

**OCENA PRACY DOKTORSKIEJ AUTORSTWA MGR INŻ. PAWŁA KRAWCZYKA, ZATYTUŁOWANEJ:
NEURYTOGENEZA KOMÓREK PC12-TET-ON WARUNKOWANA INDUKOWANĄ EKSPRESJĄ
GENÓW KODUJĄCYCH WARIANTY RECEPTOROWEJ KINAZY TYROZYNOWEJ TRKC**

Praca doktorska pana mgr inż. Pawła Krawczyka przedstawia wyniki badań przeprowadzonych przez doktoranta w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Promotorem pracy był dr hab. Janusz Matuszyk. Przedstawiona do oceny praca ma formę przewidzianą w Art. 13 p. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 3 czerwca 2016, czyli stanowi maszynopis książki. Do pracy dołączone zostało oświadczenie Autora o tym, że część wyników rozprawy została opublikowana w publikacji oryginalnej z 2015 roku, oraz w pracy poglądowej z 2011 roku.

Mimo, że miejscem realizacji pracy było Laboratorium Immunologii Mikrobiomu, to tematyka pracy dotyczy neurobiologii eksperymentalnej i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Badania prowadzone przez Autora rozprawy były finansowane z grantu badawczego NCN.

Celem wykonanej pracy było wyjaśnienie znaczenia sekwencji adaptorowej dla PLC γ 1, oraz sekwencji poprzedzającej to miejsce w C-końcowym regionie receptora TrkC, dla indukcji neurytogenezy pod wpływem NT3. Do realizacji tego celu niezbędne było stworzenie odpowiedniego modelu badawczego, to właśnie zadanie wypełniło większość czasu realizacji projektu.

Badania opisano w tradycyjnej Rozprawie, która liczy 98 stron, Składają się na nią następujące rozdziały: Wykaz skrótów, Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Abstract, Piśmiennictwo oraz Spis rycin i tabel. Struktura rozprawy jest więc typowa dla rozpraw doktorskich, różni się jedynie od większości umieszczeniem streszczeń na końcu, a nie na początku.

Wstęp liczy 26 stron, jest przejrzysto napisany i obejmuje wszystkie zagadnienia niezbędne dla zrozumienia treści badań. Opisano w nim pokrótce neurytogenezę, receptory w nią zaangażowane i aktywowane przez te receptory szlaki sygnałowe. Opisano także systemy indukcji ekspresji genów wykorzystane potem w tworzeniu modeli komórkowych do badań. Wstęp jest dobrze ilustrowany. Jedynym zastrzeżeniem, jakie mam do tej części pracy, jest umieszczenie w niej Tabeli 1. Tabela ta jest rezultatem analiz przeprowadzonych przez Autora i powinna znaleźć się w rozdziale Wyniki.

Rozdział Materiały i metody liczy 14 stron i wydaje się być wyczerpująco napisany.

Rozdział Wyniki ma 32 strony. Pierwsze 25 stron to opis przygotowania modeli komórkowych oraz ich dokładna charakterystyka. Dopiero ostatnie 7 stron to badanie hipotezy, która stała u podstaw podjętej pracy. Ten rozdział również jest nieźle napisany, mam jednak do niego kilka pytań, lub uwag krytycznych. Na stronie 47 napisano „Komórki PC12-Tet-On były następnie w badaniach własnych stabilnie transfekowane”. Czy oznacza to, że Autor rozprawy wykonał transfekcję? Rysunki 13 A-D mają bardzo niewyraźne oznaczenia. Można się oczywiście domyślić, co to jest tam napisane, lecz litery i cyfry powinny być bardziej wyraźne, choćby takie jak na Rycinie 13 E-F. Na rycinie 16 przedstawiono obrazy mikroskopowe uzyskanych modeli komórkowych barwione na obecność receptora TrkC, z wybarwionymi jądrami komórkowymi. Szkoda, że przedstawione powiększenie nie jest większe. Trudno zorientować się, w jakich obszarach komórek znajdują się wybarwione receptory. Przy tak małych obrazach wydaje się, że kolory jąder komórkowych (zielony) i receptorów (czerwony) nakładają się na siebie, co nie powinno mieć miejsca. Jakkolwiek modele komórkowe scharakteryzowane zostały bardzo szczegółowo, to wydaje się, że przydałoby się jeszcze barwienie uzyskanych komórek po ekspozycji na doksycyklinę i NT3 na obecność PLC γ 1. Pozwoliłoby to stwierdzić, czy w modelu nazwanym TrkC-820 PLC γ 1 nie jest rekrutowana do błony komórkowej. Czy Autor próbował takich eksperymentów. W ostatniej części Wyników wykazano, że zarówno mutacja w miejscu dokującym PLC γ 1, jak i w miejscu je poprzedzającym, mają wpływ na neurytogenezę aktywowaną przez NT3. Ten wpływ jest przeciwny. Bardzo

dobrym pomysłem Autora było napisanie po każdym podrozdziale krótkiego podsumowania. Dobrze oceniam też pokazanie w tabelach 7 i 8 wycinków eksperymentów western-blot, które bardzo ułatwiają ich analizę.

Rozdział Dyskusja liczy nieco ponad 4 strony. Analizowane są tam wyniki związane z badaniem hipotezy leżącej u podstaw pracy. Piśmiennictwo liczy 119 pozycji adekwatnych do tematyki rozprawy.

Za najważniejsze osiągnięcie tej pracy uważam stworzenie modeli do badań, oraz ich precyzyjną charakterystykę. Wydaje mi się, że wybrane klony komórek PC-12 uzyskane przez Autora mogą być wykorzystane do dalszych badań, które będą stanowić podstawę do dalszych publikacji.

Praca jest starannie napisana, znalazłam nieliczne błędy literowe, które mogą być wynikiem niezależnej działalności edytora tekstu. Bardzo pozytywnie oceniam też zwięzłość pracy, która nie umniejsza klarowności.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej jest pozytywna. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Pawła Krawczyka przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

