

dr hab. Michał Sobkowski, prof. ICHB PAN
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Poznań, 13.02.2019

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Liliany Czernek

pt. „Investigations on the role of cancer - derived exosomes in intercellular communication”
(„Badanie roli egzosomów pochodzenia nowotworowego w komunikacji międzykomórkowej”)

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Liliany Czernek dotyczy ważnego zagadnienia badawczego dotyczącego poznania roli egzosomów pochodzenia nowotworowego w komunikacji międzykomórkowej i potencjalnego wykorzystania tych struktur jako nośników leków. Doktorantka podjęła badania problematyki niełatwej, ale budzącej ogromne zainteresowania świata naukowego. Jest to niewątpliwie tzw. „gorący temat”, co uwidacznia zresztą sama Doktorantka, wskazując na podstawie kwerendy bazy danych PubMed, że liczba artykułów naukowych związanych z egzosomami wzrosła od kilkunastu lat pod koniec XX w., do rzędu kilku tysięcy rocznie obecnie.

Podstawowym celem pracy było poszerzenie wiedzy na temat wykorzystania egzosomów przez komórki nowotworowe do wysyłania sygnałów immunosupresyjnych. Dla jego realizacji Doktorantka sformułowała 6 zadań, które objęły charakterystykę egzosomów, ustalenie warunków ich znakowania markerami fluorescencyjnymi, ustalenie, czy egzosomy pochodzenia nowotworowego mogą wpływać na sygnały układu odpornościowego oraz na wytwarzanie cytokin, przeprowadzenie analizy bioinformatycznej miRNA zawartych w egzosomach i ich wpływu na immunosupresję i wreszcie przeprowadzenie badań nad wykorzystaniem egzosomów jako nośników leków przeciwnowotworowych.

Rozprawa doktorska mgr Liliany Czernek została napisana w języku angielskim pod kierunkiem prof. Markusa Düchlera. Liczy ona 184 stron i składa się z zestawienia osiągnięć Doktorantki, listy skrótów, streszczeń w języku angielskim i polskim, przeglądu literaturowego, określenia celu badań, czteroczęściowego przedstawienia wyników i dyskusji, części eksperymentalnej, wniosków i imponującego spisu odnośników literaturowych liczącego 518 pozycji.

Część literaturowa wprowadza czytelnika w tematykę egzosomów. Rozpoczyna ją krótki rys historyczny, po którym Doktorantka przedstawia zwięźle klasyfikację pęcherzyków błonowych wydzielanych przez komórki, porównując egzosomy z innymi rodzajami wydzielanych ciał błonowych. Dalej następuje obszernie omówienie obecnego stanu wiedzy na temat biogenezy egzosomów, ich wydzielanie i wchłanianie oraz zawartość. Kolejne podrozdziały opisują szczególnie istotne dla rozprawy zagadnienia obejmujące rolę egzosomów w organizmie zdrowym (gdzie ich główne zadania to komunikacja międzykomórkowa, stymulacja odpowiedzi immunologicznej lub tolerancji, szczególnie w czasie ciąży, oraz udział w regeneracji tkanek) oraz w warunkach patofizjologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem immunosupresji i immunomodulacji przez egzosomy pochodzenia nowotworowego. Jest to niewątpliwie fascynujący przykład, jak czynniki regulujące homeostazę w prawidłowo funkcjonującym organizmie mogą zostać wykorzystane przez tkankę nowotworową do swoich „celów”.

Rozdział literaturowy oceniam bardzo pozytywnie. Jego tematyka jest ściśle związana ze zrealizowaną pracą badawczą, porządkuje wiedzę i pozwala ulokować na jej tle przeprowadzone badania własne. Doktorantka opisała w sposób prawidłowy niezwykle obszerny temat, korzystając przy tym z ok. 400 zacytowanych publikacji naukowych. Należy zwrócić przy tym uwagę, że są to w większości prace z ostatnich kilku lat, a więc omówiony jest najnowszy stan wiedzy.

Realizację postawionych zadań badawczych Doktorantka rozpoczęła od części analitycznej, wykorzystując różne techniki do identyfikacji i scharakteryzowania badanych obiektów. Egzosomy opisane w pracy pochodziły z trzech linii komórek nowotworowych – czerniaka (linie A375 i 1205Lu) oraz linii OvC16 raka jajnika, a jako kontrolę użyto egzosomów pochodzących z osocza. Pochodzenie nowotworowe egzosomów Doktorantka potwierdziła wykazując – za pomocą cytometrii przepływowej – obecność na ich powierzchni markerów CD9 i CD63, natomiast ich rozmiary i kształt określiła stosując mikroskopię sił atomowych, transmisyjną mikroskopię elektronową i technikę śledzenia nanocząstek (NTA). Analizując nietrywialne w analizie ilustracje rodzi się pytanie, czy możliwe byłoby zobrazowanie egzosomów za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej? Ponadto Doktorantka stwierdziła na powierzchni egzosomów wysoki poziom antygenów CD47, CD80, CD14, HLA-ABC, a niski CD11b.

Następnym etapem badań była optymalizacja warunków uzyskiwania, oczyszczania i przechowywania egzosomów oraz ustalenie możliwości ich znakowania fluorescencyjnego i określenie parametrów tego procesu dla dwóch barwników, które wcześniej nie były stosowane w tym celu. Te niewątpliwie pracochłonne, ale niezbędne badania wstępne pozwoliły Doktorantce stworzyć prawidłowy warsztat pracy, umożliwiając przystąpienie do realizacji zasadniczej części doktoratu.

Przekazywanie sygnałów między komórkami za pośrednictwem egzosomów wymaga ich wychwycenia przez komórki docelowe, a zbadanie tego procesu było istotnym elementem rozprawy. Doktorantka ustaliła w pierwszym rzędzie, że egzosomy są efektywnie internalizowane przez komórki docelowe oraz że ich pochodzenie nie wpływa na ten proces, istotny jest natomiast nie tylko rodzaj komórek docelowych, ale także status ich zróżnicowania (komórki dojrzałe czyniły to wydajniej niż niedojrzałe).

Kolejnym pytaniem, które postawiła Doktorantka, była kwestia, czy egzosomy pochodzenia nowotworowego mogą wpływać na system odpornościowy. W tym celu komórki THP1 były inkubowane w obecności pożywki pozbawionej egzosomów, pożywki po hodowli komórek nowotworowych A375, także pozbawionej egzosomów, oraz w obecności komórek A375. Doktorantka analizowała poziom szeregu markerów, w tym antygenu HLA-DR zaangażowanego w odpowiedź odpornościową. Pozbawiona egzosomów pożywka po hodowli komórek A375 spowodowała znaczący wzrost ilości antygenu HLA-DR na powierzchni komórek THP1, natomiast w obecności egzosomów wydzielanych z komórek A375 jego ilość zdecydowanie zmalała, wskazując na immunosupresyjne działanie egzosomów. Innym podejściem do tego zagadnienia było zbadanie wpływu egzosomów na poziom białka NFAT5, które jest czynnikiem jądrowym aktywowanych limfocytów T i stymuluje odpowiedź odpornościową. Poprzedzone analizą bioinformatyczną badania techniką *western blot* wskazały, że miRNA zawarty w egzosomach pochodzenia nowotworowego rzeczywiście wpływa na poziom badanego białka NFAT5.

W następnej części pracy Doktorantka zajęła się wpływem egzosomów na wydzielanie cytokin. Wyniki ponownie potwierdziły jej założenia, gdyż zaobserwowała, że poziom interleukiny 12 ulegał obniżeniu po ekspozycji komórek układu odpornościowego na egzosomy pochodzenia nowotworowego. Wszystkie powyższe badania wskazują, że egzosomy uwalniane przez komórki nowotworowe mogą w znaczący sposób chronić je przed interwencją układu odpornościowego.

Ostatni obszar badawczy przedstawiony w recenzowanej dysertacji dotyczy nieco innego, lecz nadal związanego tematycznie zagadnienia wykorzystania egzosomów pochodzenia nowotworowego jako nośników leków

przeciwnowotworowych. Doktorantka zbadała różne metody wprowadzania kilku typów leków do egzosomów oraz przeprowadziła optymalizację warunków tych procesów, a następnie wykazała, że uzyskane egzosomy są zdolne do obniżania przeżywalności komórek nowotworowych.

Podsumowując przedstawione wyniki należy stwierdzić, że Doktorantka w pełni osiągnęła założone cele pracy. Poza niewątpliwymi walorami poznawczymi, przedstawiona rozprawa zawiera jednak pewną ilość mankamentów, zwłaszcza w części Results and discussion, które z obowiązku recenzenta muszą przedstawić i jednocześnie poprosić o wyjaśnienie niektórych zagadnień.

Jeśli chodzi o budowę i elementy rozprawy, to wspomniana część Results and discussion zaczyna się bez żadnego wstępu od opisu wyników – skoro są to „rezultaty i dyskusja”, to sekcję tę powinno zacząć choćby krótkie wprowadzenie. W kolejnych podrozdziałach tej części Doktorantka zastosowała układ treści, w którym po omówieniu wyników własnych zamieszcza dość obszerne opisy literaturowe dotyczące danego podrozdziału, w które wplecione są sporadycznie krótkie komentarze odnośnie badań własnych. Oczekiwałbym raczej układu odwrotnego – wprowadzenia literaturowego na początku podrozdziału, a następnie przedstawienia na tym tle swoich wyników oraz przeprowadzenia obszerniejszej dyskusji, której w niektórych podrozdziałach bardzo brakuje. Lekturę pracy utrudniają też zbyt lakoniczne opisy niektórych ilustracji i tabel (np. Tabela 3 ma podpis „Mean values of at least three experiments are shown, standard deviations are not included (less than 10%)”, nie ma natomiast informacji, czego dotyczą te wartości). W efekcie dla zorientowania się, co one przedstawiają konieczne jest czasem szukanie opisów w tekście głównym. Nie zaszkodziłyby też dokładniejsze omówienia warunków doświadczeń i zamieszczenie bardziej szczegółowych danych eksperymentalnych, jak np. stężenia, temperatura, czasy, gdyż – jak to wykazała sama Doktorantka – są to istotne parametry badanych procesów.

Z kolei za rzecz zupełnie niepotrzebną uważam zamieszczenie szczegółowej analizy rozwiązywania prostej proporcji czy pokazanie 9 kroków dzielenia masy 3×10^7 g przez liczbę Avogadry. Są to działania matematyczne na najprostszym poziomie i jako takie powinny być pominięte.

Pytania merytoryczne (na odpowiedzi lub wyjaśnienia liczę podczas publicznej obrony):

Pytanie 1: W rozdziale 1.1.6. opisane zostały badania linii komórkowych 1205Lu i A375 (Fig. 10 i 11), a w rozdziale 1.2.1.1. linii OvC16 (Fig. 12). Dlaczego wybrane zostały różne linie? Czy był jakiś klucz ich doboru? Zazwyczaj zmiana modelu utrudnia porównywanie wyników.

Pytanie 2: Analizy FACS egzosomów z komórek 1205Lu oczyszczonych jednokrotnie pokazane na Fig. 13 są bardzo zbliżone do kontroli negatywnej na Fig. 10 i dla egzosomów z THP1. Jak należy interpretować ten wynik?

Pytanie 3: s. 74, Fig. 17: Czy konkluzje odnośnie czasu inkubacji to tylko subiektywna ocena intensywności fluorescencji, czy została wykonana kwantyfikacja emisji? Nie jestem też przekonany co do właściwego doboru czasów eksperymentów. Dla DSSN+ pierwsza pokazana ilustracja po 1 h wizualnie wydaje się bowiem już maksymalna. Czy Doktorantka sprawdzała emisję wcześniej niż po 1 h? Może wystarczy czas zdecydowanie krótszy? W przypadku CFSE sytuacja jest odwrotna – czy sprawdzano emisję później niż po 24 h? Może po dłuższym czasie była ona jeszcze silniejsza? I kolejne nasuwające się pytanie – czy bezpośrednie znakowanie komórek ma taką samą kinetykę, czy też jest to zjawisko charakterystyczne dla znakowania za pomocą egzosomów?

Pytanie 4: s. 80: W Tabeli 3 niektóre wartości liczbowe zaznaczone są na czerwono. Można domyślać się, że oznacza to szczególnie duże zmiany. Jednak w przypadku makrofagów 7-krotny wzrost nastąpił nie tylko dla oznaczonych na czerwono CD11b i c, ale także dla CD86. Proszę o komentarz.

Pytanie 5: s. 80: Zdanie „the immature DCs showed a moderate upregulation of MHC class II molecules, which was reduced again during further maturation” budzi wątpliwości – jak widać w Tabeli 3, spadek następuje tylko dla CD14 i CD15, dla innych antygenów klasy MHC II nastąpił wzrost lub nie było znaczącej zmiany. Proszę o komentarz.

Pytanie 6: W rozdziale „2.5.2. Western Blot – Ovarian cancer cell line” niektóre prążki są bardzo złej jakości. Czy analiza takich wyników pozwala na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków? Jest to tym bardziej warte zwrócenia uwagi, że niektóre wyniki są zaskakujące. Po pierwsze, z wykresów zamieszczonych na Fig. 35 wynika, że egosomy FBS w stężeniu 20 µg/ml obniżały ekspresję, a przy stężeniu 50 µg/ml ekspresja wzrosła nieco powyżej próby kontrolnej. Z kolei egzosomy A375 obniżały ekspresję w obu stężeniach tak samo, ale była to wartość w przybliżeniu taka sama, jak stwierdzona dla egosomów FBS w stężeniu 20 µg/ml. Podobna sytuacja ma miejsce na Fig. 37, gdzie egzosomy A375 w stężeniu 20 µg/ml silnie obniżały ekspresję, ale przy stężeniu 50 µg/ml ekspresja była niewiele niższa od kontrolnej. Tak nieoczekiwane wyniki domagają się komentarza.

Pytanie 7: Są to w zasadzie uwagi, a nie pytanie: na s. 112 i 115 i 116 Doktorantka pisze, że „IC50 was determined” odwołując się do wykresów odpowiednio na Fig. 41, 44 i 46 – nie podała jednak wartości liczbowej (nawiasem mówiąc, na wykresach tych nie pokazano odchylenia standardowego, a wg opisu są to wartości średnie z 3 eksperymentów). Jeśli oznacza to wartość odczytaną z wykresu, to nie należy pisać, że została ona ustalona (robi się to metodami obliczeniowymi), a jedynie „oszacowana przez interpolację”. Jednak odczytywanie IC50 z wykresów na Fig. 44 i 46 jest obciążone sporym błędem ze względu na olbrzymi skok IC wynoszący od 70/100% dla c=0,01 mM do 0% dla 0,05 mM – brak jest stężeń pośrednich, które pozwoliłyby lepiej określić kształt krzywej.

Pytanie 8: Na s. 112–113 brak jest zgodności co do liczby i treści między opisami eksperymentów na s. 112 a opisami słupków na Fig. 42. Jakie były więc warunki poszczególnych eksperymentów pokazanych na Fig. 42?

Pytanie 9: W badaniach leków Doktorantka operuje tajemniczymi określeniami „drug no. 6”, „drug no. 7”, „BK176.4” i „WUM11” – o jakie substancje chodzi? Dlaczego w różnych doświadczeniach badano różne leki? Takie podejście utrudnia porównywanie wyników.

Pytanie 10: s. 119: Histogram FACS dla 100% DMSO na Fig. 49 jest bliski linii podstawowej, natomiast MFI na Fig. 50 jest jedynie o połowę mniejsze niż dla 0% DMSO. Jak wyjaśnić ten brak zgodności?

Pytanie 11: s. 120–121, Fig. 51A: exo, S daje taki sam efekt jak exo, D, S, zatem wysycenie egzosomów lekiem BK176.4 nie miało znaczenia, wystarczyły same egzosomy i saponina. Jak to wyjaśnić?

Pytanie 12: Na s. 122 Doktorantka pisze „dicarboximide compound which did not show toxicity to adherent cancer cell lines, even in concentration >100µM (WUM 11), was tested” – z Fig. 52 wynika jednak, że WUM11 jest toksyczny, IC50 = 100 µM. jak to wyjaśnić?

Pytanie 13: Opisując parametry sonifikatorów Doktorantka podaje częstotliwość 2 kHz. Tymczasem zakres ultradźwięków zaczyna się powyżej 20 kHz. Czy nie ma tu pomyłki?

Pytanie 14: Na s. 150 brak jest wprawdzie jednostek przy stężeniach, ale można domyślić się, że chodzi o stężenie milimolowe. Podane liczby są jednak 10x mniejsze niż na Fig. 41, 44 i 46. Które wartości są poprawne?

Doktorantka nie ustrzegła się też dość licznych drobnych błędów redakcyjnych, których wymienianie tu nie ma większego sensu, a które przypisuję brakowi czasu na uważniejszą korektę. Wspominam o nich dlatego, żeby zwrócić uwagę Autorki, że czytelnicy zauważają takie niedoskonałości tekstu.

Przedstawione powyżej uwagi i pytania nie umniejszają w żadnej mierze wysokiej wartości naukowej recenzowanej rozprawy i mają być dla Doktorantki wskazówkami, jakich pułapek unikać przy pisaniu tekstów naukowych. Nie ulega wątpliwości, że Doktorantka przeprowadziła bardzo rozległe badania, poczynając od poznania podstawowych właściwości badanych obiektów, po wykorzystanie zbudowanego warsztatu badawczego do prowadzenia zaawansowanych doświadczeń na wysokim poziomie. Wykazała się przy tym rozległą wiedzą, sprawnością eksperymentatora i znajomością wielu technik. Dodatkowym, niemałym atutem jest przygotowanie rozprawy w języku angielskim. Doktorantka zadbała też o jej atrakcyjny wygląd i bardzo dobrej jakości ilustracje.

Z zamieszczonego dorobku wynika, że mgr Liliana Czernek jest osobą bardzo aktywną, uczestniczką wielu konferencji, szkoleń i innych wydarzeń naukowych. Jest też współautorką 3 publikacji naukowych z listy JCR.

Mgr Liliana Czernek wykazała się pracowitością, starannością i sumiennością w prowadzonych pracach, a przede wszystkim pokazała, że potrafi prawidłowo zaprojektować, prowadzić i rozwiązać skomplikowane problemy badawcze, czego dowodem jest przedstawiona praca doktorska. Spełnia ona wszelkie wymogi ustawowe, dlatego z pełnym przekonaniem wnioskuję o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Liliany Czernek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

