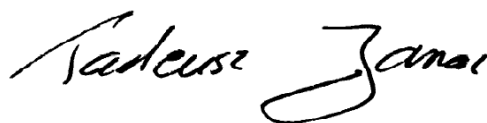
Recenzent ma następujące pytania w związku z powyższymi badaniami:

- w jaki sposób i w oparciu o jakie wzory Doktorant liczył stałe dysocjacji? W rozprawie nie występują wzory na obliczanie K_D .
- w legendzie rysunków o numerach od 2 do 7 występuje jedynie nazwa „MPP1”. Czy chodzi o natywne białko występujące w erytrocytach, czy białko zrekombinowane, czy też białko-mutant?
- w streszczeniu w artykule nr 3 (str 34) występuje nazwa „wild-type MPP1”. Czy chodzi o natywne białko występujące w erytrocytach, czy białko zrekombinowane?
- inhibicja adsorpcji białka do monowarstw przez cholesterol: czy Doktorant przeprowadził badania kontrolne wpływu samego cholesterolu na napięcie powierzchniowe monowarstwy wstrzykując zawiesinę cholesterolu bez białka do roztworu wodnego pod monowarstwą?

Ostatnia z publikacji składających się na rozprawę doktorską [Elderdfi M. and Sikorski A.F. (2018): Langmuir-Monolayer Methodologies for Characterizing Protein-Lipid Interactions. Chemistry and Physics of Lipids 29, 61-72] (występująca jako artykuł nr 1) jest pracą przeglądową zawierającą bardzo szczegółowy opis metodyki badań monowarstw lipidowych. Znaczna liczba rysunków i wzorów ułatwia zrozumienie metodyki i pozwala na ilościową analizę danych. Ponieważ Doktorant w badaniach eksperymentalnych (artykuły nr 2 i 3) używał techniki monowarstw Langmuira, dlatego praca ta może stanowić integralną część rozprawy doktorskiej jako opis metodyczny badań.

Oceniam pozytywnie rozprawę doktorską mgra Mohameda Elderdfi. Doktorant przeprowadził wiele pracochłonnych analiz, dokonał analizy wyników, i w efekcie otrzymał wartościowe dane wskazujące na bezpośrednie oddziaływanie białka MPP1 z dwuwarstwą lipidową błony plazmatycznej erytrocytów.

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona przez mgra Mohameda Elderdfi rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom Ustawy o stopniach i tytule naukowym, a dorobek naukowy kandydata uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia. Zwracam się do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie magistra Mohameda Elderdfi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Tadeusz Janas

Załącznik nr 1
Skrót recenzji w języku angielskim

The review of the doctoral (Ph.D.) thesis of Mohamed Elderdfi
„Interaction of MPP1 with membrane lipids with respect to the regulation of lateral membrane
organization”

Faculty of Biotechnology, University of Wrocław
Thesis advisor prof. dr hab. Aleksander Sikorski

My evaluation of the Ph.D. thesis of Mohamed Elderdfi is positive. He performed a lot of biophysical experiments, analyzed the results, and got strong data supporting his new idea of the direct interaction of MPP1 protein with the lipid bilayer part of the plasma membrane.

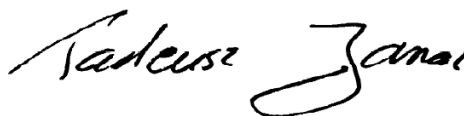
In my opinion this thesis fulfills all the requirements for the Ph. D. thesis in biological sciences, scientific discipline biotechnology, therefore I ask the Council of the Faculty of Biotechnology of the University of Wrocław to accept this thesis and admit Mohamed Elderdfi for further stages of the doctorate procedure.

Questions for Article nr 2:

- which fractions of the sucrose gradient the liposomes are located in? If this analysis was not performed, what are the literature data in the case of liposomes of lipid composition similar to liposomes used in this study?
- what differences in protein structure/modifications are possible between the native MPP1 protein in erythrocyte and the recombinant MPP1?
- have any experiments been made for liposomes in the liquid-disordered state? The changes in the interaction between MPP1 protein and liposomes in the liquid-disordered state, in comparison with liposomes containing both liquid-ordered and liquid disordered regions, would indicate the preferential binding of MPP1 protein to liquid-ordered phase.

Questions for Article nr 3:

- how were the dissociation constants calculated? What are the equations for these calculations? There are no any equations for K_D calculation within the thesis.
- there is a name “MPP1” in the legends of figures 2 – 7. What is the meaning of this name: a native MPP1 from erythrocytes, a recombinant protein, or a mutant protein?
- there is a name „wild-type MPP1” in the Abstract of the article no. 3 (p. 34). What is the meaning of this name: the native MPP1 from erythrocytes or a recombinant protein?
- Inhibition of binding of MPP1 to lipid monolayers by cholesterol: have any control experiments been performed to evaluate the effect of cholesterol suspension on the surface pressure of the lipid monolayer after addition of the cholesterol suspension into the subphase?



Prof. dr hab. Tadeusz Janas
University of Opole