

Poznań, 14.08.2025

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Anety Żebrowskiej zatytułowanej: „***Molecular characteristics of small extracellular vesicles isolated from melanoma patients' plasma***”.

Czerniak (łac. *melanoma malignum*) jest złośliwym nowotworem pochodzenia nienabłonkowego, wywodzącym się z komórek barwnikowych – melanocytów. Kojarzony głównie jako choroba skóry, może rozwinąć się również na powierzchni błon śluzowych przewodu pokarmowego oraz w gałce ocznej. Liczba zachorowań na świecie i w Polsce na ten rodzaj nowotworu dynamicznie wzrasta – każdego roku diagnozuje się około 4000 nowych przypadków. Czerniak może dawać szybkie przerzuty nie tylko do okolicznych węzłów chłonnych, ale również przerzuty odległe, najczęściej do mózgu, płuc oraz kości. Tak więc poszukiwanie nowych metod detekcji w oparciu o różnicowe panele biomarkerów jest szansą na określenie zmian chorobowych na bardzo wczesnym etapie powstawania nowotworów.

Jednym z potencjalnych źródeł biomarkerów są płyny ustrojowe, odzwierciedlające aktualnie zachodzące procesy metaboliczne w tkankach. Wśród nich wyróżnia się **małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe** (z ang. *small extracellular vesicles*, **sEV**), służące do komunikacji międzykomórkowej. Analiza cargo białkowego sEV może służyć do zrozumienia procesów i aktywacji ścieżek sygnałowych zachodzących w samych komórkach. Na tym tle analizy proteomiczny sEV wywodzących się z komórek nowotworu (np. z komórek melanoma zwanych **MTEX**, z ang. **melanoma cell-derived TEX**) może dostarczyć nam informacji o rozwoju i stanie zaawansowania nowotworu. Skład molekularny MTEX przypomina w większości skład proteomu w samych komórkach melanoma. Pozwoliło to zaklasyfikować MTEX jako „ciekłą biopsję nowotworową, z ang. *liquid tumor biopsy*), pozwalającą na nieinwazyjne monitorowanie progresji nowotworu i jego odpowiedzi na terapię.

Analiza składu molekularnego MTEX i zachodzących zmian procesów prowadzona jest często w oparciu o proteomikę bądź metabolomikę, tj. globalne lub celowane analizy proteomu i metabolomu wykonywane głównie przy użyciu spektrometrii mas (MS), bądź techniki NMR. Mimo niewątpliwego postępu w badaniach nad czerniakiem brakuje tzw. **znaczników prognostycznych (markerów)** choroby. Dalsze poznawanie procesów, których wykorzystanie może ulepszyć stosowane metody jest więc niewątpliwie uzasadnione.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Anety Żebrowskiej, znakomicie wpisuje się w tę tematykę. Praca doktorska została wykonana w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Profesora Mieczysława Chorażego, pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Moniki Pietrowskiej, której dotychczasowe osiągnięcia w zakresie badań nad mechanizmami molekularnymi nowotworów oraz kompozycji sEV w różnych jednostkach chorobowych przy użyciu spektrometrii mas są szeroko rozpoznawane i cytowane. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie zostały zatem, jak można się było spodziewać, bardzo dobrze zaplanowane pod względem metodologicznym. Ogrom pracy, jaki wykonała Doktorantka budzi uznanie, zwracając też

uwagę znakomite ilustracje zawierające szczegółowe analizy wyników z profilowania białek sEV za pomocą spektrometrii mas.

Rozprawa ma układ klasyczny. W obszernym wstępie Doktorantka dyskutuje szeroko zagadnienie powstawania czerniaka, znanymi czynnikami ryzyka, włączając to rodzinne przypadki (10%) i epidemiologią. Wśród stosowanych metod terapeutycznych Doktorantka wylicza celowaną terapię molekularną o (kombinacyjną terapię z użyciem inhibitorów BRAF i MEK) oraz immunoterapię. W następnej części Doktorantka skupia się na metodach detekcji melanoma, powiązanych ścieżkach sygnałowych (PI3/AKT, MAPK, Wnt/ β -katenina, MITF, TGF- β i inne) oraz wprowadza pojęcie markerów molekularnych i metabolitów jako markerów różnicowych raka. Duża część poświęcona jest klasyfikacji i terminologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w tym samych sEV, o wielkości 30-200 nm, błoniastych pęcherzyków wydzielanych przez wszystkie typy komórek o cargo przypominającym komórki wyjściowe. Godne podkreślenia jest to, że sEV wydzielane przez zdrowe komórki jest inne od tego wydzielane przez zmienione komórki rakowe, co umożliwia badania porównawcze z zużyciem technik multiomicznych i wyodrębnienie białek i metabolitów różnicujących. sEV wyodrębnione z komórek rakowych (TEX) odgrywają ważną rolę w biologii raka zmieniając mikrośrodowisko, umożliwiając ucieczkę immunologiczną komórek rakowych (z ang. *immune escape*), stymulując unaczynienie (angiogenezę), czy indukując przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT) i metastazę. Pełen zakres procesów komórkowych indukowanych przez MTEX został bardzo szczegółowo przedstawiony przez Doktorantkę na **Rycinie 5**. Spośród metod izolacji sEV wyróżnia się ultrawierowanie i sączenie molekularne, często połączone z metodą tzw. *immunocapture*, tak jak przedstawiono to w dalszych etapach rozprawy doktorskiej z wysoce specyficznymi monoklonalnymi przeciwciałami rozpoznającymi białka **CSPG4** i **CD3**. Część metodologiczna dotycząca profilowania proteomicznego z użyciem spektrometrii mas w badaniach nad proteomem sEV opisana jest bardzo poprawnie i szczegółowo (znakomity przegląd stosowanych metod zawarty jest w **Tabeli 1** i bardzo gruntownie dotyczących metod użytych w samej pracy doktorskiej w **Rozdziale 3, Metody**). Same metody zilustrowane zostały szeregiem szczegółowych tabel i Rycin opisujących w detalach metody chromatograficzne, parametry akwizycji widm masowych na poziomie MS i MS/MS, parametry zastosowane w programie Proteome Discoverer 1.4 czy parametry analiz bioinformatycznych włączając w to różne metody imputacji danych i analiz statystycznych.

Celem pracy było poznanie składu molekularnego sEV pochodzących z komórek czerniaka o fenotypie CSPG4-pozytywne (+) oraz z limfocytów o fenotypie CD3-pozytywne pochodzących z osocza krwi pacjentów z rozpoznaniem czerniaka oraz osób zdrowych. Wyniki zostały szeroko przedyskutowane w **Rozdziale 4 (4.1-4.3.5)** i dotyczyły strony technicznej pomiarów proteomicznych oraz identyfikacji białek w TEX, w poszczególnych grupach pacjentów z czerniakiem oraz ich porównanie z kontrolami. **Dyskusja (Rozdział 5)** jest być może zbyt oszczędna jak na rozmiar pracy, ale odnosi do wszystkich najważniejszych wyników i rozważa tematy do dalszych badań. Wyniki zostały raz jeszcze zwięźle omówione w **Podsumowaniu (Rozdział 6)**. Rozprawę kończy obszerny spis z **208 pozycjami literatury** oraz wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki (prace oryginalne, udział w zjazdach naukowych i uczestnictwo programach grantowych). Doktorantka opublikowała łącznie **pięć prac oryginalnych** i prezentowała wyniki na 11

konferencjach krajowych i międzynarodowych. W trzech pracach oryginalnych Doktorantka była pierwszym autorem a w dwóch autorem drugim.

Analiza uzyskanych wyników

Wyniki pracy doktorskiej zostały częściowo opublikowane w dwóch pracach oryginalnych. Na szczególną uwagę zasługuje praca opublikowana w *J Extracell Vesicles* 2021 Feb;10(4):e12063. doi: 10.1002/jev2.12063 o bardzo wysokim współczynniku oddziaływania (**Hirsch index =14.5**), cytowana **48 razy**, w której Doktorantka była drugim autorem. Druga praca została opublikowana w *Cells* 2022 Jun 18;11(12):1965. doi: 10.3390/cells11121965, w której Doktorantka była pierwszym autorem.

W pierwszej części Wyników, Doktorantka zbadła profile proteomiczne sEV przy użyciu sączenia molekularnego na żelu sprzężonego z immunoselekcją z użyciem wysoce specyficznego przeciwciała z osocza 15 pacjentów z czerniakiem. Wybór przeciwciała monoklonalnego do immunoselekcji oparto na szczegółowej analizie jego specyficzności względem peptydoglikanu 4 siarczanu chondroityny (CSPG4), który selektywnie rozpoznaje epitop ulegający nadekspresji w większości (>80%) komórek czerniaka i komórek macierzystych czerniaka, ale nie jest wykrywalny w normalnych tkankach, z wyjątkiem perycytów. Proteomy sEV rozdzielone na te wywodzące się z komórek czerniaka (MTEX) oraz na te pochodzące z komórek zdrowych (ang. *non-melanoma cel derived sEV*; NMTEX) analizowano za pomocą wysoko rozdzielczej spektrometrii mas. Analiza porównawcza profili białkowych prowadzona za pomocą bardzo dobrze zaplanowanej dwustopniowej analizy statystycznej (analiza ciągła i binarna) wyodrębniła 73 białek różnicowe o podwyższonej akumulacji i 77 białek o obniżonej akumulacji w MTEX (**Rycina 12 i 15**). 16 białek różnicowych było powiązanych z MTEX (spośród 573 zidentyfikowanych białek, biorąc pod uwagę MTEX i NMTEX, **Rycina 12**), powiązanych funkcjonalnie z progresją raka, szeroko rozumianym przekazywaniem komórkowym oraz regulacją systemu immunologicznego (**Ryciny 17-19**). Zidentyfikowano również profil proteomiczny MTEX, który pozwalał wyodrębnić siedmiu pacjentów bez objawów czerniaka (NED, z ang. *non-evidence for a disease*) po terapii od ośmiu z chorobą postępującą (PD, z ang. *progressive disease*). Spośród 75 białek MTEX o wysokiej akumulacji u pacjentów z PD, białko PDCD6IP (z ang. *programmed cell death-6 interacting protein*, zwane również jako ALIX, z ang. *ALG 2-interacting protein XALIX*, $p < 0.0003$) określono jako statystycznie najlepiej różnicujące, podczas gdy kontaktyne-1 CNTN1 obserwowano jedynie w MTEX u pacjentów NED.

W dalszej części pracy doktorskiej opisano wyniki analiz proteomu SEV przy użyciu specyficznego przeciwciała CD3. Wykazano, że sEV wytwarzane przez komórki T można wyizolować z osocza krwi poprzez immunoselekcję przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi CD3, który jest kluczowym składnikiem kompleksu TCR obecnego we wszystkich limfocytach T. Metodę tą zastosowano by odróżnić sEV pochodzące specyficznie z limfocytów T (CD3-positive (+)) w odróżnieniu od tych wydzielanych przez inne komórki CD3-negative (-). Znaleziono 36 białek sEV, o podwyższonej akumulacji we frakcji CD3(+), oraz 56 białek sEV, o podwyższonej akumulacji we frakcji CD3(-). Ogółem we frakcjach CD3 zidentyfikowano 402 białka (**Rycina 21**). Dokonano analiz porównawczych białek sEV z frakcji CD3(+) z proteomem komórek T (CD3+/CD4+/CD8+, Joshi et al.2019), liczącym **6572 białka** oraz lizatami komórek T od 10 pacjentów z melanomą (**3281 białek**, laboratorium kierowane przez

Panią Prof. T. Whiteside; **Rycina 22**). Po wykluczeniu 108 białek osocza zidentyfikowano 268 specyficznych dla komórek CD3+ (138 białek nie wykrytych uprzednio w proteomie limfocytów T; zdrowi osobnicy) i odpowiednio 335 białek (109 białek nie wykrytych uprzednio w proteomie pacjentów z czerniakiem). Stwierdzono, że wśród najliczniejszych podgrup białek, których akumulacja była zwiększona w frakcjach CD3(+) lub CD3(-), znajdowały się białka związane z procesami immunologicznymi (GO:0002376; odpowiednio 20 i 26 białek DEPs wykazywało zwiększoną akumulację w frakcjach CD3(+) i CD3(-)) oraz reakcją na stres (GO:0006950; odpowiednio 20 i 28 białek DEPs we frakcjach CD3(+) i CD3(-)). Warto zauważyć, że białka związane z układem odpornościowym, które zwiększoną akumulację we frakcjach CD3(+) i CD3(-) plazmatycznych sEV, były związane z różnymi typami komórek odpornościowych. Pośród białek różnicujących proteom sEV CD3(+) pochodzący od pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem (*melanoma patients*, MP) od osób zdrowych (*healthy subjects*, HD), wykryto **65 białek (26 białek wykazujących zwiększoną i 38 białek wykazujących obniżoną akumulację)**. W przypadku proteomu CD(-) wskazano odpowiednio **65 białek różnicujących (51 białek wykazujących zwiększoną i 11 białek wykazujących obniżoną akumulację)**. W podsumowaniu przedstawienie Wyników przez Doktorantkę było bardzo czytelne a opisy tabel i Rycin szczegółowo i dobrze zilustrowane.

Zalety doktoratu

Oceniana rozprawa prezentuje nowoczesne podejście w poszukiwaniu nowych biomarkerów i szlaków molekularnych, których regulacja ma znaczenie w mechanizmach zawiadującym tworzeniem czerniaka. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i przeprowadzenia wielkoskalowej analizy proteomicznej **małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych** pochodzącej od pacjentów w porównaniu do kontroli. Praca pokazuje bardzo cenne umiejętności Doktorantki w zakresie wykorzystania technik globalnej spektrometrii mas oraz bioinformatycznej i statystycznej obróbki wyników. Rozprawa prezentuje również dużą wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie mechanizmów powstawania czerniaka a także liczne umiejętności praktyczne, obejmujące analizy sączenia molekularnego czy immunowychwyty sEV z przeciwciałami i wnikliwą analizę zmienionych ścieżek bioinformatycznych. Otrzymane wyniki mogą się przyczynić do opracowania skuteczniejszych metod detekcji i progresji czerniaka w oparciu o stworzone, wysoce specyficzne metody analityczne.

Uwagi krytyczne i pytania

Przedłożona rozprawa ma charakter monografii, ale przedstawione wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych (patrz poniżej), które zostały uwzględnione w spisie literatury. W odczuciu Recenzenta, byłoby może bardziej czytelnie gdyby poszczególne ryciny i opisy do rycin w części dysertacji dotyczących opisu Wyników miały odpowiednie odnośniki do oryginalnych prac.

- 1) Jednym z interesujących pytań w kwestii metodologicznej (**Tabela 7A i 7B**) są różne typy akwizycji widm masowych (*acquisition type*), tj. Full-MS DDA (top10) oraz Full-MS DDA (top12). Podobnie *mass range* był różny, odpowiednio: 200-200 *m/z* i 350-1500 *m/z*. Czy takie użycie było podyktowane wcześniejszymi eksperymentami i różnicami w proteomicznym cargo sEV poddanych immunoselekcji?

- 2) Doktorantka pisze (str. 52), że „ratios of MTEX/NMTEX” oraz MTEX/TEP nie odzwierciedlały tzw. „disease activity”, jak należałoby to interpretować?
- 3) Zwróciłem uwagę, że w opisie na **str. 54 i 55** jest napisane: „In MTEX 62 proteins were upregulated (**P > 0.05** and RBCC ≥ 0.5) oraz „...11 proteins with increased levels in MTEX (**p > 0.05** and Cohen’s $g \geq 0.5$)...” Wydaje mi się, że powinno być **P < 0.05**), tak jak w **Tabeli 10** (Wilcoxon test p-value) czy w **Tabeli 12** (McNemar test p-value), co zaznaczono na zielono. Podobne pytanie nasuwa mi się po analizie opisu na **stronie 84** (**p-value > 0.05** and RBCC ≥ 0.5) czy (**p-value > 0.05**, **FDR > 0.05** and RBCC ≥ 0.5) (i porównanie wyników z **tabel 15 i 16**). W opisie profili proteomicznych CD3(-) sEV izolowanych od pacjentów z czerniakiem (MP) i zdrowymi kontrolami (HD) zawarte są podobne informacje (**str. 95**; p-value > 0.05 and RBCC ≥ 0.5). **Tabela 19** pokazuje 41 białek różnicowych o podwyższonej akumulacji z $p < 0.05$ (na zielono, p.val_U-test) i 8 białek o obniżonej akumulacji (na zielono, p.val_U-test, **Tabela 20**). **Rycina 28** ukazuje panel **19 białek różnicowych** (15 o podwyższonej a 4 o obniżonej akumulacji). W opinii recenzenta powinny być to białka o wartościach: p-value < 0.05, FDR < 0.05 and RBCC ≥ 0.5 , ponieważ obie **tabele 19 i 20** pokazują wartości FDR_U-test jako FDR < 0.05 (na zielono). Tak więc opis legendy i w samym tekście powinien chyba być inny.
- 4) Interesującym pytaniem jest dlaczego profile proteomiczne sEV NMTEX oraz te izolowane z plazmy ludzi zdrowych częściowo się różnią, byłbym ciekaw opinii Doktorantki na ten temat,
- 5) W mojej opinii opis diagramów Venna (**na str. 81**) jest dość chaotyczny, ponieważ liczby podawane w opisie nie mają bezpośrednich odnośników na rycinie,
- 6) W **Tabeli 18** w opisie legendy ścieżek sygnałowych z bazy *Reactome* powiązanych z zidentyfikowanymi białkami o podwyższonej akumulacji, DEP jest p-value > 0.05 choć w samej tabeli wszystkie zidentyfikowane ścieżki mają wartość $p < 0.05$ (zaznaczone na zielono).

Uwagi o charakterze technicznym

1. Wydaje się, że w niektórych miejscach przydatne byłoby użycie dokładniejszego przyporządkowania, np. OMIM IDs w opisie historii czerniaka na stronie 2-3. Pewne skróty są wyjaśniane 2 razy np. TEX (str. 17) czy powinny być wprowadzone wcześniej (EMT ze str. 14 zamiast na stronie 5). Inne skróty nie zostały wyjaśnione, np. MITF (str. 3).
2. Jest istotne by stosować *italics* w opisie nazw genów. Tak jak jest to przedstawiane w pracy nie jest poprawne. Dotyczy to szeregu genów opisywanych na stronie 2 i dalej w tekście. W opisie mutacji i zasocjowanych genów warto byłoby pokazać to w formie tabeli opisowej a nie tylko wymieniać w tekście (**strony 2, 6, 23**). Skróót *m/z* (mass-over-charge), piszemy zazwyczaj w *italics*, str. 23. Podobnie typy jonów szeregu *b* i *y* czy *de novo* (str. 24).
3. Wydaje się, że dobrym podsumowaniem Wyników byłyby graficzne schematy.

Uwagi redakcyjne

Rozprawę napisaną w języku angielskim czyta się bardzo dobrze, jest napisana wartkim, sprawnym językiem. Mimo jednak wielkiej staranności Doktorantki w opisie można dopatrzeć się kilku błędów frazeologicznych czy stylistycznych:

- 1) W Streszczeniu angielskim, str. VII, linijka 1 brakuje przecinka po „Melanoma is a highly invasive cancer, the incidence of which...”,
- 2) Streszczenie angielskie, str. VIII, powinno być “NCN OPUS project”,
- 3) “Key words”, str. IX, powinno być “high resolution tandem mass spectrometry”, podobnie na stronie XII w „Słowach kluczowych” powinno być „wysokorozdzielcza tandemowa spektrometria mas”,
- 4) Streszczenie polskie, str. X, „...chorzy na czerniak odniosą najwyższy zysk ...”, powinno być napisane inaczej,
- 5) Streszczenie polskie, str. XI, „...analiza statystyczna zidentyfikowała...”, powinno być „wyodrębniła”,
- 6) Str. 5, “...comprising of APC, Axin, and GSK3b)...”,
- 7) Str. 6, “...patient monitoring.”- dodatkowa spacja,
- 8) Str. 6, “However, there is still unmet need...”, brakujący przecinek,
- 9) Str. 9, słowo “fluid” powtórzone 5 razy, frazeologia!,
- 10) Str. 20, zdanie „...and is extremely expensive to implement [Lin et al.2020]...”, jest raczej przesadnie sformułowane,
- 11) Str. 21, powinno być “immunosuppression”,
- 12) Str. 31, “...compared to NED and HD.” - dodatkowa spacja,
- 13) Str. 36, “...and CD3(-) phenotype,...”, brakujący przecinek,
- 14) Str. 36, „...were sent to Poland...”,
- 15) Str. 41, powinno być: “from a well”,
- 16) Str. 48, „...and repeatedly tested in our collaborative laboratory headed by Prof. Theresa L. Whiteside, PhD, in UPMC...”- dodatkowe spacje,
- 17) Rycina 9 “antigen” a nie „antygen”, powtórzone 3 razy oraz „melanoma”,
- 18) Str. 54, Rycina 12, powinno być: „ 4 patients”,
- 19) Str. 62-63, Tabela 12, powinno być: “effect size Cohen g”,
- 20) Str. 66, powinno być: „ ...compared with immunohistochemical data...”,
- 21) Str. 73-74, Rycina 17, powinno być: „Reactome”,
- 22) Str. 87, Rycina 26, powinno być: „...DEPs differentiating T-cell derived CD3(+)...”,

Uwagi końcowe i wnioski

Przedstawione uwagi i pytania merytoryczne oraz wskazane drobne zastrzeżenia techniczne i formalne nie wpływają oczywiście na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy. Ogrom pracy Doktorantki, wielość zastosowanych technik i analiz budzą uznanie i wskazują z jednej strony na znaczącą pracę eksperymentalną, jaką wykonała Doktorantka, a z drugiej strony na jej bardzo dobre umiejętności analityczne. Sposób przygotowania rozprawy dowodzi także zdolności do krytycznej analizy wyników, zarówno tych opublikowanych jak i własnych. Przedstawiona do oceny rozprawa wnosi ważne informacje do wiedzy na temat profilowania czerniaka, analizy proteomu sEV oraz wielkoskalowej oceny markerów. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Anety Żebrowskiej **spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r o stopniach i tytule**



naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) (zgodnie z art. 175.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.2018, poz. 1669).

Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii o dopuszczenie Pani mgr Anety Żebrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy**.

Maciej Lalowski, PhD, DSc, AMU prof.
Department of Gene Expression
Institute of Molecular Biology and Biotechnology
Faculty of Biology,
Adam Mickiewicz University
Uniwersytetu Poznańskiego 6 St.
61-614 Poznań, Poland
Tel. (mobile) +48-797991432
<mailto:maciej.lalowski@amu.edu.pl>
<https://ibmib.web.amu.edu.pl/groups/omics-diabetes-group/>

Maciej M. Lalowski, Ph.D., D.Sc., Associate professor
Principal investigator
Medicum
Biochemistry/Developmental Biology
Meilahti Clinical Proteomics Unit
PO Box 63 (Haartmaninkatu 8), Room C214a
FI-00014 University of Helsinki
Finland
Tel. (mobile) +358-407790950
<mailto:maciej.lalowski@helsinki.fi>