

Dr hab. Paweł Pomorski, prof. Instytutu
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. Marcelego Nenckiego,
Polska Akademia Nauk

Warszawa, 11 czerwca 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

Wykonanej w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej Uniwersytetu Jagiellońskiego,

Autor: mgr Olga Sylwia Adamczyk

Tytuł: "The effects of cell – microspheres interaction on the cytoskeletal architecture in fibroblasts"

Promotor: dr hab. Zenon Rajfur

Przedstawiana recenzja zawiera następujące sekcje: tło projektu, ogólny opis dysertacji, komentarze i wnioski końcowe.

Tło projektu

Autorka porusza bardzo ciekawe zagadnienie wpływu adhezji na stan cytoszkieletu, badając zarówno wpływ elastyczności podłoża jak i obecności kulek lateksowych, które mogą być celem fagocytozy na stan cytoszkieletu. Autorka podejmuje również próbę zbadania redystrybucji białek związanych z mikrotubulami (MAPs) pod wpływem stosowanych manipulacji eksperymentalnych.

Ogólny opis dysertacji

Przedstawiona dysertacja magister Olgi Adamczyk ma klasyczny układ. Zawiera cztery typowe części: wstęp, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję wyników po której następuje krótkie podsumowanie wniosków z wykonanych prac. Praca ma w sumie 137 stron wraz ze streszczeniem i spisem treści. Na końcu dysertacji znajdujemy listę cytowanej literatury, zawierającą 242 pozycje. Praca jest w całości napisana w języku angielskim i towarzyszy jej streszczenie w języku polskim. Tekst czyta się bardzo dobrze, choć autorka nie uniknęła skrótów myślowych, jak na stronie 32, gdzie pisze „Microtubules are not as well understood as actin filaments”. Rozumieć można fizjologię czy strukturę mikrotubul a nie samo białko. Praca zawiera czterdzieści

osiem rycin, ujętych w osobnym spisie. Przedstawiają one wyniki i pomagają zrozumieć zagadnienia opisywane we wstępie i używane metody badawcze. Ryciny są przygotowane starannie a zamieszczone zdjęcia są wydrukowane zdjęcia są dość czytelne i nie sprawiają większych trudności interpretacyjnych co wcale nie zdarza się tak często. Jedyne zastrzeżenie jakie ma recenzent do strony prezentacyjnej pracy, to uparte używanie kolorów w jednokanałowych mikrofotografiach z mikroskopu konfokalnego. Autorka powinna zauważyć, że praktyka ta obniża czytelność prezentowanych obrazów, zwłaszcza dla kanału niebieskiego. Jednocześnie jest to tak naprawdę błąd merytoryczny, gdyż mikroskop konfokalny rejestruje obraz monochromatyczny a zastosowany kolor jest swobodną interpretacją tego jak świeci znacznik fluorescencyjny. Trzeba pamiętać, że nawet kolor, który widzimy patrząc w okulary mikroskopu szerokokopułowego, jest wynikiem zastosowania filtra barierowego a nie rzeczywistym kolorem światła, jakie emituje fluorochrom.

Wstęp do pracy jest długi i stanowi mniej więcej jedną trzecią całej pracy. Jest podzielony na dwie wyraźnie oddzielne części. Pierwsza to detaliczny opis tych składników cytoszkieletu, które bada autorka dysertacji, oraz procesów biologicznych, w których one uczestniczą. Rozdział jest nieco zbyt rozbudowany, w świetle prezentowanych następnie wyników. Opisy roli mikrotubul w podziale komórki czy część poświęcona prokariotycznym białkom cytoszkieletalnym nie znajdują uzasadnienia w prezentowanych wynikach. Z kolei recenzent odczuwa lekki niedosyt w części opisującej białka związane z mikrotubulami (MAP). Najbardziej brakuje tu uzasadnienia wyboru badanych białek związanych z mikrotubulami. Biorąc pod uwagę obecność wśród nich białka IQGAP1, przydał by się we wstępie krótki rozdział o znaczeniu małych białek związanych z białkiem G i ich roli w regulacji struktury cytoszkieletu, zwłaszcza białka Ras. Druga część wstępu, zdaniem recenzenta, powinna znaleźć się w rozdziale „Materiały i metody”, jako że dotyczy metod używanych do uzyskania prezentowanych wyników właśnie. Tu niestety wkraść się poważny błąd merytoryczny, omówiony szerzej w uwagach szczegółowych.

Rozdział Materiały i Metody wydaje się recenzentowi z kolei nieco za krótki i pobieżny. Nawet po przeniesieniu odpowiednich fragmentów wstępu do Materiałów i metod, pozostaje wiele niedosytu. Zagadnienie rozplatania funkcji rozmycia plamki (PSF deconvolution) autorka zamyka w jednym zdaniu, że procedura była wykonywana na „niektórych obrazach (some of them)”. To nieco frustrujące dla czytelnika, gdy nie wiem, które z oglądanych obrazów były poddane tej procedurze a które nie. Co więcej, warto by było opisać, co tak naprawdę było rozplatane: czy autorka mierzyła PSF posiadanego obiektywu, czy używała popularnych metod teoretycznego obliczania tej funkcji, opartych o podstawowe parametry używanego obiektywu.

Sercem każdej pracy naukowej są przedstawione w niej wyniki. Autorka przedstawia je w najlepszy chyba dostępny sposób, czyli prezentując bogaty album mikrofotografii. Widzimy na nich wpływ obecności kulek lateksowych w środowisku komórki na stan cytoszkieletu oraz to jak ten obraz zmienia się w zależności od elastyczności podłoża, na które wysiewano komórki. Autorka posługuje się również cytochalazyną-D w celu dekompozycji cytoszkieletu aktynowego by sprawdzić jego wpływ na obserwowane zmiany. Wyniki są klarowne i efekty dobrze widoczne. Każdy zestaw mikrofotografii jest starannie opisany. Drugą część wyników stanowią

mikrofotografie, przedstawiające wpływ wzmiankowanych powyżej czynników na dystrybucję trzech białek związanych z mikrotubulami (MAPs): białka adaptorowego CLIP1, białka aktywującego GTP-asy hamującej małe białko zależne od białka G Ras (IQGAP1) oraz kinazy MARK2.

Obie części wyników są przedyskutowane w liczącym osiem stron, osobnym rozdziale szóstym, zatytułowanym „Discussion”. Rozdział przedstawia wyniki na tle literatury, pozostawia jednak pewien niedosyt przez brak jakichkolwiek wycieczek w kierunku zrozumienia mechanizmu działania opisywanych białek związanych z mikrotubulami.

Uwagi szczegółowe

We wstępie autorka twierdzi, że „The antibodies can be monoclonal (one antibody with a fluorophore)”. Przeciwciała monoklonalne, to nie są przeciwciała pierwszorzędowe sprzężone ze znacznikiem fluorescencyjnym. Przeciwciała monoklonalne to przeciwciała produkowane przez pojedynczy klon limfocytów B, które są strukturalnie identyczne i wiążą się tylko z jednym epitopem na docelowym białku. Dzięki temu ich specyficzność jest większa niż przeciwciał poliklonalnych, izolowanych z krwi po immunizacji organizmu badanym białkiem, często jednak dają one słabszy sygnał. Recenzent przypuszcza, że błąd jest skutkiem faktu, że przy barwieniu immunocytochemicznym preparatów metodą pośrednią, gdy najpierw podajemy specyficzne przeciwciało znakujące badane białko, tak zwane przeciwciało pierwszorzędowe, a potem to przeciwciało wizualizujemy przeciwciałem drugorzędowym, związanym ze znacznikiem fluorescencyjnym, to przeciwciało drugorzędowe jest zawsze poliklonalne. To wcale jednak nie znaczy, że przeciwciało pierwszorzędowe jest zawsze monoklonalne czy też, że przeciwciała monoklonalne są zawsze bezpośrednio znakowane fluorescencyjnie.

Podstawowym zastrzeżeniem recenzenta do przedstawionej pracy jest zatrzymanie się autorki w pół kroku i brak interpretacji związków pomiędzy zmianami cytoszkieletu i zmianami dystrybucji białek związanych z mikrotubulami (MAPs). Wybrane białka pozwalają wysnuć pewne wnioski mechanistyczne, czego autorka nie robi. Wręcz odwrotnie, autorka nie uzasadnia jasno samego wyboru tych białek, który zdaniem recenzenta jest bardzo dobry i ciekawy.

Recenzent dostrzega też szereg drobnych uchybień, których usunięcie pomogłoby docenić jakość prezentowanych wyników. Na stronie 71 autorka pisze „proteins or antibodies” co dla biologa brzmi nieco dziwnie. Opisując na stronie 76 wyniki ilościowe, autorka pracowicie podaje ile policzyła kulek lateksowych nie podając ilu komórek dotyczą te wyniki. Prezentując wyniki dotyczące elastyczności podłoża, podaje sztywność podłoży elastycznych, zawierającą się pomiędzy 2 a 40 kPa, nie wzmiankując jaką sztywność ma szkło, użyte jako kontrola. Nie wnikając jaki tym szkła został użyty, trzeba jednak pamiętać, że jego sztywność liczy się w GPa, co stawia całe doświadczenie w odpowiedniej perspektywie. W tej perspektywie, nieco niezrozumiała jest kolejność paneli na stronie 82. Szkoda też, że opisując wraz ze wzrastającą sztywnością spada liczba niepowlekanych kulek związanych z powierzchnią komórek ale nie dotyczy to bardzo sztywnego szkła. Pewien

niedosyt czujemy też nie znajdując nigdzie w pracy jak sztywne są użyte kulki lateksowe. Niezrozumiałe jest też dla recenzenta, dlaczego używając wpierw trzech standardów sztywności podłoża, badając białka związane z mikrotubulami, autorka nie używa żadnego z nich a wprowadza czwarty. Autorka nie wyjaśnia wreszcie, dla czego dlaczego w jednych przypadkach przedstawia nam wykresy gęstości optycznej preparatów wokół zaadherowanych kulek a w innych nie i dla czego badając kinazę MARK2 zrezygnowała z porównywania jej dystrybucji na podłożach o różnej sztywności.

Recenzent pragnie podkreślić, że wzmiankowane uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji a jedynie wskazują o ile mogłaby być ona jeszcze lepsza, gdyby autorka tylko zechciała.

Wnioski końcowe

W świetle przedstawionej opinii, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani Olgi Sylwii Adamczyk pod tytułem: „The effects of cell – microspheres interaction on the cytoskeletal architecture in fibroblasts” w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnoszę zatem o przyjęcie przedłożonej rozprawy i dopuszczenie jej do publicznej obrony. Przedstawiona do recenzji praca daje podstawę do ubiegania się o stopień doktora w dyscyplinie nauk fizyczne.

Paweł Pomorski