



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

dr hab. n. farm Joanna Gdula-Argasińska  
Katedra Farmakobiologii  
Zakład Radioligandów  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków  
Tel. 12 6205 664  
e-mail: joanna.gdula-argasinska@uj.edu.pl

1

Kraków 26.08.2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Pawła Krawczyka  
pt.: „Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On warunkowana indukowaną ekspresją genów kodujących  
warianty receptorowej kinazy tyrozynowej TrkC”

wykonanej pod kierunkiem Pana Dr hab. Janusza Matuszyka  
w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im.  
Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Proces neurytogenezy zachodzi intensywnie w rozwijającym się układzie nerwowym. Obwodowy układ nerwowy u dorosłych ssaków posiada zdolność do odbudowy, ośrodkowy układ nerwowy zaś, ma ograniczoną zdolność do regeneracji. Za ograniczenia odbudowy funkcjonalnej mogą odpowiadać proteoglikany siarczanu chondroityny, glikoproteina związana z mieliną, które są deponowane przez mielinę ośrodkowego układu nerwowego, jak również obniżenie poziomu czynników neurotroficznycy. Badania neurytogenezy, które są obecnie prowadzone, już przyniosły wyniki o dużym znaczeniu w biologii i funkcjonowaniu komórek nerwowych i odgrywają coraz większą rolę w medycynie. Zidentyfikowanie związków regulatorowych, odpowiedzialnych za kierowanie neurytogenezą podczas rozwoju, może być kluczowe w celu aktywacji i regeneracji komórek nerwowych. Jednak identyfikacja celów terapeutycznych jest trudna, ponieważ mechanizmy leżące u podstaw tworzenia neurytów pozostają niezbadane. Szczegółowe wyjaśnienie tych mechanizmów ma istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia chorób neurorozwojowych, związanych z urazem rdzenia kręgowego, czy chorób neurodegeneracyjnych, a także zidentyfikowania potencjalnych celów dla innowacyjnej farmakoterapii.



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Pan mgr inż. Paweł Krawczyk wpisuje się w ten trend, stawiając sobie za cel wyjaśnienie znaczenia sekwencji regulatorowych w C-końcowym regionie białka – receptorowej kinazy tyrozynowej C (TrkC), zarówno wiążących fosfolipazę Cy1, jak i bezpośrednio poprzedzających miejsce wiązania PLC.1 w indukcji neurytogenezy zależnej od TrkC. Niezbędnym narzędziem do realizacji powyższego było otrzymanie modelu komórkowego z kontrolowaną ekspresją TrkC oraz analiza szlaków sygnałowych i procesu neurytogenezy w następstwie aktywacji fosfolipazy C.1.

2

**Formalna ocena pracy**

Przedstawiona do recenzji, na podstawie Uchwały Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu z dnia 17 czerwca 2021 r., rozprawa doktorska Pan mgr inż. Pawła Krawczyka to 98-stronicowe opracowanie w j. polskim, zawierające wstęp, materiał i metodykę, opis wyników, dyskusję z wnioskami, streszczenie polskie i angielskie oraz spis piśmiennictwa.

Część wyników ukazała się drukiem w recenzowanym czasopiśmie *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* (2015; 5: 241–248, IF=1.145). Doktorant jest również współautorem pracy poglądowej, powiązanej z rozprawą, opublikowanej w *Postępkach Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (2011; 65: 470–477, IF=0.633).

Warto tu podkreślić, że badania finansowano z grantu Narodowego Centrum Nauki (N N401 063636 „Rola fosfolipazy C w indukcji neurytogenezy przez receptorową kinazę tyrozynową TrkC. Badania *in vitro*”).

**Ocena merytoryczna zawartości pracy**

Wstęp, zawierający się na 31 stronach, stanowi bardzo dobre kompendium wiedzy, zilustrowany jest 10 rycinami, które ułatwiają odbiór tekstu. Definiuje neurytogenezę jako proces różnicowania neuronalnego i tworzenia wypustek nerwowych. Doktorant szczegółowo opisuje mechanizm rearanżacji architektury cytoszkieletu, regulatory, szlaki przekazywania sygnału, czynniki transkrypcyjne oraz główne markery procesu neurytogenezy. W kolejnym podrozdziale charakteryzuje kinazy tyrozynowe Trk, które są receptorami dla neurotrofin i odgrywają istotną rolę w procesie wzrostu, różnicowania i przeżycia komórek nerwowych. W sposób szczegółowy opisuje budowę receptorów Trk oraz mechanizm aktywacji, interakcje dimerów neurotrofin z monomerami Trk, internalizację receptora i proces jego ubikwitynacji. W dalszej części wstępu Autor skupia się na receptorze TrkC, który bierze udział w regulacji proliferacji i różnicowania komórek nerwowych. Opisuje izoformy oraz szlaki sygnałowe receptora TrkC, w szczególności szlak aktywacji kinaz białkowych ERK1/2, transdukcję sygnału poprzez fosfolipazę PLCy1- kinazę białkową C (PKC), szlak kinazy -3-fosfatydyloinozytolu PI3K-PKB/Akt oraz kaskadę sygnałową przy udziale kinazy białkowej A (PKA) w kontekście znaczenia w procesie neurytogenezy. Kolejny podrozdział obejmuje charakterystykę, budowę, specyfikę tkankową



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

izoenzymów fosfolipazy Cy, a także mechanizmy aktywacji fosfolipazy Cy1 zależne od receptorowych kinaz tyrozynowych. Ostatnia część wstępu dotyczy budowy oraz schematu działania i rodzajów tetracyklinowych systemów indukcji ekspresji genów.

3

W dalszej części rozprawy, Doktorant przedstawia cele badawcze, którym było wyjaśnienie znaczenia sekwencji regulatorowych w C-końcowym regionie białka TrkC (zarówno wiążących PLCy1, jak i bezpośrednio poprzedzających miejsce wiązania PLCy1) w indukcji neurytogenezy zależnej od TrkC.

Pani mgr inż. Paweł Krawczyk realizując cele badawcze, otrzymał klony komórek PC12-Tet-On z indukowaną przez doksycylinę ekspresją genów kodujących warianty TrkC, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Potwierdził identyczność sekwencji mRNA kodującego warianty TrkC z sekwencjami DNA użytymi do transfekcji komórek. Obecność wariantów receptora TrkC na powierzchni komórek stabilnych transfektantów PC12-Tet-On udowodnił z wykorzystaniem cytometrii przepływowej oraz mikroskopii fluorescencyjnej. W klonach komórek z ekspresją wariantów TrkC stwierdził porównywalny poziom mRNA dla receptora p75NTR i zróżnicowaną ilość mRNA dla receptorów TrkA.

Inkubacja komórek klonalnych wykazujących ekspresję TrkCwt z neutrofiną NT3 przez pięć dni nie powodowała zmian w poziomie mRNA dla genu trkA. Doktorant wykazał zależność ekspresji genu trkC od stężenia doksycyliny (induktora). W wyniku egzogenego pobudzenia receptora TrkC przez NT3 zaobserwował krótko- i długotrwałą aktywację kinaz ERK1/2 w komórkach TrkCwt 4.1.

Wykazał znaczące różnice w fosforylacji ERK1/2 przez warianty TrkCwt i TrkC817-819, zdolne do rekrutacji PLCy1 i przez wariant TrkC820 niezdolny do rekrutacji PLCy1. Dla klonów TrkC820 (36.1, 55.1 i 65.1) po inkubacji z NT3 przez 5 lub 15 minut wykazał niższą aktywację ERK1/2, oraz nikłą fosforylację kinaz białkowych p38 MAPK i JNK, w porównaniu do komórek TrkCwt 4.1. Klony TrkCwt 4.1 i TrkC817-819 2.1 w następstwie traktowania NT3 przez 15 minut, charakteryzowały się zwiększoną aktywacją kinazy JNK i nieznaczną aktywacją białka p38 MAPK. Dla komórek z ekspresją TrkC typu dzikiego lub wariantu TrkC817-819 zaobserwował fosforylację kinazy Akt w wyniku krótkotrwałej ekspozycji na NT3, w porównaniu do komórek z wariantem receptora TrkC820. Inaktywacja miejsca wiążącego PLCy1 w komórkach TrkC820 (36.1, 55.1 i 65.1) skutkowałą osłabieniem aktywacji kinaz białkowych ERK1/2.

Doktorant otrzymane klony komórek zbadał w kontekście zdolności do tworzenia struktur neurytopodobnych. Wykazał, że w otrzymanych klonach komórek PC12-Tet-On zawierających egzogeny TrkC zdolny do rekrutacji fosfolipazy Cy1, neurytogeneza zachodziła zarówno w obecności nerwowego czynnika wzrostu (ligand TrkA), jak i neurotrofiny 3 (ligand TrkC). Inkubacja z neurotrofiną 3 nie indukowała neurytogenezy w komórkach zawierających TrkC z inaktywowanym miejscem wiązania



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

PLC $\gamma$ 1 lub jej poziom był bardzo niski, co wskazuje na znaczenie reszty tyrozyny w pozycji 820 TrkC dla neurytogenezy oraz sugeruje udział fosfolipazy C $\gamma$ 1 w pobudzaniu tego procesu przez TrkC.

Wykazał ponadto statystycznie istotną tendencję do mocniej, pobudzanej przez neurotrofinę 3, neurytogenezy komórek klonu zawierającego wariant TrkC T817S I819V, w porównaniu z klonem zawierającym TrkC typu dzikiego. Wskazuje to, że przynajmniej w komórkach PC12-Tet-On dla pobudzanego przez neurotrofiny wytwarzania struktur neurytopodobnych, oprócz kluczowej reszty tyrozyny w miejscu przyłączenia fosfolipazy C $\gamma$ 1 do receptora neurotrofiny, znaczenie mają także reszty aminokwasów regionu C-końcowego receptora znajdujące się poza właściwym miejscem rekrutacji fosfolipazy C $\gamma$ 1. Ponadto wykazał statystycznie istotną tendencję do mocniej pobudzanej przez NT3 neurytogenezy komórek klonu 2.1 (wariant TrkC z C-końcem takim jak w TrkB), w porównaniu z klonem 4.1 (TrkC typu dzikiego).

Bardzo wysoko oceniam przedstawioną rozprawę doktorską Pana mgr inż. Pawła Krawczyka. Praca zawiera oryginalne i nowatorskie wyniki, uzyskane nowoczesnymi i właściwie zastosowanymi metodami, które mają także charakter aplikacyjny. Pragnę podkreślić, że Doktorant świetnie opanował warsztat metodologiczny, biegle posługuje się technikami molekularnymi. Potrafi wnikliwie analizować uzyskane wyniki i wyciągać racjonalne wnioski. Potwierdza to nie tylko doskonałe przygotowanie do badań eksperymentalnych, dowodzi również dojrzałości naukowej Doktoranta.

Treść rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Pawła Krawczyka jest zgodna z tezą postawioną w tytule rozprawy. Cel pracy został poprawnie zrealizowany zarówno w części eksperymentalnej, jak i w wynikach oraz podsumowaniu. Dane eksperymentalne zostały także doskonale omówione w dyskusji w kontekście piśmiennictwa światowego. Doktorant w sposób niezwykle staranny udokumentował i zilustrował przeprowadzone eksperymenty, a także dokonał ich wnikliwej analizy.

Rozprawa jest napisana poprawnym językiem, zwracam jednak uwagę na drobne błędy, które napotkałam w pracy:

1. Strona 2 praca oryginalna ukazała się drukiem.
2. Spis treści oraz Metodyka 3.1.7. „Sekwencje oligonukleotydów”, powinno być nukleotydów.
3. Wstęp str. 19 reticulum, powinno być retikulum.
4. Metody str.40 powinno być surowicy końskiej (nie „końską”).
5. Metody str. 41 przy parametrach wirowania powinno się podawać krotność g, a nie ilość obrotów, które są zależne od promienia rotora.
6. Metodyka str. 45 podrozdział 3.2.12. Powtórzenia „Następnie”, może kolejno znakowano...inkubowano z koniugatem... przez 10 min i barwiono.



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

7. Wyniki str. 54 „ Na kolor niebieski...na kolor czerwony” może lepiej kolorem niebieskim, na czerwono...

8. Wyniki str 55. „nietratkowane”, powinno być nietraktowane.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

5

Wnioski końcowe

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pan mgr inż. Pawła Krawczyka w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.).

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr inż. Pawła Krawczyka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom przeprowadzonych eksperymentów, aktualność i nowatorstwo tematyki badawczej oraz walory aplikacyjne wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

**KIEROWNIK**

Zakładu Radioligandów

Katedra Farmakobiologii UJ CM

dr hab. Joanna Gdula-Argasinska

Katedra Farmakobiologii | Zakład Radioligandów

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 6205664

farmakob@cm-uj.krakow.pl



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

dr hab. n. farm Joanna Gdula-Argasińska  
Katedra Farmakobiologii, Zakład Radioligandów  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Kraków 26.08.2022 r.

Szanowny Pan  
Profesor dr hab. Maciej Zabel  
Przewodniczący  
Rady Naukowej  
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
Im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk  
Ul. Rudolfa Weigla 12  
53-114 Wrocław

WNIOSEK

O wyróżnienie Rozprawy Doktorskiej Pana mgr inż. Pawła Krawczyka  
pt: „ Neurytogeneza komórek PC12-Tet-On warunkowana indukowaną ekspresją genów kodujących  
warianty receptorowej kinazy tyrozynowej TrkC”  
wykonanej pod kierunkiem Pana Dr hab. Janusza Matuszyka  
w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im.  
Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Wniosuję o wyróżnienie w/w Dysertacji ponieważ spełnia regulaminowe wymogi Rady Naukowej  
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we  
Wrocławiu.

1. Rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom naukowy wyrażony zarówno poprzez warsztat metodologiczny, jak również wnikliwą analizę wyników i adekwatne wnioski.
2. Praca zawiera ciekawe i nowatorskie rezultaty, uzyskane nowoczesnymi i właściwie zastosowanymi metodami, które cechuje walor poznawczy, naukowy, a także aplikacyjny.
3. Część wyników opublikowana została w recenzowanym czasopiśmie naukowym, w którym Doktorant jest pierwszym autorem.

łączę wyrazy głębokiego szacunku,

**KIEROWNIK**  
Zakładu Radioligandów  
Katedra Farmakobiologii UJ CM  
dr hab. Joanna Gdula-Argasińska

Katedra Farmakobiologii | Zakład Radioligandów  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. +48 12 6205664  
farmakob@cm-uj.krakow.pl