



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA
W KRAKOWIE



Prof. dr hab. Květoslava Burda

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
30-059 Kraków, ul. Reymonta 19

Kraków, 22.05.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr. Zbigniewa Bastera

Pan mgr inż. Zbigniew Baster wykonał pracę doktorską zatytułowaną „*Interplay between talin and β 1-integrin in cancer cells motility*” w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem dr. hab. Zenona Rajfura, prof. UJ. Badania, których wyniki zostały zawarte w niniejszej rozprawie były częściowo finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Etiuda nr 2019/32/T/NZ3/00444 (tytuł: „Aktywność białek związanych z migracją w komórkach eukariotycznych”) przyznanego panu Zbigniewowi Basterowi oraz przez the National Institute of General Medical Sciences (NIGMS), USA, w ramach projektu badawczego No R01 GM122994 („Talin2-mediated traction force drives MMP secretion and cell invasion”), którego kierownikiem był prof. Cai Huang z University of Kentucky, KY, USA. Mgr inż. Zbigniew Baster był beneficjentem Jagiellońskiego Programu Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich realizowanego jako Działanie 5 projektu ZintegrUJ - Kompleksowy Program Rozwoju Uniwersytetu Jagiellońskiego, w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (nr umowy POWR.03.05.00-00-Z309/17-00).

Pan Z. Baster zajmował się wysoce specyficznym dla taliny2 mechanizmem molekularnym regulacji sekrecji i transportu wewnątrzkomórkowego metalopeptydazy macierzowej 9 (MMP9). Talina 2 jest izoformem białka taliny, który wykazuje z jednej strony wiele podobnych funkcji dość dobrze poznanych dla taliny1, a z drugiej strony może uczestniczyć w procesach, które nie dublują jej funkcji. Obie taliny wykazują dużą homologię pierwotnej struktury (aż w 76%), która dotyczy głównie ich specyficznych miejsc oddziaływania. Jednakże przed kilku laty pokazano, że obecność seryny Ser339 w przypadku taliny2 w obrębie domeny wiążącej β -integrynę (F3) decyduje o wzroście jej wiązania z β 1-integryną w porównaniu z taliną1, która w domenie F3 zawiera cysteinę Cys336. Obserwacja ta ma ogromne znaczenie dla lepszego zrozumienia powiązania tworzenia się inwadopoidów, które degradują macierz zewnątrzkomórkową (ECM) poprzez miejscowe odkładanie proteaz i w

efekcie biorących udział w inwazji komórek nowotworowych. Ponadto zauważono, że zależne od naprężenia zmiany konformacyjne białek są ważne dla zwiększenia wytrzymałości wiązań adhezyjnych przy określonej przyłożonej sile. Ponadto wpływ na to ma także gęstość wiązań i struktura molekuł w nich uczestnicząca. Silniejsze wiązanie taliny 2 z β 1-integryną wpływałoby na wzrost stabilizacji stanu otwartego heterodimeru integrzyn i wzmocnienie jego oddziaływania z ECM poprzez dodatkowe wiązania wodorowe. Tak więc, poznanie mechanizmów związanych z powstawaniem i działaniem inwadopoidów może pomóc w opracowaniu innowacyjnych metod poprawiających skuteczność leczenia poprzez osłabienie komórek nowotworowych i w zahamowaniu przerzutów. Do tego nurtu działań wpisują się przeprowadzone przez p. Z.Bastera badania wpływu cyjanidyno-3-O-glukozydu (C3G) na interakcje taliny1 i taliny2 z β 1-integryną w procesie nowotworzenia i adhezji komórek jelita grubego. W literaturze można było znaleźć nieliczne doniesienia o związku C3G, znanym ze swych właściwości antyutleniających, sugerujące o jego potencjalnym działaniu antynowotworowym.

Na rozprawę doktorską mgr. inż. Zbigniewa Bastera składają się trzy prace naukowe opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w których jest pierwszym autorem, a w dwóch spośród nich autorem korespondencyjnym (a.k.). Poniżej wymienione są w kolejności, w której umieścił je Doktorant:

- P1) Z.Baster and Z.Rajfur, „BatchDeconvolution: a Fiji plugin for increasing deconvolution workflow” (2020) *Bio-Algorithms and Med. Systems* 16(3): 20200027; (ZB – k.a.; 5-letni IF= 0.334)
- P2) Z.Baster, L. Li, Z.Rajfur and Cai Huang, „Talin2 mediates secretion and trafficking of matrix metalloproteinase 9 during invadopodium formation” (2020) *BBA- Molecular Cell Research* 1867: 118693; (ZB – k.a.; 5-letni IF= 4.578);
- P3) Z.Baster, L.Li, S.Kukkurainen, J.Chen, O.Pentikainen, B. Gyorffy, V.P.Hytonen, H.Zhu, Z.Rajfur and C.Huang, “Cyanidin-3-glucoside binds to talin and modulates colon cancer cell adhesions and 3D growth” (2020) *FASEB Journal* 34: 2227-2237 (5-letni IF= 4.368).

Praca p. Z.Bastera liczy łącznie 151 stron i została napisana w języku angielskim. Jest zredagowana z dużą starannością. Na początku Doktorant zamieścił stosowne oświadczenie, podziękowania, spis treści, listę użytych akronimów i skrótów, abstrakt w języku angielskim i w języku polskim, streszczenie. Dalsza część pracy została podzielona na pięć rozdziałów (*Wprowadzenie, Zakres badań, Podsumowanie wyników i komentarze, Końcowe uwagi, Referencje*). Stanowią one zwięzłe wprowadzenie do tematu będącego przedmiotem rozprawy oraz techniki eksperymentalnej – mikroskopii fluorescencyjnej, którą między innymi stosował w swoich badaniach. Pierwsze trzy załączniki są publikacjami w/w wymienionymi. W dwóch kolejnych załącznikach zamieścił oświadczenie o własnym wkładzie do publikacji przedstawionych w ramach rozprawy doktorskiej oraz wkładzie pozostałych współautorów i umowy licencyjne dotyczące praw autorskich.

Z oświadczenia p. Zbigniewa Bastera wynika, że w przypadku publikacji:

- (P1) samodzielnie sformułował problem, rozwinął program, przeprowadził testy poprawności działania algorytmów, interpretacji i dyskusji wyników, sformułował konkluzje oraz przygotował manuskrypt wraz z szatą graficzną;
- (P2) zajmował się stroną eksperymentalną, począwszy od przygotowania próbek poprzez zaplanowanie pomiarów mikroskopowych po ich przeprowadzenie, a następnie opracowanie uzyskanych wyników wykorzystując oprogramowanie przedstawionego w pracy (P1); zaproponował model molekularny uwalniania metaloproteiny macierzy pozakomórkowej 9 (MMP 9) przy współudziale taliny2; przeprowadził interpretację i

dyskusję uzyskanych wyników; sformułował wnioski; przygotował manuskrypt wraz z rysunkami;

(P3) brał udział w doborze metod eksperymentalnych, przeprowadził badania aktywacji i adhezji intergryn w komórkach raka piersi; zaproponował model molekularny udziału C3G w regulacji oddziaływania talina-integryna; uczestniczył w interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników; brał udział w przygotowaniu manuskryptu; przygotował przegląd literatury.

Zarówno oświadczenia p. Z. Bastera jak i pozostałych współautorów wskazują na jego znaczący wkład w w/w wymienionych pracach. Doktorant stworzył oprogramowanie, które połączyło istniejące programy PSF Generator i DeconvolutionLab2, umożliwiające wydajne i szybkie procesowanie wielu plików do uzyskiwania obrazów z dekonwolucją 3D w mikroskopii fluorescencyjnej przy minimalnym nakładzie pracy ze strony użytkownika (praca P1). Dzięki temu znacznie zwiększyła się funkcjonalność istniejącego oprogramowania pozwalając na masową obróbkę obrazów. Z powodzeniem narzędzie to wykorzystał do obróbki obrazów fluorescencyjnych w swojej kolejnej pracy (P2). Pokazał w niej, iż zablokowanie ekspresji talin2 w komórkach raka piersi nie pozwala na dokowanie pęcherzyków MMP 2 i MMP 9 do błony podstawowej, co hamuje degradację ECM. Podobny efekt zaobserwował w przypadku mutacji punktowej Ser339Cys białka talin2 powodującej obniżenie powinowactwa jego do $\beta 1$ integryny i w efekcie również zahamowanie sekrecji MMP 9. Wskazuje to na konieczność występowania silnego wiązania taliny2 z $\beta 1$ integryną, by uruchomić sekrecję MMP 9 i dojrzewanie inwadopoidów w początkowych stadiach inwazji nowotworowej. W przypadku komórek pozbawionych taliny2 wzrost liczby przerośniętych pęcherzyków wewnątrzkomórkowych mógł wynikać z ograniczenia wydajności procesu ich degradacji w lizosomach. Wyniki badań nad molekularnym mechanizmem oddziaływania C3G z matrycą komórkową, które potencjalnie byłyby odpowiedzialne za jego antynowotworowe własności zawarł w pracy P3. Wskazał miejsce łączące talin1 z $\beta 1$ integryną jako miejsce wiązania C3G, które poprzez oddziaływania allosteryczne wpływa na zwiększenie powinowactwa taliny do integryny wpływając na zwiększoną adhezję komórek raka jelita grubego. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* nie zaobserwowano wpływu C3G na poliferaację komórek rakowych, ale zauważono znaczące zahamowanie wzrostu mini-guzów raka jelita grubego.

Bez wątpienia wyniki uzyskane przez p. Z. Bastera znacząco wpłynęły na lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych związanych z funkcjonowaniem białek taliny1 i taliny2, które mają wpływ na procesy powstawania i rozprzestrzeniania się nowotworów. Sam fakt, że prace ukazały się w bardzo dobrych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu jest tego dowodem. Tak więc osiągnięcia Doktoranta uzyskały już pozytywną recenzję ekspertów w tej dziedzinie. Nie mam więc żadnych uwag krytycznych. Jedynie kierując się ciekawością chciałabym się dowiedzieć:

- jakie inne czynniki jego zdaniem mogą uczestniczyć w mechanizmie, który opisał w swojej pracy P2 (według oznaczenia w niniejszej recenzji) odnosząc się do graficznego abstraktu przedstawionego w rozprawie doktorskiej na stronie 79;
- jakie skutki może wywołać nadmierna akumulacja pęcherzyków z MMP9 wewnątrz komórki.

W trakcie realizacji doktoratu p. Z. Baster zdobył duże doświadczenie i szeroko zakrojoną wiedzę, umiejętność współpracy z wieloma zespołami badawczymi, a efektem tego jest jego współautorstwo w 23 publikacjach, nie wliczając tych wchodzących do rozprawy doktorskiej. Potrafi samodzielnie stawiać i rozwiązywać problemy badawcze, co udowodnił

zdobywając granty naukowe. Można więc powiedzieć, że jest już „dojrzałym” naukowcem, który wykazuje wszechstronne zainteresowania i przygotowanie do samodzielnej pracy badawczej.

Wyniki uzyskane przez pana Z. Bastera w ramach pracy doktorskiej wnoszą nie tylko istotny wkład do badań podstawowych nad rolą talin w procesie przerzutowania nowotworów, ale też mają potencjalne zastosowanie praktyczne, gdyż dokonane obserwacje mogą przyczynić się do wykorzystania nowych mechanizmów w terapii antynowotworowej.

Praca spełnia wszystkie kryteria rozprawy doktorskiej i dlatego wnioskuję o dopuszczenie pana mgr. inż. Zbigniewa Bastera do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, ze względu na bardzo ważny wkład Doktoranta w rozwój zrozumienia mechanizmów prowadzących do przerzutów nowotworów przy udziale białek talin oraz potencjalną terapeutyczną aplikacyjność tych procesów, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej p. mgr. inż. Zbigniewa Bastera.

Prof. dr hab. Květoslava Burda

