



WYDZIAŁ
BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Łódź 14 października 2016 r.

Wanda Małgorzata Krajewska
Katedra Cytobiochemii UŁ

O C E N A

pracy doktorskiej mgr Anny Selmi

pt. *Wpływ tymozyny beta 4 na funkcjonowanie komórek śródbłonka*

Badania przedstawione w recenzowanej rozprawie, zainicjowane przez profesora Czesława Cierniewskiego, dotyczą 43-aminokwasowego peptydu wiążącego globularne monomery aktyny G i regulującego jej polimeryzację, tj. tymozyny beta 4, w kontekście indukcji migracji, proliferacji i adhezji komórek ludzkiego śródbłonka. Tymozyna beta 4 należy do najpowszechniej występujących u ssaków bioaktywnych peptydów z rodziny tymozyn. Dane literaturowe wskazują, że tymozyna beta 4 moduluje różnorodne procesy biologiczne, w tym związane z różnicowaniem, adhezją, migracją, apoptozą, regeneracją tkanek, hamowaniem reakcji zapalnych i gojeniem się ran. Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej wpisuje się więc w nurt badań dotyczących procesu angiogenezy i mechanizmów ją warunkujących, zarówno o charakterze poznawczym, jak i poszukiwania nowych celów terapii antyangiogennej i w konsekwencji bardziej efektywnych strategii terapeutycznych wielu patologii, w tym chorób nowotworowych. Wzrost ekspresji tymozyny beta 4 stwierdza się w różnych typach nowotworów, a procesy komórkowe, w których uczestniczy tymozyna beta 4 mają szczególnie istotne znaczenie dla fenotypu nowotworowego. Mechanizm plejotropowego działania tymozyny beta 4, obecnej zarówno wewnątrz komórki, jak i poza nią, a także w płynach ustrojowych, nie jest do końca poznany.

Praca doktorska mgr A. Selmi wykonana została w Zakładzie Cytologii i Proteomiki Katedry Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Jej

promotorem jest dr hab. prof. nadzw. UMed. Maria Świątkowska, a promotorem pomocniczym dr Marta Stasiak. Podstawą pracy doktorskiej jest zbiór spójnych tematycznie trzech artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2012-2013 i nagrodzonych w 2014 roku Nagrodą Naukową Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pierwszego stopnia, których współautorem jest mgr A. Selmi. Dwie z tych trzech prac są pracami eksperymentalnymi, a trzecia, zawierająca wyniki badań własnych, jest pracą poglądową. Wszystkie publikacje ukazały się w międzynarodowych czasopismach naukowych indeksowanych przez *Journal Citation Reports*, tj. *Experimental Cell Research*, *Protein Expression and Purification* oraz *Annals of the New York Academy of Sciences*. Łączna wartość współczynnika wpływu IF z roku 2015 w przypadku *Protein Expression and Purification* oraz 5-letniego w przypadku dwóch pozostałych czasopism, wynosi 9,17, a liczba punktów MNIŚW według obowiązującego wykazu z grudnia 2015 roku – 85. Mgr A. Selmi jest pierwszym autorem jednej z prac i drugim lub trzecim autorem w przypadku pozostałych prac. Jak wynika z przedstawionych oświadczeń współautorów publikacji składających się na rozprawę doktorską, udział mgr A. Selmi w pracy eksperymentalnej, której jest pierwszym autorem, wynosi 40%, a w dwóch pozostałych po 20%. Wszyscy współautorzy prac potwierdzają indywidualny wkład mgr A. Selmi w zaplanowanie badań, wykonywanie części eksperymentalnej oraz opracowywanie i interpretację wyników.

Przedstawiona dysertacja doktorska obok trzech publikacji stanowiących jej podstawę, zawiera 33-stronicowe opracowanie w języku polskim z podziałem na wstęp, cel pracy, metody, omówienie wyników i dyskusję oraz podsumowanie i wnioski, a także wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografię oraz informację o dorobku i aktywności naukowej Doktorantki. Poza trzema pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej mgr A. Selmi jest współautorem jednej pracy oryginalnej opublikowanej w 2016 roku i 11 komunikatów prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Pod względem merytorycznym prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej nie budzą zastrzeżeń, czego najlepszym potwierdzeniem jest pozytywna ocena recenzentów i redakcji uznanych czasopism, w których zostały opublikowane. Celem badań była:

1. ocena wpływu tymozyny beta 4 na migrację i adhezję komórek śródbłonna,
2. przybliżenie mechanizmów oddziaływania tymozyny beta 4 na procesy wewnątrzkomórkowe,

3. porównanie efektów biologicznych tymozyny beta 4 syntetycznej (komercyjnie dostępnej) i rekombinowanej.

Badania przeprowadzono na dwóch liniach ludzkich komórek śródbłonna, tj. EA.hy926 i HUVEC i zrealizowano za pomocą nowoczesnych technik badawczych, w tym angażującego Doktorantkę testu migracji, testu formowania struktur kapilaropodobnych w *Matrigelu*, pomiaru wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia z wykorzystaniem dwóch sond fluoroscencyjnych oraz mikroskopii konfokalnej.

Do najważniejszych, przedstawionych w pracy doktorskiej wyników badań nad rolą tymozyny beta 4 w komórkach śródbłonna należy wykazanie, że:

1. tymozyna beta 4 i jej mutanty pozbawione N-końcowego tetrapeptydu SDKP/4A zaangażowanego w proliferację komórek śródbłonna lub centralnie położonego peptydu KLKKTET/7 zaangażowanego w wiązanie aktyny G, zwiększają migrację komórek śródbłonna w kierunku witronektyny,
2. tymozyna beta 4 i jej mutanty pozbawione wyżej wymienionych bioaktywnych peptydów zwiększają tempo formowania się struktur kapilaropodobnych,
3. procesy komórkowe indukowane przez tymozynę beta 4 nie są związane z wewnątrzkomórkową mobilizacją jonów wapnia.
4. tymozyna beta 4 ulega szybkiej internalizacji do wnętrza komórki,
5. zarówno tymozyna beta 4 syntetyczna, jak i rekombinowana promują angiogenezę, co ma szczególnie istotne znaczenie z punktu widzenia zastosowania klinicznego.

Z uznaniem odnoszę się do zamieszczonego w przedstawionej formie pracy doktorskiej krótkiego, 9-stronicowego omówienia i dyskusji wyników, w którym Doktorantka wykazała się nie tylko znajomością literatury przedmiotu, ale również umiejętnością dyskusji wyników. Bardzo wysoka wartość naukowa publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, oświadczenia współautorów oraz wspomniane wyżej omówienie i dyskusja wyników stanowią podstawę dla recenzenta do pozytywnej oceny dokonań naukowych, wiedzy i umiejętności Doktorantki.

O ile w pracy doktorskiej przedstawiono mechanizmy molekularne wewnątrzkomórkowych efektów działania zewnątrzkomórkowej tymozyny beta 4, o tyle zabrakło jakiegokolwiek informacji odnośnie do potencjalnego mechanizmu sekrecji tymozyny beta 4. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić obecny stan wiedzy w tym zakresie ?

Prosiłabym także o uzasadnienie dla stosowania w swoich badaniach *in vitro* tymozyny w stężeniu 200 nM lub 160 nM.

W omówieniu wyników i dyskusji na stronie 25 znalazło się niezbyt właściwe stwierdzenie cytując ...nadekspresja T β 4 w komórkach raka okrężnicy SW480 powoduje wzrost aktywności Rac1 oraz ekspresję na poziomie motywu IQ, zawierającego GTPazę aktywującą białko IQGAP1 oraz ILK., które również wymaga wyjaśnienia i doprecyzowania.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na niepoprawne sformułowania czy też rozwinięcia akronimów. Na przykład:

- komórki traktuje się określonym związkim a nie stężeniem, więc zamiast cytując...HUVEC (w domyśle komórki) traktowane 200 nM stężeniem tymozyny β 4... powinno być komórki HUVEC traktowane tymozyną β 4 o stężeniu 200 nM (str.22, 23),
- JNK to nie jest kinaza z N-końcową domeną c-Jun (str. 6), ale kinaza fosforylująca białko c-Jun w jego N-końcowej domenie, a dokładnie w pozycji 63 i 73 łańcucha polipeptydowego,
- PI3K to nie jest fosfatydylo-4,5-bisfosforan kinazy 3 (str. 6), ale 3 kinaza fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu, co wskazuje, że fosforylacja zachodzi na grupie hydroksylowej w pozycji węgla trzeciego fosfatydyloinozytolu.

Podsumowanie

Praca doktorska mgr Anny Selmi pt. „Wpływ tymozyny beta 4 na funkcjonowanie komórek śródbłonna” zawiera oryginalne, znaczące poznawczo wyniki odnośnie do mechanizmów działania tymozyny beta 4 i jej roli w angiogenezie. Wartość merytoryczna i wysoki poziom metodyczny prezentowanych w rozprawie prac zasługują na uznanie. Rozprawę oceniam pozytywnie jako spełniającą wymogi art.13 obowiązującej, znowelizowanej ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2014, poz. 1852, tekst jednolity) i wnoszę do Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Anny Selmi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.