

Bydgoszcz 27. 09. 2015

Prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka  
Kierownik Katedry i Zakładu  
Histologii i Embriologii, CM w Bydgoszczy,  
UMK w Toruniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Simiczyjew  
pt. „Zróżnicowanie funkcjonalne izoform aktyny  $\beta$  i  $\gamma$   
w procesie migracji komórek nowotworowych”**

Recenzowana praca dotyczy bardzo ważnego procesu, jakim jest migracja komórek nowotworowych oraz udziału w nim dwóch cytoplazmatycznych izoform aktyny -  $\beta$  i  $\gamma$ . Pozostaje ona w nurcie badań nad cytoszkieletem aktynowym, który odgrywa kluczową rolę nie tylko w migracji komórek, ale także w wielu innych zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych procesach komórkowych. Z dotychczasowych badań wynika, że w trakcie przerzutowania komórki nowotworowe wykorzystują jeden z dwóch typów migracji – mezenchymalny lub ameboidalny. A zatem zamysł zaprojektowania badań w oparciu o dwa różniące się typem ruchu modele komórek nowotworowych wydają się zasadne i pozwoliły Doktorantce zrealizować założone przez Nią cele pracy.

Należy nadmienić, że za celowością przeprowadzenia niniejszych badań przemawia również fakt, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja izoform aktyny -  $\beta$  i  $\gamma$  oraz pełnione przez nie funkcje pozostają w dalszym ciągu nie w pełni wyjaśnione. Temat rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Simiczyjew pt. „Zróżnicowanie funkcjonalne izoform aktyny  $\beta$  i  $\gamma$  w procesie migracji komórek nowotworowych” uważam za interesujący i posiadający znaczenie poznawcze. Doktorantka podjęła się zbadania czy w

procesie migracji komórek nowotworowych istnieje funkcjonalne zróżnicowanie cytoplazmatycznych, niemięśniowych izoform aktyny –  $\beta$  i  $\gamma$  oraz jaki jest ich udział w mezenchymalnym i ameboidalnym typie ruchu. Dokonała również szczegółowej analizy roli badanych izoform aktyny w powstawaniu i aktywności inwadopodiów.

Rozprawa doktorska przygotowana jest bardzo starannie, napisana jest w sposób przejrzysty, zwięzły i zrozumiały. Obejmuje 172 strony maszynopisu i podzielona jest na rozdziały i podrozdziały w sposób wymagany dla rozpraw doktorskich. Na początku rozprawy oprócz zwięzłego i rzeczowego streszczenia (w języku angielskim i polskim) znajduje się wykaz skrótów użytych w pracy, co znacznie ułatwia zapoznanie się z tekstem. Podział rozprawy doktorskiej na poszczególne rozdziały i podrozdziały, a także ich wzajemne proporcje są właściwe.

Wstęp oparty jest o dobrze dobrane piśmiennictwo, uwzględniające najnowszą wiedzę w zakresie tematyki badawczej. Rozdział ten jest zrozumiały i daje dobre podstawy do lektury dalszych części rozprawy, wskazuje także na dużą wiedzę Doktorantki w zakresie tematyki badawczej.

Jasno i precyzyjnie sformułowany przez Doktorantkę cel pracy został w całości zrealizowany, w czym pomogły Jej właściwie dobrane techniki badawcze.

W rozdziale "Materiały i Metody" Doktorantka bardzo dokładnie opisała wszystkie metody jakie stosowała w swoich doświadczeniach na poszczególnych etapach badań m.in. oznaczanie ilości DNA i RNA, przejściową transfekcję komórek plazmidami kodującymi cytoplazmatyczne izoformy aktyny, stabilną transfekcję komórek plazmidami pAcGFP-C1- $\beta$  aktyna i pAcGFP-C1- $\gamma$  aktyna, analizę qRT-PCR – PCR w czasie rzeczywistym, przygotowanie ekstraktów komórkowych, izolację frakcji cytoplazmatycznej, oznaczanie stężenia białka metodą Bradford, elektroforezę białkową w warunkach denaturujących, immunoblotting, test cytotoksyczności XTT oraz oznaczenie stopnia spolimeryzowania aktyny. Opisała Ona także techniki mikroskopowe zastosowane w badaniach, jak również metody służące do badania inwadopodiów, test adhezji komórek, oznaczanie współczynnika migracji i inwazji oraz metodykę do określenia prędkości migracji i inwazji komórek. Materiał badawczy stanowiły dwie linie komórkowe: linia ludzkiego raka piersi MDA-MB-231 jako model komórek poruszających się mezenchymalnie oraz komórki nowotworu jelita grubego LS174T, migrujące ameboidalnie. Rozdział ten został napisany jasno i wyczerpująco, a

przedstawiony w nim warsztat badawczy jest na wysokim poziomie i pokazuje jaki ogrom pracy Doktorantka wykonała, aby zrealizować cele jakie sobie postawiła w pracy.

Rozdział "Wyniki" jest obszerny, liczy 70 stron maszynopisu, napisany jest jasno i konkretnie. Na uwagę zasługuje fakt, że podzielony został na trzy podrozdziały, w których Doktorantka logicznie i wyczerpująco opisuje wyniki otrzymane na poszczególnych etapach doświadczenia, co pozwala czytającemu dokładnie przeanalizować efekty całego doświadczenia. Należy również zaznaczyć, że w każdym podrozdziale omówione wyniki ilustrowane są jednocześnie przemyślanymi rycinami w formie wykresów oraz zdjęć mikroskopowych, co wpływa na przejrzystość przedstawionych wyników i znacznie ułatwia zapoznanie się z nimi. Pierwszy podrozdział opiera się na charakterystyce komórek wykorzystujących odmienne typy ruchu, które zostały zastosowane w niniejszej pracy. W badaniach stwierdzono, iż poziom izoform aktyny  $\beta$  i  $\gamma$  w obu typach komórek jest zbliżony i obydwie izoformy występują głównie w obszarze podbłonowym, w obrębie wypustek związanych z ruchem komórek – lamellipodiów i invadopodiów w komórkach migrujących mezenchymalnie oraz pęcherzyków migracyjnych w komórkach migrujących ameboidalnie. W drugim podrozdziale obejmującym wyniki wykazano, że w przypadku badanych linii komórkowych podwyższenie ekspresji genów obu cytoplazmatycznych izoform aktyny spowodowało wzrost zdolności migracyjnych i inwazyjnych tych komórek. Doprowadziło również do podwyższenia stopnia spolimeryzowania aktyny, mierzonego stosunkiem ilości aktyny filamentarnej do monomerycznej. Egzogenne aktyny, obecne w komórkach wskutek transfekcji, występowały głównie w formie spolimeryzowanej i zlokalizowane były w obszarze podbłonowym. Ich obecność powodowała również wzrost zdolności obu typów komórek do tworzenia wypustek migracyjnych. W trzecim podrozdziale Doktorantka opisała wyniki dotyczące udziału  $\beta$  i  $\gamma$  aktyny w tworzeniu invadopodiów. Wskazują one, że obie badane cytoplazmatyczne izoformy aktyny biorą udział w formowaniu aktywnych proteolitycznie invadopodiów, tworzonych zarówno w środowisku 2D jak i 3D. Wyniki uzyskane poprzez badanie aktyn endogennych potwierdzono eksperymentami prowadzonymi na komórkach ekspresjonujących egzogenne izoformy aktyny i wykazano, iż zwiększone zdolności inwazyjne komórek nowotworowych odznaczających się podwyższoną ekspresją genów  $\beta$  i  $\gamma$  aktyny mogą wiązać się z tworzeniem przez nie dużej liczby aktywnych invadopodiów.

Otrzymane wyniki zostały omówione i poddane dogłębnej analizie w rozdziale "Dyskusja", który napisany jest rzeczowo i merytorycznie. Wysoki poziom tej części rozprawy doktorskiej świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i bardzo dobrym przygotowaniu do pracy naukowej. W rozdziale tym mgr Aleksandra Simiczyjew odniosła się do dostępnych w piśmiennictwie publikacji innych autorów, wykazując dużą kompetencję, zrozumienie przeprowadzonych badań jak i krytyczną analizę własnych badań w stosunku do innych badaczy. Jest to rozdział dość obszerny, Doktorantka pisząc go udowodniła, że potrafi ustosunkować się do wyników badań własnych w kontekście dobrze dobranego piśmiennictwa.

Rozprawę doktorską kończy rozdział Wnioski, który obejmuje jasno, logicznie sformułowane wnioski o dużej wartości poznawczej otrzymane na podstawie uzyskanych wyników.

Piśmiennictwo obejmuje 200 pozycji, pochodzących z prestiżowych czasopism, dobrze dobranych i wykorzystanych w rozprawie.

Z rozprawy doktorskiej wynika, że Doktorantka potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, dobrze dobrać i opanować techniki badawcze, a także umiejętnie przeprowadzić dyskusję swoich wyników z wynikami innych grup badawczych. A zatem, udowodniła ona, że posiada zdolności do prowadzenia samodzielnych badań naukowych.

Podsumowując, mogę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca mgr Aleksandry Simiczyjew pt. „Zróżnicowanie funkcjonalne izoform aktywności  $\beta$  i  $\gamma$  w procesie migracji komórek nowotworowych” w pełni odpowiada warunkom Ustawy z dnia 18.03.2011 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych, a dorobek naukowy Kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Simiczyjew do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, ze względu na jej wysoki poziom oraz oryginalność uzyskanych wyników. Nadmieniam, że część wyników recenzowanej pracy doktorskiej została już opublikowana w czasopiśmie Histochem Cell Biol. o IF wynoszącym 3,193.