

dr hab. inż. Ewa Stodolak-Zych, prof. AGH
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica w Krakowie
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów i Kompozytów

Kraków dn. 15.09.2024

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Karoliny Feliksiak

pt. *Architecture of the vimentin cytoskeleton in mouse embryonic fibroblasts cultured on various biopolymers*

rozprawa doktorska realizowana w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej na
Wydziale Fizyki Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod kierunkiem

dr hab. Zenona Rajfura, prof. UJ

promotor

dr Tomasza Witko, UEK

promotor pomocniczy

**na zlecenie Rady Dyscypliny NAUKI FIZYCZNE Uniwersytetu Jagiellońskiego w
Krakowie z dnia 16 maja 2024 (pismo z dnia 28 maja 2024).**

Wstęp

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została oceniona na podstawie następujących kryteriów:

1. Prawdliwość zdefiniowania problemu naukowego i jego oryginalność
2. Poprawność celów i hipotez badawczych oraz poziomu ich weryfikacji
3. Poprawność prezentacji wyników badań i wnioskowania
4. Umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz dorobek naukowy

1. Zdefiniowanie problemu badawczego i jego oryginalność

W badaniach biomedycznych, komórkę, szczególnie komórkę embrionalną, traktować należy jako swoisty marker biologiczny czuły na minimalne zmiany mikrośrodowiska (niszy). Aby móc wykorzystać w pełni możliwości komórek embrionalnych (pluripotencjalnych) w warunkach *in vitro*, hodowle poprzedza się komórkami wspomagającymi, których zadaniem jest przygotowanie bazy czynników wzrostu, czy czynników różnicujących się, stąd też komórki te nazywane są komórkami wspierającymi lub karmiącymi (ang. *feeder cells*). Ich podstawową rolą jest zapewnianie wsparcia w funkcjonowaniu komórek macierzystych lub progenitorowych, przez poprawę ich zdolność do podziału, różnicowania oraz zachowania pluripotencji lub multipotencji. Przykładem tego typu komórek wsparcia (komórek karmiących) są embrionalne fibroblasty mysie MEF (ang. *mouse embryonic fibroblasts*). W literaturze pojawiają się zwykle, w badaniach biomedycznych, jako komórki wspierające hodowle embrionalnych komórek macierzystych (ESC, ang. *embryonic stem cells*) oraz indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC, ang. *induced pluripotent*

stem cells). MEF pełnią kluczową rolę jako model badawczy w eksperymentach nad podstawowymi procesami biologicznymi, związanymi z cyklem komórkowym, odpowiedzią na stres, starzeniem komórkowym czy śmiercią komórkową. Wiele prac poświęconych jest również wykorzystaniu MEF jako modelu w badaniach związanych z fibrogenezą, czyli tworzeniem blizn oraz reakcji na urazy. Potencjał wykorzystania MEF, podczas badań *in vitro*, rośnie wraz z możliwością monitorowania odpowiedzi komórkowej na zmiany środowiska czy powierzchni. Wiadomym bowiem jest, że komórka – niezależnie od jej pochodzenia czy rodzaju – aby mogła osiągnąć wysoką sprawność metaboliczną musi zaadherować do powierzchni. Podczas tego procesu zmiana ułożenia mikrotubul i mikrofilamentów powoduje rozplaszczanie komórki i możliwość wytworzenia kontaktów ogniskowych kotwiczących komórkę z niszą tkanki (w warunkach *in vivo*) lub z powierzchnią podłoża (w warunkach *in vitro*). W przypadku komórek mezenchymalnych kluczową rolę w procesach związanych z adhezją i rozplaszczaniem odgrywa wimentyna. Jest to białko atrakcyjne wszędzie tam, gdzie konieczne jest śledzenie zmian związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT) i migracją mezenchymalną. Tym samym wimentyna jest dobrym markerem zmian morfologicznych związanych z ruchem komórkowym (migracją), zmianą kształtu komórki (mechanotransdukcją) czy inwazją nowotworu. Co warto podkreślić filamenty wimentyny pomagają utrzymywać kształt komórki i chronić ją przed stresem mechanicznym, a jednocześnie wimentyna przyczynia się do wielu stanów patofizjologicznych, takich jak: rak, choroby autoimmunologiczne, zapalne czy infekcje. Badania opublikowane w ostatnich latach dowodzą, że białko to jest silnie zaangażowane w migrację komórek nowotworowych, które są szczególnie elastyczne ze względu na dużą zawartość wimentyny. Z tego powodu badania nad wimentyną stają się szczególnie istotne dla potrzeb onkologii klinicznej.

W kontekście powyższych doniesień tematyka rozprawy p. mgr Karoliny Feliksiak koncentrująca się na pogłębionej analizie cytoszkieletu komórek MEF pod kątem struktury i ułożenia wimentyny (filamentu pośredniego) w komórkach kontaktowanych z powierzchniami biopolimerów, co wpisuje się w aktualną tematykę badawczą z zakresu inżynierii biomedycznej, medycyny klinicznej jak i biofizyki. **Oryginalność pracy to przede wszystkim identyfikacja nowej formy wimentyny (*nutshell*), określenie jej preferowanej lokalizacji w komórkach, powiązanie defermacji jądrowych z obecnością wimentyny, a także braku powiązania pomiędzy zmianami VIF w komórkach a wartością modułu sztywności podłoża.**

Tak zaproponowany i zrealizowany temat badawczy ma charakter badań podstawowych, które są warunkiem koniecznym jeśli myśli się o wykorzystaniu wimentyny jako wiarygodnego biomarkera zmian morfologii komórki. Ciekawy i interdyscyplinarny charakter pracy nie przekłada się na jakość opracowania części teoretycznej. Szkoda że Doktorantka nie pokusiła się o przegląd literaturowy obejmujący to co już wiadomo nt. wimentyny czy też filamentów pośrednich wimentyny (VIF) np. w zależności od sztywności podłoża naturalnego np. ECM czy ECM obciążonego chorobami czy też syntetycznego podłoża. Takie wprowadzenie lepiej przygotowałoby odbiorcę na część praktyczną niż obecna we wstępie forma encyklopedyczna, która nie stanowi adekwatnego wprowadzenia do tematu roli, możliwości i ograniczeń wimentyny, a także specyfiki zachowania samego białka – bo trzeba zaznaczyć, że wybór biomarkera – wimentyny, należy uznać za niezwykle trafny i topowy. Że wspomnę tu o tendencji białka do specyficznej ekspresji na powierzchni komórki, czy możliwości sekrecji

do otoczenia co istotnie wpływa na fizjologię komórki, a przede wszystkim wykracza poza funkcje strukturalne i cytoszkieletowe.

2. Poprawność celów i hipotez badawczych oraz poziomu ich weryfikacji

Praca napisana jest w języku angielskim i ma układ klasyczny; po części teoretycznej, wprowadzającej do tematu badań, następuje zdefiniowanie celu głównego i celów częściowych aby potem przedstawić materiały i metodykę badań oraz uzyskane rezultaty. Ostatnie rozdziały poświęcone są dyskusji wyników badań i przedstawieniu najważniejszych osiągnięć pracy (prezentowanych w dwóch opublikowanych przez Doktorantkę manuskryptach).

Cele pracy zdefiniowane są jasno i rzeczowo; po pierwsze Doktorantka zamierza dowieść zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznych podłoży a morfologią cytoszkieletu (za pomocą obrazowania wimentyny), po drugie dokonać analizy obszaru okołojądrowego za pomocą mikroskopii konfokalnej i pokazać, że zmiany w tym obszarze można przypisać obecności wimentyny. Kolejny rozdział dezyderatu dotyczy przygotowania materiałów wybranych na modelowe podłoża w badaniach komórkowych (PLA, PHO), preparatyki badań biologicznych (hodowli komórkowych) i analizie uzyskanych wyników.

Wymiernym sukcesem pracy jest wykazanie tendencji wimentyny do organizowania się w dwie formy nazwane przez p. Doktorantkę jako klasyczna (ang. *classical net*) i 'skorupkę orzecha' (ang. *nutshell*) i są wynikiem oddziaływania komórek MEF z podłożem (traktowanym tu jako modelowa powierzchnia - mikrośrodowisko). Jak wykazują badania prezentowane w pracy doktorskiej – istnieje uzasadnione przypuszczenie, że wimentyna uczestniczy aktywnie w przekazywaniu sygnałów między zewnętrzną częścią komórki a jądrem ze względu na jej obecność w chropowatościach tego organellum. Pozwala to na stwierdzenie, że obecność różnych podtypów filamentów pośrednich wimentyny (VIF) pełni funkcję zabezpieczającą jądro przed dalszymi zniekształceniami w trakcie migracji czy deformacji komórek. To bardzo cenne informacje w kontekście dostępnych danych mówiących o tym, że deformacje jądra (np. forma ziaren kawy) powiązana jest ze zmianami nowotworowymi w komórce i służy jako marker rozpoznawania choroby. Istotnym atutem pracy jest potraktowanie wimentyny jako białka analitycznego, które przy wykorzystaniu odpowiednich metod barwienia jak i możliwości jakie daje analiza obrazu za pomocą mikroskopu konfokalnego oddziela wimentynę od innych elementów cytoszkieletu (mikrofilamenty, mikrotubule w tym aktyny). Trafnie dobrana metodyka – mikroskopia konfokalna wraz z celowo wybranymi podłożami modelowymi PLA i P(3HO) pozwoliła p. Doktorantce na uzupełnienie i potwierdzenie zależności pomiędzy rolą wimentyny a morfologią komórek MEF w tym morfologią jądra komórkowego.

3. Poprawność prezentacji wyników badań i wnioskowania

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 76 stron i składa się aż z 13 rozdziałów, z czego dwa ostatnie stanowią spis rysunków i bibliografię. Przyznaje, że przy klasycznym dezyderacie, który dokładnie opisuje uzyskane wyniki badań i odnosi je do podobnych prezentowanych w literaturze – streszczenia manuskryptów – nie wydają się konieczne. Z kolei wnioski z opublikowanych prac w postaci najważniejszych punktów (ang. *highlights*) są

rozwinięte w podsumowaniu. Jakkolwiek te uwagi są raczej natury kosmetycznej ale pokazują skłonność Autorki do powtórzeń czy też trudności w wyborze formy opracowania: klasyczny dezyderat czy cykl tematyczny publikacji.

Głównym zarzutem względem pracy jest jej niespójność lub brak danych bazowych, utrudniająca analizę wyników i zmuszająca częstokroć do szukania tych danych w literaturze. Dodam, że są to dane podstawowe, do których Doktorantka miała pełny dostęp (jest współautorką publikacji), a które istotnie tłumaczą Jej wnioskowanie co do zachowania się wimentyny chociażby w zakresie wpływu powierzchni modelowych na morfologię komórki. Bardzo niewiele miejsca w dezyderacie poświęcono charakterystyce podłoży wykorzystanych w badaniach, a przecież to w głównej mierze od nich zależy odpowiedź komórkowa. Zastosowanie dwóch biopolimerów różnych co do struktury, pochodzenia a formowanych w ten sam sposób (odlewanie i odparowywanie rozpuszczalnika, ang. *solvent casting*) istotnie różnicuje powierzchnie pod kątem: struktury warstwy wierzchniej (chemii powierzchni), właściwości powierzchniowych (mikrostruktury na poziomie setnych części mikrometra – ze względu na konieczne do rozplaszczania – punkty tzw. *focal contact adhesion*) i właściwości fizykochemiczne (w tym zwilżalności, energia powierzchniowa, proporcje w składowych SFE) oraz struktury molekularnej biopolimeru kształtującej się podczas odparowywania. Wskazane byłoby zestawienie tabelaryczne pokazujące na czym opierają się podobieństwa/różnice tych biopolimerów. Jest to tym istotniejsze, że niektóre z danych (krystaliczność, kąt zwilżania, moduł Younga warstwy powierzchniowej) pojawiają się w pracy bez informacji co do metody/sposobu pomiaru danej wielkości. Zmusza to Recenzenta do samodzielnego poszukiwania danych podstawowych np. w innych pracach z udziałem Doktorantki. Daje też fałszywy obraz – ograniczenia się do jednej metody badawczej stosowanej w całej pracy. W kontekście tego zarzutu proszę o uzasadnienie, na podstawie np. konkretnych parametrów, dlaczego to właśnie PLA i P(3HO) wybrano do badań nad morfologią komórek MEF w odniesieniu do zastosowanego markera jakim była wimentyna.

Kolejne pytanie jakie nasuwa się po przeczytaniu dezyderatu dotyczy wskazania czy można w badaniach z udziałem MEF posługiwać się konkretną cechą powierzchni indukującą procesy adhezji i rozplaszczania tych komórek? A jeśli tak, to czy cecha ta nie indukuje również zmian w morfologii jądra. Czy badano jakieś inne podłoża polimerowe znacznie różniące się strukturą (proporcją między obszarami krystalicznymi i amorficznymi) czy chemią powierzchni (obecność polarnych, niepolarnych grup funkcyjnych) czy chropowatością lub sztywnością powierzchni. Proszę o odniesienie się do badań własnych lub/i danych literaturowych.

W jednej z prac (publikacja I) Autorka wskazuje, że przyczyna zmian morfologii jąder komórkowych może wynikać ze zmiany pH podczas hodowli komórkowej, szczególnie jeśli mamy do czynienia z podłożem degradującym za jaki uznaje się PLA. Prowadzona analiza zmian morfologii komórek i jąder komórkowych prowadzona była po 12h hodowli, to zdecydowanie za krótki czas do rozpoczęcia procesu hydrolizy PLA, nawet w odniesieniu do niszy jaka stanowić mogą nieregularności powierzchni podłoża. Czy badano mikro/nano chropowatość powierzchni podłoży i zmianę chemii powierzchni np. po 12h inkubacji? Jaka mogłaby być inna przyczyna zmiany morfologii jądra komórkowego MEF i jego interakcji z wimentyną jeśli wykluczamy działanie czynnika ze środowiska zewnętrznego (np. pH). Proszę o odniesienie się do zagadnienia na podstawie własnych doświadczeń lub danych

literaturowych np. dotyczących zmian ECM tkanek zdrowych/chorych vs zachowanie się komórek.

Kolejnym zagadnieniem, które wydaje się być kluczowe dla analizowanych wyników jest powtarzalność (homogenność podłoża). Czy biorąc pod uwagę fakt, że jeden z polimerów P(3HO) otrzymywany był metodą biotechnologiczną przy udziale bakterii za każdym razem otrzymywano jednakowy co do struktury chemicznej i sztywności warstwy wierzchniej materiał podłoża?

Kwestią bezsporną jest rola sztywności warstwy wierzchniej w organizacji cytoszkieletu komórki. Wiadomo, że zanim nastąpi adhezja komórek do podłoża, na powierzchni adsorbowana jest warstwa białek z otoczenia. Czy taki proces nie wpływa na sztywność warstwy wierzchniej podłoża? Czy badano powierzchnię podłoża poddanych inkubacji w samym medium hodowalnym, w którym obecne są aminokwasy przed i po zakończonej hodowli komórkowej? Jak zmienia się zachowanie wimentyny i innych elementów cytoszkieletu komórki w odniesieniu do sztywnych i miękkich powierzchni? Czy wszystkie komórki – embrionalne i klasyczne (somatyczne) są jednakowo czułe na ten parametr.

Przedstawione tutaj uwagi nie wpływają na pozytywną, ogólną ocenę opracowania. Potwierdzają też opinię co do wagi podejmowanego problemu badawczego i wartości pracy stanowiącej – w mojej ocenie - istotny przyczynek do wiedzy na temat roli i ważności wimentyny w procesach migracji, mechanotransdukcji komórek. Zastrzeżenia budzi jednak sposób ich prezentowania, co rzutuje na odbiór dezyderatu, często czyniąc go nieczytelnym a miejscami wręcz chaotycznym.

4. Umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz dorobek naukowy

Naukowy dorobek Doktorantki składa się z pięciu prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z wysokim wskaźniku oddziaływania (IF 3.2-4.9). W dwóch manuskryptach mgr Karolina Feliksiak jest pierwszym autorem, w pozostałych jednym z współautorów. Liczba cytowań na dzień 15.09.2024 wynosi 35. Niestety nie otrzymałam danych na temat prezentowanych publicznie przez Doktorantkę wyników badań własnych np. podczas konferencji naukowych. Brak również danych co do stażów naukowych czy szkoleń.

5. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Feliksiak stanowi oryginalną pracę naukowo-badawczą wpisującą się w interdyscyplinarny nurt badań służących wyjaśnieniu mechanizmów komórkowych i możliwości wykorzystania wimentyny jako markera stanu czynnościowego komórek embrionalnych ze względu na ułożenie i formę białka, a także ze względu na właściwości podłoża. Doktorantka poprawnie zdefiniowała problem badawczy, a do jego rozwiązania wykorzystwała mikroskopię konfokalną i metody analizy obrazu pozwalające na uzyskanie danych ilościowych co do struktury i ułożenia wimentyny.

Sposób zaplanowania i prowadzenia eksperymentu badawczego, poprawna analiza uzyskanych wyników, a następnie wnioskowanie świadczą o prawidłowym podejściu i realizacji eksperymentu badawczego.

Na podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny wymiar pracy badawczej zrealizowanej przez Doktorantkę, jak również jej aspekt praktyczny – wskazanie narzędzia (mikroskopii konfokalnej) oraz parametru (struktura i ułożenie wimentyny) służącego monitorowaniu zmian komórkowych szczególnie w stanach chorobowych. Przedstawione w recenzji uwagi, w większości o charakterze porządkującym, nie umniejszają pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Stwierdzam, że przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Feliksiak jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia ona kryteria stawiane kandydatom w ustawie z dn 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie rozprawy Pani mgr Karoliny Feliksiak do publicznej obrony.

Prof. dr hab. Tadeusz Anie