

Ocena rozprawy doktorskiej
„*Rola małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez keratynocyty w interakcji z układem odpornościowym w atopowym zapaleniu skóry*”

autorstwa mgr Adriana Kobieli

z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu
Gdańskiego

i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

przygotowanej pod opieką

promotora dr hab. Danuty Gutowskiej-Owsiak, prof. UG



Uniwersytet Jagielloński

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) to dwuwarstwowe struktury membranowe o rozmiarach *nano* i *mikro*, wytwarzane przez większość typów komórek i uwalniane do środowiska komórkowego *milieu*. Te nano- i mikrofragmenty błon komórkowych klasyfikuje się ze względu na ich sposób wytwarzania przez omórkę i różnice w wielkości (średnicy) na podgrupy, według klasyfikacji *International Society for Extracellular Vesicles - JEV* (MISEV). Ponieważ wciąż dyskusji podlega ustalenie konsensusu nad wykorzystaniem specyficznych markerów dla różnych podtypów EVs, takich jak „egzosomy” powstające w szlaku endocytozy i „ektosomy” pochodzące z błony komórkowej (mikrocząstki/mikropęcherzyki) przypisanie poszczególnej podgrupy EVs, stanowiącej obiekt badań, do określonego szlaku biogenezy jest trudne, stąd w swojej pracy doktorskiej mgr **Adrian Kobiela** zastosował rekomendowaną przez JEV nomenklaturę t.j. „małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe” (*small EVs*) dla określenia badanych struktur zewnątrzkomórkowych.

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

Filagryna, to bardzo ważne białko, którego rolą jest stabilizacja włókien keratynowych stanowiących macierz dla znajdujących się w skórze korneocytów. Produkowana w swej prekursorowej formie (profilagryny) wyłącznie przez keratynocyty i podlega procesom dojrzewania i polimeryzacji, współuczestnicząc w tworzeniu zwartej i nieprzepuszczalnej warstwy naskórka.

W swej pracy doktorskiej p. mgr **Adrian Kobiela** pokazał i udokumentował związek między tym specyficznym białkiem i małymi EVs w bardzo a odpowiedzią zapalną w bardzo złożonej jednostce objawowej o przewlekłym przebiegu jakim jest atopowe zapalenie skóry (AZP).

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

W swych artykułach składających się na przedstawioną mi do oceny pracę doktorską doktorant podjął się testowania dwóch podstawowych hipotez wyjaśniających przyczynę choroby: (1) „outside-in”- naruszenie integralności naskórka występuje jako pierwsze i jest odpowiedzialna za aktywację nieprawidłowej odpowiedzi odpornościowej; (2) „inside-out” – układ odpornościowy zapoczątkowuje reakcja, który prowadzi do uszkodzenia naskórka. Udzielenie odpowiedzi na pytanie, która z tych hipotez przeważa jest nie lada wyzwaniem, wymagało sformułowania bardzo odważnych pytań, opracowania złożonego modelu badawczego oraz sięgnięcia do bardzo różnorodnych i zaawansowanych technik badawczych.

Praca p. **mgr Adriana Kobieli** składa się z trzech (3) artykułów w których doktorant jest pierwszym autorem, z czego dwa zostały złożone do czasopisma *JEV (Journal of Extracellular Vesicles)*, które jest najbardziej prestiżowym czasopismem poświęconym tematyce EVs.

Układ pracy jest wyjątkowo staranny i dopracowany, co ułatwia poruszanie się po tak dobitnym i bogatym w materiał dziele. Niewątpliwie szczegółowe streszczenie pomaga czytelnikowi zapoznać się z materiałem i wynikami zawartymi w pracy doktorskiej. W streszczeniu tym zawarty został cel pracy, opis wyników oraz podsumowanie poparte wnioskami.

Wstęp pracy doktorskiej jest bardzo rozbudowany, zawiera szczegółowe informacje dotyczące tematu pracy, od podstaw budowy skóry, mechanizmu dojrzewania profilagryny, opisu komórek układu odpornościowego skóry, procesów związanych z atopowym zapaleniem skóry, włączając procesy zapalne, zakażenia i podłoże genetyczne, oraz biogenezy tworzenia EVs. Jest to wyjątkowe obszerne kompendium, bogate w informację i odniesienia do literatury naukowej. Świadczy o rozległych zainteresowaniach doktoranta i jego potrzebie zgłębiania tematyki w obszarze badań jakimi się zajmuje.

Ze wstępu można dowiedzieć się między innymi o ważnej roli jonów wapnia (Ca^{2+}) w procesie różnicowania i obumierania keratynocytów, zabrakło jednak informacji jak wzrasta stężenie Ca^{2+} w warstwach naskórka, czy jest to wzrost o rząd wielkości, czy może więcej, czy dotyczy on także kompartmentów



Uniwersytet Jagielloński

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

wewnątrzkomórkowych, czy raczej stężenia wapnia pozakomórkowego? Poniekąd odpowiedzi na te pytania udzielają publikacje których opisywane są eksperymenty w warunkach *in vitro* na pierwotnych hodowlach keratynocytów ludzkich (NHEK) i linii nieśmiertelnych keratynocytów (N/TERT-1), w obu przypadkach komórki te poddawane były niskiemu (0,06 mM) i wysokiemu (1,5 mM) stężeniu Ca^{2+}



Uniwersytet Jagielloński

Po obszernym wstępie następuje część stanowiąca trzy artykuły zgłoszone przez doktoranta do dysertacji. Artykuły te (jeden opublikowany, jeden przyjęty do druku) stanowią wyniki badań tematycznie związanych z atopowym zapaleniem skóry, jednak dotyczą odmiennych zjawisk jakie występują u podstaw patomechanizmu zespołu objawów atopowego zapalenia skóry, od roli glikozylacji w procesie wychwytu małych EVs pochodzących od keratynocytów w zakażeniach skóry, po rolę filagryny w metabolizmie lipidów i transporcie małych EVs. Do artykułów dołączone są stosowne oświadczenia współautorów określające ich wkład i stanowiące podstawę do oceny udziału doktoranta w zgłoszonych do pracy doktorskiej artykułach.

Wychwyty EVs a w szczególności małych EVs jest silnie modulowanych przez glukokoniugaty błonowe, a w szczególności reszty kwasu sialowego. W tym artykule (Kobiela et al. *Front Immunol* 2022) doktorant wykazał, że blokada receptorów Siglec-7 i Siglec-9 zmniejsza wychwyty małych EVs pochodzących z keratynocytów, co sugeruje o roli tych receptorów w procesie przekazywania informacji między keratynocytami a komórkami prezentującymi antygen i znaczenie dla przebiegu alergicznego zapalenia skóry z zakażeniem *C. albicans*.

Wyniki te zachęcają do dalszych badań nad rolą glikozylotransferaz w modulacji odpowiedzi zapalnej w atopowym zapaleniu skóry (ST6GAL1 lub C1GALT1) jako enzymów prawdopodobnie przyczyniając się do zmian na powierzchni małych EVs.

W drugim artykule wykazano, że niedobór białka specyficznego dla keratynocytów filagryny wiąże się ze zmienioną regulacją szlaków metabolicznych związanych z obrotem lipidów błonowych w tym lipidów małych EVs. Ten niedobór moduluje zdolność EVs do promowania komórek T zależnych od receptora CD1a poprzez uwalnianie za pośrednictwem fosfolipazy

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków

A2 stymulujących i hamujących ligandów i przejście z odpowiedzi typu 1 do typu 2 (Kobiela et al. 2023 *JEV* w recenzji).



Uniwersytet Jagielloński

Trzecia praca, w której doktorant jest po zmianach autorem wiodącym pokazuje, że małe EVs zawierające filagrynę znajdują się w osoczu zarówno osób zdrowych, jak i osób z atopowym zapaleniem skóry, a zakażenie *S. aureus* zwiększa pakowanie i wydzielanie filagryny. Praca ta pokazuje, że małe EVs stanowią swego rodzaju system usuwania filagryny, zapobiegając przedwczesnej śmierci keratynocytów, w którym pośredniczy TLR2 (Kobiela et al. 2022 *JEV* przyjęta do druku).

Zbiór artykułów zamyka podsumowanie wyników wraz z wypunktowanymi kluczowymi odkryciami dokonanymi jako wyniki badań, oraz imponująca lista cytowanej literatury.

Uwagi do pracy:

Artykuły czyta się dobrze, styl i język pracy bogaty i złożony, co wymaga od czytelnika zaangażowania. Największą trudność sprawiło jednak przy czytaniu pracy studiowanie rycin. Artykuły są bogate w ryciny i stanowią ważny element wizualizacji wyników, stąd ich jakość i rozdzielczość jest istotna. Ryciny w artykułach załączonych do pracy doktorskiej straciły na jakości i wymagały posiłkowania się wersjami „preprint” dostępnymi w internecie.

Prof. n. med.

Ewa Łucja Stępień

Kierownik Zakładu

e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Kolejna uwaga ma również charakter edytorski, na wykresach brakuje jednostek, skala często jest nieujednolicona (wykresy NTA), prążki skali na fotografiach mikroskopowych są nieczytelne lub ich brak. Na przykład, w pracy trzeciej jest napisane, że komórki unieśmiertelnione keratynocytów N/TERT-1 w wysokim stężeniu Ca^{2+} tworzą *syncytium*. Ta obserwacja jest słabo udokumentowana, ponieważ na rycinie 3a (Fig. 3a) komórki w wyższym stężeniu Ca^{2+} wydają się być mniejsze, ale może ta różnica wynika z innego powiększenia na fotografii.

Instytut Fizyki

im. M. Smoluchowskiego



Zakład Fizyki Medycznej

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską p. mgr **Adriana Kobieli** oceniam pozytywnie, jest ona dziełem o wybitnej wartości naukowej i walorach poznawczych dla badań nad mechanizmami leżącymi u podstaw atopowego zapalenia skóry. Praca ta nie tylko rozszerza i ugruntowuje

tel. sekr. 12 664 46 40

tel. bezp. 12 664 47 62

ul. Łojasiewicza 11

30-348 Kraków

stan wiedzy na temat udziału mych *EVs*, ale także stanowi przykład rzetelnego badania naukowego. Doktorant stawia w swej pracy odważne hipotezy, które ugruntowuje w oparciu o doskonale dobrane piśmiennictwo.



Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymogi ustawowe (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.; Dz.U. z 2018 r. poz.1668 – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie dla p. **mgr Adriana Kobieli**, zgodnie z obowiązującymi przepisami ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”.

Wniosuję również do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej p. **mgr Adriana Kobieli**, zgodnie z Regulaminem wyróżniania rozpraw doktorskich przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczna, co uzasadniam w osobnym wniosku.

Prof. n. med.
Ewa Łucja Stępień
Kierownik Zakładu
e-mail: e.stepien@uj.edu.pl

Instytut Fizyki
im. M. Smoluchowskiego

ZFM
Zakład Fizyki Medycznej

tel. sekr. 12 664 46 40
tel. bezp. 12 664 47 62
ul. Łojasiewicza 11
30-348 Kraków