

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Juliana Swatlera: “Role of leukemic extracellular vesicles in differentiation and suppressive activity of regulatory T cells”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska to praca doświadczalna, której celem było określenie, jaką rolę w modulacji limfocytów T regulatorowych (Tregs) odgrywają białaczkowe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs). Autor wychodzi z założenia, że rozwój białaczki jest promowany w sposób pośredni poprzez te pęcherzyki. Miałyby one działać poprzez aktywację supresyjnych limfocytów Tregs. Weryfikacja tej hipotezy została przeprowadzona w modelu zwierzęcym (*in vitro* i *in vivo*) oraz materiale ludzkim *in vitro*. Autor zaobserwował, że w hodowlach *ex vivo* mysich i ludzkich Tregs z białaczkowymi pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi, białaczkowe EVs zwiększają aktywność supresyjną Tregs oraz poziom czynnika Foxp3. Ponadto EVs prowadziły do wzrostu fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT5 oraz zahamowania szlaku mTOR-S6 w limfocytach T promując w ten sposób aktywność limfocytów Tregs. W obecności EVs wykazano też podwyższoną ekspresję genów specyficznych dla Tregs. Zidentyfikowano dwie subpopulacje ludzkich efektorowych Tregs (eTreg), które ulegały ekspansji pod wpływem białaczkowych EVs - CD30+CCR8hiTNFR2hi eTreg1 oraz CD39+TIGIThi eTreg2. Za pomocą spektrometrii masowej przeanalizowano skład białkowy białaczkowych EVs i zidentyfikowano w nich białko 4-1BBL, które odpowiadało za wzrost ilości cząsteczek efektorowych CD30, TNFR2 i LAG-3 na powierzchni limfocytów Tregs. Na uwagę zasługuje też weryfikacja wpływu EVs na limfocyty Tregs w mysim modelu przewlekłej białaczki szpikowej. Autor porównał rozwój białaczki wywołanej przez komórki typu dzikiego oraz przez komórki pozbawione białka Rab27a, które wydzielają mniejszą ilość białaczkowych EVs. Brak ekspresji Rab27a przez komórki białaczkowe doprowadził do mniejszych nacieków komórek białaczkowych u myszy, a regulatorowe limfocyty T wyizolowane z tych zwierząt wykazywały mniejszą aktywność supresyjną w porównaniu do białaczki

indukowanej linią dziką. Głównym wnioskiem pracy jest potwierdzenie indukcyjnej funkcji EVs wydzielanych przez komórki białaczkowe na funkcje limfocytów Tregs.

Praca ma układ klasyczny. Rozpoczyna ją Wstęp, w którym Doktorant w sposób szczegółowy omawia pochodzenie i biologię limfocytów Tregs oraz ich znaczenie w nowotworzeniu. Następnie omówione zostało pochodzenie i funkcja białaczkowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, w szczególności ich rola w regulacji działania limfocytów Tregs i w patogenezie nowotworów. Uważam, że rozdział jest napisany przystępnym językiem z wykorzystaniem najnowszej literatury. Sposób prezentacji pozwala w pełni zrozumieć możliwe interakcje między limfocytami Tregs i EVs. Kolejnym rozdziałem są Materiały i Metody, w którym Doktorant przedstawił szczegółowo stosowaną metodologię. Dobór metod uważam za właściwy do zaproponowanych celów pracy. Użyte techniki są nowoczesne i pozwoliły odpowiedzieć na zadawane w pracy pytania badawcze. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz stosowanych metod, nowoczesne wieloparametryczne metody interpretacji wyników oraz weryfikacja hipotez badawczych w modelu *in vitro*. Kolejną częścią pracy są Wyniki. Pomimo dużej ilości rezultatów Autor przedstawił je w sposób czytelny rozpoczynając od analizy wpływu pęcherzyków na aktywność limfocytów Tregs, następnie opisał „morfologię” i sposoby działania pęcherzyków na aktywność limfocytów i na końcu przedstawił weryfikację hipotez *in vitro* w modelu mysim. Kolejnymi rozdziałami są Dyskusja i Wnioski, w których Autor w sposób przekonujący zinterpretował uzyskane wyniki. Użyta literatura podobnie jak we Wstępie jest adekwatna i w pełni popiera wnioski wysnute przez Doktoranta.

Czytałem pracę z bardzo dużą przyjemnością i wzbudziła we mnie naukową ciekawość, dlatego pozwoliłem sobie na kilka pytań:

1. Fundamentalnym pytaniem dotyczącym wyników pracy jest to dotyczące opinii Doktoranta na temat istniejących badań, w których autorzy wskazują na regulacyjną rolę limfocytów Tregs w nowotworach hematologicznych, np. praca zespołu Carreras J. (Blood. 2006;108:2957–2964). Wprawdzie są to wyniki dotyczące konkretnego typu chłoniaka, ale wskazują one, że Tregs mają potencjał do ograniczania progresji nowotworu, a nie jego promocji. Rozumiejąc różnice między komórkami chłoniaka i komórkami białaczek (zarówno typów limfoidalnych, jaki i mieloidalnych), chciałbym zapytać czy jest możliwość, że pęcherzyki EV byłyby w stanie modulować limfocyty Tregs, aby komórki te hamowały rozwój nowotworu? Jaki jest pogląd Autora?

2. Autor analizuje transkryptom limfocytów Tregs traktowanych EVs, ale także cargo niesione w samych pęcherzykach (Tabela 4.1). Czy można przyjąć, że przynajmniej część pokazywanych zmian transkryptomu limfocytów Tregs wynika nie ze zmian transkrypcji w samych Tregs, ale raczej z obecności w analizie materiału RNA przeniesionego przez pęcherzyki EV? Taka informacja miałaby potencjalnie duże znaczenie dla przyszłych terapeutycznych zastosowań cargo niesionego przez EVs.
3. Zastosowane w modelu zwierzęcym linie komórkowe różnią się ilością wydzielanych EV, co wpływa na przebieg choroby poprzez modulację limfocytów Tregs. Czy podobny efekt różnicy dynamiki rozwoju białaczki byłby notowany w przypadku użycia jako modelu zwierząt pozbawionych limfocytów Tregs (np. zwierząt NIHIII lub SCID lub knockoutów rag-negative common-gamma-chain-negative, tj. pozbawionych układu odpornościowego)? Taka kontrola odpowiedziałaby definitywnie na pytanie czy *in vivo* limfocyty Tregs są jedynym modulatorem wzrostu komórek białaczkowych poprzez EV. Czy w literaturze są prace z takimi kontrolami eksperymentu?
4. Użycie EV z linii białaczkowych jest pasjonujące dla przyszłych terapii, ale niewątpliwie istotna jest odpowiedź na pytanie czy i w jakim stopniu podobna regulacja istnieje w warunkach fizjologicznych? Czy u zdrowego człowieka/zwierzęcia indukcja tolerancji immunologicznej również może się odbywać poprzez aktywację limfocytów Tregs pęcherzykami EV? Wprawdzie Autor podaje kilka pozycji literatury opisującej elementy tego zjawiska, ale byłbym niezwykle ciekawy jak jest to opisywane w szerokiej literaturze.

Konkludując, uważam pracę za bardzo pożyteczną i niosącą duży wkład do naszego rozumienia funkcjonowania układu odpornościowego w chorobach nowotworowych. Zastosowane metody i uzyskane wyniki pozwalają na dalszy rozwój tego pomysłu do badań klinicznych włącznie. Na uwagę zasługuje także szeroki wachlarz przeprowadzonych badań i zapewne bardzo duży wkład pracy Autora w przeprowadzenie tych eksperymentów.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2021 poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję o dopuszczenie mgr. Juliana Swatlera do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego o wyróżnienie pracy ze względu na jej wartości merytoryczne i warsztatowe. Na szczególną uwagę w pracy zasługuje rzeczowy sposób udowodnienia stawianych hipotez poprzez bardzo adekwatnie dobrane prace eksperymentalne. Dzięki rozbudowanemu warsztatowi laboratoryjnemu Doktorant udowodnił *in vitro* i *in vivo*, iż istnieje istotny wpływ pęcherzyków EV na aktywność limfocytów Tregs. Na uwagę zasługuje publikacja wyników pracy w prestiżowym piśmie z Listy Filadelfijskiej.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Piotr Trzonkowski
prof. dr hab. med. Piotr Trzonkowski



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Juliana Swatlera
pt. „Role of leukemic extracellular vesicles in differentiation and suppressive activity of regulatory T cells”

Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Juliana Swatlera wykonana została pod kierunkiem promotora głównego - Pani dr hab. Katarzyny Piwockiej, prof. Instytutu Nenckiego, oraz promotora pomocniczego - dr Ewy Kozłowskiej, z wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Projekt doktorski realizowany był przy wsparciu finansowym pochodzącym z kilku grantów finansowanych przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej oraz Narodowe Centrum Nauki, w tym przez grant PRELUDIUM, którego kierownikiem był Doktorant. W wyniku realizacji projektu powstały trzy oryginalne publikacje naukowe w recenzowanych czasopiśmie takich jak *European Journal of Immunology*, *Current Protocols in Immunology*, *Blood Advances* oraz jedna praca przeglądowa w czasopiśmie *Cancers*.

Temat pracy doktorskiej dotyczy zagadnień związanych z patomechanizmem rozrostów hematologicznych wywodzących się z komórek linii mieloidalnej, takich jak przewlekła i ostra białaczka szpikowa. Jednym z istotnych elementów sprzyjających rozwojowi białaczek szpikowych jest immunosupresja, która związana jest ze zwiększoną ilością i aktywnością regulatorowych limfocytów T. Celem niniejszej pracy było zbadanie roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych produkowanych przez komórki białaczkowe w modulacji regulatorowych limfocytów T. Doktorant zastosował w swojej pracy kilka modeli *ex vivo*, w których zbadał wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na limfocyty regulatorowe, w dwóch układach: mysim i ludzkim. Zbadane zostały zarówno pęcherzyki zewnątrzkomórkowe produkowane przez linie komórkowe przewlekłej i ostrej białaczki szpikowej, jak i pęcherzyki izolowane z surowicy chorych na białaczki szpikowe. Doktorant wykonał również badania w modelu mysim. Hipoteza badawcza jest jasno sformułowana. Postawiony cel naukowy, zastosowane w pracy metody i modele badawcze pozwalają na lepsze zrozumienie patomechanizmu białaczek szpikowych, a więc spełniają wymóg stawiany pracy doktorskiej. Rozprawa napisana została w języku angielskim. Pracę czyta się dobrze, znalazłam jedynie drobne i nieliczne literówki bądź pominięcia słów, które nie wpłynęły na ogólny, bardzo dobry odbiór pracy. Praca obejmuje 176 stron i zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały takie jak wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, wnioski, spis literatury. Poniżej odniosę się do poszczególnych rozdziałów.



Zakład Immunologii
Department of Immunology

Wstęp

Wstęp do pracy w sposób spójny i logiczny wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej. W oparciu o bardzo aktualną literaturę doktorant opisał aktualny stan wiedzy dotyczący zagadnień związanych z tematem pracy, takich jak: patomechanizm i leczenie białaczek szpikowych, mechanizmy ucieczki spod nadzoru immunologicznego w białaczkach szpikowych, limfocyty regulatorowe i ich rola w nowotworach litych i białaczkach szpikowych, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (charakterystyka, metody izolacji i rola w nowotworach). Rolę limfocytów regulatorowych w białaczkach szpikowych Doktorant opisuje na stronach 28-30. Na podstawie przytoczonych publikacji, Doktorant opisuje, że deplecja limfocytów regulatorowych wydłuża przeżycie myszy, zarówno w modelach ostrej jak i przewlekłej białaczki szpikowej. Brakuje jednak informacji, na jakim etapie rozwoju białaczki usuwane są limfocyty regulatorowe? Czy usunięcie limfocytów regulatorowych u myszy z rozwiniętą białaczką powoduje regresję choroby? Ma to istotne znaczenie z punktu widzenia celowania w limfocyty regulatorowe w terapii białaczek.

Materiały i Metody

W rozdziale *Materiały i metody* doktorant szczegółowo opisuje linie komórkowe, modele in vitro oraz in vivo, układy eksperymentalne, materiał kliniczny i techniki, jakich używał w pracy. Na podkreślenie zasługuje różnorodność technik badawczych użytych w pracy. W tym rozdziale zabrakło kilku informacji.

W części opisującej modyfikacje genetyczne CRISPR-Cas9 linii K562 oraz 32D Doktorant nie podaje informacji jaki plazmid użyty został do nukleofekcji. Warunki nukleofekcji też nie zostały szczegółowo opisane.

W celu izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z medium kondycjonowanego z nad komórek mysich i ludzkich Doktorant zastosował różne warunki wirowania (str. 45 i tabela 3.1). Z czego wynikały te różnice?

Do testów supresji używane były bardzo małe ilości limfocytów regulatorowych i konwencjonalnych. Jaka ilość konwencjonalnych limfocytów T analizowana była w celu oceny frakcji komórek proliferujących?

Wyniki

Rozdział ten w logiczny i usystematyzowany sposób prezentuje uzyskane w pracy wyniki, które pozwalają na zweryfikowanie stawianych hipotez i stanowią znaczący wkład i uzupełnienie istniejącej wiedzy naukowej. Doktorant wykazał, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe produkowane przez komórki białaczkowe zwiększają poziom czynnika Foxp3 i aktywność supresyjną regulatorowych limfocytów T. Za pomocą spektralnej cytometrii



Zakład Immunologii
Department of Immunology

przeptywowej Doktorant zidentyfikował i scharakteryzował dwie subpopulacje ludzkich efektorowych limfocytów regulatorowych, które pojawiały się pod wpływem białaczkowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Ponadto, za pomocą spektrometrii mas, Doktorant zidentyfikował białka obecne w białaczkowych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, w tym ligand receptora z rodziny TNF - białko 4-1BBL. W ostatniej części Doktorant zaprezentował wyniki uzyskane w mysim modelu przewlekłej białaczki szpikowej, za pomocą którego potwierdził istotną rolę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w modulacji limfocytów regulatorowych oraz w progresji białaczki. Do tego rozdziału mam kilka pytań i komentarzy.

Na rycinie 4.3 zaprezentowanej na str. 83 pokazano, że w szpiku i śledzionach myszy z przewlekłą białaczką szpikową jest większy odsetek limfocytów regulatorowych grasiczych (Helios+ Tregs). Czy Doktorant ocenił całkowity odsetek limfocytów regulatorowych w obrębie limfocytów CD4-dodatnich? Indukowane limfocyty regulatorowe też zwiększają się wraz z progresją białaczek. Czy ten efekt był obserwowany w badanym modelu?

Białko 4-1BBL zidentyfikowane zostało jako istotny czynnik obecny w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ludzkie komórki białaczkowe i wpływający na modulację limfocytów regulatorowych. Badania proteomiczne pęcherzyków wykazały jednak obecność bardzo wielu białek (ponad 2000). Na jakiej podstawie do dalszych badań wybrane zostało białko 4-1BBL? Czy inne też były testowane? Czy białko to zostało również zidentyfikowane w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki mysie?

Bardzo wartościowe są też wyniki uzyskane w modelu *in vivo*, opisane w podrozdziale 4.3. Zauważyłam jednak pewne niejasności. Na str. 135, w podsumowaniu podrozdziału 4.3.4., Doktorant wnioskuje: "Altogether, *in vivo* experiments in a mouse model of CML-like disease have confirmed crucial role of Treg cells in disease development". To stwierdzenie nie jest poparte wynikami zaprezentowanymi w pracy. Wpływ regulatorowych limfocytów T na rozwój /progresję białaczki zbadany został później (Rycina. 4.44, str. 138) i tylko pośrednio. Jeśli ten wniosek został sformułowany w oparciu o literaturę, powinna ona być w tym miejscu zacytowana.

Znalazłam też drobne błędy. W opisach do rycin 4.21 i 4.24 jest informacja, że „-log₁₀ adj pvalue <0,05”, a raczej to wartość $p < 0,05$, a -log₁₀ adj pvalue >1,3.

Mam również dwa pytania do analiz statystycznych. Dlaczego w niektórych wypadkach do porównania więcej niż dwóch grup Doktorant używa testu t i podaje nieskorygowane wartości p (np. 4.5 A i C (prawe panele), 4.10 B, 4.11 A , 4.33 B), a w innych jednoczynnikowej analizie



Zakład Immunologii
Department of Immunology

wariancji z korektą wartości p (np. 4.38 B, 4.39, 4.40B)? Drugie pytanie dotyczy analizy przedstawionej na rycinie 4.7 B. Czy na pewno zastosowanie testu t pozwala wnioskować, że wzrost ekspresji FoxP3 jest bardziej nasilony po dodaniu pęcherzyków produkowanych przez komórki białaczkowe?

Dyskusja i Wnioski:

Na podstawie przedstawionych wyników sformułowane zostały główne wnioski a w rozdziale *Dyskusja* Doktorant wnikliwie i systematycznie odniósł się do istniejącej literatury, wykazując się szeroką wiedzą w temacie. Wnioski, zakres i jakość zaprezentowanych wyników wskazują, że Doktorant przedstawił oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i tym samym spełnił ustawowy warunek stawiany pracom doktorskim. Zgadzam się z większością wniosków, które Doktorant wyciągnął na podstawie wyników uzyskanych w pracy.

Chciałabym jednak poruszyć dwie kwestie, ważne z punktu widzenia terapii białaczek szpikowych i celowania w szlaki związane z wydzielaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bądź w limfocyty regulatorowe.

Po pierwsze, czy na tym etapie badań Doktorant jest w stanie przypuszczać, która z tych strategii jest bardziej prawdopodobna w białaczkach szpikowych? W modelu *in vivo* Doktorant wykazał, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe produkowane przez komórki białaczkowe sprzyjają progresji białaczki i nasilają supresyjny fenotyp limfocytów regulatorowych. Na podstawie obecnych wyników nie można jednak w jednoznaczny sposób wnioskować, czy obserwowany efekt zależy od limfocytów regulatorowych czy też wpływu pęcherzyków na inne elementy mikrośrodowiska, np. limfocyty T konwencjonalne.

Doktorant w swoich badaniach wyodrębnił i bardzo szczegółowo scharakteryzował dwie główne subpopulacje limfocytów regulatorowych, jakie powstają w wyniku inkubacji z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi pochodzącymi z ludzkich komórek białaczkowych. Czy taki fenotyp limfocytów regulatorowych został wcześniej zidentyfikowany u chorych na białaczki? Biorąc pod uwagę dość ograniczone dane literaturowe, warto by było potwierdzić opisany fenotyp w materiale pierwotnym. Ponadto, Doktorant ocenił również fenotyp limfocytów regulatorowych w modelu *mysim* białaczki szpikowej (ryciny 4.40, 4.41). Niektóre markery, jak np. CCR4, CCR8, TIGIT, nie zostały jednak pokazane w pracy. Czy Doktorant sprawdzał obecność tych markerów? Czy w obecnym modelu *mysim* byłaby możliwość użycia jakiegoś markera do deplecji limfocytów regulatorowych?



Wniosek końcowy

Na koniec chciałabym podkreślić, że pomimo moich uwag i pytań, jakie zadałam w recenzji, uważam, że wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej są bardzo ciekawe i mają duże znaczenie w zrozumieniu interakcji pomiędzy komórkami białaczkowymi a regulatorowymi limfocytami T. Postawiona hipoteza badawcza, jakość przedstawionych wyników i wnikliwie przedyskutowanie ich w odniesieniu do literatury świadczą o dużej samodzielności naukowej Doktoranta. Gratuluję Doktorantowi i paniom Promotor ciekawej koncepcji badań, dociekliwości i szerokiego podejścia do zbadania roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w modulowaniu regulatorowych limfocytów T. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Ze względu na jakość naukową uzyskanych wyników, które udało się opublikować w trzech pracach oryginalnych i jednej pracy przeglądowej w renomowanych czasopiśmie naukowych, wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Małgorzata Firczuk

dr hab. n med. Małgorzata Firczuk

Warszawa, 1/03/2022



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Prof. dr hab. Ewa Zuba-Surma
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 8 marca 2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Juliana Swatlera

**pt. „Role of leukemic extracellular vesicles in differentiation and suppressive activity
of regulatory T cells”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Piwockiej
przy udziale promotora pomocniczego dr Ewy Kozłowskiej
w Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego
Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (z ang. *extracellular vesicles*; *EVs*) wydzielane przez komórki, w tym zwierzęce i ludzkie różnego pochodzenia tkankowego, stanowią w ostatnich latach istotny przedmiot badań wielu zespołów na świecie, jako ważne mediatory komunikacji międzykomórkowej. Jednym z ważnych obszarów badań EVs oraz ich znaczenia w regulacji procesów biologicznych stanowią badania EVs pochodzących z komórek nowotworowych oraz ich udziału w regulacji funkcji innych komórek, w tym komórek immunokompetentnych.

Praca doktorska Pana mgr Juliana Swatlera w pełni wpisuje się w ten ważny obszar badawczy, koncentrując się na ocenie wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki nowotworowe przewlekłej i ostrej białaczki szpikowej (w skrócie odpowiednio: CML oraz AML) na fenotyp oraz potencjał funkcjonalny różnych populacji limfocytarnych, w tym w szczególności limfocytów T regulatorowych (tzw. komórek Tregs), co Doktorant badał zarówno w modelu mysim, jak i ludzkim w warunkach *in vitro*, jak również w mysim modelu *in vivo*.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została przygotowana w formie książkowej, w języku angielskim i liczy 175 stron. Rozprawa zachowuje układ typowy dla rozpraw doktorskich. Praca rozpoczyna się od szczegółowego spisu skrótów używanych w rozprawie (*Abbreviations*), po którym następują dwustronicowe streszczenie (*Abstract*) pracy w języku angielskim oraz *Streszczenie* w języku polskim, a także *Spisu treści*. Następnie w pracy umieszczono rozdział *Introduction*, będący merytorycznym wstępem do podejmowanych w rozprawie doktorskiej aspektów badawczych. Rozdział ten liczy 26 stron i został podzielony na 3 główne podrozdziały, zaopatrzone w 6 rycin ilustrujących prezentowane treści wprowadzające. W kolejnym, jednostronicowym rozdziale zatytułowanym *Aims* Doktorant sformułował najważniejsze cele swojej rozprawy doktorskiej. Kolejny obszerny, 40-stronicowy rozdział zatytułowany *Materials and Methods* obejmuje opis materiału biologicznego oraz procedur eksperymentalnych zastosowanych w pracy. Rozdział został zaopatrzony w 20 rycin oraz 10 tabel odnoszących się do przeprowadzonych procedur doświadczalnych oraz odczynników wykorzystanych w badaniach. Rozdział obejmujący wyniki badań uzyskanych przez Doktoranta (rozdział *Results*) liczy 60 stron, na których umieszczono opis wyników zaopatrzonego w 44 złożone, często wielopanelowe ryciny oraz 1 tabelę. Kolejno w pracy umieszczono 16-o stronicowy rozdział *Discussion*, obejmujący dyskusję przedstawionych wcześniej wyników na tle dotychczasowych doniesień naukowych, po której następuje 2-stronicowy rozdział podsumowujący najważniejszy wyniki badań przeprowadzonych przez Doktoranta oraz prezentujący konkluzje pracy (*Summary and Conclusions*). Rozdział ten został zaopatrzony w dodatkową rycinę. Na końcu rozprawy umieszczono spis piśmiennictwa (rozdział *Literature*) oraz spis publikacji, które powstały dzięki realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia w pełni wymogi formalne stawiane rozprawie doktorskiej.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Pod względem edytorskim praca doktorska jest przygotowana bardzo starannie. Rozprawa została przygotowana w estetycznej formie książkowej. Jest napisana bardzo poprawnym, rzeczowym językiem angielskim, a w czasie jej czytania zwracają uwagę jedynie nieliczne, drobne błędy literowe i interpunkcyjne. Wspomniane drobne błędy edytorskie nie umniejszają jednak w żaden sposób wysokiej jakości rozprawy. Na podkreślenie zasługuje także graficzna strona pracy, przedstawiająca niezwykle dokładnie i starannie (wręcz pieczołowicie) wykonane wielopanelowe ryciny. Dzięki w/w pracę czyta się z dużą przyjemnością, jasno podążając za tokiem prezentacji danych przez Doktoranta. Stronę edytorską pracy oceniam bardzo wysoko.

Ocena merytoryczna

Umieszczone na początku rozprawy Streszczenie pracy, przygotowane zarówno w języku angielskim, jak i polskim, zostało przygotowane bardzo informatywnie i w sposób wyczerpujący przedstawia zakres rozprawy doktorskiej.

W rozdziale Introduction stanowiącym wstęp teoretyczny do rozprawy, Doktorant przedstawił dobrze dobrany zestaw informacji, dobrze wprowadzający czytelnika w badania przeprowadzone w pracy, w tym umożliwia zrozumienie celów oraz znaczenia badań podejmowanych w rozprawie doktorskiej.

We wstępie do pracy, podzielonym na trzy zasadnicze podrozdziały, Doktorant w sposób wyczerpujący omówił: (1) zagadnienia dotyczące patogenezy przewlekłej i ostrej białaczki szpikowej (CML/ AML) oraz funkcjonowania komórek układu immunologicznego w tych chorobach, (2) aspekty związane z pochodzeniem oraz właściwościami biologicznymi komórek Tregs, w tym ich roli w przebiegu AML/AML, oraz (3) zagadnienia związane z charakterystyką oraz znaczeniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs), w tym jako modulatorów funkcji komórek T oraz w przebiegu białaczek.

W pierwszej części rozdziału *Introduction* Doktorant w sposób wnikliwy i dobrze zilustrowany przedstawił etiologię rozwoju ostrej i przewlekłej białaczki szpikowej oraz udział w tych procesach poszczególnych elementów układu immunologicznego, w tym populacji limfocytarnych, których efektywność immunologiczna zmienia się w przebiegu choroby nowotworowej.

W kolejnej części Doktorant omawia obszernie właściwości komórek Tregs oraz ich udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej. W sposób bardzo informatywny omawia także aspekty związane z ich pochodzeniem oraz charakterystyką fenotypową, w sposób przejrzysty przedstawiając różnorodność populacyjną oraz funkcjonalną tych komórek. W tym kontekście wskazuje także na szereg markerów identyfikujących różne subpopulacje komórek Tregs, w tym kluczowe markery identyfikacyjne, które będą następnie wykorzystywane w pracy badawczej Doktoranta, w tym m.in. na ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3 oraz antygenu CD25 stanowiącego składową ważnego funkcjonalnie receptora dla IL-2. Wszystkie te informacje w sposób przejrzysty i uporządkowany rzucają światło na zróżnicowany układ populacji limfocytarnych, w tym heterogenność subpopulacji komórek Tregs, co ma bardzo istotne znaczenie dla dalszej interpretacji wyników przedstawionych przez Doktoranta. W tej części Doktorant przedstawia także stan wiedzy odnośnie immunosupresyjnej roli limfocytów Tregs w chorobach nowotworowych, w tym także w przebiegu CML/AML. Uważam, że ta część Wstępu w szczególności zasługuje na podkreślenie i mogłaby stać się podstawą ważnej, kompleksowej pracy przeglądowej w tej tematyce.

Ostatnią część wstępu Doktorant poświęcił omówieniu zagadnień związanych z charakterystyką oraz aktywnością biologiczną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs). Obok standardowych informacji dotyczących charakterystyki EVs, metod ich pozyskiwania i oceny fenotypowej, Doktorant przedstawił także istotne aspekty roli EVs pochodzących z różnych komórek, w tym komórek nowotworowych, w regulacji anty-nowotworowej odpowiedzi immunologicznej, w tym ich wpływu na funkcje komórek Tregs, które są zasadniczym obiektem badań niniejszej rozprawy Doktorskiej. Doktorant dokonał także wnikliwej analizy dotychczasowego stanu wiedzy odnośnie immunomodulacyjnego działania EVs w przebiegu chorób nowotworowych, w tym także w CML/ AML, co jest istotne w kontekście dalszych jego badań. Uważam tę część wstępu również za bardzo dobrze opracowaną, dobrze wprowadzającą czytelnika w aspekty eksperymentalne pracy.

Podsumowując, rozdział *Introduction* oceniam bardzo wysoko, jako przemyślaną i bardzo dobrze skompilowaną oraz zilustrowaną część informacji, dobrze wprowadzających do prac eksperymentalnych podejmowanych przez Doktoranta. Na podkreślenie zasługuje także informatywny i staranny materiał graficzny w postaci sześciu (6) rycin obrazujących poruszane zagadnienia.

Do tej części mam jedynie kilka *de facto* drobnych uwag i pytań podanych poniżej:

1. Na ryc. 1.6 na schemacie przedstawiającym pęcherzyk, wśród markerów obecnych na EVs przedstawiono m.in. obecność antygenów MHC klasy II, typowych dla komórek APC, co może sugerować, że jest to uniwersalny marker obecny na EVs pochodzących ze wszystkich typów komórek zwierzęcych/ ludzkich.
2. W części dotyczącej roli EVs brakuje mi nieco krótkiej informacji dotyczącej wpływu EVs pochodzących z komórek prawidłowych (np. z niszowych komórek stromalnych i innych) na komórki rezydujące w prawidłowej niszy szpikowej, w tym komórki immunokompetentne i ich progenitory. Byłoby to istotnym punktem odniesienia w jaki sposób zmienia się rola komunikacji za pomocą EVs w niszy szpikowej w trakcie rozwoju białaczki.
3. Na początku rozdziału 1.3.2. Doktorant przywołuje - jako pierwsze doniesienie odnośnie EVs, badania na retykulocytami z lat 80-tych XX wieku. Tymczasem za pierwsze doniesienie wskazujące na istnienie EVs, uznaje się co ciekawe jeszcze wcześniejszą pracę (z 1967r.) Petera Wolfa opublikowaną w *British Journal of Haematology*, opisującą mikropęcherzyki płytkowe (z ang. *microparticles*, MPs), powstające na skutek aktywacji płytek krwi, które zostały określone w tej pracy, jako „platelet dust” i zostały wyizolowane na drodze ultrawirowania.

Cele Pracy (Aims) zostały sformułowane jasno oraz są przedstawione i dobrze uzasadnione w kontekście wiedzy omówionej we wprowadzeniu.

W rozdziale *Materials and Methods* umieszczono opis bogatego materiału biologicznego stosowanego w badaniach oraz opis procedur eksperymentalnych.

Materiał badawczy stanowiły m.in. mysie oraz ludzkie komórki białaczkowe, w tym komercyjne linie ludzkie reprezentujące modele CML (linia K562) oraz AML (linia MOLM-14). Doktorant stosował także różnie modyfikowane genetycznie mysie komórki progenitorowe mieloidalne, pochodzące z linii komórek 32D. Należy podkreślić, że niektóre z tych linii, w tym z ekspresją znacznika GFP oraz dodatkowym wyłączeniem (KO) genu Rab27, zostały przygotowane w trakcie prowadzenia niniejszych badań Doktoranta, w tym z zastosowaniem techniki CRISP/Cas9. Co warto podkreślić Doktorant przytoczył także krótko istotną charakterystykę wykorzystywanych linii, w tym odnośnie typów mutacji oraz modyfikacji genetycznych istotnych dla powstania fenotypu białaczkowego. Ta część jest napisana jasno i informatywnie. Na podkreślenie zasługuje bogaty materiał badawczy/modelowy, zastosowany w pracy.

W części opisującej metody eksperymentalne, Doktorant w sposób dokładny i wyczerpujący opisał procedury zastosowane w jego pracy doświadczalnej, w tym dotyczące badań na materiale komórkowym oraz z wykorzystaniem EVs w warunkach *in vitro* oraz badania w warunkach *in vivo* w mysim modelu zwierzęcym. Wszystkie procedury są opisane dokładnie oraz zostały uzupełnione schematami i tabelami, które ułatwiają czytelnikowi prześledzenie kroków proceduralnych, a także pozwalają na odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant zastosował w swoich badaniach liczne unikatowe metody i techniki, w tym dedykowane analizie nanocząstek biologicznych oraz fenotypu oraz funkcji komórek immunokompetentnych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, w tym zaawansowane techniki wieloparametrycznej akwizycji i analizy w cytometrii przepływowej.

Do moich uwag i pytań do tej części pracy należą poniższe:

1. Z metodyki wynika, że do hodowli komórek 32D używano medium kondycjonowanego z nad komórek linii WEHI produkujących IL-3. Tu mam pytanie, czy do hodowli komórek 32D nie można było zastosować pożywek zdefiniowanych, w tym suplementowanych IL-3? Byłby to układ bardziej zdefiniowany. Jak przygotowywano w/w pożywki kondycjonowane do hodowli komórek 32D, aby mieć pewność, że nie zawierają one EVs z komórek WEHI (zwłaszcza, że jest to linia chłoniaka B-komórkowego)? Czy oprócz filtrowania przez filtr 0.22um stosowano jeszcze jakąś metodę deplekcji EVs, w tym frakcji egzosomalnej?

2. W przypadku oceny ilości/ stężenia EVs w preparatach mysich Doktorant stosował metodę Bradforda oceniającą stężenie białka, a w przypadku oceny stężenia EVs w próbkach ludzkich stosował technikę NTA wskazującą na liczbę cząstek w danej objętości, co jest preferowaną dziś metodą oceny stężenia EVs. Z czego wynikała ta różnica w doborze w/w metod pomiaru w próbkach pochodzenia ludzkiego i mysiego?
3. Moją wątpliwość budzi metoda znakowania frakcji EVs zawierającej zarówno ektosomy, jak i egzosomy, z zastosowaniem barwnika CFSE, który to znacznik bazuje na obecności i aktywności cytoplazmatycznych esteraz w barwionym obiekcie. W mojej ocenie, ze względu na biogenezę egzosomów, nie możemy wykluczyć, że ta frakcja EVs będzie słabiej wybarwiona lub nawet pozbawiona sygnału fluorescencyjnego. Proszę Doktoranta o komentarz w jaki sposób dobierał barwniki do znakowania frakcji EVs.
4. Na rycinie 3.4 odnoszącej się do analizy wiązania/ pochłaniania EVs przez frakcję izolowanych tymocytów, na jednym z dot-plotów (plot SSC vs CD3, panel górny) przedstawiona jest prominentna populacja komórek CD3- (ok. 30%). Moją ciekawość budzi to, jakie komórki może reprezentować ta frakcja (np. biorąc pod uwagę procedury izolacyjne)? Dalsza analiza była już bowiem prowadzona na komórkach CD3+ i subpopulacjach tej frakcji, odnoszących się do limfocytów T.
5. W rozdziale 3.4.2.1 Doktorant wskazuje jako źródło pochodzenia ludzkich komórek pierwotnych tzw. „buffy coats” pozyskiwane z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa w Warszawie. Prosiłabym Doktoranta o doprecyzowanie, czy ludzkie komórki PBMCs izolowane były rzeczywiście z „frakcji/ podfrakcji poizolacyjnych” krwi (na co wskazuje to określenie „buffy coats”), czy też z pełnej krwi obwodowej dawców pozyskanej z RCK, z której Doktorant sam izolował dalej PBMCs i kolejno sortował już frakcje komórek T.
6. W przypadku eksperymentów opisanych w rozdziale 3.6, byłoby wskazane umieszczenie spisu/ tabeli obejmującej kontrole, które były wykorzystane w poszczególnych testach. Pomimo schematów i opisu w tekście, nie zawsze jest to jasne jaka kontrola/e była zastosowana (np. czy były uwzględniane komórki Tregs nietraktowane EVs w teście 3.6.1?)
7. W rozdziale 3.6. opisano także dawkowanie różnych frakcji EVs w celu oceny ich wpływu na komórki T. Z czego wynikało zastosowanie różnych dawek EVs pochodzących z różnych komórek. W jaki sposób Doktorant dobierał podane dawki? Czy jakaś optymalizacja dawek była wcześniej przeprowadzona?

Wyniki badań uzyskane przez Doktoranta zostały zaprezentowane w rozdziale *Results*, podzielonym na 3 obszerne podrozdziały. Doktorant w sposób logiczny i uporządkowany przedstawił główne osiągnięcia swoich badań, które zostały odpowiednio zilustrowane dobrze opisanymi, wielopanelowymi rycinami i tabelami.

W pierwszej części (podrozdział 4.1) Doktorant przedstawił – stosując komórki pochodzenia mysiego w warunkach *in vitro* - wyniki dotyczące wpływu EVs wydzielanych przez mysie komórki białaczkowe (CML) 32D z mutacją BCR-ABL+ na różne populacje limfocytów mysich, w tym komórek Treg oraz efektorowych komórek T (CD4+ i CD8+). W tej części badań Doktorant scharakteryzował pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez mysie linie komórek 32D, stosując kryteria rekomendowane przez światowe Towarzystwo Badan Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych (ISEV), stosując metody przyjęte obecnie w badaniach tych nanocząstek. Potwierdził ich tożsamość co jest istotne dla dalszych wyników jego badań.

W dalszej części wykazał także, że EVs pochodzące z mysich komórek CML (CML-EVs) są wiązane na powierzchni komórek T, co wskazuje na możliwe potencjalne oddziaływanie CML-EVs na te komórki, a co zostało także potwierdzone w dalszej części pracy. W kolejnych podrozdziałach Doktorant wykazał bowiem, że CML-EVs zwiększają aktywność immunosupresyjną mysich komórek Treg jak również zwiększają ekspresję czynnika Foxp3 - odpowiedzialnego za aktywację funkcji suspensyjnych Tregs, jak również hamują proliferację efektorowych limfocytów T CD4+ oraz CD8+. Wszystkie te efekty mediowane przez CML-EVs mogą wpływać na obniżenie antynowotworowej odpowiedzi immunologicznej w rozwoju białaczki.

W kolejnej części pracy (podrozdział 4.2), wpływ EVs wydzielanych przez komórki białaczkowe na komórki T został także w sposób przekonujący potwierdzony przez Doktoranta w badaniach na komórkach pochodzenia ludzkiego, z zastosowaniem wielokierunkowych analiz fenotypowych i funkcjonalnych w warunkach *in vitro*. W tej części Doktorant wykazał m.in., że CML-EVs zwiększają ekspresję ludzkiego czynnika Foxp3 także w ludzkich komórkach T i aktywują je w kierunku fenotypu regulatorowego (w tzw. komórki iTregs), jak również zwiększają aktywność immunosupresyjną samych komórek Tregs oraz obniżają aktywność zapalną efektorowych, nieregulatorowych limfocytów T. Poszukując mechanizmów działania CML-EVs na ludzkie komórki T, Doktorant ocenił skład białkowy tych EVs oraz wykazał, że modulują one m.in. aktywność szlaku mTOR prowadząc do ekspresji czynnika Foxp3. Dodatkowo Doktorant wykazał, że wpływają one globalnie na transkryptom komórek Tregs, w tym na ekspresję takich genów jak TFRC, IKZF2, czy też CCR4, co może sugerować działanie czynników regulujących ekspresję genów przenoszonych przez CML-EVs do ludzkich komórek T. Co ciekawe Doktorant wykazał także, że EVs z komórek białaczkowych wpływają w szczególności na aktywację dwóch subpopulacji efektorowych komórek Tregs, tj. tzw. frakcji eTreg1 oraz eTreg2, różniących się fenotypem antygenowym, co Doktorant

wykazał w zaawansowanych i świetnie wykonanych oraz przeanalizowanych eksperymentach z zastosowaniem wielokolorowej (23-kolorowej) cytometrii przepływowej.

W ostatniej części (podrozdział 4.3) Doktorant potwierdził także immunosupresyjne działanie białaczkowych EVs w modelu mysim w warunkach *in vivo*, wykorzystując jako źródło komórek białaczkowych linię komórek 32D, w tym modyfikowaną genetycznie z zastosowaniem zaawansowanej techniki edycji genów CRISPR.Cas9. Wykazał m.in., że mysie komórki białaczkowe linii 32D (BCR-ABL+) z wyłączonym genem Rab27a, co upośledza wydzielanie przez te komórki EVs przy zachowanej zdolności tych komórek do namnażania i klonogenności *in vivo*, wpływają m.in. na skład populacyjny komórek T CD3+, jak również komórek Tregs, przekierowując je - ale w sposób znacznie mniej istotny w porównaniu do komórek białaczkowych, które wydzielają EVs (tj. komórek z zachowaną ekspresją Rab27a) - w kierunku fenotypów immunosupresyjnych. Obserwacje te wskazują na rolę białaczkowych EVs w promowaniu aktywności immunosupresyjnej limfocytów T w czasie rozwoju tego nowotworu w warunkach *in vivo*.

Podsumowując, wyniki przedstawione przez Doktoranta oceniam bardzo wysoko. Wyniki są spójne, co do badanych efektów białaczkowych EVs na potencjał komórek T. Zostały one uzyskane w kilku modelach, z zastosowaniem najnowszych technik biologii komórkowej oraz molekularnej i w sposób przekonujący przedstawiają wpływ EVs wydzielanych przez komórki białaczkowe w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw temu nowotworowi, poprzez m.in. zwiększenie aktywności immunosupresyjnej komórek Tregs, jak również promowanie powstawania fenotypów/ subpopulacji komórek T o zwiększonej aktywności immunosupresyjnej. Zastosowane techniki oraz prezentacja wyników nie budzą wątpliwości. Na podkreślenie zasługują bardzo informowane, dobrze opisane ryciny przedstawiające uzyskane dane.

Do tej części mam jedyne kilka uwag i pytań:

1. Czy obok badań proteomicznych ludzkich CML-EVs, Doktorant prowadził jeszcze inne analizy składu molekularnego EVs wydzielanych przez mysie lub ludzkie komórki białaczkowe (w tym AML), w tym np. składu miRNAs lub mRNA, w celu identyfikacji mechanizmów potencjalnie zaangażowanych w ich działania na komórki T?
2. Czy Doktorant wykonał obok testów z zastosowaniem cytometrii przepływowej, jakieś dodatkowe badania potwierdzające internalizację EVs przez komórki T? Np. czy zbadano obecność wybranych cząsteczek przenoszonych przez białaczkowe EVs wewnątrz komórek T (np. miRNA, mRNA lub białek)? W tej chwili nie wiemy, czy efekty mediowane przez białaczkowe EVs wynikają raczej z ich oddziaływania powierzchniowego (np. wiązania się do pewnych receptorów i aktywacji ich szlaków), czy poprzez ich internalizację i działanie

- cząsteczek uwolnionych z EVs do cytoplazmy komórek T. Czy Doktorant mógłby to skomentować?
3. W podrozdziale 4.2.1 Doktorant wspomina (i pokazuje również na Ryc. 4.8, panel C), że ludzkie komórki linii AML wydzielają ok. 50% więcej EVs w porównaniu z linią CML. Moją ciekawość budzi to, czy jest to według Doktoranta fenomen przypadkowy, czy może potencjalnie wynikać z różnych właściwości tych dwóch typów białaczek.
 4. Kontynuując, co ciekawe na Ryc. 4.10 przedstawiono, że EVs z AML indukują wyższy odsetek tzw. komórek iTreg (CD25^{hi}/Foxp3⁺) z nieregulatorowych komórek T (CD4⁺/CD25⁻), w porównaniu do CML-EVs (odpowiednio, ok. 20% vs. 30%). Jestem ciekawa opinii Doktoranta, z czego może wynikać taka wyższa aktywność immunosupresyjna AML-EVs i czy ona może mieć ew. znaczenie w regulacji aktywności innych populacji komórek T, w tym komórek eTregs, co było badane dalej?
 5. W w/w kontekście, w podrozdziale 4.2.4, brakuje mi nieco danych odnośnie wpływu AML-EVs na komórki Tregs, gdzie bardzo przekonująco przedstawiono wpływ jedynie CML-EVs na te komórki.
 6. Na rycinie 4.3, panel B: Jaka populacja komórek jest przedstawiona na obu złożonych histogramach jako kontrola FMO dla komórek barwionych pochodzących z 3 różnych tkanek mysich?
 7. Na rycinie 4.5, panel A i C: Jak wyliczany był tzw. „Expansion index”?

W rozdziale *Discussion* autor krytycznie ocenia własne wyniki na tle innych danych literaturowych oraz wskazuje na potencjalne obszary, gdzie wyniki uzyskane w pracy doktorskiej mogłyby być wykorzystane w przyszłości. Dyskusja jest napisana bardzo starannie i wskazuje na znajomość tematu. Została podzielona również na podrozdziały, co ułatwia czytelnikowi odniesienie jej fragmentów do odpowiednich, wcześniejszych podrozdziałów opisujących uzyskane wyniki.

Rozprawę kończy krótki rozdział *Summary and Conclusions*, w którym Doktorant podsumował w punktach swoje główne osiągnięcia badawcze oraz konkluzje płynące z przeprowadzonych przez niego badań, które mogą mieć istotne znaczenia dla opracowania przyszłych terapii białaczki szpikowej, nacełowanych na oddziaływanie pomiędzy pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi wydzielanymi przez komórki białaczkowe, a komórkami T organizmu gospodarza.

Na zakończenie Doktorant przedstawił także swój dorobek publikacyjny będący efektem niniejszych badań, które przedstawił w swojej rozprawie. Należy podkreślić, że wynikiem przeprowadzonych badań są trzy (3) publikacje oryginalne w rozpoznawalnych czasopismach międzynarodowych (w tym jedna w recenzji) oraz jedna (1) praca przeglądowa.

Podsumowując, w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pana mgr Juliana Swatlera, autor podjął istotny badawczo oraz klinicznie nowy temat badawczy, dotyczący oceny wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) wydzielanych przez komórki białaczkowe (w tym CML oraz AML) na właściwości komórek immunokompetentnych, w tym w szczególności komórek T regulatorowych. Uzyskane wyniki w sposób dobrze udokumentowany wskazują na immunoregulacyjny udział białaczkowych EVs w promowaniu immunosupresyjnej aktywności m.in. komórek Tregs, co rzuca nowe światło na rolę pęcherzyków wydzielanych przez komórki nowotworowe w regulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza, sprzyjającej przeżywalności oraz dalszemu rozwojowi nowotworu. Badania Doktoranta wpisują się w najnowsze trendy polegające na coraz lepszym rozumieniu interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi (tu: białaczkowymi), a komórkami immunokompetentnymi gospodarza oraz na poszukiwaniu nowych podejść terapeutycznych w leczeniu nowotworów.

Uzyskane wyniki przedstawione w pracy stanowią bardzo istotny, nowatorski wkład Doktoranta w światowe badania w tym zakresie i mogą mieć w przyszłości istotne znaczenie aplikacyjne.

Rozprawę doktorską Pana mgr Juliana Swatlera oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym i edytorskim. Przedstawione w recenzji uwagi oraz pytania w żadnym stopniu nie wpływają na moją jak najbardziej pozytywną ocenę rozprawy.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr Juliana Swatlera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na dotychczasowy dorobek Doktoranta, zakres przeprowadzonych prac oraz jakość zaprezentowanych wyników, a także nowatorskie aspekty i wysoką wartość naukową rozprawy, wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.