INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Dr hab. Aleksandra Klimczak, prof. PAN
Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek
Macierzystych i Nowotworowych

Wrocław, 4.04.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Karnas

Temat rozprawy: „Wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych na potencjał hematopoetyczny krwiotwórczych komórek macierzystych krwi pepowinowej"

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Elżbiety Karnas wykonana została pod kierunkiem Pani dr hab. Ewy Zuby-Surmy, prof. UJ, w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie .

Jest to obszerne opracowanie napisane w języku polskim, zawarte na 189 stronach maszynopisu, bogato ilustrowane zawierające 44 ryciny stanowiące wykresy, fotografie lub schematy oraz 22 tabele ułatwiające analizę uzyskanych wyników. Rozprawa posiada układ typowy dla prac doktorskich tj. Streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzający w temat rozprawy Wstęp, jasno sformułowane Hipoteza i Cel pracy, opisy stosowanych Materiałów i Metod, Wyniki i Dyskusję. Bogate piśmiennictwo liczy 529 pozycji. Obszerny wykaz stosowanych skrótów poprzedzający Wstęp znakomicie ułatwia recenzję pracy.

Sprawna i efektywna rekonstytucja układu krwiotwórczego jest oczekiwanym efektem przeszczepiania komórek hematopoetycznych w leczeniu dysfunkcji lub chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Głównym źródłem pozyskania komórek hematopoetycznych jest szpik kostny lub komórki progenitorowe układu krwiotwórczego CD34+ mobilizowane do krwi obwodowej. Alternatywnym źródłem jest również krew pępowinowa bogata w komórki CD34+, jednak ich liczba, niezbędna do odtworzenia układu krwiotwórczego, jest odpowiednia dla dzieci ale niewystarczająca dla dorosłego organizmu. Z uwagi na ograniczone możliwości ekspansji komórek CD34+ *in vitro* trwają badania, które pozwoliłyby na zwiększenie liczby i potencjału krwiotwórczego komórek CD34+ pozyskanych z krwi pępowinowej. Takiego zadania podjęła się Doktorantka w pracy badawczej będącej podstawą rozprawy doktorskiej, której celem było zbadanie wpływu pęcherzyków

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

zewnątrzkomórkowych, pochodzących z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPS-EVs), na właściwości biologiczne i potencjał krwiotwórczy komórek hematopoetycznych pozyskanych z krwi pępowinowej, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Część doświadczalną rozprawy poprzedza obszerny Wstęp literaturowy, w którym Doktorantka opisuje hematopoetyczne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego oraz ich biologiczną niszę. Jako alternatywne źródło szpikowych komórek hematopoetycznych Doktorantka wybrała krew pępowinową przedstawiając we Wstępie możliwości jej zastosowania i wynikające z tego zarówno zalety jak i ograniczenia. Trzecią część Wstępu stanowi charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zarówno pod kątem ich klasyfikacji, właściwości biologicznych, metod ich pozyskania i możliwości zastosowania w naukach biomedycznych.
We Wstępie znalazły się uchybienia redakcyjne, które nie umniejszają wartości pracy a przedstawiam je z obowiązku recenzenta:
- W opisie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) w Tabeli 4 oraz na Ryc 6. wielkość onkosomów doktorantka opisała jako 1-2μm, natomiast w charakterystyce opisanej na stronie 39 Wstępu podała 1-10 nm – wg cytowanych prac powinno być 1-10μm. Również wielkości egzosomów i ektosomów różnią się w odniesieniu do cytowanej pracy referencyjnej (Ref 280).
- Zarówno we Wstępie jak i w pozostałych rozdziałach pracy, Autorka posługuje się terminem „przeszczepy komórek hematopoetycznych", podczas gdy poprawna forma to „przeszczepienie(a) komórek hematopoetycznych".
- Ponadto, w pracy zwraca uwagę powtarzające się wyrażenie „namnażanie komórek z krwi pępowinowej", które jest raczej wyrażeniem używanym potocznie w pracy laboratoryjnej. W przypadku propagacji komórek używamy terminu „rozmnażanie", natomiast termin „namnażanie" określa proces powielania czy reprodukcji wirusów i tylko w tej sytuacji ma zastosowanie.

Hipoteza i cel pracy zostały jasno sformułowane i wynikają z przedstawionych we Wstępie zagadnień dotyczących biologii hematopoetycznych komórek macierzystych rezydujących w szpiku kostnym i pozyskanych z krwi pępowinowej oraz roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w regulacji procesów biologicznych komórek. Cele pracy zostały zilustrowane schematem graficznym przedstawiającym kolejne etapy badań.

Rozdział Materiał i Metody rozpoczyna wykaz programów komputerowych użytych do archiwizacji i analizy bioinformatycznej danych oraz końcowego przygotowania niniejszej dysertacji. W dalszej części przedstawione zostały szczegółowe informacje dotyczące wykonanych procedur umożliwiające ewentualne powtórzenie przedstawionych w pracy badań. Lista opisanych procedur i badań jest wyczerpująca i wraz z przedstawionymi wynikami nie

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

pozostawia wątpliwości, że Doktorantka znakomicie opanowała warsztat badawczy w zakresie niezbędnym do oceny wyników badań stanowiących cel niniejszej rozprawy doktorskiej.
Dodatkowym atutem pracy jest bogata ilustracja przeprowadzonych procedur eksperymentalnych w postaci schematów co znakomicie ułatwia ocenę przeprowadzonych czynności.
W pracy badawczej Autorka posłużyła się wieloma metodami poczynając od kilkuetapowych metod izolacji i ekspansji komórek o fenotypie CD34+ z krwi pępowinowej poprzez izolację pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z kondycjonowanych pożywek hodowlanych. W obrębie metod stosowanych do oceny ilościowej i jakościowej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pozyskanych z linii ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych hiPS, znalazła zastosowanie cytometria przepływowa wzbogacona o obrazowanie indywidualnych obiektów obecnych w heterogennej populacji hiPS-EVs oraz mikroskopia sił atomowych.
Wśród licznych testów czynnościowych w badaniu wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na aktywność komórek CD34+ pozyskanych z krwi pępowinowej, na uwagę zasługują metody oparte na analizie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w komórkach CD34+, analiza zmian profilu ekspresji genów mających wpływ na różnicowanie i samoodnowę komórek CD34+ z wykorzystaniem komercyjnych zestawów do profilowania mRNA dla kilkudziesięciu genów związanych z regulacją hematopoezy oraz analiza proteomu związanego ze zmianami fosforylacji kinaz białkowych z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi bioinformatycznych.

W rozdziale Wyniki Autorka szeroko udokumentowała wyniki badań dotyczące wpływu heterogennej populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, pozyskanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych hiPS, na aktywność biologiczną komórek CD34+ pozyskanych z krwi pępowinowej. Doktorantka wykazała, że EVs wydzielane przez komórki hiPS są zdolne do interakcji z komórkami CD34+ *ex vivo* oraz mogą być przez nie internalizowane. EVs zwiększają ich aktywność metaboliczną oraz potencjał klonogenny *in vitro*, nie zwiększają jednak tempa proliferacji komórek CD34+. Ponadto, zwiększają aktywność chemotaktyczną oraz adhezję komórek CD34+ z krwi pępowinowej do białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz do komórek podścieliska szpiku i śródbłonka naczyniowego *in vitro,* co prawdopodobnie związane jest ze wzrostem poziomu molekuł adhezyjnych na powierzchni tych komórek. Istotną obserwacją jest ocena wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na aktywację szeregu szlaków wewnątrzkomórkowych związanych z przekazywaniem sygnału w obrębie komórki, których aktywacja lub hamowanie związane jest z promowaniem przeżycia i proliferacji komórek CD34+ i ma wpływ na regulację procesu hematopoezy. Ponadto, przeprowadzona analiza bioinformatyczna wzajemnych interakcji pomiędzy genami oraz analiza sieci powiązań wzajemnego oddziaływania pomiędzy badanymi białkami zaangażowanymi w szlakach transdukcji sygnału, stanowią istotne dopełnienie badań *in vitro* nad biologiczną aktywnością pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odniesieniu do komórek CD34+ pochodzacych z krwi pępowinowej.

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Ostatnim etapem badań była ocena zdolności zasiedlania nisz szpikowych i rekonstytucja układu krwiotwórczego *in vivo*, w modelu mysim szczepu NOD/SCID, przez komórki CD34+ krwi pępowinowej prekondycjonowane pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi pochodzącymi z indukowanych komórek pluripotencjalnych - hiPS-EVs. Autorka wykazała, że hiPS-EVs zwiększają efektywność zasiedlania nisz hematopoetycznych przez komórki CD34+ oraz wpływają na tempo rekonstytucji układu krwiotwórczego, poprzez analizę ekspresji antygenu CD45 specyficznego dla ludzkich komórek układu krwiotwórczego (oprócz erytrocytów) bez względu na stopień ich zróżnicowania. W opini recenzenta dopełnieniem badań *in vivo* byłoby określenie obecności komórek CD34+ oraz ich odsetka, jak również zbadanie fenotypu komórek (CD3, CD14, CD19, CD66b, CD235a, CD41) będącego odzwierciedleniem obecności poszczególnych populacji komórek hematopoetycznych specyficznych dla danej linii komórkowej układu krwiotwórczego, podobnie jak to Doktorantka uczyniła w w badniu *in vitro*. Szczególnie istotne byłoby badanie fenotypu po obserwacji długoterminowej tj. po 8 tygodniach po przeszczepieniu komórek CD34+ uprzednio prekondycjonowanych pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, co stanowiłoby potwierdzenie utrzymania puli progenitorów krwiotwórczych CD34+ oraz efektywności różnicowania komórek CD34+ w warunkach *in vivo*. Brak wspomnianej analizy nie umniejsza efektów wykonanych badań a bogactwo zastosowanych metod analizy *in vitro* sprawia, że wyniki niniejszej dysertacji są znakomicie udokumentowane i nie budzą wątpliwości.

Biorąc pod uwagę przedstawione przez Doktorantkę wyniki, należy podkreślić, że postęp w porównawczych analizach genomowych oraz proteomowych jak również dostepność nowoczesnych metod analiz bioinformatycznych dają możliwości precyzyjnej analizy wzajemnych interakcji pomiedzy ekspresją badanych genów lub białek co w przyszłości może przyczynić się do odpowiedniej ich modyfikacji w celu zwiększenia pożądanej aktywności biologicznej komórek.

Dogłębna dyskusja świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnień dotyczących biologicznej charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz potencjalnego wykorzystania ich aktywności w postępowaniu terapeutycznym. Doktorantka w sposób krytyczny dokonała przejrzystej analizy i interpretacji uzyskanych wyników na tle bogatego piśmiennictwa, liczącego 529 pozycji, w większości opublikowanego w ostatnich latach.
Ponadto, istotnym aspektem dyskusji jest stanowisko Doktorantki, która w świetle uzyskanych wyników kreśli wizję dalszych badań eksperymentalnych dotyczących aktywności biologicznej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na usprawnienie zasiedlania nisz szpikowych i rekonstytucji układu hematopoetycznego, w tym badania dotyczące wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na komórki CD34+ bezpośrednio po izolacji bez uprzedniego ich rozmnażania *in vitro*, co w przyszłości może mieć zastosowanie aplikacyjne.

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Wnioski wynikające z podsumowanych wyników stanowią wyczrpującą odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze i zostały zilustrowane schematem graficznym podsumowujacym uzyskane wyniki.

Praca została starannie zredagowana z dużą dbałością o stronę graficzną, jednak Doktorantka nie ustrzegła się pewnych błędów redakcyjnych czy stylistycznych. Uchybienia redakcyjne, o których wspomniano w treści recenzji, nie umniejszają wartości pracy a stanowią jedynie wskazówki dla Autorki przed przygotowaniem pracy do druku w specjalistycznym czasopiśmie.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Elżbiety Karnas stanowi oryginalne i nowatorskie osiągnięcie naukowe polegające na wykazaniu pozytywnego wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych na aktywność biologiczną hematopoetycznych komórek progenitorowych CD34+ pozyskanych z krwi pępowinowej. Doktorantka wykorzystała współczesne metody analizy i obrazowania stosowane w biologii komórki, testy funkcjonalne, macierze genomowe i proteomowe oraz analizy bioinformatyczne co pozwoliło na realizację zadań badawczych wyznaczonych w celach pracy.
Poddana recenzji niniejsza dysertacja doktorska ma duże znaczenie poznawcze a jej wyniki mogą znaleźć zastosowanie praktyczne i pozwolą na opracowanie zoptymalizowanych metod zastosowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych do prekondycjonowania prekursorowych komórek hematopoetycznych krwi pępowinowej celem zwiększenia ich zdolności do zasiedlania nisz szpikowych i potencjału krwiotwórczego. W przyszłości mogą stanowić podstawę opracowania protokołu terapeutycznego do potencjalnego zastosowania klinicznego.

Z uwagi na wysoką wartość poznawczą wyników niniejszej rozprawy doktorskiej oraz wyjątkową staranność w opracowaniu wielowątkowego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, zgodnie z Ustawą o Stopniach i Tytułach Naukowych określonych w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora, wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Elżbiety Karnas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Laboratorium Biologii Komórek
Macierzystych i Nowotworowych
Dr hab. Aleksandra Klimczak
profesor Instytutu

Dr hab. Aleksandra Klimczak, prof. PAN