Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD PATOLOGII KOMÓRKI
ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

www.biotech.uni.wroc.pl

Dr hab. Dorota Nowak

Wrocław, 8 listopada 2017

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR. SŁAWOMIRA LASOTY PT. „ROLA DOKOMÓRKOWYCH PROSTOWNICZYCH KANAŁÓW POTASOWYCH KIR W ELEKTROTAKSJI FIBROBLASTÓW SWISS 3T3"

Zdolność komórek do poruszania się jest niezmiernie ważnym aspektem prawidłowego funkcjonowania żywych organizmów. Miliony komórek naszego ciała znajdują się w nieustającym ruchu, uczestnicząc zarówno w procesach fizjologicznych takich jak morfogeneza, różnicowanie, gojenie ran, angiogeneza, infekcje, jak i patologicznych takich jak tworzenie przerzutów nowotworu. Z tego właśnie względu szczegółowe poznanie molekularnych podstaw procesu migracji komórkowej jest niezmiernie istotne dla wyjaśnienia szeregu procesów zachodzących w organizmie.

Jednym z czynników istotnych dla kierunkowego ruchu komórek jest endogenne pole elektryczne generowane przez mikrośrodowisko, jednakże nie poznano jak dotąd dokładnych mechanizmów detekcji tego pola przez poruszające się komórki. Praca doktorska Pana mgr. Sławomira Lasoty włącza się w ten nurt badań, dotyczy bowiem ustalenia roli elektrotaksji w ukierunkowanym ruchu komórkowym na modelu linii fibroblastów mysich Swiss 3T3.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Zbigniewa Madeji, w Zespole posiadającym bardzo duże tradycje w zakresie badań nad kierunkową migracją komórkową.

Oceniana przeze mnie praca liczy 141 stron, w tekście zamieszczono 32 ryciny, 17 tabel i cytowano 166 pozycji literaturowych, wśród których blisko połowa pochodzi z ostatnich pięciu lat. Ponadto w celu pełniejszego przedstawienia uzyskanych wyników Doktorant dołączył do pracy płytę z filmami ilustrującymi dynamikę obserwowanych reakcji elektrotaktycznych, co bardzo ułatwia analizę przeprowadzonych eksperymentów. Rozprawa doktorska mgr. Sławomira Lasoty ma układ typowy dla tego typu opracowań. W 30 stronicowym „Wstępie" Autor przedstawił informacje przybliżające temat i ułatwiające czytelnikowi zrozumienie całości pracy. W rozdziale tym Doktorant zamieszcza dane dotyczące pochodzenia endogennych pól elektrycznych działających na komórki w warunkach fizjologicznych. Ponadto przedstawia stan wiedzy na temat

proponowanych mechanizmów detekcji tych pól, ze szczególnym uwzględnieniem roli dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir. Zakres informacji zawartych we wstępie jest adekwatny do opisanych później wyników i nie zawiera zbędnych wątków. W odbiorze tekstu pomogłyby natomiast ilustracje, których brakuje. Jedyny, ułatwiający odbiór tekstu schemat znajduje się na stronie 13 (ryc.1).

W rozdziale „Materiały i metody" Autor zawiera wyczerpujące informacje dotyczące zarówno stosowanego w pracy modelu komórkowego, jak i metod eksperymentalnych służących do badania dynamiki reakcji elektrotaktycznej komórek, rejestracji obrazu, analizy ilościowej kierunkowej migracji, oraz analiz statystycznych. W przeciwieństwie do „Wstępu", w tej części pracy Autor wspiera opis stosowanych metod rycinami (Ryc. 2-4), które bardzo dobrze wyjaśniają czytelnikowi w jaki sposób przeprowadzono eksperymenty. Ze sposobu opisu doświadczeń dotyczących pomiaru elektrotaksji oraz z analizy dorobku naukowego można wysnuć wniosek, że Doktorant bardzo interesuje się tym zagadnieniem.

Przy opisie metod Autor opracowania nie ustrzegł się żargonu laboratoryjnego, w tym zapożyczeń z języka angielskiego. Dla przykładu, termin „bankowanie" zręczniej zastąpić słowem „przechowywanie", „pellet" to po prostu osad, przy określaniu czasu lepiej posłużyć się „godziną" nie zaś skrótem „h" od angielskiego słowa „hour". Wreszcie przy opisywaniu parametrów wirowania, posługujemy się siłą odśrodkową wirowania odniesioną do przyśpieszenia ziemskiego g czyli np. 200 x g, nie 200 g - jak pisze Autor.

Najważniejszy rozdział rozprawy doktorskiej to oczywiście „Wyniki", w którym Doktorant przedstawia główne rezultaty swoich eksperymentów dotyczących ustalenia roli dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir w elektrotaksji. W pierwszym etapie badań analizuje aktywność elektrotaktyczną fibroblastów Swiss 3T3 w polach elektrycznych o fizjologicznym natężeniu. Wskazuje na ich ukierunkowany ruch oraz dynamiczny proces tworzenia wypustek migracyjnych po stronie katody, co może odzwierciedlać sytuację zaistniałą w trakcie procesu gojenia się ran, podczas którego biegun ujemny endogennego pola elektrycznego lokalizuje się w centrum rany. Na podstawie tych wstępnych obserwacji Autor sugeruje, że w reakcję elektrotaktyczną badanych komórek są zaangażowane różne mechanizmy, które ulegają aktywacji w zależności od wielkości i natężenia pola elektrycznego, jak i z różnym opóźnieniem od momentu aplikacji pola elektrycznego.

W swojej pracy mgr Lasota przedstawia szczegółową charakterystykę ilościową dynamiki reakcji elektrotaktycznej fibroblastów, jak również porównuje pierwotną reakcję na pole z dynamiką nawrotu w odpowiedzi na zamianę jego biegunów. Wykazuje, że pierwsze

symptomy reakcji na pole elektryczne mają miejsce w czasie do 2 minut od jego aplikacji, zaś zamiana biegunów wywołuje jeszcze szybszą reakcję. Na podstawie tych obserwacji Doktorant wyciąga słuszny wniosek, że tak dynamicznej reakcji na pole elektryczne nie można tłumaczyć proponowanym w ostatnich latach mechanizmem odpowiedzi opartym na redystrybucji białek błonowych o charakterze receptorowym. To stwierdzenie skłoniło Autora pracy do poszukiwania innych mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko.

Stąd uzasadnienie dalszych badań, które wykazały, że w mechanizm detekcji pola elektrycznego o fizjologicznym natężeniu w sposób szczególny zaangażowane są dokomórkowe prostownicze kanały potasowe Kir4.2 w połączeniu z poliaminami – sperminą i spermidyną. Miałam jednak na tym etapie czytania pracy pewien niedosyt informacji. Z literatury wiadomo, że wśród dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych Kir wyróżnia się 7 podrodzin Kir1.x - Kir7.x, z których najliczniejsze obejmują do 4 przedstawicieli. Dodatkowo, funkcjonalne zróżnicowanie kanałów Kir komplikuje fakt, iż formują one homo- lub heterotetramery. Chciałam zatem zapytać Doktoranta, czy wiadomo jaki jest profil ekspresji genów odpowiedzialnych za tworzenie tych kanałów w fibroblastach Swiss 3T3 i jak uzasadnia On wybór kanału Kir 4.2 jako głównego celu swoich eksperymentów?

W dalszej części pracy bowiem, mgr Lasota, stosując odpowiednie siRNA, dokonuje wyciszenia ekspresji genu KCNJ15 kodującego kanał Kir 4.2 w fibroblastach Swiss 3T3. Zabieg ten wywołuje podobny wpływ na reakcję elektrotaktyczną badanych komórek, jak farmakologiczne zahamowanie całej rodziny tych kanałów.

Uzyskane przez mgr Lasotę wyniki wskazały, że funkcja kanałów Kir jest szczególnie istotna w pierwotnej, szybkiej odpowiedzi na pole elektryczne, jednakże wzrost kierunkowości ruchu komórek z zahamowaną funkcją tych kanałów w czasie dłuższej ekspozycji na pole może wskazywać na obecność dodatkowych mechanizmów reakcji elektrotaktycznych. Dlatego też dalszym etapem badań była farmakologiczna inhibicja aktywności wybranych białek sygnalizacyjnych uczestniczących w reakcji migrującej komórki na obu jej biegunach. Uzyskane przez Doktoranta wyniki wskazują, że dla generowania skurczu po stronie anody istotna jest aktywność miozyny II pod kontrolą kinazy ROCK. Wydaje się, że w proces ten nie są zaangażowane zmiany stężenia jonów wapnia, co zostało potwierdzone licznymi metodami. Z kolei dynamiczny proces tworzenia wypustek migracyjnych po stronie katody przebiega pod kontrolą białka Rac1, z prawdopodobnym udziałem kinazy PI3K.

Podsumowując dane doświadczalne zawarte w pracy doktorskiej, mgr Lasota stwierdza, że w reakcję elektrotaktyczną fibroblastów Swiss 3T3 zaangażowane są różne mechanizmy, które ulegają aktywacji zarówno przy różnym natężeniu pola elektrycznego, jak i z różnym opóźnieniem od momentu aplikacji pola elektrycznego.

Ostatnim rozdziałem ocenianej przeze mnie pracy jest obszerna, 23 stronicowa „Dyskusja". Rozdział ten przeczytałam z dużym zainteresowaniem, bowiem zagłębiając się w analizę prezentowanych wcześniej wyników zastanawiałam się, jak wiele wniosków właściwych dla modelu fibroblastów Swiss 3T3 będzie miało charakter uniwersalny w przypadku innych migrujących komórek prawidłowych i nowotworowych. Zgodnie z moimi oczekiwaniami, mgr Lasota w tej części pracy podjął próbę weryfikacji uzyskanych rezultatów z danymi literaturowymi. Ogromna złożoność badanego zagadnienia znalazła odzwierciedlenie w piśmiennictwie, gdzie na przestrzeni ostatnich kilku dekad zaproponowano szereg pozornie wykluczających się mechanizmów, leżących u podstaw elektrotaksji. Sytuację komplikuje również brak standaryzacji aparatury badawczej, jak i stosowanie szerokiego zakresu natężeń pola elektrycznego oraz prowadzenie obserwacji w zróżnicowanej skali czasowej. W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej poddano obserwacji szereg aspektów dotyczących reakcji na pole elektryczne, ze szczególnym uwzględnieniem dynamiki tej odpowiedzi, co pozwala na szersze spojrzenie na badany proces. Ze względu na znaczną ilość różnorodnych doniesień dotyczących reakcji elektrotaktyczych komórek różnego typu omawianych przez Doktoranta, zabrakło mi jednak w tej części pracy zbiorczego zestawienia danych (np. w postaci tabeli), które ułatwiłoby porządkowanie stanu wiedzy i wyciąganie bardziej uniwersalnych wniosków. Mam nadzieję, że Doktorant będzie mógł dokonać takiego podsumowania w czasie publicznej obrony.

Oceniana przeze mnie praca została napisana poprawna polszczyzną i starannie opracowana pod względem edytorskim, zaś wymienione wcześniej drobne błędy dotyczą wyłącznie części metodycznej.

Analizując dorobek publikacyjny Pana mgr Lasoty stwierdzam, że jest On współautorem siedmiu publikacji, dwie kolejne są przyjęte do druku. W jednej z prac przeglądowych Doktorant jest pierwszym autorem, zaś pozostałe dotyczą badań nad migracją komórek prawidłowych i nowotworowych.

Reasumując, rozprawę doktorską pana mgr Sławomira Lasoty oceniam bardzo pozytywnie. W moim przekonaniu Autor uzyskał interesujące wyniki, które uzupełniają wiedzę o mechanizmach reakcji elektrotaktycznych migrujących komórek. Mogą

stanowić podstawę do dalszych badań nad nowymi strategiami terapeutycznymi związanymi przykładowo z procesami gojenia się ran.

Przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom Ustawy z dnia 18.03.2011 o stopniach i tytule naukowym (z późniejszymi zmianami). Wnoszę zatem do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. Sławomira Lasoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

