



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk
Centrum Doskonałości IMMUNE
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. 71- 3371172, fax 71- 33713 82
<http://immuno.iitd.pan.wroc.pl>

Wpłynęło do Dziekanatu
Wydziału Biologii UJ
w dniu 27 SIE. 2020

prof. dr hab. Hubert Krotkiewski
Laboratorium Glikobiologii

Wrocław, 25.08. 2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Surman pt. „**Charakterystyka ektosomów uwalnianych przez komórki ludzkiego czerniaka złośliwego**”.

Choroby nowotworowe są bardzo poważnym i groźnym w swoich skutkach problemem zdrowotnym wszystkich praktycznie społeczeństw. Zaistnienie tego problemu zdrowotnego spowodowało powstanie i szybki rozwój nowych kierunków badawczych w ramach kilku dziedzin nauki: medycyny, biologii, biochemii. Z jednej strony chodzi o opracowanie metod diagnostyki tych chorób, metod specyficznych i czułych, pozwalających wykryć chorobę na wczesnych etapach jej rozwoju, z drugiej strony chodzi o opracowanie skutecznych metod leczenia. Badania są prowadzone w dwóch systemach: w układzie poza ustrojem żywym (*in vitro*) oraz w układzie *in vivo*. W maju 1967 roku Peter Wolf opublikował pracę w której, jako pierwszy doniósł, że ludzkie płytki krwi wydzielają tzw. mikropęcherzyki błonowe (ang. extracellular vesicles, EVs). Rzecz wzbudziła duże zainteresowanie w środowisku naukowym i stała się przedmiotem licznych badań. Ze względu na wielkość wyróżnia się trzy populacje mikropęcherzyków: najmniejsze egzosomy, większe ektosomy i największe, tzw. ciała apoptotyczne. Całkowicie uformowane EVs są uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej, dotyczy to zarówno linii komórkowych w hodowli, jak też warunków *in vivo*, co daje możliwość ich izolacji z płynów ustrojowych (np. z moczu, krwi, śliny). Jak dotąd, najwięcej badań przeprowadzono na ektosomach znajdujących we krwi, uwalnianych przez erytrocyty, neutrofile, płytki krwi, makrofagi. Zarówno w stanie fizjologicznym jak i w stanach patologicznych ektosomy, reprezentujące stosunkowo heterogenną populację cząstek o średnicy w granicach 0,1 – 1 μm , są zaangażowane w wiele procesów biologicznych. Dużo uwagi poświęca się obecnie potencjalnej roli EVs w progresji chorób nowotworowych, a wśród zawartych w nich białek poszukuje się charakterystycznych biomarkerów do wykorzystania w diagnostyce i prognozowaniu rozwoju tych chorób. Funkcje fizjologiczne EVs dotyczą

komunikacji międzykomórkowej, regulacji fizjologicznych i patologicznych procesów w komórce, regulacji odpowiedzi immunologicznej, wpływu na syntezę różnych cytokin w komórkach docelowych. Poznano już skład biochemiczny ektosomów; ich błona zawiera m.in. sfingomielinę, ceramidy, fosfatydyloserynę. Białkami występującymi w ektosomach są integryny, metaloproteinazy, białka szoku cieplnego, cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu; znajdujemy tam również kwasy nukleinowe: microRNA, mRNA i niekodujący RNA. Stwierdzono, że we wszystkich populacjach mikropęcherzyków błonowych występują białka charakterystyczne dla chorób neurodegeneracyjnych: choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, płasawicy Huntingtona. Ektosomy mają także swój udział w procesie regeneracji tkanek, stymulując migrację i różnicowanie komórek macierzystych w miejscu uszkodzenia tkanki. Z tego pobieżnego opisu budowy i funkcjonowania ektosomów wynika wyraźnie, że biorą one udział w wielu procesach fizjologicznych, zachodzących w komórkach organizmu.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy badania ektosomów wydzielanych przez komórki ludzkiego czerniaka złośliwego, który jest nowotworem agresywnym z szybkim tempem wzrostu i wczesnym przerzutowaniem. Rozprawa zawiera opis doświadczeń i wyników już opublikowanych w trzech pracach oryginalnych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Chronologia czasowa tych artykułów jest następująca: praca 1: Surman M. et al., *Life Sciences* **207**, 395-411 (2018) ; praca 2: Surman M. et al., *Int J Molec Sciences* **20**, 3789 (2019); praca 3: Surman M. et al., *Int J Molec Sciences* **21**, 2934 (2020). Przedstawię najważniejsze ustalenia zawarte w wymienionych pracach. W artykule 1 badano glikozylację białek zawartych w ektosomach wydzielanych przez linie komórkowe czerniaka skóry: pierwotne i metastatyczne. Analizowano frakcję membranową komórek wyjściowych oraz frakcję białkową ektosomów przez nie wydzielanych. Stosowano metodę z wyboru – ze względu na ilość materiału – tzn. elektroforezę SDS-PAGE i lektynobloting z panelem biotynylowanych, wybranych lektyn. Do analizy powierzchniowych struktur cukrowych wyjściowych ektosomów zastosowano metodę cytometrii przepływowej, użyto zestawu tych samych lektyn. Najważniejsze ustalenia dotyczące przeprowadzonych doświadczeń były następujące:

- stan deglikozylacji lub desjalilacji glikoprotein w ektosomach ma wpływ na wzrost lub zmniejszenie inkorporacji EVs do komórek docelowych,
- struktury cukrowe białek mają wyraźny wpływ na ich rekrutację do ektosomów oraz na wydajność tego sortowania,
- badane ektosomy były wzbogacone w określone epitopy cukrowe: N-glikany z rozdzielającą resztą GlcNAc, reszty Fuc oraz reszty kwasu sjałowego związane α 2-6 do galaktozy, w porównaniu z frakcją błonową komórek wyjściowych,
- profil glikozylacji określonych białek, zawartych w ektosomach, może promować progresję

nowotworu; wśród glikanów są obecne tzw. TACAs (tumor-associated carbohydrate antigens), a ich zdefiniowanie pomoże określić je jako biomarkery danej choroby.

Łańcuchy cukrowe glikoprotein, oprócz wpływu na właściwości fizyko-chemiczne tych cząsteczek, najczęściej mają też wpływ na wypełnianie przez glikoproteiny ich określonych funkcji w organizmie. W takiej sytuacji glikany, obecne w białkach, pełnią rolę precyzyjnego przekaznika informacji biologicznej; informacja ta jest zawarta w elementach ich struktury. W czasie zatem badań aktywności biologicznej glikoprotein należy określić rolę glikanów w nich zawartych.

W artykule 2 badano ektosomy, wydzielane przez linię komórkową Mel202 czerniaka gałki ocznej w hodowli; analizowano skład białkowy oraz, przy użyciu lektyn, pewne elementy strukturalne łańcuchów N-glikozydowych obecnych tam glikoprotein:

- metodą komputerowego „składania” glikopeptydów, uzyskanych po trawieniu materiału wyjściowego trypsyną i po wykorzystaniu istniejących baz danych zidentyfikowano 2527 indywidualnych białek obecnych w badanych ektosomach; wśród nich, m.in., 13 białek, związanych z przeżyciem lub śmiercią komórek nowotworowych oraz 27 innych białek, biorących udział w procesie przerzutowania; wykazano również obecność trzech białek oporności wielolekowej (MDR),
- w badanych ektosomach czerniaka oka stwierdzono podwyższoną zawartość glikoprotein, zawierających złożone N- glikany z rozdzielającą (bisecting) resztą GlcNAc (zastosowano lektynę PHA-E, *Phaseolus vulgaris*, forma erytro), w porównaniu z ekstraktami całych komórek wyjściowych. Taki wynik wyraźnie sugeruje, że rekrutacja tych białek do ektosomów odbywała się w sposób preferencyjny,
- w białkach ektosomów stwierdzono, również w porównaniu z ekstraktami całych komórek wyjściowych, podwyższoną zawartość reszt kwasu sialowego, związanego α 2-6 do galaktozy (zastosowano lektynę SNA, *Sambucus nigra*),
- w pozytywnej reakcji z lektyną AAA (*Aleuria aurantia*) wykazano obecność fukozy związanej α 1-6 do rdzeniowej reszty GlcNAc.

W artykule 3 opisano badania ektosomów, wydzielanych w hodowli przez pierwotne i metastatyczne komórki czerniaka skóry; najważniejsze ustalenia były takie:

- stosując metodę chromatografii wysokociśnieniowej cieczerwowej z detektorem masowym (shotgun nano LC-MS/MS), stosując metodologię analogicznie jak w pracy 2, zidentyfikowano 1507 białek w badanych ektosomach,
- w wykonanych testach funkcjonalnych wykazano, że izolowane ektosomy zwiększały proliferację i ruchliwość komórek wyjściowych. Wynik taki sugeruje, że w ektosomach są zawarte cząsteczki promujące rozwój nowotworu.

Ocena rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest utworem klarownym w swojej konstrukcji, ponieważ zawiera opis doświadczeń i wyników zawartych w trzech pracach oryginalnych, już opublikowanych w bardzo dobrych, recenzowanych czasopismach angielskojęzycznych. W tych trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co wyraźnie świadczy o Jej dużym zaangażowaniu w powstanie tych artykułów. Opisane w pracy doktorskiej badania profilu proteomicznego ektosomów miały na celu identyfikację białek, które będą mogły być określone jako swoiste biomarkery nowotworowe. Z punktu widzenia diagnostyki medycznej wiedza taka jest niezwykle istotna, ponieważ potwierdzony jest udział pewnych białek, zawartych w ektosomach, w procesie namnażania komórek nowotworowych i nabywania przez nie zdolności do tworzenia przerzutów. Przedstawione w niniejszej rozprawie badania są pionierskie pod względem charakterystyki profilu glikozylacji białek ektosomalnych; dokładna charakterystyka struktur cukrowych może przynieść identyfikację charakterystycznych antygenów cukrowych, związanych z nowotworem (ang. TACAs).

Bardzo ważnym, wstępnym etapem przedstawionych tu badań jest izolacja i oczyszczanie ektosomów; wybrano metodę różnicowego wirowania medium hodowlanego. Po izolacji frakcji ektosomów, przed przystąpieniem do właściwych badań, sprawdzano ich czystość stosując transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) i analizę śledzenia nanocząstek (NTA). W toku badań proteomicznych, dzięki współpracy z pracownią spektrometrii mas, możliwe było zastosowanie bardzo nowoczesnej i zaawansowanej technologicznie metody analizy peptydów z użyciem detektora masowego pracującego w układzie MS/MS; detektor taki, który umożliwia wtórną fragmentację jonów, pozwolił na jednoznaczną identyfikację wyjściowych białek ektosomalnych. Opisane w pracy badania są ciekawe, wielowątkowe, z wyraźnym akcentem na możliwość ich praktycznego wykorzystania w przyszłości. Ciekawa jest np. sugerowana koncepcja o możliwości zastosowania mikropecherzyków jako systemów dostarczających leki; w tym względzie jest to pewna analogia do stosowanych już miceli. W podsumowaniu - omawiana tutaj rozprawa doktorska przedstawia badania tematycznie aktualne, realizowane z wykorzystaniem nowoczesnych metod analizy, badania które przyniosły wyniki dające się opublikować. Rozprawa wpisuje się w aktualny obecnie trend badań mikropecherzyków, szczególnie tych wydzielanych przez komórki nowotworowe.

W tekście pracy znalazłem kilka błędów, merytorycznych i edytorskich, które – dla porządku – przytoczę:

- str. 9, wiersz 6. od góry: powinno być „...to niewielkie **kuliste** struktury, ...”. Określenie „kolisty” odnosi się jednak do struktur płaskich, a te omawiane są trójwymiarowe,
- str. 96, wiersz 9. od dołu : powinno być „...opiera się głównie na badaniach *in vitro*.”
- str. 17, wiersz 18. od dołu: powinno być „ enzym **katalizujący degradację** „

- str. 89, wiersz 2. od góry: powinno być „ wybranej do **izolacji** „
- str. 91, wiersz 4. od góry: powinno być „ całego profilu **białkowego** „
- str. 95, wiersz 15. od dołu: powinno być „ rozpoznawania komórek **czerniaka** „
- str. 96, wiersz 1. od góry: powinno być „ w przyszłości stać się **alternatywą**...”
- str. 97, wiersz 18. od dołu: powinno być „ przy użyciu linii **komórkowych**, „
- str. 99, wiersz 7. od góry: powinno być „ pomiędzy wybranymi **glikoproteinami**..”
- str. 99, wiersz 6. od dołu: powinno być „ wykazywały wyższą **intensywność** „
- str. 101, wiersz 3. od dołu: powinno być „zwiększona **glikozylacja** ektosomów „

Ogólna wartość merytoryczna recenzowanej tu rozprawy doktorskiej jest bardzo dobra, praca jest nowoczesna pod względem zastosowanych metod doświadczalnych i aktualna ze względu na przedmiot badań. Biorąc pod uwagę wszystkie elementy przeprowadzonej oceny uważam, że rozprawa doktorska p. **mgr Magdaleny Surman pt. „Charakterystyka ektosomów uwalnianych przez komórki ludzkiego czerniaka złośliwego”** spełnia wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny *Nauki biologiczne* Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie **mgr Magdaleny Surman** do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie *nauk ścisłych i przyrodniczych* w dyscyplinie *nauki biologiczne*. Jednocześnie, biorąc pod uwagę zawartość merytoryczną pracy (aktualny temat badań, nowoczesne metody analizy i uzyskane, opublikowane już wyniki) oraz sposób jej prezentacji, składam wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

H. Kościński