



17 października 2016 r.

Dr hab. prof. nadzw. Joanna Boncela

Pracownia Proteomiki Komórkowej

Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Ocena pracy doktorskiej **mgr Anny Selmi**

„Wpływ tymozyny beta 4 na funkcjonowanie komórek śródbłonka”

Pani mgr Anna Selmi swoją karierę naukową rozpoczęła w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Medycznej, a następnie kontynuowała w Zakładzie Cytobiologii i Proteomiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W obu Zakładach Doktorantka dostała szansę wykonania swojej pracy doktorskiej w uznanych na świecie zespołach badawczych, od lat regularnie publikujących swoje prace w czołowych czasopismach naukowych. Realizacja pracy doktorskiej w takich zespołach stawia przed Doktorantką oczekiwania rozwiązania istotnych problemów naukowych oraz wniesienia znaczącego wkładu w badane przez nią zagadnienia. Z drugiej strony Doktorantka miała do dyspozycji bogaty, wyszukany warsztat badawczy, niezbędną aparaturę naukową i co najważniejsze, wiedzę i doświadczenie naukowe promotora oraz członków zespołu. Bardzo miło mi, jako recenzentowi, po lekturze pracy doktorskiej stwierdzić, że te wysokie oczekiwania zostały spełnione. Pozostaje mi mieć nadzieję, że doktorantka w przyszłości wykorzysta efektywnie i z pożytkiem dla swojej kariery naukowej umiejętności nabyte w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pracę doktorską Pani mgr Anny Selmi stanowi zbiór trzech, spójnych tematycznie prac eksperymentalnych o sumarycznym współczynniku cytowalności $IF > 9$. Doktorantka jest

pierwszą autorką jednej pracy, ale dołączone oświadczenia współautorów nie pozostawiają żadnych wątpliwości co do jej samodzielnej roli w realizacji wybranych badań w dwóch pozostałych pracach. W pierwszej pracy opublikowanej w *Experimental Cell Research* doktorantka podjęła próbę opisanie mechanizmów zaangażowanych w proces migracji komórek śródbłonna zachodzącej pod wpływem tymozyny beta 4. Kolejna praca opublikowana w *Annals of the New York Academy of Science* jest szerokim omówieniem badań zespołu nad rolą tymozyny beta 4 w migracji komórek, natomiast ostatnia praca, opublikowana w *Protein Expression and Purification* dotyczy otrzymywania i właściwości rekombinowanej formy tymozyny beta 4.

Tymozyna beta 4 to białko o szerokim zakresie działania, zaangażowane w szereg procesów biologicznych, min. gojenie się ran, regenerację skóry, dojrzewanie komórek macierzystych, i dlatego też od wielu lat pozostaje w kręgu zainteresowań wielu grup badawczych jako cząsteczka, która potencjalnie może być wykorzystana w medycynie regeneracyjnej. Najważniejszą oraz dotychczas najlepiej opisaną funkcją tymozyny beta 4 jest kontrola polimeryzacji aktyny. W ostatnich latach coraz większa liczba badań dostarcza dowodów na to, że tymozyna beta 4 może wykazywać działanie zewnątrzkomórkowe, a jej aktywność w komórce nie dotyczy tylko aktyny. Prace składające się na rozprawę Pani mgr Anny Selmi wpisują się doskonale w ten nurt badawczy.

W pierwszej z ww. prac Doktorantka podjęła ambitną próbę zidentyfikowania mechanizmu, który wykorzystywany jest przez tymozynę beta do zwiększenia tempa migracji komórek śródbłonna, stawiając sobie za cel sprawdzenie czy tymozyna beta 4, podana zewnątrzkomórkowo, wpływa na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia. Cel pracy został sformułowany w oparciu o dostępne dane literaturowe oraz wcześniejsze prace zespołu promotora. Aby zweryfikować hipotezę badawczą Doktorantka do eksperymentów użyła pierwotnych komórek śródbłonna izolowanych z żyły pępowinowej. Taki model badawczy znacznie podnosi wiarygodność uzyskanych wyników. W swoich badaniach Doktorantka zastosowała standardowe, aczkolwiek wymagające dużej wprawy i zastosowania specjalistycznej aparatury, metody do badań właściwości komórek śródbłonna. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że efekt stymulacji komórek śródbłonna przez tymozynę beta 4 nie zależy od zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Identyczne wyniki uzyskano również w przypadku linii komórek śródbłonna - EA.hy926 oraz gruczolakoraka okrężnicy - HT29. Ponadto zastosowanie w pracy zmutowanych form tymozyny beta pokazało, że promigracyjne funkcje tymozyny beta 4 nie są związane z procesem kontroli polimeryzacji

aktywny. Dyskusja w pracy przeprowadzona jest w sposób bardzo profesjonalny, świadczący o świetnej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki badań.

Kolejna praca z udziałem Doktorantki to podsumowanie aktualnej wiedzy na temat mechanizmów przekazywania sygnałów indukowanych przez zewnątrzkomórkową tymozynę beta 4. Publikacja ta stanowi szerokie omówienie zagadnień i koncepcji weryfikowanych w poprzedniej pracy i jest ilustrowana wynikami własnymi zespołu.

Warto podkreślić, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę wskazują, że tymozyna beta 4 jest szybko internalizowana przez komórki, co może być dowodem na poparcie tezy, że tymozyna beta 4 realizuje swoje funkcje wewnątrz komórek po związaniu się do innych białek, które stanowią jej wewnątrzkomórkowy receptor. W tym miejscu, jako recenzentowi, nasuwa mi się pytanie: czy Doktorantka nadal uważa, że to najbardziej prawdopodobna teza i dlaczego ?

W ostatniej pracy stanowiącej treść rozprawy doktorskiej, która dotyczy otrzymywania rekombinowanej formy tymozyny beta 4 z bakterii *E.coli*, na podkreślenie zasługuje dobre opanowanie i wykorzystanie warsztatu badawczego przez Doktorantkę, oraz umiejętność doboru właściwych kontroli eksperymentów i weryfikacji uzyskanych wyników. Aby zaspokoić w pełni moją ciekawość chciałabym wiedzieć: **czy Doktorantka zna dalsze losy otrzymanego preparatu tymozyny beta 4, czy jest wykorzystywany tylko w badaniach naukowych czy znalazł inne zastosowanie ?**

Na zakończenie z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi oraz sugestie dotyczące głównych rozdziałów rozprawy.

- W rozdziale *Spis skrótów użytych w tekście* Doktorantka wykazała się pewną niekonsekwencją, a mianowicie część skrótów pozostawiła w języku angielskim, tj. IQGAP1 lub Rac1, a część przetłumaczyła na język polski. Przyznaję, że niektóre nazwy trudno jest przetłumaczyć, ale można je przecież podać w sposób opisowy, tak jak, np. Doktorantka zrobiła to w przypadku białka NF- κ B, określając je jako czynnik transkrypcyjny. Ponadto nieprecyzyjnie lub błędnie podano inne polskie rozwinięcia skrótów, np. podłoża DMEM, białka c-Fos czy PI3K.
- We wstępie pracy w moim odczuciu, Doktorantka nieprawidłowo rozłożyła akcenty, poświęciła za dużo uwagi i miejsca na budowę i strukturę tymozyny beta 4. Tematem pracy nie są przecież badania strukturalne, ale funkcjonalne tymozyny beta 4.

- Cele pracy zostały sformułowane poprawnie, choć moim zdaniem cel 1 jest przedstawiony zbyt ogólnie, bo pokrywa się właściwie z tytułem rozprawy, zastanawia mnie również czy cel 2 i 3 nie mogłyby być sformułowane jako jeden punkt.
- W rozdziale *Materiały i metody* Doktorantka nie uniknęła kolokwializmów i wyrażeń żargonowych, np. „ komórki uległy migracji”, „ nadmiar białka był odmywany”, „komórki wysiewano”. Ponadto Doktorantka nieprawidłowo opisała używane w pracy komórkowe modele badawcze, w punkcie *Hodowla komórkowa* do opisu zarówno linii komórkowej EA.hy926 oraz komórek izolowanych z żyły pępowinowej (HUVEC) użyła stwierdzenia linia komórkowa, co jest błędem.
- Nieprawidłowy opis w/w modeli komórkowych został również zastosowany w rozdziale *Omówienie wyników i dyskusja*. Inne uwagi dotyczące tego rozdziału to określenie (str.21), „... coraz więcej sygnałów wskazuje, że...” Doktorantka miała na myśli zapewne doniesienia lub prace, kolejne określenie, że receptor P2X4 „reaguje na ATP”(str.23), receptor wiąże ATP lub ATP wiąże się do/z receptorem, stwierdzenie (str.24), że nadekspresja tymozyny beta 4 w linii komórkowej HeLa „... może mieć znaczenie w utrzymaniu procesu apoptozy komórek wywołanej przez paklitaksel (PXL)...”. Apoptoza jest procesem zabójczym dla komórek i może być indukowana lub hamowana. Nieprecyzyjne jest również zdanie (str.24) „Tymozyna beta 4 wydaje się pobudzać promotor PAI-1”. Promotory genów są aktywowane przez różne czynniki.
- W podsumowaniu w pkt.4 Doktorantka używa stwierdzenia, że „ Różnice w oddziaływaniu na komórki śródbłónka pomiędzy tymozyną beta 4 syntetyczną, a rekombinowaną są niewielkie”. Moim zdaniem jest to sformułowanie nieprecyzyjne, czytelnik nie wie czy istotne czy nie ? Poza tym w rozdziale *Omówienie wyników i dyskusja* Doktorantka napisała, że w przypadku peptydu rekombinowanego obserwowany efekt adhezji komórek był 10-15% większy niż peptydu syntetycznego. Czy zatem można powiedzieć, że oba preparaty wykazują identyczną aktywność czy nie?

Powyższe uwagi nie umniejszają jednak wartości przedstawionej mi rozprawy. Mam nadzieję, że Doktorantka przyjmie je jako cenne wskazówki, przydatne w jej dalszej karierze naukowej.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Anny Selmi uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i wartościowe wyniki. Ponadto stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Anny Selmi spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz.595 z późn.zm.).

Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi dopuszczenie mgr Anny Selmi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. prof. nadzw. Joanna Boncela

