Prof. dr hab. Aleksander F. Sikorski
Uniwersytet Wrocławski
Wydział Biotechnologii
Zakład Cytobiochemii
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 2013-12-08

Ocena

osiągnięcia naukowego Pana doktora Zenona Rajfura w związku z postępowaniem o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk biologicznych w zakresie biofizyki

Tytuł osiągnięcia: **„Zaawansowane metody mikroskopii optycznej w badaniach procesów migracji komórkowej"**

Ocena formalna:

Razem z wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego Pan dr Zenon Rajfur przedstawił: (1) kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego pod wyżej wspomnianym tytułem. (2) szczegółowy wykaz publikacji z określeniem I.F.(impact factor), punktacji MNSW, liczby cytowań i krótkim określeniem swojej roli i udziału w projekcie. (3) zestaw oświadczeń współautorów potwierdzających ich udział oraz udział Habilitanta w osiągnięciu (4) kopie prac opublikowanych po doktoracie nie wchodzące w skład osiągnięcia będącego podstawą postępowania, (5) zwięzłe podsumowanie tzw. „autoreferat" przedstawiające osiągnięcie oraz przedstawiające własną charakterystykę dorobku naukowego, (6) opis aktywności dydaktycznej oraz współprac naukowych a także dokumenty podstawowe, jak kopia dyplomu Doktora, życiorys naukowy oraz listy polecające znanych naukowców w reprezentowanej przez Kandydata dziedzinie. Można zatem stwierdzić, że przedstawiona dokumentacja została zgromadzona z należytą starannością, zgodnie z wymogami Ustawy.

Ocena merytoryczna osiągnięcia

Migracja (lokomocja) komórek należy do zasadniczych procesów w rozwoju i funkcjonowaniu organizmów jedno- i wielokomórkowych. W przypadku organizmów wielokomórkowych rozwój zarodkowy, gojenie ran oraz odpowiedź immunologiczna

wymagają zorganizowanego ruchu komórek w określonym kierunku do określonych miejsc docelowych. Błędy związane z kontrolą ruchu komórek wiążą się z poważnymi skutkami, włączając niedorozwój umysłowy, choroby naczyniowe, oraz przerzuty nowotworowe. Ruch komórek odbywa się zwykle na skutek i w kierunku zewnętrznych sygnałów włączając chemiczne (chemotaksja) oraz mechaniczne (mechanotaksja). Ze względu na mechanizmy wykorzystywane, wyróżniamy kilka rodzajów ruchu: 1. aktywne pływanie (organizmy jednokomórkowe ale także plemniki wielokomórkowców) z wykorzystaniem witek i rzęsek, 2. różne formy pełzania, w tym obejmujące drastyczne zmiany kształtu komórki, które napędzane są przez elementy szkieletu komórkowego oraz 3. ruchliwość oparta na pączkowaniu „blebbing". Zrozumienie molekularnych podstaw ruchu komórek może doprowadzić do rozwoju nowych strategii terapeutycznych, np. zapobiegających przerzutowaniu guzów nowotworowych.

Zainteresowanie Habilitanta zjawiskami migracji komórkowej, szczególnie zastosowaniem zaawansowanych metod mikroskopii optycznej do ich analizy zaowocowało przedstawionym do oceny osiągnięciem. Na osiągnięcie to składa się 7 opublikowanych w bardzo poważnych periodykach naukowych w latach 2001-2009 prac, w tym 5 prac doświadczalnych oraz 2 przeglądowych. Wszystkie prace są dziełem zespołowym, a Habilitant jest pierwszym autorem w jednej a pierwszym współautorem w 2 pracach, w pozostałych 4 pracach jest On drugim współautorem. Należy podkreślić, ze wszystkie prace składające się na oceniane osiągnięcie opublikowane zostały w wysoko cenionych czasopismach: Nature (1), Nature Cell Biology (2), Trends in Cell Biology (1), J. Cell Biology (1), J. Biol. Chem. (1) oraz Analytical Chemistry (1). Łączna wartość IF prac składajacych się na osiągnięcie to ok. 105 a liczba cytowań 490.

Dr Rajfur we wniosku ocenia swój udział w pracach stanowiących oceniane osiągnięcie na 25 do 80% (Zał. 5). Współautorzy złożyli stosowne oświadczenia, które potwierdzają znaczny udział Habilitanta w poszczególnych pracach. Co więcej, oświadczenia współpracowników są w pełni zgodne z oświadczeniem Kandydata. Na uwagę zasługuje opinia wyrażona przez Dr Kena Jacobsona, kierownika zespołu, z którego pochodzą oceniane prace stwierdzająca, że Dr Rajfur był „siłą napędową" w większości podprojektów wnosząc do nich wysoce znaczący wkład intelektualny i eksperymentalny. Dr Jacobson stwierdza też, że „wyniki opublikowane w ramach powyższego projektu są rezultatem współpracy wielu osób z różnych laboratoriów i to dzięki ich doświadczeniu zespół odniósł sukces. Realizacja tego typu interdyscyplinarnego projektu byłaby niemożliwa w pojedynczym zespole (tłum. AFS)". Rzeczywiście, zdaniem recenzenta, jakość pracy doświadczalnej oraz poziom

publikacji budzi podziw. Pomimo bardzo zróżnicowanego i wieloosobowego zespołu autorów z łatwością można wyodrębnić udział Habilitanta, ponieważ zastosowanie zaawansowanych metod i technik mikroskopii optycznej(fluorescencyjnej) oraz technik z zakresu fotochemii stanowi ważny element wszystkich prac. Zatem, odpowiedź na pytanie dotyczące integralności osiągnięcia można uznać za w pełni pozytywną.

Dzieło p.t. „Zaawansowane metody mikroskopii optycznej w badaniach procesów migracji komórkowej" podzielić można za Autorem na trzy części odnoszące się do zastosowania osobnych metod zaawansowanej mikroskopii fluorescencyjnej i technik fotochemicznych do analizy molekularnych podstaw ruchliwości komórek:

1. Zastosowanie wspomaganej przez chromofor laserowej inaktywacji białek (CALI). Na to osiągnięcie składają się dwie prace doświadczalne i dwie przeglądowe.

Przegląd zastosowań zaawansowanych metod mikroskopii optycznej w badaniach ruchu i adhezji komórek zawarł Habilitant w artykule opublikowanym w Nature Cell Biology w 2002 roku. Artykuł ten przedstawia kilka ważnych w badaniach adhezji i migracji komórek technik mikroskopii optycznej/fluorescencyjnej (FRET, FRAP) oraz technik z zastosowaniem metod wygaszania/inaktywacji/aktywacji fluoroforów oraz obrazowania sił wywieranych na podłoże przez migrujące komórki. Nie bez znaczenia są także techniki obserwacji pojedynczych cząsteczek, takie jak ICS (image correlation spectroscopy), typ FCS pozwalające ocenić np. interakcje pomiędzy białkami w komórce.

Autor wraz z zespołem w eleganckiej pracy opublikowanej w Anal. Chem. określił mechanizm leżący u podstaw zjawiska CALI. Wykazali oni, że wyniku naświetlania chromoforu (białek fluorescencyjnych XFP) powstają reaktywne formy tlenu, których głównym składnikiem jest tlen singletowy. Reaktywne formy tlenu inaktywują białka przyłączone do fluorescencyjnych białek typu XFP. Doświadczenia opisane w tej pracy wykazały także, że skuteczność inaktywacji zależy od wielu czynników, takich jak typ chromoforu, dawka promieniowania, czy obecność tlenu w otoczeniu.

Podstawy teoretyczne oraz przegląd zastosowań metody w biologii komórki zostały wyłożone w artykule przeglądowym opublikowanym w Trends in Cell Biology. Ten bogaty w szczegóły teoretyczne i doświadczalne oraz sugestie dla eksperymentatorów artykuł okazał się poczytnym tekstem cytowanym w literaturze 31 razy.

Głównym osiągnięciem uzyskanym przez Habilitanta w zespole badaczy za pomocą wspomnianej wyżej metody jest praca „Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with EGFP fusion proteins" opublikowana w Nature Cell Biology. W tej pracy wykazano, że białka w fuzji z EGFP mogą służyć jako skuteczne mediatory laserowej

inaktywacji białek za pomocą chromoforu (CALI). Dalej Autorzy wykazali, że inaktywacja alfa-aktyniny w fuzji z EGFP za pomocą wiązki laserowej skutkuje odłączeniem włókien naprężeniowych z ognisk kontaktowych (focal adhesions/contacts), podczas gdy struktura tych ostatnich pozostaje zachowana, co stwierdzono w technice mikroskopii interferencyjnej odbicia (IRM). Doświadczenia in vitro wykazały obniżenie wiązania EGFP-alfa-aktyniny z podjednostką beta1 integryny nie ograniczając wiązania z aktyną. Zatem alfa-aktynina odgrywa zasadniczą rolę w wiązaniu mikrofilamentów włókien naprężeniowych z integryną ognisk kontaktowych. Zastosowanie CALI do analizy lokalizacji i roli FAK (kinaza ogniska kontaktowego) nie wykazało zmian struktury ognisk kontaktowych lub też odłączania od nich włókien naprężeniowych sugerując jej tylko sygnalizacyjną a nie strukturalną rolę w funkcji ogniska kontaktowego.

W opinii recenzenta przedstawiony tu zestaw wyników jest istotnym wkładem w rozwój dziedziny badań na mechanizmem ruchu komórki, zarówno z punktu widzenia teorii – rola alfa-aktyniny w połączeniu włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych, które to połączenie i rola białkowych składników ogniska kontaktowego było przedmiotem wielu dyskusji i sporów naukowych oraz znacznym postępem w dziedzinie technik badawczych związanych z analizą roli poszczególnych białek szkieletu komórkowego w żywej komórce.

2. Kolejnym zagadnieniem wiążącym się również z rozwojem techniki badawczej, to „zastosowanie metody fotoaktywacji białek inaktywowanych przez związane molekuły „klatkujące""

Wykorzystując tę metodę Habilitant w zespole Prof. K. Jacobsona dokonał analizy funkcji tymozyny β4 w regulacji polimeryzacji aktyny w rybich keratynocytach oraz wpływu jej aktywacji na reakcje ruchowe tych komórek oraz wpływ lokalnego zahamowania kinazy ogniska kontaktowego (FAK) w komórkach NBT II (komórki raka pęcherza moczowego szczura) za pomocą fosfopeptydu peptydu naśladującego region ograniczony resztami 391-406 kinazy FAK. Podejście z zastosowaniem „klatkowanych" cząsteczek podawanych do żywych komórek, które można fotoaktywować w określonym czasie i miejscu komórki (obszar o średnicy kilku μm) pozwala na czasowo przestrzenną analizę wpływu określonej cząsteczki na reakcję komórki. W przypadku aktywacji tymozyny β4 na „skrzydłach" migrujących keratynocytów obserwowano swoiste skręcanie wokół naświetlonego miejsca (miejsca aktywacji tymozyny). Natomiast w przypadku kompetycyjnego zahamowania kinazy FAK przez fosfopeptyd obserwowano czasowe zatrzymanie migracji lamellipodium przy zachowanej ruchliwości ciała komórki. Rezultaty tych badań potwierdzają znaczącą rolę tymozyny β4 w kontroli polimeryzacji (również lokalnej) aktyny i kontroli mobilności

komórki a także rolę kinazy FAK w ruchliwości lamellipodium. Obydwa podprojekty przyczyniły się do znaczącego postępu wiedzy odnoszącej się do roli zarówno tymozyny β4 jak i kinazy FAK w kontroli ruchliwości komórek.

3. Ostatnia część ocenianego osiągnięcia to zastosowanie fluorescencji całkowitego wewnętrznego odbicia w badaniach roli fosforylacji paksyliny przez kinazę N-końcową białka c-Jun. Tę część osiągnięcia opublikowano w eleganckim artykule (Letter) w czasopiśmie „Nature" w 2003 roku. W artykule tym wykazano, że kinaza JNK jest niezbędna do szybkich ruchów zarówno rybich keratynocytów jak i komórek NBT-II, nabłonkowych komórek nowotworu pęcherza moczowego szczura. Co więcej, wykazano, że kinaza ta fosforyluje resztę seryny 178 paksyliny, białka adaptorowego ogniska kontaktowego. Komórki ekspresjonujące muteinę S178A paksyliny wykazywały ograniczoną ruchliwość w przeciwieństwie do komórek ekspresjonujących „dziką" jej formę, które poruszały się szybko. Komórki ekspresjonujące muteinę S178A tworzyły typowe dla komórek wolno wędrujących ogniska kontaktowe połączone z włóknami naprężeniowymi, podczas gdy w komórkach ekspresjonujących paksylinę dzikiego typu dominujące struktury adhezyjne miały charakter „close contacts" - małych punktów adhezyjnych o dyfuzyjnym rozkładzie na dolnej powierzchni komórki. Zatem, fosforylacja paksyliny przez kinazę JNK według powyższych danych ma zasadnicze znaczenie w utrzymywaniu labilnych punktów adhezji niezbędnych do szybkiej migracji komórek. W projekcie tym użyto wielu nowoczesnych technik badawczych, ale kluczową, jak się wydaje, była technika mikroskopii całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF), która umożliwiła dokładną obserwację morfologii struktur adhezyjnych komórek poddanych doświadczeniom. Fakt akceptacji pracy w Nature pozostawia poza dyskusją nowatorstwo i jakość techniczną wyników. Zgodnie z oświadczeniem Habilitanta i współautorów, do Niego należała część projektu związana z mikroskopią TIRF.

Podsumowując tę część recenzji należy stwierdzić, że osiągnięcie zaprezentowane przez Habilitanta jest ważnym, indywidualnym wkładem w rozwój badań w ważnej dziedzinie biologii komórki – badań nad mechanizmami ruchu komórek. Mimo iż wszystkie prace składające się na to osiągnięcie są dziełem zespołów, to bez trudu można zaobserwować wagę wkładu Habilitanta w powodzenie projektów.

Dorobek naukowy Habilitanta poza osiągnięciem stanowiącym podstawę postepowania habilitacyjnego.

Poza omówionym powyżej dorobkiem stanowiącym podstawę postępowania habilitacyjnego Dr Zenon Rajfur jest współautorem 15 prac opublikowanych w czasopismach ze współczynnikiem wpływu (I.F.) oraz kilkunastu prac w wydawnictwach nie notowanych w

bazach danych, a są to czasopisma, które nie uzyskały jeszcze odpowiedniego statusu oraz materiały konferencyjne. Mieszczą się tu także: 1 rozdział w monografii z serii Methods in Cell Biology(vol. 72, 2003) oraz 3 rozdziały w podręcznikach laboratoryjnych, w tym 2 rozdziały w Cold Spring Harbor Protocols oraz rozdział w podręczniku laboratoryjnym pod redakcją Spector D, and Goldman B(R) „A Laboratory Manual" wyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Dorobek ten świadczy o dużej aktywności naukowej Habilitanta zarówno przed jak i szczególnie po uzyskaniu stopnia doktora.

Prace habilitanta po doktoracie oprócz dokonań omówionych w pierwszej części recenzji dotyczyły bardzo interesujących zjawisk z zakresu biologii komórki. Należą do nich prace nad spontanicznymi i indukowanymi oscylacjami komórkowymi opublikowanymi w Cell Motility Cytoskeleton (2001) oraz dwukrotnie w Biophys. J. (2008, 2010), które doprowadziły do stwierdzenia, że białko Rho jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie oscylacji a jony wapnia odgrywają podrzędną rolę w tym procesie.

Kolejnym przedmiotem zainteresowań Habilitanta jest wykorzystanie zjawiska FRET w konstrukcji swoistych biosensorów: jednego monitorującego fosforylację określonego białka (tu kinazy FAK) oraz biosensora monitorującego zmiany konformacyjne kinazy FAK (wyniki tego projektu opublikowano w Mol. Cell. Biol. w 2008 roku. Ostatnią grupą zagadnień będących przedmiotem zainteresowań dr Rajfura jest analiza tzw. trakcji komórkowych. Te interesujące badania pozostają jeszcze w fazie przedpublikacyjnej, ale przyniosą one zapewne wiele interesujących rezultatów.

Istotną cechą wspomnianych powyżej dokonań jest spójność przedmiotu zainteresowań, wysoka jakość techniczna a przede wszystkim znaczący postęp w zrozumieniu zjawisk dotyczących ruchów komórek. Te jak i inne dokonania świadczą też o umiejętności współpracy Habilitanta z wieloma partnerami, zarówno doktorantami zespołów, jak i bardzo znanymi w dziedzinie biologii komórki badaczami, takimi jak np. Keith Burridge.

Aktywność naukowa

Aktywność naukową Habilitanta przejawiająca się Jego współpracą z wieloma ośrodkami i badaczami częściowo oceniono wysoko w poprzedzających częściach tej recenzji. W swoim autoreferacie Autor wymienia 10 ośrodków, z którymi współpracował w przeszłości, z niektórymi z nich kontynuuje współpracę obecnie. Okresy pracy w zagranicznych ośrodkach badawczych obejmują większość czasu Jego aktywności zawodowej. Zatem umiejętności współpracy i doświadczenie w pracy w wielu ośrodkach należy uznać za więcej niż bardzo dobre.

Kandydat nie był kierownikiem projektów badawczych, ale brał udział w dwóch projektach badawczych KBN jako wykonawca lub główny wykonawca. Za granicą brał udział w kilku ważnych projektach badawczych koordynowanych przez badaczy amerykańskich.

W ramach swoich obowiązków podczas pracy w laboratorium Prof. Jacobsona opiekował się studentami, doktorantami i mniej doświadczonymi pracownikami na stanowisku „post-doc". Pełnił też rolę instruktora w dwóch międzynarodowych warsztatach „Carolina Workshop – Light Microscopy for the Biomedical Sciences w 2001 i 2002. Ze względu na nieobecność w Kraju nie miał możliwości sprawować oficjalnie funkcji promotora pomocniczego.

Habilitant od początku swojej działalności w pracy naukowej brał czynny udział w wielu konferencjach krajowych (10) oraz zagranicznych (15) prezentując wyniki swoich badań. Co więcej, wygłosił 5 wykładów na zaproszenie organizatorów różnych konferencji międzynarodowych oraz władz Instytutu Fizyki Jądrowej U.J.

Podsumowanie:

Zgodnie z sugestią Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów stwierdzam, że zaprezentowane przez Habilitanta osiągnięcie: **„Zaawansowane metody mikroskopii optycznej w badaniach procesów migracji komórkowej"** oraz dokonania naukowe uzyskane po otrzymaniu stopnia doktora wykazują znaczny i znaczący wkład Autora w rozwój biologii komórki i wykazuje On istotną aktywność naukową (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, ze zm. w Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365 oraz w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455 art. 17.1 oraz p. 4).

W skrócie: Autor opublikował po doktoracie 20 publikacji z I.F., 3 bez I.F. oraz 3 rozdziały w monografiach i podręcznikach laboratoryjnych. Przed doktoratem opublikował w różnych czasopismach 9 prac współautorskich. Zatem liczbowo dorobek Habilitanta jest pokaźny, ale najistotniejszą jest jakość publikacji stanowiących oceniane osiągnięcie – ich łączny I.F. to prawie 105 i znajduje się wśród nich praca publikowana w najbardziej prestiżowym czasopiśmie z naszej dziedziny a mianowicie w Nature. Pracę tę cytowano już ponad 260 razy. Pozostałe prace składające się na osiągnięcie opublikowano również w bardzo dobrych periodykach, znacznie przewyższających średnią w tej dziedzinie badań – I.F. od 5,2 do 18,3.

Pozostały dorobek Habilitanta jest również znaczący, publikacje z jego udziałem wniosły znaczny postęp w zrozumieniu ważnych procesów komórkowych. One również

zostały opublikowane w czasopismach o bardzo dużym znaczeniu, takich jak: Nature Cell Biology, Biophys. J., BBA-Molecular Basis of Disease, J. Biol. Chem., Mol. Cell. Biol., i Mol. Biol. Cell. Według Web of Knowledge prace Habilitanta cytowano 923 razy (908 bez autocytowań) a Jego aktualny „indeks" Hirsha wynosi 13.

Kandydat współpracował w przeszłości i współpracuje obecnie z wieloma ośrodkami zagranicznymi a także brał czynny udział w licznych konferencjach naukowych w Polsce i zagranicą. wygłosił tez kilka wykładów za zaproszenie organizatorów konferencji i władz Instytucji.

Zatem z pełnym przekonaniem stwierdzam, że osiągnięcie zaprezentowane przez Pana Doktora Zenona Rajfura spełnia z powodzeniem wymogi i kryteria określone w ustawie (art. 17.1) z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Zatem zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o uznanie osiągnięcia naukowego **„Zaawansowane metody mikroskopii optycznej w badaniach procesów migracji komórkowej"** i nadanie Panu doktorowi Zenonowi Rajfurowi stopnia naukowego doktora habilitowanego.