



WYDZIAŁ  
BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA



Uniwersytet  
ŁÓDZKI

## Uniwersytet Łódzki

### Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Katedra Genetyki Molekularnej

dr hab. Tomasz Popławski, prof. UŁ

Łódź, 17. 06. 2018

#### Ocena pracy doktorskiej mgr Marcina Popielarskiego pt. "Mechanizm aktywacji integryny $\alpha 11\beta 1$ "

Interakcje pomiędzy komórkami a elementami tworzącymi pozakomórkowe mikrośrodowisko są warunkowane przez rodzinę receptorów powierzchni komórek znanych jako integryny. Integryny to heterodimeryczne receptory transmembranowe składające się z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , które mogą łączyć się tworząc 24 różnych heterodimerów integrynowych. Białka te regulują procesy zmian cytoszkieletu, wpływając w ten sposób na adhezję, migrację i różnicowanie komórek. Integryny odgrywają również kluczową rolę w aktywacji czynników wzrostu, takich jak np. transformujący czynnik wzrostu ( $TGF\beta$ ). Integryny są zaangażowane w procesy zwłóknienia wielu tkanek oraz pełnią ważną rolę w procesach nowotworzenia warunkując wiele aspektów tego procesu tak jak migrację komórek nowotworowych czy też ich lekooporność. Z tych powodów integryny są przedmiotem intensywnych badań mających na celu określenie ich budowy, funkcji oraz mechanizmów aktywacji. W powyżej opisaną tematykę dobrze wpisuje się recenzowana praca doktorska i stanowi wąski wycinek szerszego nurtu badań, w tym Promotora pracy dr hab. n. med. prof. nadzw. Marii Świątkowskiej wraz z zespołem dotyczącego roli i mechanizmu działania tej dużej rodziny transbłonowych receptorów adhezyjnych. Jest to tematyka bliska moim zainteresowaniom naukowym a techniki laboratoryjne w prezentowanej w recenzowanej pracy przynajmniej w części są używane przez mój zespół. W bazie *PubMed* znalazłem 4 pozycje których współautorem jest Doktorant. Wszystkie pozycje to dobre publikacje w uznanych czasopismach. Z tej liczby 3 pozycje dotyczą bezpośrednio problematyki prezentowanej w pracy, ostatnia koncentruje się na innej tematyce. Sumaryczna wartość IF dorobku doktoranta zbliża się do liczby 10. Nie jest to może dorobek wybitny ale całkiem niezły jak na początek kariery naukowej.

Oceniana praca licząca 137 stron przygotowana jest według przyjętego kanonu dla dysertacji na stopień naukowy doktora w zakresie nauk eksperymentalnych. Rozpoczyna ją liczący 32 strony Wstęp (nazwany tutaj Wprowadzeniem) w którym Doktorant przedstawił obecną wiedzę na temat receptorów integrynowych ze szczególnym uwzględnieniem Integryny  $\alpha 11$ . Wszystkie zagadnienia zostały opisane w sposób kompetentny i przejrzysty. Stanowią one właściwe wprowadzenie w problematykę badawczą pracy doktorskiej. Nie dopatrzyłem się żadnych istotnych błędów zarówno w sferze tekstowej jak i ilustracyjnej. Ta ostatnia najczęściej oznacza zapożyczenia ale ze wskazaniem pochodzenia i autorstwa. Ponieważ recenzent musi jednak wykazać się wnikliwością mam kilka uwag/komentarzy do tej części pracy.

Co Doktorant miał na myśli pisząc „nowotworzenie...jest kluczowym procesem dla funkcjonowania całego organizmu” (str. 8)? Co Doktorant rozumie przez formę integryn zaktywowaną i czym się ona na poziomie funkcjonalnym różni się od formy aktywnej integryn (str. 12)? Tym bardziej, że w dalszej części tekstu Autor rozróżnia tylko stany: aktywne i

nieaktywny (str. 38). Zwrot „część głowowa” (str.12 i dalej) brzmi dziwnie, tym bardziej, że w tekście Autor używa do określenia części integryny przeciwnej niż głowa zwrotu „noga” a nie analogicznie do „części głowowej” „część nożna/nogowa”. Co Doktorant rozumie przez wielokrotnie używany przez niego zwrot „pełny aktywny stan” (str. 15 i dalej)? Zwrot ten sugeruje, że istnieje również „niepełny stan aktywny”. Skrót PI3K nie odpowiada kinazie 3-fosfatydyloinozytolu, co mogłoby implikować, że substratem jest 3-fosfatydyloinozytol. Rozwinięciem tego akronimu jest 3-kinaza fosfatydyloinozytolu, co wskazuje, że fosforylacja zachodzi na grupie hydroksylowej w pozycji węgla trzeciego fosfatydyloinozytolu.

Cele pracy napisane są jasno i zrozumiale – nie ma najmniejszych wątpliwości do czego dąży Autor – do oceny mechanizmu aktywacji integryny  $\alpha 11\beta 1$  przez białkową izomerazę dwusiarczkową (PDI) oraz działania inhibitorów PDI. Dodatkowo mgr Marcin Popielarski podjął próbę analizy oddziaływania czynników blokujących wolne grupy tiolowe na proces adhezji oraz migracji komórek linii hTERT BJ do liganda integryny  $\alpha 11\beta 1$  – kolagenu typu I. Jakie było kryterium wyboru linii hTERT BJ do zaplanowanych badań?

Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń do bardzo dobrze opracowanej części prezentującej Materiały i Metody w pracy doktorskiej mgr Marcina Popielarskiego. W kolejnych dwudziestu podrozdziałach tej części pracy wystarczająco dokładnie i jasno opisano techniki i metody molekularne zastosowane na poszczególnych etapach pracy dla realizacji założonych celów takie jak: hodowla komórkowa, rozdział białek metodą Western Blot, analiza wydzielania PDI, znakowanie wolnych grup tiolowych, koimmunoprecypitacja, mikroskopia konfokalna, analiza FRET-AP, plazmonowy rezonans magnetyczny oraz testy adhezji i migracji komórek i tworzenie struktur sferoidalnych. Stosowane metody opisane zostały z dużą precyzją, co wskazuje na ich pełne zrozumienie przez Doktoranta. Moja jedyna uwaga do tej części dotyczy tylko przedstawiania błędu standardowego średniej SEM. SEM jest miarą precyzji dla szacowanej średniej populacji. Odchylenie standardowe SD jest miarą zmienności danych wokół średniej próby populacji. W przeciwieństwie do SD, SEM nie jest statystyką opisową i jako taki nie powinien być stosowany. Wielu autorów błędnie wykorzystuje jednak SEM jako statystykę opisową, aby opisać zmienność swoich danych, ponieważ jest on mniejszy niż SD, co (błędnie) oznacza, że ich pomiary są bardziej precyzyjne. SEM jest prawidłowo stosowany jedynie do wskazania precyzji oszacowanej średniej populacji. Nawet wtedy jednak należy preferować 95-procentowy przedział ufności niż SEM.

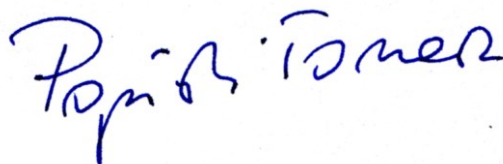
W ten sposób przechodzimy do kluczowej części pracy doktorskiej – Wyników. Lektura części doświadczałnej pokazuje, że wykonano rzetelny, rozległy zakres badań za pomocą logicznie uzupełniających się technik laboratoryjnych. Opis wyników poszczególnych eksperymentów został przedstawiony rzeczowo i kompetentnie w postaci 1 tabeli i 18 rycin. Z ogólnej liczby rycin wyłączyłem rycinę 18, przedstawiającą migrację komórek typu „wound healing”. Jestem pewien, że gdyby autor ją przedstawił jak fotografię gwiazdzistego nieba w ciemną noc to niewiele osób zauważyłoby różnicę pomiędzy tymi opisami a przedstawioną ryciną. Do najważniejszych oryginalnych wyników badań należy wykazanie, że wytworzenie kompleksów pomiędzy integryną  $\alpha 11\beta 1$  oraz PDI odpowiada za aktywację integryny i że proces ten jest związany ze zwiększeniem wolnych grup tiolowych integryny. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano także, iż zastosowanie blokerów wolnych grup tiolowych hamuje procesy zależne od aktywacji integryny  $\alpha 11\beta 1$ : adhezję, migrację oraz kurczenie się żelu kolagenowego. W moim przekonaniu wyniki te są niezwykle obiecujące i wskazują, że badania w tym kierunku warto kontynuować i weryfikować w innych układach eksperymentalnych. Ponadto mają one potencjał terapeutyczny i w przyszłości mogą być podstawą do opracowania nowych leków w patologiach człowieka charakteryzujących się nadmierną aktywacją integryny  $\alpha 11\beta 1$ .

Zwięzła dyskusja wyników w odniesieniu do dobrze dobranej literatury naukowej, przeprowadzona jest we właściwy sposób. Wszystkie najważniejsze wyniki zrealizowanych badań zostały skonfrontowane z aktualną wiedzą w zakresie przedstawianego problemu badawczego. Na wyróżnienie zasługuje fragment tłumaczący mechanizm stojący za różną aktywnością stosowanych w pracy blokerów PDI.

Spośród 295 cytowanych pozycji około 85% pochodzi z pierwszej dekady naszego wieku, co świadczy o aktualności podejmowanej problematyki badawczej.

Z punktu widzenia formalnego i edytorskiego praca przygotowana jest starannie z drobnymi wyjątkami i co należy podkreślić napisana jest poprawną polszczyzną. Wyjątki należą do tzw. „literówek” i można je policzyć na palcach jednej ręki. Wykaz skrótów jest niekompletny – brak w nim jest np. rozwinięcia skrótu PDI.

Przystępując do oceny końcowej pragnę podkreślić, że badania zrealizowano zgodnie z wytyczonymi założeniami, z zastosowaniem właściwych metod badawczych, a uzyskane wyniki poprawnie zinterpretowano na podstawie analiz własnych i danych literaturowych. Badania zostały przeprowadzone kompetentnie, wnioski są przekonujące i stanowią dobrą podstawę do dalszych badań. O oryginalności uzyskanych wyników świadczy fakt ich opublikowania w prestiżowym czasopiśmie *Biochemical and Biophysical Research Communications* o 5-letnim współczynniku oddziaływania blisko 2,3. Włączenie większości wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej do jednego artykułu jest najlepszym dowodem, że nadrzędnym celem pracy było rozwiązanie problemu badawczego, a nie pogoń za publikacjami w sensie ilościowym. Zasługuje to niewątpliwie na podkreślenie, gdyż w obecnym sparametryzowanym systemie oceny naukowców, trudno nie ulec pokusie publikowania za wszelką cenę. Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktoranta i Jego Promotora i spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Marcina Popielarskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na charakter badań, ich potencjał poznawczy oraz dorobek mgr Marcina Popielarskiego proszę o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



dr hab. prof. nadzw. UŁ Tomasz Popławski