

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz
Kierownik Pracowni Molekularnych
Podstaw Ruchów Komórkowych
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Warszawa, 10 maja 2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Zbigniewa Bastera pt.:

"Interplay between talin and β 1-integrin in cancer cells motility"

(Oddziaływanie pomiędzy taliną i integryną β 1 w ruchliwości komórek nowotworowych)

wykonanej w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej,
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod kierunkiem dr. hab. Zbigniewa Rajfura

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Zbigniewa Bastera dotyczy określenia charakteru wzajemnego oddziaływania dwóch białek - taliny i integryny β 1 - kluczowych w adhezji komórkowej, a więc i migracji komórek. Poznanie mechanizmu(ów) interakcji pomiędzy składowymi struktur biorącymi udział w adhezji i warunkujących zdolność komórek do migracji, a więc i do przerzutowania komórek nowotworowych, jest niezbędne do zrozumienia biologii nowotworów i opracowania strategii celowanej, skutecznej i specyficznej, terapii przeciwnowotworowych. Badania przeprowadzone przez Doktoranta doskonale wpisują się w ten nurt badań, tak przecież potrzebnych dla skutecznej walki z nowotworami.

Formalny opis rozprawy

Doktorant skorzystał z możliwości, jaką dawał Art. 13 pkt. 2 ustawy o stopniach i tytułach naukowych i przygotował rozprawę doktorską w formie „(...) *spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych (...)*”. Na rozprawę składają się trzy artykuły spełniające ustawowy wymóg spójności tematycznej, w tym jeden z nich ma charakter metodyczny, a dwa - eksperymentalny. Zostały one opublikowane w 2020 r. w czasopismach z listy filadelfijskiej; we wszystkich Doktorant jest pierwszym autorem. Należy również podkreślić, że do rozprawy, przygotowanej w języku angielskim, zostały dołączone oświadczenia Doktoranta oraz większości współautorów, z których jednoznacznie wynika, że mgr inż. Baster miał wiodący udział w powstaniu tych publikacji.

Poza kopiami rzeczonych artykułów (w formie załączników) oraz ww. oświadczeniami rozprawa zawiera liczące po półtorej strony streszczenia w języku polskim i angielskim, autoreferat (choć ta nazwa nie pada w rozprawie) oraz zgody redakcji na wykorzystanie w autoreferacie rycin pochodzących z innych publikacji i jednej z publikacji (nr III) wchodzących w skład rozprawy. Autoreferat liczy 58 stron, składa się ze wstępu/*Introduction* (28 stron), celu rozprawy/*Scope of the study* (1 strona), podsumowania i komentarzy/*Summary of the results and comments* (6 stron), uwag (wniosków) końcowych/*Final remarks* (1,5 strony) oraz spisu literatury/*References* cytowanej w autoreferacie (356 pozycji, 19 stron). Ponadto,

przed streszczeniami Doktorant umieścił listę skrótów i akronimów (skrótowców) oraz listę własnych publikacji (poza tymi, które weszły w skład rozprawy to 20 pozycji) oraz informację o uzyskanym finansowaniu swoich badań i zgłoszeniu patentowym. Te części rozprawy, które nie są załączonymi publikacjami, są dobrze i zrozumiale napisane, poprawnym językiem angielskim, acz zauważyłam drobne potknięcia gramatyczne. Dotyczyło to głównie stosowania liczby pojedynczej w miejsce liczby mnogiej (i odwrotnie), a w szczególności dotyczyło to trzeciej osoby liczby pojedynczej w czasie *Simple present* oraz tzw. *false friends* – np. *underlay* zamiast *underlie*. Ale zważywszy, że język angielski nie jest ojczystym językiem Doktoranta są to naprawdę bardzo niewielkie uchybienia językowe.

Ocena merytoryczna

W sytuacji, gdy na rozprawę składają się opublikowane artykuły recenzent ma teoretycznie ułatwione zadanie, gdyż zawarte w publikacjach wyniki zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów, wyznaczonych przez redakcje czasopism, którzy z reguły nie mają obiekcji do ostrej krytyki i wskazywania konieczności wykonania dodatkowych doświadczeń, zwłaszcza iż działają anonimowo. W praktyce, bywa różnie, gdyż czasem trudno jest określić, które wyniki przedstawione w danym artykule są autorstwa Doktoranta, zwłaszcza w przypadku publikacji wieloautorskich. Idealną sytuacją byłoby zatem, gdy autorami artykułów byłiby jedynie Doktorant i jego promotor/promotorzy (opiekunowie naukowci) i ewentualnie osoba wspierająca stronę metodyczno-techniczną, co - z uwagi na wymagania redakcji dobrych czasopism dbających o poziom naukowy nadsyłanych manuskryptów - w dzisiejszych czasach zdarza się niesłychanie rzadko. W przypadku niniejszej rozprawy taka sytuacja występuje w artykule o charakterze metodycznym (Doktorant i promotor) oraz w jednym z artykułów doświadczalnych (Doktorant, promotor, wsparcie techniczne – techniki biologii molekularnej -i kierownik zagranicznego laboratorium, w którym doktorant wykonywał część doświadczeń). Trochę bardziej skomplikowana sytuacja jest w przypadku trzeciej publikacji, autorstwa 10 osób, ale tu Doktorant wyraźnie wskazuje, które ryciny zawierają wykonane przez niego doświadczenia i analizy. Przed każdą z publikacji zamieszczono abstrakt graficzny i podsumowanie najważniejszych wyników (*highlights*), myślę że i tu można było zamieścić informacje o udziale Doktoranta, pozostawiając oświadczenia pozostałych autorów na końcu rozprawy; ułatwiłoby to niewątpliwie lekturę.

Lista skrótów i akronimów jest wyczerpująca, ale może warto byłoby pomyśleć o dodaniu polskich znaczeń. Mam też wątpliwość co do polskojęzycznego streszczenia - nie wiem, czy ablacja jest najlepszym terminem na określenie nokautu genu.

Wstęp to doskonale wprowadzenie w tematykę rozprawy, znajdują się tu informacje o epidemiologii nowotworów, ich charakterystycznych cechach, procesie tworzenia guzów i przerzutowania oraz mechanizmach inwazji komórek nowotworowych. Kolejna część opisuje białka adhezyjne i ich udział w ruchliwości komórkowej; tu sporo miejsca Doktorant poświęcił integrynom i obu izoformom taliny, które choć wykazują bardzo duże podobieństwo nie do końca pełnią podobne funkcje, przy czym rola taliny 2, odkrytej blisko dwie dekady później, nie jest tak dobrze poznana jak taliny 1. Najobszerniejsza część wstępu poświęcona jest zastosowaniom mikroskopii fluorescencyjnej w badaniach biologicznych; tu znajdziemy podstawowe informacje o zasadzie działania mikroskopii świetlnej i akwizycji uzyskanych obrazów, zjawisku fluorescencji i rozdzielczości mikroskopów, funkcji rozmycia obiektu punktowego, technice mikroskopii superrozdzielczej, a także oprogramowania służącego do ulepszenia uzyskanych obrazów. Wstęp jest bogato ilustrowany, Doktorant posiłkuje się tu 15. rycinami i czterema równaniami; zamieścił też istotne informacje o macierzy zewnątrzkomórkowej i budowie struktur adhezyjnych w postaci dwóch tzw. *box* (wstawek), co

jest praktykowane w niektórych czasopismach. Wysoko oceniam tę część rozprawy, ułatwia bowiem lekturę publikacji stanowiących trzon rozprawy. Jako cel rozprawy Doktorant wyznaczył (i) określenie roli interakcji izoform taliny z integrzyną $\beta 1$ i udziału tej interakcji w inwazyjności komórek nowotworowych związanych z degradacją białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) poprzez regulację sekrecji, wewnątrzkomórkowego transportu i recyklingu pęcherzyków zawierających metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP9) w komórkach raka piersi oraz (ii) opracowanie molekularnego modelu opisującego wpływ naturalnego barwnika cyjanidyno-3-glukozydu (C3G) na interakcję izoform taliny z integrzyną $\beta 1$ oraz regulację adhezji i procesu tworzenia guzów przez komórki raka jelita grubego.

Analiza składających się na rozprawę artykułów wskazuje, że Doktorant zrealizował swoje ambitne zamierzenia. Wykorzystał do tego celu narzędzia bioinformatyczne, w tym stworzoną przez siebie wtyczkę Fiji oraz dokowanie molekularne, techniki nowoczesnej biologii komórki, w tym obrazowania komórek i immunolokalizacji z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej i zaawansowanej analizy uzyskanych obrazów oraz techniki biologii molekularnej.

Zanim Doktorant przystąpił do realizacji celu, opracował oprogramowanie - wtyczkę Fiji, co umożliwiło mu bardziej precyzyjną analizę obrazów uzyskanych w mikroskopie fluorescencyjnym. Różni się ono od już istniejących tym, że pozwala na sekwencyjne i zautomatyzowane wyostrenie plików graficznych w trybie wsadowym. Opis i funkcjonalność oprogramowania zostały przedstawione w pierwszej publikacji cyklu, która ukazała się we wrześniu 2020 r. w czasopiśmie *Bio-Algorithms and Med-Systems* (figuruje w bazie Web of Science-Emerging Sources Citation Index). Mając w ręku narzędzie bioinformatyczne przystąpił do pracy doświadczalnej, a wyniki jego dokonań zostały opublikowane w dwóch artykułach, które również ukazały się w 2020 r. w *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (IF 4,105) oraz w *FASEB Journal* (IF 4,966), wiodących czasopismach w tematyce badań prowadzonych przez Doktoranta. Zostały one przedstawione w rozprawie w postaci załączników, a podsumowanie uzyskanych wyników zostało zamieszczone w autoreferacie. Część doświadczalna rozprawy została wykonana w laboratorium kierowanym przez Cai Huanga na University of Kentucky w Lexington, gdzie był finansowany z grantu R01 NIGMS NIH prof. Huanga.

W pierwszym z artykułów doświadczalnych Doktorant zainteresował się taliną 2, jedną z dwóch izoform taliny, która jest obecna w inwadopodiach i bierze udział w ich dojrzewaniu, natomiast nie wiadomo, w jaki sposób białko to uczestniczy w tym procesie. Doktorant wykazał, że w komórkach raka piersi talina 2 jest zaangażowana w sekrecję i transport wewnątrzkomórkowy MMP9, a niefunkcyjny mutant taliny 2 słabiej oddziałuje z integrzyną $\beta 1$. Brak taliny 2 powoduje zahamowanie sekrecji MMP9 (i MMP2), co skutkuje inhibicją degradacji ECM, a w konsekwencji obniżeniem potencjału inwazyjnego badanych komórek. W komórkach, w których nie produkowana jest talina 2 dochodzi do akumulacji metaloproteinazy w powiększonych endosomach i amfiosomach, co wskazuje na zaburzenia w ich dokowaniu do błony komórkowej. Są to bardzo wartościowe badania, oceniam je bardzo wysoko, ale zastanawiam się, dlaczego nie sprawdzono (albo nie pokazano), czy w tak traktowanych komórkach nie dochodzi do zmian w poziomie taliny 1, co mogłoby mieć wpływ na uzyskane dane.

W kolejnym artykule wykazano, że podczas gdy wzrost poziomu taliny 1 i integryny $\beta 1$ negatywnie wpływa na przeżywalność pacjentów z rakiem jelita grubego, to obniżenie poziomu taliny powoduje zahamowanie wzrostu sferoidów w żelu zawierającym fibrynę, tworzonych przez komórki raka jelita grubego. Podobny wpływ zaobserwowanego dla naturalnie występującego barwnika C3G z grupy antocyjanów, który – jak wcześniej opisano – posiada działanie antyoksydacyjne i wpływa także na adhezję komórek do podłoża. Związek ten – co tu wykazano - wiąże się bowiem z taliną, promując jej interakcję z integrzyną $\beta 1$, co powoduje zwiększenie adhezji komórek raka jelita grubego do podłoża pokrytego fibronektyną (a więc i obniżenie

potencjału inwazyjnego komórek) i zahamowanie wzrostu sferoidów. Badacze, tu duża rola Doktoranta, zaproponowali model molekularny opisujący wiązanie C3G w kieszeni powstałej podczas oddziaływania taliny 2 z integryną $\beta 1$, przy czym związanie tego związku stabilizuje kompleks obu białek. Słuszność zaproponowanego modelu wykazano stosując mutanty fragmentu taliny 1, w których zmutowano reszty aminokwasowe biorące udział w wiązaniu C3G. Autorzy postulują, że C3G może być potencjalnie zastosowany w prewencji lub terapii raka jelita grubego. Czy zdaniem Doktoranta związek ten mógłby mieć zastosowanie również w terapii innych nowotworów. Zastanawia mnie też kwestia, na ile specyficzne jest oddziaływanie C3G z kompleksem talina-integryna, tzn. czy związek ten może także wiązać się z innymi białkami, kwasami nukleinowymi i/lub lipidami.

Przedstawienie rozprawy w postaci publikacji skutkuje brakiem tradycyjnej dyskusji. W tym przypadku Doktorant przedstawił w Autoreferacie jej dyskusji – *Final remarks*, acz czuję niedosyt, gdyż w prezentowanych w rozprawie artykułach (a w szczególności dotyczy to artykułu III) są także zamieszczone (oraz dyskutowane) wyniki uzyskane przez innych współautorów. Tym niemniej, lektura dyskusji w publikacjach dotyczących zakresu rozprawy, jak i samego autoreferatu, wskazuje na dużą dojrzałość naukową Doktoranta i doskonałą znajomość zagadnień, którymi się zajmuje. Wykazał się on zdolnością do zdefiniowania istotnego problemu badawczego i opracowania sposobu odpowiedzi na postawione założenia, a także umiejętnością krytycznego spojrzenia na uzyskane przez siebie wyniki i posiłkowaniem się obszerną bibliografią.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Zbigniewa Bastera ma niewątpliwie bardzo dużą wartość poznawczą i znacznie wzbogaca naszą wiedzę o udziale białek zaangażowanych w tworzenie struktur adhezyjnych w procesie nowotworzenia i inwazyjności nowotworów, w tym przypadku raka piersi i raka jelita grubego. Wyniki jego badań, uzyskane z zastosowaniem szerokiego wachlarza metod i technik badawczych z obszaru biofizyki, bioinformatyki i biologii komórki dostarczyły istotnej wiedzy o mechanizmach zaangażowania obu izoform taliny z integryną $\beta 1$ w obniżeniu potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych i wskazały na potencjalny czynnik terapeutyczny - cyjanidyno-3-glukozyd, który wiążąc się do kompleksu obu białek powoduje zwiększenie adhezji komórek raka jelita grubego do podłoża, uniemożliwiając ich efektywne przemieszczanie się. Doktorant stworzył też – już ogólnie dostępne - narzędzie bioinformatyczne ułatwiające analizę danych uzyskanych w wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej. A więc jego badania mają nie tylko charakter poznawczy, metodyczny, ale i potencjalnie aplikacyjny.

Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorant jest również współautorem aż dwudziestu innych artykułów doświadczalnych opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, które dotychczas były cytowane 170 razy (bez autocytowań, stan na 9 maja), a indeks Hirscha Doktoranta wynosi 8. We wszystkich tych publikacjach wykorzystano jego doskonałą znajomość technik mikroskopowych i analizy obrazu. Doktorant kierował dwoma grantami finansowanymi przez NCN - -Preludium i Etiuda. To wyróżniający dorobek jak na ten etap kariery naukowej, wskazujący na doskonałe przygotowanie Doktoranta do samodzielnej pracy naukowej.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr inż. Zbigniewa Bastera spełnia warunki określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki

Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Bastera do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez niego stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w zakresie nauk fizycznych.

Ponadto, zważywszy na wysoką wartość poznawczą i potencjalnie aplikacyjną recenzowanej rozprawy doktorskiej oraz wyróżniający się dorobek naukowy Doktoranta z całym przekonaniem wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną dla szacownej Rady nagrodą.

Maria Jolanta Rędownicz