



Prof. dr hab. Janina Gabrielska

Wrocław, 15.05.17 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Magister **Karoliny Sapoń** pt. „Rola polimerów kwasu sjałowego w modulowaniu właściwości błon modelowych” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Janas na Wydziale Przyrodniczo-Technicznym w Katedrze Biotechnologii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Opolskiego i przedstawiona Radzie Wydziału Przyrodniczo-Technicznego na tym Uniwersytecie.

Polimery kwasu sjałowego (polySia), substancje będące przedmiotem badań w tej rozprawie, biorą udział w szeregu procesach komórkowych takich jak m.in. migracja i różnicowanie komórek, występują również w komórkach nerwowych mózgu embrionów ssaków. Funkcje biologiczne polySia, obejmują między innymi modulację migracji komórek nerwowych, wzrostu aksonów oraz tworzenie synaps. W dorosłym organizmie polySia wpływają też na plastyczność układu nerwowego w tym przebudowę połączeń nerwowych oraz wzrost neuronów. Łańcuchy polySia występują również na kanałach sodowych oraz potasowych zmieniając potencjał membranowy wymagany do ich aktywacji. Występując na powierzchni szeregu komórek nowotworowych najprawdopodobniej biorą udział, poprzez działania antyadhezyjne, w procesie odrywania komórek nowotworowych, ich migracji, inwazji oraz w tworzeniu przerzutów. Uważa się, że obecność polySia może chronić komórki nowotworowe przed układem immunologicznym oraz ułatwiać przejście bariery krew-płyn mózgowo rdzeniowy w celu infekowania centralnego układu nerwowego. Wpływają także na neuro-inwazyjny potencjał chorobotwórczych szczepów bakterii *Escherichia coli* K1 oraz *Neisseria meningitidis* grupy B oraz C. Wywołują, w przypadku tych drugich bakterii zapalenie opon mózgowych. Wobec tak szerokiego spektrum funkcji, jakie spełniają polySia w różnych procesach biologicznych i niepoznanych jak do tej pory molekularnych mechanizmów je wyjaśniających, badania podjęte w tej pracy wychodzą naprzeciwko tym wyzwaniom.

#### **Merytoryczna ocena pracy:**

Przedstawiona do recenzji praca napisana jest zgodnie z wymogami stawianymi pracom doktorskim. Układ pracy jest klasyczny z wyodrębnionymi podstawowymi rozdziałami i następnie podrozdziałami, co czyni pracę czytelną. Napisana jest językiem poprawnym i zrozumiałym, chociaż spotykane są „skrótowe myślowe”, co w pracach naukowych nie zawsze przynosi pozytywny efekt. Jest zwięzła, a poszczególne jej rozdziały tworzą logiczną i spójną sekwencję. Liczy 132 strony, na które składa się 5 rozdziałów oraz Wnioski, Bibliografia i Streszczenie - w języku polskim i angielskim. Bogaty spis piśmiennictwa liczy 211 pozycji, z czego ok. 26 % pochodzi z ostatnich 5 lat.



W pierwszym rozdziale rozprawy doktorskiej pt. **Założenia i cel pracy** Autorka wprowadza krótko w zagadnienia podjęte do rozwiązania, uzasadniające cel badań. Stwierdza, że istnieje wiele pytań dotyczących oddziaływań polimerów kwasu sjałowego z błonami komórek, w szczególności brakuje wiedzy, gdy chodzi o błony lipidowe, będące w fazie ciekło - uporządkowanej, które są mikro-domenami zwanymi tratwami. Trochę przewrotnie sformułowała hipotezę badań, ponieważ apriori stwierdza cyt. „Hipotezą badawczą jest to, że uporządkowanie lipidów w błonie moduluje oddziaływania polySia z błonami modelowymi oraz, że ujemnie naładowane łańcuchy tych polimerów modulują właściwości błon i wpływają na procesy dynamiczne z udziałem lipidów błonowych”. W mojej opinii należałoby zmienić nacisk tej hipotezy, stawiając pytanie do rozwiązania, (co zresztą uczyniła Autorka w toku badań) „...czy uporządkowanie molekularne w błonie moduluje sposób oddziaływania polySia....., oraz ...czy ujemnie naładowane łańcuchy polimerów ....?”. Stąd planowane szczegółowe pytania do rozwiązania można by nieco zmodyfikować o formę - Czy istnieją związki i jakie... w sześciu obszarach zagadnień postawionych do rozwiązania (str. 6/7). Sądzę, że ten pierwszy rozdział (**Założenia i cel pracy**) korzystniej byłoby zamieścić po **Wstępie literaturowym** a na początku rozprawy jej **Streszczenie**. Doktorantka zamieściła następnie dobrze opracowaną część teoretyczną (**Wstęp literaturowy** - 42 strony), stanowiącą charakterystykę między innymi właściwości zarówno kwasu sjałowego jak i jego oligo- i polimerów oraz stan wiedzy dotyczący funkcji, jakie spełniają one w szeregu procesów komórkowych. Część opracowania dotyczyła zagadnień związanych z różnorodnością lipidów w błonach biologicznych także w aspektach ich rozmieszczenia i samoorganizacji w różnych stanach fizycznych, ruchliwości molekularnej oraz roli w generowaniu właściwości elektrycznych błon komórkowych. Są to istotnie informacje literaturowe i dobrze ukierunkowane, bo pozwalają czytającemu na osadzenie w temacie i uzmysławiają rozpiętość zagadnień pozostających do poznania i rozwiązania chociażby cząstkowego. Tak zestawiony przez Autorkę przegląd literatury był uzasadnieniem, zarówno do sformułowanej hipotezy badawczej jak i dla zaprojektowanych badań dla jej zweryfikowania.

Uważam, że tytuł pracy jest adekwatny do postawionego celu pracy i został sformułowany prawidłowo a przedstawione zagadnienia do rozwiązania wielowątkowe i ważne. Moim zastrzeżeniem do tej części pracy doktorskiej jest fakt przekopiowania niektórych rysunków bezpośrednio z cytowanych publikacji, przez co nie są autorskie i dodatkowo przedstawione w niskiej rozdzielczości (np. Rysiny: 19, 24, 27 oraz 29). W przypadku danych w Tabeli 2, korzystne byłoby zdefiniowanie zestawionych współczynników S – uporządkowania łańcuchów i D –współczynnika dyfuzji lateralnej, które są pokrótce omawiane na str. 40/41 rozprawy.



Rozpoczęcie opisu wyników badań przez Doktorantkę poprzedził rozdział **Materiały i metody badawcze** (19 stron), który został poprawnie opracowany. W badaniach zastosowano nowoczesne metody badawcze mieszczące się w wysokich standardach badań naukowych - metody: spektroskopii konfokalnej i techniki przeniesienia energii FRET z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych. Mam w związku z tym drobne uwagi i pytania dotyczące tego rozdziału, a mianowicie:

1. Nazwy stosowanych sond podano w języku angielskim zamiast, tak jak zrobiono w przypadku lipidów, w języku polskim.
2. We wzorze 3 brakuje doprecyzowania znaczeń  $\Delta F$  i  $\Delta F_{\max}$  – jakie różnice fluorescencji Autorka ma na myśli?
3. Prawie wszystkie wymieniane wartości fizyczne w rozprawie pisane są łącznie (bez spacji) z mianem zamiast z odstępem np. str. 56 – stężenie 1,2mM zamiast 1,2 mM; 59 –  $\lambda = 488\text{nm}$  zamiast 488 nm
4. Str. 61, Brak podania temperatury hydratacji liposomów trójskładnikowych.
5. Str 65 akapit cyt. Zmniejszenie się dodatniego potencjała dipolowego dwuwarstwy lipidowej powoduje przesunięcie widma ku czerwieni...” – ten fragment należałoby umieścić w Dyskusji wyników
6. Brakuje informacji dotyczącej statystyki pomiarów i opracowania statystycznego wyników np. dotyczy to zagadnień w rozdziale 2.3.2 oraz 2.4 pozwala wyrobić poglądu na temat stopnia wartości przedstawionych wyników.
7. Przykład niezręczności językowej: str 12 – Kolejnym przykładem struktur, które wiążą się do błony są glikosfingolipidy – niezręczność słowa „struktur” zamiast np. molekuł, biomolekuł, cząsteczek.
8. Cytowania dotyczące niektórych preparatyk i metod badawczych są z ostatnich lat, a przecież są wzorowane na wcześniejszych pracach, stąd w mojej opinii brakuje zacytowania prac źródłowych. Dotyczy to dla przykładu podrozdziałów 1.8; 1.11 – wzór van't Hoffa.

Kolejne dwa rozdziały: **Omówienie wyników i Dyskusja**, przedstawiono na odpowiednio 28 i 10 stronach znormalizowanego tekstu wraz z tabelami i rysunkami. Wykresy i Tabele zamieszczone w pracy są poprawnie opracowane jedynie w podpisach brakuje podstawowej informacji np. o temperaturze pomiaru czy liczbie powtórzeń.

Omówienia wyników dokonano systematycznie i szczegółowo. W ich ramach istotne osiągnięcia Doktorantki wynikają z kilku zagadnień, które rozwiązała. Dwa pierwsze zagadnienia to wykazanie istnienia zależności pomiędzy zdolnością do wiązania się polySia z błoną lipidową a stanem jej molekularnego uporządkowania oraz rolą kationów  $\text{Ca}^{2+}$  w tym procesie. Wykazała między innymi, że największe powinowactwo polySia ma miejsce do błon charakteryzujących się wysokim uporządkowaniem, czyli faz: żelu i ciekło-uporządkowanej. Autorka rozprawy przeprowadziła także (w części Dyskusja) racjonalne wyjaśnienie asocjacji polimerów z dwuwarstwą oraz roli jonów  $\text{Ca}^{2+}$  zwiększających ten proces w wyniku najprawdopodobniej tworzenia mostków (lipid- $\text{Ca}^{2+}$ -lipid), w polarnym, powierzchniowym rejonie błony. Skutkuje to Jej zdaniem wprowadzeniem dodatniego ładunku, ułatwiającego wiązanie się ujemnych polimerów kwasu sjałowego do tak zmodyfikowanej



elektrostatycznie błony. Rezultaty tych badań, mogą przyczynić się do wyjaśnienia molekularnych procesów łączenia komórki jajowej z plemnikiem u jeźwoców, u których w błonie główki plemnika występują tratwy lipidowe. Mogą one uczestniczyć w procesie fuzji komórkowej. Adsorpcja polySia do tratw lipidowych (fazy ciekło-uporządkowanej), wykazana w tej rozprawie, może być jednym z początkowych elementów ciągu zdarzeń, które prowadzą do fuzji komórki jajowej z plemnikiem.

W innym aspekcie badań podjętych w rozprawie Doktorantka dowiodła, istnienie dodatniej korelacji pomiędzy ilością polimerów kwasu sjałowego w dwuwarstwie lipidowej a indukcją przez jony  $Ca^{2+}$  fazy heksagonalnej odwróconej, jako fazy przejściowej, niezbędnej w procesach fuzji komórkowej oraz wykazała możliwości ułatwiania/przyspieszania tego procesu. Takie właściwości modulacyjne polySia w odniesieniu do np. fuzji z komórkami nowotworowymi mogą przyczynić się do wyjaśnienia ich roli w zwiększaniu potencjału inwazyjnego i przerzutowego nowotworów oraz w innych zjawiskach takich jak transport komórek bakteryjnych *E.coli* K1 przez barierę krew-mózg.

Znaczącym osiągnięciem Autorki rozprawy w kolejnym aspekcie badań było określenie roli polySia w generowaniu potencjału dipolowego błon lipidowych. Wykazała, że obniżają one potencjał dipolowy błon w zakresie od 15% do 5%, zależnie od stopnia ich molekularnego uporządkowania. W przypadku mikrodomen zwanych tratwami błon plazmatycznych, z którymi zasocjowane są białka sygnalizacyjne, zmiany potencjału dipolowego mogą skutkować zmianami konformacyjnymi tych białek zarówno w obrębie tej samej tratwy błonowej jak również pomiędzy domenami międzykomórkowymi. Są to procesy oddziaływania molekularnego, które są kluczowe dla wyjaśnienia między innymi tworzenia dendrytów i aksonów oraz komórek pewnych nowotworów. Istotne mogą być także zależności odkryte w badaniach prezentowanych w tej rozprawie pomiędzy modulacją potencjału dipolowego przez polimery kwasu sjałowego a potencjałem błonowym w kontekście wpływu na funkcjonowanie pomp jonowych na poziomie organizmu. Może to skutkować zmianami konformacyjnymi kanałów jonowych, od których zależą ich parametry elektryczne jak również możliwym zwiększeniem energii aktywacji potrzebnej do wniknięcia jonu do pomp jonowych. Z obowiązku podam uchybienia, jakie zauważyłam podczas czytania opracowanego rozdziału **Omówienie wyników**:

1. Str. 71 - Ryc. 8 – przedstawiony na niej elektroforetyczny rozkład długości polimerów kwasu sjałowego – jest niejednoznaczny (rozmyty) – można go dopracować np. za pomocą strzałek wskazujących miejsca pojawienia się paska niebieskiego.
2. Str. 80 – Ryc. 15 – Jak należy rozumieć informację w podpisie „...sondy Pacific Blue lokującej się w fazie ciekło-uporządkowanej i ciekło-nieuporządkowanej...” w kontekście podpisu pod Ryc. 13, gdzie tę sondę stosowano do wizualizacji tylko fazy ciekłej-nieuporządkowanej?



3. Jakie są rozmiary pęcherzyków olbrzymich (Ryc.11-15)? Czy na podstawie wizualizacji przedstawionych na Ryc. 14 i 15 można oszacować wielkości mikro-domen zwanych tratwami?
4. Rozdział 2.3.2. W mojej opinii zamieszczenie wizualizacji izotermy Langmuira i przedstawienie sposobu wyznaczenia  $K_D$  oraz wyjaśnienie relacji pomiędzy stałymi wiązania i dysocjacji (?) oraz zestawienie wyników w tabeli, dotyczących wpływu kationów  $Ca^{2+}$  na stałe wiązania kwasu Sia i jego polimerów znacząco rozjaśniłoby i wzbogaciło opracowanie.
5. Str. 92 - Ryc. 21- Podpis pod rysunkiem niewłaściwy, ponieważ przedstawiona jest „Zależność parametru R sondy RH 421 od temperatury dla dwuwarstwy DPPC” a nie „Przejście fazowe...” We fragmencie opracowania pomiędzy Ryc. 21 i 22 należałoby pamiętać i używać sformułowania „zmiany entalpii przejścia fazowego” a nie entalpii przejścia fazowego. W podpisach Ryc. 22 a także wcześniejszych Rycinach 10, 17 należy używać sformułowania cyt. „...z zaznaczoną niepewnością pomiaru...” a nie z zaznaczonym błędem pomiaru.”

Bardzo ważnym rozdziałem każdej pracy naukowej, w tym dysertacji doktorskiej, jest **Dyskusja** (10 stron), która została oddzielona od omówienia wyników badań, co sprawiło, że przeprowadzona została bardzo rzetelnie z zachowaniem chronologii do opisanych wyników badań. Zasluguje na szczególną pochwałę. Doktorantka z dużą starannością i dojrzałością naukową omawia uzyskane wyniki na tle dobrze dobranej literatury. W rozdziale **Wnioski** znalazło się 7 wniosków. Sądzę, że byłoby korzystniej zatytułować ten rozdział **Podsumowanie i Wnioski**, ponieważ kilka z tych wniosków - dotyczy to punktów 1, 2, 3 i 5 stanowi jedynie podsumowanie otrzymanych rezultatów. Nowe i istotne informacje, jakie wniósł doktorat do nauki sformułowane zostały w punktach 4, 6 i 7, które są w mojej ocenie właściwymi wnioskami. W rozdziale **Streszczenie** rozprawy (2 strony) jasno i chyba zbyt szeroko zawarto uzasadnienie podjętych badań, natomiast bardzo lakonicznie odniesiono się do uzyskanych wyników i osiągnięć, jakie wynikają z przeprowadzonych badań.

Rozprawa napisana jest starannie, także stronę graficzną pracy oceniam wysoko, Pozwala to na jednoznaczną ocenę przedstawionych wyników. Z obowiązku podam jeszcze drobne uchybienia, jakie zauważyłam podczas czytania końcowych części rozprawy, także te, które sygnalizowałam już wcześniej:

1. Zdanie końcowe w **Streszczeniu** jest niezrozumiałe, bo niezręcznie sformułowane. Należałoby je sformułować np. w postaci 2 zdań. Cyt. „Badania opisane w niniejszej pracy po raz pierwszy wskazują na istotną rolę uporządkowania lipidów na oddziaływanie łańcuchów polimerów kwasu sjałowego z błonami oraz jego roli w modulowaniu wybranych właściwości błon”. Co Autorka miała na myśli w końcowej części tego zdania?
2. W różnych miejscach pracy używano skrótu słów „polimerów kwasu sjałowego” ( polySia) niesłusznie w liczbie pojedynczej np. str. 110 pkt. 4,5 i 7 (polySia ..obniża energię, ..może wpływać, ...może modulować, ...ułatwia proces fuzji); str. 132 PolySia..bierze udział, ...na kanałach sodowych zmienia)
3. **Wnioski** (str. 108) 1-6 pisano w formie bezosobowej, wniosek 7 – w mianowniku formy osobowej.
4. Str. 127 i 128 – W części **Objaśnienia użytych skrótów** znalazły się dwa niedociągnięcia w nazewnictwach, a mianowicie a) GalNAc – N-acetylogalaktozoamina zamiast N-acetylogalaktozamina.; b) GluNAc- N-acetyloglukozoamina zamiast N-acetyloglukozamina.



5. Pozycje zacytowane pod Rycinami: 15, 17, 19, 20, 24, 27 nie są źródłowymi. W części tych Rycin zostały przedstawiano wzory strukturalne podstawowych molekuł lipidowych znanych od bardzo dawna - lepiej wtedy zacytować podręcznik np. Albert'sa, jak zrobiono to w przypadku Rycin 16 i 23, na innych przedstawiono układy modelowe związane z samoorganizacją lipidów, które zostały opisane pod koniec ubiegłego wieku Kruiff i współ., 1985; Lewis i in. 1997; Israelachvilli, 1992, Cevc 1991, Huang i Li, 1991; Simons i Ikonen, 1997)

### Wnioski końcowe

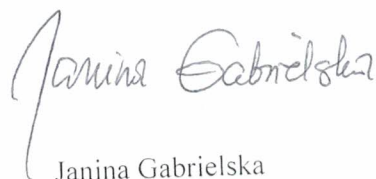
Oceniana praca ma charakter interdyscyplinarny. Założenia badawcze oparto na głębokim studium literaturowym (211 pozycji). Podsumowując rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Sapoń stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja jest profesjonalnie przygotowana pod względem merytorycznym i językowym. Zauważyć należy staranne wykonanie, z dużym nakładem pracy, wielu pomiarów. Tak duża ilość różnorodnych metod pomiarowych a tym samym wyników badań mogły być wykonane i opracowane przez Doktorantkę jedynie dzięki Jej pracowitości i zaangażowaniu. Występują nieliczne usterki dotyczące sformułowań bądź błędy literowe. Niektóre z nich dla poprawy, względnie sugestie, zamieściłam w recenzji, część zaznaczyłam w tekście pracy. Uwagi te jednak nie mają bezpośredniego wpływu na merytoryczną wartość pracy, mogą natomiast posłużyć bezpośrednio podczas przygotowania otrzymanych wyników do opublikowania. Doktorat jest znaczącym dorobkiem naukowym Autorki. W szczególności rozprawa posiada elementy nowości naukowej i stanowi oryginalny wkład do wiedzy podstawowej w zakresie wyjaśnionych mechanizmów, o których pisałam wcześniej. Pracę doktorską oceniam na bardzo dobry. Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Przyrodniczo-Technicznego wnioski o jej wyróżnienie nagrodą. Należy podkreślić, że Doktorantka jest już współautorem trzech artykułów znajdujących się w wykazie A listy czasopism MNiSZW. Zamieszczone zostały w wysoko punktowanych czasopismach w latach 2016, 2015 oraz 2013. (FEBS Letters, BBA, CMBL). IF tych artykułów wynosi 8,96 i jest równoważny 80 punktom z listy MNiSW (liczba współautorów – 7). Wyniki swoich prac Doktorantka zaprezentowała także na 5 konferencjach w formie referatów. Odbyla trzy staże 3 miesięczne w Zakładzie Cytobiologii na Wydziale Biotechnologii UW, co pozwoliło Jej na zdobycie wielu kompetencji i otrzymaniu wyników badań eksperymentalnych na wysokim światowym poziomie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki badań uzyskane na lipidowych błonach modelowych w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej są kontynuowane w aspekcie badań właściwości anti-kancerogennych i anti-proliferacyjnych polySia na komórkach nowotworowych w ramach grantu badawczego Preludium 9, finansowanego przez NCN (2015-2017), którego kierownikiem jest Doktorantka i jest dowodem na to, że zdobył uznanie Recenzentów i był przez nich wysoko oceniony.



UNIWERSYTET  
PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU

KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona przez mgr Karolinę Sapoń rozprawa w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (ustawa z dnia 14.03.2003 o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki - Dz. U. nr 65, poz. 595). Wobec powyższego przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Przyrodniczo-Technicznego Uniwersytetu Opolskiego wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr Karoliny Sapoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Janina Gabrielska