Prof. dr hab. Marta Miączyńska
Laboratorium Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 01.10.2018 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr Marty Adamiak

p.t.: „Charakterystyka właściwości biologicznych oraz potencjału regeneracyjnego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z mysich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w modelu uszkodzenia mięśnia sercowego"

wykonanej pod kierunkiem pani dr hab. Ewy Zuby-Surmy, prof. UJ
w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Rozprawa doktorska pani mgr Marty Adamiak łączy w sobie zagadnienia z dziedziny biologii komórki, fizjologii komórek macierzystych i medycyny regeneracyjnej. Jej celem było, po pierwsze, wyizolowanie i scharakteryzowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) produkowanych przez mysie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPS), oraz po drugie, określenie ich potencjału terapeutycznego do stymulowania funkcji uszkodzonego mięśnia sercowego. Tematyka przeprowadzonych badań jest w każdym swoim aspekcie niezwykle aktualna. Duże zainteresowanie naukowców na całym świecie budzą obecnie mechanizmy powstawania i funkcje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co przekłada się na lawinowo rosnącą liczbę doniesień literaturowych na tym polu. Niezmiennie intensywnie badane są indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, a przede wszystkim ich możliwe zastosowania terapeutyczne do naprawy i odtwarzania tkanek uszkodzonych w wyniku chorób lub starzenia. Istotność i aktualność podjętego w rozprawie problemu badawczego nie budzi więc żadnych wątpliwości, a lektura rozprawy potwierdza, że Doktorantka uzyskała solidne i znaczące wyniki, a tym samym wniosła swój wkład do światowej literatury przedmiotu.

Formalny opis rozprawy

Obszerna rozprawa licząca 193 stron maszynopisu ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się listą publikacji Doktorantki, wykazem stosowanych skrótów, listą użytych programów komputerowych oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. Wstęp (23 strony) zawiera 4 podrozdziały. Po dwustronicowym przedstawieniu celów pracy następuje szczegółowy opis materiałów i metod (51 stron). Wyniki (49 stron) są podzielone na 9

podrozdziałów, a dyskusja liczy 19 stron. Rozprawa kończy się jednostronicowym podsumowaniem i zestawieniem wyników końcowych, spisem literatury zawierającym 239 pozycji oraz listą trzech załączników.

Ocena merytoryczna

Wstęp jest bardzo dobrze skomponowanym i solidnym wprowadzeniem do tematyki badań zamieszczonych w rozprawie. Po krótkim omówieniu problematyki chorób sercowo-naczyniowych, Autorka koncentruje się na dwóch kluczowych dla swojej pracy zagadnieniach: komórkach macierzystych (w tym komórkach iPS) oraz pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. W pierwszej części prezentuje definicje, hierarchię i różnorodność komórek macierzystych, historię odkrycia i charakterystykę iPS oraz przykłady zastosowania komórek macierzystych do regeneracji mięśnia sercowego. W drugiej części dotyczącej EVs, omawia historię ich odkrycia, mechanizmy formowania, strukturę i znane funkcje biologiczne w komunikacji międzykomórkowej.

Bardzo wysoko oceniam dobór treści Wstępu, klarowny styl i logiczny sposób prezentowania informacji. Ta część zawiera 7 rycin, które bardzo trafnie ilustrują omawiane treści. Warto podkreślić bardzo bogate piśmiennictwo: ponad 140 pozycji cytowanych we Wstępie, zarówno najnowszej literatury, jak i najstarszych prac oryginalnych stanowiących podwaliny dla danej dziedziny. Jednym z aspektów, który bardzo mi się spodobał był krótki rys historyczny badań nad EVs, sięgający do obserwacji z lat 40-tych XX wieku. Generalnie, umiejętność przedstawiania informacji w szerokim kontekście wiedzy całej dziedziny, w tym także jej rozwoju historycznego, świadczy o dużej dojrzałości Doktorantki.

W tej części chciałam jedynie zwrócić uwagę na drobne nieścisłości:

- str. 33, niefortunne sformułowanie: „Późne endosomy mogą ulegać degradacji" – chodzi o degradację makromolekuł transportowanych w późnych endosomach (ładunku endocytarnego), ale nie samych endosomów, które wedle dotychczasowej wiedzy nie ulegają degradacji w całości.

- str. 33, białko TSG101 nie jest białkiem pomocniczym dla kompleksów ESCRT, jak napisano, a kluczowym składnikiem kompleksu ESCRT-I, bez którego kompleks ten nie może zostać utworzony.

- str. 33, stwierdzenie, że egzocytoza to sekrecja egzosomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej zbytnio zawęża znaczenie tego terminu. Egzocytoza to ogólnie sekrecja, nie tylko egzosomów – także wszelkich innych produktów komórkowych, np. hormonów czy enzymów wydzielanych na klasycznej drodze sekrecji z udziałem ER, aparatu Golgiego i pęcherzyków wydzielniczych.

- str. 34, legenda do Ryc. 6, tłumaczenie angielskiej nazwy ESCRT nie jest fortunne. Nie jest to kompleks sortujący wymagany do transportu endosomów, a endosomalny kompleks sortujący wymagany do transportu (w domyśle: ładunku endocytarnego).

Cztery szczegółowe **cele pracy** zostały jasno sformułowane i zrealizowane podczas badań. Doktorantka przedstawiła cele swojej pracy także w przejrzystej formie graficznej jako Ryc. 8.

Materiały i metody to bardzo szczegółowe i starannie opracowane kompendium wszystkich protokołów doświadczalnych zastosowanych w rozprawie. Ta część, zawierająca

także informacje o podstawach teoretycznych wybranych metod, świadczy o głębokim zrozumieniu przez Doktorantkę istoty i przebiegu wszystkich procedur doświadczalnych. Czytając tę część rozprawy można z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że pani mgr Adamiak jest bardzo sprawną i uważną eksperymentalistką dbającą o szczegóły. Jak Autorka słusznie zauważa, zwłaszcza w dziedzinie izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych szczegóły stosowanych metod są niezwykle istotne, a brak jednolitych standardów utrudnia porównywanie wyników pomiędzy różnymi zespołami badawczymi. Jestem przekonana, że tak dokładny opis metod doświadczalnych będzie służył jako ważny odnośnik dla kolejnych pokoleń badaczy w zespole Promotorki pracy doktorskiej. Do pełnej doskonałości tej części rozprawy zabrakło mi podania numerów katalogowych przeciwciał wymienionych w Tabelach 9, 14 i 17, potrzebnych aby znać wszystkie warunki przeprowadzenia doświadczeń. W przypadku kilku użytych przeciwciał, sama informacja o producencie nie jest wystarczająca, gdyż dysponują oni kilkoma przeciwciałami rozpoznającymi ten sam antygen. Również określenie „klon" w stosunku do przeciwciał poliklonalnych nie jest poprawne. Ponadto, na str. 94, opis pomiaru gęstości naczyń powinien brzmieć jako ich liczba (a nie ilość) przypadająca na powierzchnię 1 mm^2 (w Wynikach opis jest już poprawny).

Wyniki rozprawy zawarte są w 9 podrozdziałach i przedstawione na 27 rycinach. Doktorantka w sposób precyzyjny i zwięzły przedstawia logiczny ciąg przeprowadzonych doświadczeń. Rozpoczyna go optymalizacja hodowli i charakterystyka komórek iPS jako źródła do pozyskiwania EVs. Kolejnym etapem było opracowanie metod do izolacji EVs z komórek iPS oraz ich dogłębna charakterystyka pod względem cech morfologicznych, właściwości fizykomechanicznych, wielkości i heterogenności. Następnie Doktorantka zbadała obecność wybranych białek i transkryptów w EVs, a później preparaty te zostały poddane globalnej analizie profilu miRNA i analizie proteomicznej w porównaniu do wyjściowych komórek iPS. W dalszej części Wyników opisano działanie EVs na komórki śródbłonka mięśnia sercowego in vitro, a etapem ostatnim była ocena potencjału regeneracyjnego pęcherzyków w mysim modelu in vivo zawału mięśnia sercowego.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że EVs uzyskane z komórek iPS są nośnikami białek, cząsteczek mRNA i miRNA. W stosunku do komórek śródbłonka naczyń mięśnia sercowego EVs działają proangiogennie i cytoprotekcyjnie in vitro. Z kolei po podaniu in vivo EVs poprawiają czynności mięśnia sercowego i perfuzję tkanki serca po zawale. Rezultaty te wskazują na potencjał preparatów EVs pozyskanych z komórek iPS do wykorzystania w medycynie regeneracyjnej.

Generalnie, przedstawione wyniki są solidne, spójne i przekonujące, uzyskane i opracowane w sposób poprawny, z zastosowaniem odpowiednich kontroli doświadczalnych. Ich znaczenie i wysoką jakość potwierdza fakt, że znaczna ich część została opublikowana w artykule w bardzo prestiżowym czasopiśmie *Circulation Research*, w którym Doktorantka jest jednym z dwóch równorzędnych pierwszych autorów.

W tej części rozprawy, mam jedynie drobne uwagi:

- Ryc. 17A, dotyczy obecności mRNA dla genów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych: Oct3/4A, Nanog i Rex1 w komórkach iPS. Doktorantka pisze, że poziom tych transkryptów w komórkach iPS jest zbliżony do poziomu w kontrolnych komórkach ES-D3. Jeśli dobrze rozumiem użyty sposób normalizacji, to faktycznie poziomy transkryptów Oct3/4A i Nanog są porównywalne, ale poziom transkryptu Rex1 wydaje się około dziesięciokrotnie niższy w komórkach iPS niż w komórkach ES-D3?

- str. 117, niewłaściwe tłumaczenie angielskiego terminu: aryl hydrocarbon receptor signaling. Hydrocarbon to węglowodór, a nie jak podano wodorowęglan.

Dyskusja jest bardzo ciekawie napisanym i dojrzałym omówieniem znaczenia uzyskanych wyników na tle dostępnej literatury. Doktorantka w uporządkowany sposób dyskutuje swoje wyniki dotyczące kolejno: optymalizacji hodowli komórkowej i procedury izolacji EVs, charakterystyki wyizolowanych EVs, ich oceny funkcjonalnej in vitro oraz in vivo. Dyskusję kończy podsumowanie, ilustrowane ryciną ze schematem potencjalnego zastosowania klinicznego EVs do naprawy uszkodzonego mięśnia sercowego. Doktorantka bardzo sprawnie porusza się w światowej literaturze przedmiotu i w tym szerokim kontekście krytycznie i bez nadinterpretacji ocenia swoje wyniki. Co bardzo ważne, jest świadoma ograniczeń poszczególnych technik eksperymentalnych i znaczenia doboru odpowiednich kontroli w doświadczeniach, co świadczy o Jej dużej dojrzałości naukowej. Autorka proponuje także zagadnienia, które byłyby ciekawym rozszerzeniem Jej badań w przyszłości, a także prezentuje dalekosiężną perspektywę wykorzystania EVs w medycynie regeneracyjnej. W mojej opinii, także ta część rozprawy zasługuje na bardzo wysoką ocenę.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Pod względem edytorskim, praca jest napisana bardzo starannie, bardzo podoba mi się również strona graficzna i jasny sposób prezentacji danych. Dopatrzyłam się co prawda kilku drobnych błędów, anglicyzmów czy literówek (parę z nich wymieniam poniżej, aby unikać takich pomyłek w przyszłości), ale te małe niedostatki nie wpływają na odbiór całej rozprawy.
Anglicyzmy: pik (zamiast maksimum), koncentracja (zamiast stężenie).
Poprawna pisownia słów: niepożądany (streszczenie), nowo powstały (str. 39).

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Marty Adamiak podejmuje ważny i nowatorski problem naukowy z pogranicza dziedzin biologii komórki, fizjologii komórek macierzystych i medycyny regeneracyjnej. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę są wartościowe i stanowią istotny wkład do światowej literatury przedmiotu, wskazując obszary do przyszłych badań i zastosowań terapeutycznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Przedstawione w rozprawie doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane, wykonane i zinterpretowane, co jest potwierdzone faktem ich publikacji w bardzo prestiżowym czasopiśmie międzynarodowym, z Doktorantką jako jednym z dwóch pierwszych równorzędnych autorów. Ponadto, pani Adamiak jest współautorką trzech kolejnych publikacji eksperymentalnych, jednego artykułu przeglądowego oraz dwóch rozdziałów książkowych, co świadczy o Jej dużej aktywności naukowej.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Marty Adamiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Marta Miączyńska