



Kraków, 20 lipca 2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Laury Turows-Korgul
pt. Intercellular transfer of CD44 from bone marrow stroma to chronic myeloid leukemia cells as a driver of niche-mediated imatinib resistance

wykonanej w Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Piwockiej

**JAGIELLONIAN
UNIVERSITY
IN KRAKOW**

Faculty of Biochemistry,
Biophysics and
Biotechnology

Department of Cell
Biology

Prof. Jarosław Czyż

Postęp wiedzy na temat biologii nowotworów, który nastąpił w ciągu ostatnich dekad, doprowadził do zasadniczej zmiany sposobu postrzegania procesu rozwoju nowotworów. Współczesne badania coraz bardziej jednoznacznie pokazują, że proces ten jest wynikiem nie tylko kumulacji zmian genetycznych zachodzących w komórkach guza, ale też złożonych oddziaływań pomiędzy komórkami nowotworowymi a otaczającym je mikrośrodowiskiem. Mikrośrodowisko nowotworu nie stanowi biernego tła dla komórek nowotworowych, lecz uczestniczy w regulacji ich proliferacji, plastyczności fenotypowej oraz lekooporności. Szczególne znaczenie przypisuje się więc mediatorom międzykomórkowej wymiany informacji, które ułatwiają adaptację komórek do zmiennych warunków mikrośrodowiskowych sprzyjających progresji nowotworu. W przypadku nowotworów układu krwiotwórczego, zwłaszcza przewlekłej białaczki szpikowej (CML), rola mikrośrodowiska szpiku kostnego nabiera wyjątkowego znaczenia. Nisza szpikowa stanowi bowiem miejsce, w którym komórki białaczkowe znajdują warunki sprzyjające ewolucji klonalnej komórek macierzystych oraz rozwojowi oporności na chemioterapię. Dzieje się tak dzięki skoordynowanej wymianie informacji między komórkami nowotworowymi a ich podścieliskiem za pośrednictwem oddziaływań krynych i fizycznych, a także dzięki bezpośredniej międzykomórkowej wymianie mikrocząsteczek, makrocząsteczek i organelli.

Pomimo ogromnego postępu w leczeniu CML, jaki dokonał się po wprowadzeniu do powszechnej praktyki inhibitorów kinaz tyrozynowych i terapii celowanych, mechanizmy odpowiedzialne za nawroty białaczek po chemioterapii nadal pozostają jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej hematologii. Coraz więcej danych wskazuje, że istotnym elementem złożonej sieci oddziaływań między komórkami a ich niszami w białaczkach, są bezpośrednie połączenia międzykomórkowe określane jako nanotunele (nanotuby tunelujące; tunneling nanotubes, TNTs). Struktury te umożliwiają transfer nie tylko małych cząsteczek, lecz również białek i całych organelli, wpływając na właściwości biologiczne komórek-biorców. Jednocześnie ich ultrastruktura, mechanizmy powstawania oraz znaczenie biologiczne pozostają przedmiotem intensywnych badań i licznych kontrowersji. Tematyka rozprawy Pani mgr Laury Turows-Korgul wpisuje się w ten nurt badań, podejmując próbę wyjaśnienia ultrastrukturalnych aspektów funkcjonowania TNTs, jak znaczenia tych struktur w komunikacji pomiędzy komórkami podścieliska (zrębu szpiku kostnego) a komórkami CML. U jej podstaw leży hipoteza zakładająca, że międzykomórkowy transfer białka CD44 za pośrednictwem tych struktur leży u podstaw przebudowy fenotypu komórek białaczkowych, w tym rozwoju ich lekooporności. Wybór tej tematyki należy uznać za zasadny, gdyż podejmuje ona problem o wysokiej wartości poznawczej, wpisujący się w jeden z najbardziej perspektywicznych kierunków współczesnej biologii nowotworów.

Układ rozprawy jest przejrzysty i odpowiada klasycznemu schematowi eksperymentalnej pracy doktorskiej. Oprócz Streszczeń w języku polskim i angielskim (stanowiących syntetyczne podsumowania tła, celów pracy i uzyskanych wyników spuentowanych zestawieniem wniosków płynących z pracy) składają się na nią Wstęp, opis Celów pracy, Metod, Wyników, Dyskusja oraz Wnioski i Bibliografia, zawierająca pozycje, które uznać można za klasyczne, jak i nowsze prace dotyczące tematyki rozprawy. Objętościowo rozprawa jest dość obszerna, gdyż liczy 195 stron, zawiera 54 w większości złożone ryciny oraz kilka rozbudowanych tabel. Taka

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 6146

fax +48(12) 664 69 02

e-mail: jarek.czyz@uj.edu.pl

objętość uzasadniona jest jednak ilością uzyskanych danych. Napisana jest przyjemną w percepcji angielszczyzną a jej strona redakcyjna nie wzbudza większych zastrzeżeń. Praca przygotowana jest starannie, ryciny są czytelne i wyraźne, a kilka drobnych błędów redakcyjnych, które zauważyłem, nie wpłynęło na jednoznacznie pozytywny jego odbiór.

Wstęp rozprawy obejmuje trzy komplementarne sekcje poświęcone (i) biologii przewlekłej białaczki szpikowej, (ii) charakterystyce TNTs oraz (iii) biologii białka CD44. W pierwszej z nich Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący patogenezы CML, mechanizmów rozwoju oporności na leczenie, znaczenia niszy szpiku kostnego dla dobrostanu białaczkowych komórek macierzystych oraz roli bezpośrednich kontaktów międzykomórkowych. Następnie omawia ona budowę, mechanizmy powstawania i funkcje TNTs, wskazując jednocześnie na pewne kontrowersje dotyczące ich identyfikacji i znaczenia biologicznego. Trzecią część stanowi charakterystyka CD44 jako wielofunkcyjnego receptora uczestniczącego w adhezji komórkowej, przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz przekazywaniu sygnałów regulujących zachowanie komórek nowotworowych. Rozdział ten został napisany językiem swobodnym, precyzyjnym i łatwym w odbiorze. Jego walory poznawcze podnoszą trafnie dobrane ryciny, które stanowią integralny element wywodu a sam wywód logicznie też prowadzi do celów pracy. Zakres przedstawionego we Wstępie materiału oraz sposób wyeksponowania zagadnień kluczowych dla realizowanych badań potwierdza, że Kandydatka dysponuje ugruntowaną i pogłębioną wiedzą w zakresie tematyki rozprawy.

Punktem wyjścia badań stanowiących podstawę pracy była hipoteza zakładająca kluczową rolę bezpośredniego transferu białek pomiędzy komórkami podścieliska a komórkami białaczkowymi, w którym pośredniczą TNTs, w komunikacji międzykomórkowej w ekosystemach białaczkowych. Szczególną uwagę poświęcono białku CD44, koncentrując się na jego transferze z komórek podścieliska do komórek białaczkowych oraz na konsekwencjach tego procesu dla fenotypu komórek CML, w tym ich potencjału inwazyjnego, profilu metabolicznego i lekooporności. Jednak po pierwsze podjęto próbę rozwiązania jednego z podstawowych problemów metodologicznych w badaniach nad TNTs, jakim jest ich wiarygodna identyfikacja i charakterystyka ultrastrukturalna. Taka konstrukcja rozprawy świadczy o dobrze przemyślanej strategii badawczej nakierowanej na rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego.

O dobrze przemyślanej strategii badawczej świadczy również strona metodyczna pracy. Oprócz klasycznych hodowli komórkowych i modeli ko-hodowli Autorka wykorzystwała szeroki wachlarz nowoczesnych technik badawczych, obejmujący m.in. modyfikacje genetyczne komórek, cytometrię przepływową, mikroskopię konfokalną i FIB-SEM, analizy metabolizmu komórkowego, sekwencjonowanie RNA (RNA-seq), badania poziomów białek w poszczególnych frakcjach komórkowych oraz liczne testy funkcjonalne służące ocenie migracji komórek, ich inwazyjności, proliferacji, profilu metabolicznego, ferroptozy i odpowiedzi na leczenie. Jedyne nasuwające się zastrzeżenie dotyczy wykorzystania testu *MitoStress* do oceny proporcji między OXPHOS i glikolizą w komórkach. Wydaje się, że *ATP Rate Assay* byłby bardziej odpowiedni do tego typu analiz. Nie zmienia to faktu, że szerokie spektrum zastosowanych w pracy technik świadczy o bogatym warsztacie badawczym Doktorantki, jej biegłości w stosowaniu nowoczesnych metod biologii eksperymentalnej oraz umiejętności integrowania komplementarnych narzędzi badawczych. Podkreśla też interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań. Na tyle, na ile mogłem to ocenić, opis zastosowanych metod jest kompletny, szczegółowy i spełnia wymogi odtwarzalności badań, umożliwiając ich powtórzenie przez badacza dysponującego odpowiednim zapleczem aparaturowym i kompetencjami.

Rozdział opisujący wyniki został podzielony na dwa zasadnicze bloki tematyczne, które tworzą spójną i konsekwentnie rozwijaną „opowieść”. Pierwsza część poświęcona została ultrastrukturalnej analizie TNTs tworzonych przez komórki CML i

ich podścielisko. W warstwie metodycznej: dzięki skojarzonej wizualizacji struktur nanotubularnych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej i techniki FIB-SEM Autorka zyskała możliwość znacznie bardziej precyzyjnej niż dotychczas oceny parametrów strukturalnych i topograficznych tych struktur, co w mojej ocenie powinno stać się „złotym standardem” dla tego typu analiz. W warstwie merytorycznej: interpretując obrazy tych struktur wykazała ona potencjał techniki FIB-SEM w identyfikacji i analizach TNTs w oparciu o standardowo stosowane kryteria. Potwierdziła też, że część struktur przypominających TNTs może nie spełniać kryterium ciągłości przedziałów cytoplazmatycznych komórek połączonych tymi strukturami. Do tej kwestii odniosę się później. Druga część dotyczy biologicznej funkcji transferu CD44 z komórek podścieliska do komórek CML. Po pierwsze Autorka wykazała, że CD44 jest transportowane bezpośrednio między komórkami w sposób zależny od obecności TNTs. Analizując konsekwencje transferu CD44 zaobserwowała ona, że nowotworowe akceptory CD44 ulegają przeprogramowaniu transkrypcyjnemu obejmującemu geny związane z adhezją komórkową, przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej oraz migracją. Zmianom tym towarzyszy wzrost potencjału inwazyjnego i przeprogramowanie metaboliczne komórek CML. Jednocześnie wykazała ona zależny od osi ERK/AP-1/HIF-1 α wzrost ekspresji endogennego CD44 zarówno na poziomie mRNA, jak i białka oraz wzrost oporności komórek CML na chemioterapię. Osłabienie ochronnego działania mikrośrodowiska i wzrost skuteczności imatinibu po farmakologicznym zahamowaniu oddziaływania CD44 z hialuronianem wskazuje na potencjalne znaczenie terapeutyczne uzyskanych wyników. Generalnie projekt doświadczeń, ich wykonanie oraz opis wyników potwierdzają kluczowy wkład Doktorantki w przygotowanie przedłożonej do recenzji rozprawy. Co więcej pokazują one dobrze zarysowaną logikę eksperymentalną: Autorka zaczyna od badań metodologicznych, prowadzi narrację poprzez identyfikację mechanizmów leżących u podstaw międzykomórkowego transferu białka, aż do opisu funkcjonalnych konsekwencji tego procesu. Narracja jest płynna, a na uznanie zasługują krótkie podsumowania kończące poszczególne sekcje, które wprowadzają też czytelnika w wątki poruszane następnie w Dyskusji.

Istotna część Dyskusji poświęcona została problemom związanym z identyfikacją TNTs. Autorka omawia ograniczenia mikroskopii konfokalnej oraz punktuje przewagi obrazowania FIB-SEM w ocenie ultrastruktury tych połączeń. Jednocześnie poddaje ona krytycznej analizie wyniki dotyczące ultrastruktury TNTs formowanych między komórkami CML i podścieliska w świetle stosowanych obecnie kryteriów identyfikacji tych struktur. Wprawdzie na poziomie strukturalnym nie udało się jednoznacznie wykazać obecności otwartych mostków cytoplazmatycznych. Jednak na poziomie funkcjonalnym dane dotyczące międzykomórkowego transferu CD44 sugerują, że takie struktury są obecne w badanym modelu. Autorka podejmuje próbę wytłumaczenia tego dysonansu jako skutku możliwych artefaktów związanych z przygotowaniem preparatów lub istnienia alternatywnych mechanizmów transbłonowego transportu tego białka (np. trogocytozy). Tworzy to chyba najciekawszą ścieżkę kontynuacji przeprowadzonych w ramach rozprawy badań.

Z drugiej strony nie do końca przekonuje mnie nacisk położony w opisie wyników i w ich dyskusji na kryterium (braku) adhezji i odległości tych struktur od podłoża. Powoduje on, że po pierwsze ucieka z pola widzenia funkcjonalny aspekt definicji TNTs, których najważniejszym wyróżnikiem jest jednak funkcjonalna lub/i strukturalna ciągłość przedziałów cytoplazmatycznych komórek kontaktujących się za pośrednictwem TNTs. Po drugie z pola widzenia ucieka rola filopodiów w formowaniu mostków cytoplazmatycznych. Powstaje na przykład pytanie, czy otwarte mostki cytoplazmatyczne, które zachowały kontakt z podłożem (o co znacznie łatwiej *in vivo* niż *in vitro*), należałoby zaliczyć do TNTs? Prosiłbym Doktorantkę o ustosunkowanie się do tej kwestii w trakcie obrony.

Dalej Autorka koncentruje się na mechanizmach i biologicznym znaczeniu transferu CD44 pomiędzy komórkami podścieliska i CML, w tym na wpływie CD44

na transkryptom i proteom, poziomy endogennego CD44, potencjał inwazyjny komórek CML, ich profil metaboliczny i podatność na ferroptozę. Słusznie interpretuje ona uzyskane wyniki w (i) kontekście bezpośredniego transferu białek, jako systemu komplementarnego dla innych mediatorów komunikacji międzykomórkowej i (ii) roli mikrośrodowiska szpiku kostnego w fenotypowym przeprogramowaniu komórek białaczkowych i progresji CML. Sporo uwagi poświęca znaczeniu aktywacji osi ERK/AP-1 w rozwoju oporności na leczenie. Końcowa część dyskusji odnosi uzyskane wyniki do możliwości terapeutycznego wykorzystania CD44 jako celu leczenia wspomagającego inhibitory kinaz tyrozynowych. Nieco szkoda, że Autorka nie pokusiła się o zwięźcenie dyskusji krótkim choćby rozdziałem poświęconym kierunkom kontynuacji swoich badań. Jednak sama dyskusja jest wielowymiarowa i inspirująca, przeprowadzona na podstawie aktualnego stanu wiedzy. Potwierdza ona pogłębioną wiedzę Kandydatki w zakresie przedmiotu a także jej dojrzałość naukową. Po jej lekturze skryształizowały mi się jednak trzy dodatkowe pytania:

- w pracy wykazano jądrową akumulację cząsteczek CD44 w komórkach nowotworowych. Ponieważ w skład cząsteczek CD44 wchodzi transmembranowa α -helisa, powstaje pytanie o formę w jakiej CD44 wpływa na transkryptom komórek. Czy białko to integruje się np. z otoczką jądrową, czy może w grę wchodzi systemy analogiczne do transporterów mitochondrialnych?
- CD44 jest markerem komórek macierzystych. Czy na podstawie uzyskanych danych można spekulować na temat roli transferu CD44 z komórek podścieliska do komórek białaczkowych w rozwoju populacji nowotworowych komórek macierzystych?
- czy w wykorzystanym modelu obserwowano transfer makrocząsteczek/organeli z komórek CML do podścieliska?

Te i wcześniej sformułowane pytania mają charakter uzupełniający i nie podważają ogólnie bardzo wysokiej oceny rozprawy. Sama rozprawa doktorska Pani mgr Laury Turowskiej-Korgul stanowi spójne tematycznie opracowanie o dużym walorze poznawczym i potencjale wdrożeniowym. Rozprawa została zaplanowana i zrealizowana w sposób bardzo konsekwentny. W elegancki sposób łączy ona dwa wzajemnie uzupełniające się nurty badawcze: metodologiczny, dotyczący ultrastruktury i identyfikacji TNTs, oraz biologiczny, odnoszący się do roli transferu CD44 w komunikacji pomiędzy komórkami podścieliska i komórkami CML i w przebiegu tej choroby. Poszczególne etapy badań tworzą spójny ciąg eksperymentów prowadzących od obserwacji morfologicznych, poprzez identyfikację mechanizmów molekularnych obserwowanych zjawisk, aż do wykazania ich konsekwencji biologicznych i (potencjalnie) klinicznych. Wkład Doktorantki w przygotowanie przedłożonej do recenzji rozprawy był kluczowy dla jej powstania, sama rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a jej treść potwierdza pogłębioną wiedzę Kandydatki w zakresie przedmiotu. Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska mgr Laury Turowskiej-Korgul spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Laury Turowskiej-Korgul do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie biorąc pod uwagę rozmach i szeroki wachlarz technik wykorzystanych w rozprawie, wagę uzyskanych wyników, a także poważny dorobek naukowy Kandydatki, wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

(Jarosław Czyż)

Warszawa, 27/07/2026

Rada Naukowa
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Ludwika Pasteura 3
02-093 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Laury Turos-Korgul pt. „Intercellular transfer of CD44 from bone marrow stroma to chronic myeloid leukemia cells as a driver of niche-mediated imatinib resistance” wykonanej pod kierunkiem Prof. Katarzyny Piwockiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska poświęcona jest badaniu roli białka CD44 w komunikacji pomiędzy komórkami zrębu szpiku kostnego (bone marrow stromal cells, BMSCs) a komórkami przewlekłej białaczki szpikowej (CML). Punktem wyjścia pracy jest obserwacja, że komórki białaczkowe pozostające w kontakcie ze stromą wykazują zwiększoną ekspresję CD44 oraz większą oporność na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej (TKI). Celem pracy było wyjaśnienie mechanizmu tego zjawiska oraz określenie, czy CD44 może być przekazywane z komórek zrębu do komórek białaczkowych za pośrednictwem tunneling nanotubes (TNTs), a także czy wpływa to na właściwości biologiczne komórek nowotworowych. Rozprawa została napisana w języku angielskim i jest starannie przygotowana pod względem edytorskim. Praca obejmuje klasyczny układ rozprawy doktorskiej, zawierający wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, wnioski oraz obszerny spis literatury. Poszczególne rozdziały są logicznie uporządkowane i tworzą spójną całość.

Omówienie poszczególnych rozdziałów

Wstęp do pracy w sposób przejrzysty i logiczny wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem rozprawy. Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący biologii przewlekłej białaczki szpikowej, roli mikrośrodowiska szpiku kostnego w rozwoju oporności na inhibitory kinazy tyrozynowej, biologii białka CD44 oraz tunneling nanotubes jako nowego mechanizmu komunikacji międzykomórkowej. Wstęp jest oparty na aktualnej literaturze i dobrze uzasadnia podjęcie przedstawionych badań oraz postawione hipotezy. Rozdział „Materiały i metody” został przygotowany starannie i w większości zawiera szczegółowy opis zastosowanych modeli eksperymentalnych oraz technik badawczych. Na podkreślenie zasługuje bardzo szeroki zakres wykorzystanych metod, obejmujący zarówno nowoczesne techniki obrazowania komórkowego, analizy molekularne i transkryptomiczne, jak również liczne doświadczenia funkcjonalne.

Rozdział „Wyniki” został opracowany w sposób logiczny i konsekwentny. Poszczególne podrozdziały prowadzą czytelnika od szczegółowej analizy tworzenia się i charakterystyki TNT, poprzez wykazanie transferu CD44 pomiędzy komórkami zrębu i komórkami CML, analizę mechanizmu tego zjawiska oraz jego wpływu na ekspresję genów, aż do oceny znaczenia biologicznego i potencjalnych implikacji terapeutycznych. Cennym elementem pracy jest włączenie do badań materiału pochodzącego od pacjentów z CML, co zwiększa znaczenie biologiczne uzyskanych wyników.

Rozdziały „Dyskusja” i „Posumowanie” zostały napisane w sposób dojrzały i dobrze udokumentowany literaturą. Doktorantka krytycznie odnosi uzyskane wyniki do aktualnego stanu wiedzy, wskazując zarówno ich znaczenie poznawcze, jak i potencjalne implikacje biologiczne oraz terapeutyczne. Na szczególne podkreślenie zasługuje wyważona interpretacja większości uzyskanych wyników oraz umiejętność formułowania nowych hipotez wynikających z przeprowadzonych badań. Z punktu widzenia mechanistycznego interesujące jest wykazanie udziału TNT i bezpośredniego kontaktu komórek w przekazywaniu CD44 pomiędzy komórkami zrębu i CML. Jednocześnie wydaje się, że dla potencjalnego znaczenia terapeutycznego kluczowe pozostaje samo zwiększenie funkcjonalnej ekspresji CD44 w komórkach białaczkowych oraz możliwość farmakologicznego zahamowania osi CD44–HA, niezależnie od mechanizmu prowadzącego do wzrostu ekspresji tego białka.

Ogólna ocena rozprawy

Przedstawiony we wstępie przegląd literatury świadczy o bardzo dobrej znajomości aktualnego stanu wiedzy dotyczącego biologii przewlekłej białaczki szpikowej, mikrośrodowiska szpiku kostnego, biologii CD44 oraz mechanizmów komunikacji międzykomórkowej z udziałem tunneling nanotubes. W mojej ocenie rozprawa jednoznacznie potwierdza, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne. Na szczególne uznanie zasługuje wysoka wartość naukowa oraz nowatorski charakter przedstawionej rozprawy. Autorka podjęła się rozwiązania ważnego i nadal słabo poznanego problemu dotyczącego mechanizmów komunikacji pomiędzy komórkami zrębu szpiku kostnego a komórkami przewlekłej białaczki szpikowej. Najbardziej oryginalnym osiągnięciem pracy jest wykazanie, że białko CD44 może być przekazywane z komórek zrębu do komórek CML w sposób zależny od bezpośredniego kontaktu komórek, z udziałem tunneling nanotubes (TNT), oraz że zjawisko to wiąże się ze zmianami ekspresji genów i właściwościami biologicznymi komórek białaczkowych. Interesująca jest również zaproponowana przez Autorkę hipoteza wskazująca, że CD44 może nie tylko podlegać transferowi przez TNT, ale także uczestniczyć w regulacji powstawania lub funkcji tych struktur. O ile hipoteza ta wymaga dalszej weryfikacji eksperymentalnej, stanowi niewątpliwie cenny wkład do obecnego stanu wiedzy i wyznacza interesujący kierunek przyszłych badań.

Wysoko oceniam również bardzo szeroki i nowoczesny warsztat badawczy obejmujący zaawansowane techniki mikroskopowe (mikroskopię konfokalną, TEM i FIB-SEM), cytometrię przepływową i sortowanie komórek, analizy ekspresji genów i białek (RT-qPCR, Western blot, RNA-seq), manipulacje genetyczne (nadekspresję i wyciszanie CD44) oraz liczne testy funkcjonalne. Przedstawione wyniki, sposób zaplanowania kolejnych etapów badań oraz umiejętne wykorzystanie różnorodnych metod eksperymentalnych świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Na szczególne podkreślenie zasługuje umiejętność formułowania hipotez badawczych, ich konsekwentnej weryfikacji oraz krytycznej interpretacji uzyskanych wyników.

Istotnym atutem pracy jest także umiejętne połączenie badań podstawowych prowadzonych na liniach komórkowych z doświadczeniami wykorzystującymi materiał pochodzący od pacjentów z CML. Należy jednak zauważyć, że doświadczenia z wykorzystaniem materiału pierwotnego mają charakter ograniczony do 4 pacjentów. Ich rozszerzenie, zarówno o większą liczbę próbek pacjentów, jak i szerszą charakterystykę ekspresji CD44 na komórkach CML oraz wykorzystanie pierwotnych komórek BMSC, mogłoby istotnie wzmocnić translacyjne znaczenie przedstawionych wyników oraz potwierdzić, że obserwowane zjawiska nie są ograniczone do zastosowanych modeli komórkowych.

Pomimo kilku kwestii wymagających doprecyzowania, do których odniosę się w dalszej części recenzji, uważam, że większość przedstawionych wyników została poprawnie zinterpretowana i prowadzi do dobrze uzasadnionych wniosków. Dotyczy to w szczególności końcowej części rozprawy – dyskusji oraz wniosków – które są napisane w sposób dojrzały, wyważony i pozostają w zgodzie z przedstawionymi danymi eksperymentalnymi.

Komentarze i pytania

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka uwag dotyczących interpretacji przedstawionych wyników oraz kilka pytań, które – w mojej ocenie – mogą stanowić punkt wyjścia do interesującej dyskusji naukowej podczas obrony. Proszę Doktorantkę o odniesienie się do poniższych punktów w czasie obrony.

1. Wzrost ilości CD44 w komórkach białaczkowych po kontakcie ze stromą został przekonująco udokumentowany na poziomie mRNA. Natomiast na poziomie białka został wykazany głównie dla linii K562, podczas gdy w przypadku LAMA84 podobnego efektu nie obserwuje się (Fig. 4.2.21A-B). Warto odnieść się do tej różnicy i przedyskutować jej możliwe przyczyny. Dodatkowo, czy podobne obserwacje dotyczące wzrostu ilości białka CD44 na powierzchni komórek wykonano również w pierwotnych komórkach CML?
2. Wyniki przedstawione na Fig. 4.2.20C wskazują, że obecność CD44 w komórkach stromalnych jest kluczowa dla indukcji endogennej ekspresji CD44 w K562. Czy zależność tę oceniono również w innych modelach CML, zwłaszcza w LAMA-84 lub pierwotnych komórkach CD34+? Potwierdzenie jej w dodatkowym modelu istotnie wzmocniłoby wniosek o ogólnym znaczeniu tego mechanizmu.
3. Proszę o doprecyzowanie, czy w eksperymentach przedstawionych w podrozdziałach 4.2.5 i 4.2.6 (na Fig. 4.2.28B i 4.2.29) sortowano komórki wyłącznie na podstawie ekspresji CD44, czy również obecności CD44-GFP. Nie jest to dla mnie jednoznaczne z opisu, a ma istotne znaczenie dla interpretacji uzyskanych wyników. Jeśli sortowanie przeprowadzono wyłącznie na podstawie ekspresji CD44, proszę o odniesienie się do tego, czy przedstawione wyniki rzeczywiście pozwalają jednoznacznie przypisać obserwowane efekty „stroma-mediated CD44 upregulation” jak to jest przedstawione w tytułach podrozdziałów oraz w Dyskusji.
4. Interpretacja wyników przedstawionych na Fig. 4.2.34 wymaga wyjaśnienia. W tekście stwierdzono, że CD44-HAi sam nie wpływa na apoptozę ani tworzenie kolonii, podczas gdy na rycinie obserwowane są istotne statystycznie efekty działania samego inhibitora. Ponadto, ponieważ CD44-HAi sam wykazuje własną aktywność biologiczną, trudno jednoznacznie ocenić wpływ tego inhibitora w kombinacji z imatynibem na żywotność komórek i tworzenie kolonii. W celu wzmocnienia tego wniosku warto byłoby wykonać testy dla większej liczby dawek i uzupełnić analizę o ocenę interakcji pomiędzy CD44-HAi i imatynibem (np. test interakcji w 2-way ANOVA lub analizę synergizmu).
5. Różnice pomiędzy HS-5 i HS-27A wskazują, że komórki zrębu są funkcjonalnie heterogenne. Jak Autorka odnosi te wyniki do zróżnicowania mikrośrodowiska szpiku u pacjentów z CML? Które populacje komórek niszy mogą in vivo odpowiadać za transfer CD44 i ochronę komórek białaczkowych przed TKI oraz na ile zastosowane linie stromalne odzwierciedlają właściwości komórek izolowanych od pacjentów? Poproszę o odpowiedź w odniesieniu do literatury.
6. Na kilku rycinach (np. Fig. 4.2.18–4.2.20) grupa kontrolna została znormalizowana do wartości 1 i przedstawiona bez rozrzutu. Proszę o doprecyzowanie, na jakich danych przeprowadzono

analizę statystyczną. Jeżeli testy wykonano na wartościach po normalizacji, w których wszystkie próbki kontrolne przyjmują wartość 1, grupa kontrolna ma sztucznie zerową wariancję, co budzi zastrzeżenia co do poprawności zastosowanej analizy statystycznej.

Wnioski końcowe

W mojej ocenie przedstawione wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego dotyczącego mechanizmów komunikacji pomiędzy komórkami zębów i komórkami CML oraz znaczenia CD44 w rozwoju oporności na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej.

Uwzględniając przedstawione powyżej argumenty, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Laury Turowskiej-Korgul spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne, potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr Laury Turowskiej-Korgul do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Małgorzata Firczuk

29.07.2026

Dr hab. Anna Marusiak
Laboratorium Molekularnej OnkoSygnalizacji
IMol Polska Akademia Nauk
Ul. Flisa 6
02-247 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Laury Turos-Korgul pt. "Intercellular transfer of CD44 from bone marrow stroma to chronic myeloid leukemia cells as a driver of niche-mediated imatinib resistance"

Przedmiotem rozprawy, zgodnie z jej tytułem, było zbadanie roli transferu białka CD44 z komórek podścieliska szpiku kostnego do komórek przewlekłej białaczki szpikowej (CML) za pośrednictwem nanotuneli (tunneling nanotubes, TNTs) oraz określenie znaczenia tego procesu w rozwoju oporności na leczenie imatynibem. Drugim istotnym celem pracy była charakterystyka ultrastruktury TNTs oraz krytyczna ocena obecnie stosowanych metod ich identyfikacji. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w poznanie mechanizmów komunikacji pomiędzy komórkami nowotworowymi i mikrośrodowiskiem, a także wskazują nowe potencjalne cele terapeutyczne związane z przezwyciężaniem oporności na inhibitory kinaz tyrozynowych w CML.

Praca została wykonana w Laboratorium Cytometrii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN pod kierunkiem prof. Katarzyny Piwockiej. Rozprawa została przygotowana w języku angielskim i zawiera streszczenie w języku polskim. Pracę rozpoczyna obszernie i bardzo dobrze opracowane wprowadzenie obejmujące aktualny stan wiedzy. W dalszej części przedstawiono cele pracy, szczegółowy opis materiałów i metod oraz obszerny rozdział wyników zakończony dyskusją i podsumowaniem. Na uwagę zasługuje również bogaty dorobek publikacyjny Doktorantki zamieszczony w rozprawie, obejmujący prace oryginalne oraz artykuły przeglądowe związane z tematyką badań.

Ocena merytoryczna

Rozprawa przedstawia wielowątkowy projekt badawczy dotyczący mechanizmów komunikacji pomiędzy komórkami podścieliska szpiku kostnego a komórkami przewlekłej białaczki szpikowej. Autorka podjęła się rozwiązania aktualnego i istotnego problemu badawczego, którego zrozumienie może przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów rozwoju lekooporności w przewlekłej białaczce szpikowej. Praca obejmuje dwa wzajemnie uzupełniające się nurty badawcze. Pierwszy dotyczy charakterystyki ultrastruktury nanotuneli (TNTs), natomiast drugi koncentruje się na określeniu roli transferu białka CD44 z komórek stromalnych do komórek białaczkowych oraz jego wpływu na rozwój oporności na imatynib.

Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrze przygotowane wprowadzenie do tematyki badań. Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący biologii przewlekłej białaczki szpikowej, mikrośrodowiska szpiku kostnego, nanotuneli oraz biologii białka CD44. Świadczy to o bardzo dobrej znajomości literatury oraz szerokiej wiedzy teoretycznej z zakresu realizowanej tematyki badawczej.

Pierwsza część rozprawy poświęcona została analizie ultrastruktury TNTs z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej FIB-SEM. Autorka porównała wyniki uzyskane metodą konfokalną z analizą ultrastrukturalną. Przedstawione wyniki pokazują, że część struktur identyfikowanych jako TNTs przy użyciu standardowych kryteriów nie spełnia tych kryteriów podczas analizy w wyższej rozdzielczości. Co więcej, TNTs nie zawsze stanowią całkowicie otwarte kanały cytoplazmatyczne, co sugeruje, że obecny model budowy TNTs może wymagać doprecyzowania oraz dalszej weryfikacji. Jest to interesujący aspekt pracy, który ma znaczenie nie tylko dla badań przedstawionych w rozprawie, ale również dla całej dziedziny zajmującej się biologią TNTs.

Drugi, zasadniczy nurt badań dotyczy roli białka CD44 w komunikacji pomiędzy komórkami podścieliska szpiku kostnego a komórkami CML. Wykorzystując wcześniejsze obserwacje laboratorium jako punkt wyjścia, Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła szereg własnych doświadczeń, które doprowadziły do identyfikacji mechanizmów regulujących komunikację pomiędzy komórkami podścieliska szpiku kostnego i komórkami CML poprzez transfer CD44. Transfer ten wymaga bezpośredniego kontaktu komórek, zachodzi niezależnie od egzosomów i odbywa się z udziałem pęcherzyków transportowanych przez TNTs. Co istotne, wyciszenie CD44 w komórkach stromalnych ogranicza tworzenie nanotub, wskazując, że CD44 pełni rolę nie tylko transportowanego białka, ale również uczestniczy w procesie powstawania TNTs. Interesującą obserwacją jest także wykazanie obecności pełnej formy białka CD44 w jądrach komórek białaczkowych po jego transferze z komórek stromalnych.

Kolejne doświadczenia zostały logicznie zaplanowane i stanowią naturalną kontynuację wcześniejszych obserwacji. Uzyskane wyniki sugerują, że komórki, które otrzymały stromalne CD44, charakteryzują się zmienionym profilem transkrypcyjnym. Analiza RNA-seq wskazuje na zwiększoną ekspresję genów związanych z adhezją komórkową, migracją oraz przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej. Uzyskane wyniki zostały następnie zweryfikowane szeregiem doświadczeń funkcjonalnych - Doktorantka przedstawia zwiększoną aktywność metaloproteinaz, wzrost migracji oraz inwazyjności komórek białaczkowych, potwierdzając funkcjonalne znaczenie obserwowanych zmian transkryptomicznych. Takie podejście znacząco wzmacnia wiarygodność przedstawionych wniosków.

Jednym z bardziej interesujących wyników rozprawy jest wykazanie, że transfer stromalnego CD44 wiąże się ze zwiększeniem ekspresji endogennego CD44 w komórkach białaczkowych. Doktorantka przeanalizowała mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko i wykazała udział osi ERK/AP-1 oraz HIF-1 α . Rozprawę kończą doświadczenia pokazujące, że farmakologiczne zahamowanie interakcji CD44 z hialuronianem zwiększa skuteczność działania imatynibu w warunkach odtwarzających mikrośrodowisko szpiku kostnego. Jest to interesująca obserwacja

wskazująca na potencjalne możliwości wykorzystania uzyskanych wyników w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych.

Podsumowując, wielometodyczny charakter pracy jest jej niewątpliwym atutem. Doktorantka wykorzystwała szeroki zakres nowoczesnych metod eksperymentalnych, wykazując się bardzo dobrym warsztatem badawczym. Na szczególne podkreślenie zasługuje logiczna konstrukcja całego projektu, w którym kolejne doświadczenia wynikają z uzyskanych wcześniej obserwacji i prowadzą do stopniowej weryfikacji postawionej hipotezy badawczej. Największą wartością rozprawy jest jednak konsekwentne prześledzenie badanego zjawiska – od obserwacji transferu białka pomiędzy komórkami, poprzez analizę mechanizmów molekularnych, aż do wykazania biologicznych konsekwencji tego procesu oraz jego potencjalnych implikacji terapeutycznych. **W mojej ocenie przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz potwierdza umiejętność Doktorantki do samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych.**

Ocena edytorska

Przedłożona do oceny rozprawa została przygotowana bardzo starannie zarówno pod względem edytorskim, jak i językowym. Tekst jest przejrzysty, logicznie uporządkowany i napisany poprawnym językiem angielskim. Wprowadzenie stanowi wyczerpujący przegląd literatury, a poszczególne rozdziały zostały ułożone w sposób pozwalający czytelnikowi łatwo śledzić tok rozumowania Autorki. Na szczególne uznanie zasługują wysokiej jakości ilustracje oraz czytelny sposób prezentacji wyników.

Pytania na obronę

Przedstawiona rozprawa stanowi bardzo wartościowe opracowanie i dostarcza wielu nowych informacji dotyczących komunikacji pomiędzy komórkami podścieliska szpiku kostnego i komórkami przewlekłej białaczki szpikowej. Jednocześnie wyniki pracy rodzą kilka interesujących pytań, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań.

1. Przedstawione wyniki wskazują, że transfer CD44 z komórek podścieliska szpiku kostnego wiąże się z zmianą właściwości biologicznych komórek białaczkowych. Jednocześnie wiadomo, że nanotunele umożliwiają transport wielu różnych składników komórkowych. W dyskusji Autorka omawia ograniczenia związane z możliwością jednoznacznego określenia udziału nanotuneli oraz innych mechanizmów kontaktowego transferu. Interesujące byłoby jednak poznanie opinii Doktorantki, jakie **doświadczenia pozwoliłyby jednoznacznie wykazać, że to właśnie transferowane CD44, a nie inne składniki transportowane pomiędzy komórkami za pośrednictwem nanotuneli, odpowiada za obserwowane efekty biologiczne.**
2. W pracy wykazano, że transfer stromalnego CD44 wiąże się ze wzrostem ekspresji endogennego CD44 w komórkach białaczkowych. Autorka proponuje model, w którym zjawiska te stanowią element dodatniego sprzężenia zwrotnego. Interesujące byłoby

jednak poznanie opinii Doktorantki, jakie doświadczenia pozwoliłyby rozstrzygnąć, czy **obserwowane zmiany fenotypowe wynikają bezpośrednio z obecności transferowanego CD44, czy też są przede wszystkim konsekwencją wtórnej indukcji ekspresji endogennego CD44.**

3. W pracy skupiono się na komunikacji za pośrednictwem nanotuneli, jednak w mikrośrodku szpiku kostnego równocześnie funkcjonują również inne mechanizmy komunikacji międzykomórkowej, takie jak egzosomy czy sygnalizacja zależna od wydzielanych cytokin. Jak, zdaniem Doktorantki, mechanizmy te mogą wzajemnie się uzupełniać? Czy uważa Pani, że transfer za pośrednictwem nanotuneli odgrywa szczególną rolę w rozwoju lekooporności komórek CML?
4. Przedstawione wyniki wskazują, że zarówno CD44, jak i nanotunele mogą stanowić potencjalne cele terapeutyczne. Które z tych podejść uważa Doktorantka za bardziej obiecujące z punktu widzenia przyszłych zastosowań klinicznych? Jakie są największe ograniczenia każdego z nich?

Wnioski końcowe

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska stanowi wartościowe opracowanie dotyczące mechanizmów komunikacji pomiędzy komórkami przewlekłej białaczki szpikowej i komórkami podścieliska szpiku kostnego. Przedstawione dane wskazują, że transfer białka CD44 za pośrednictwem nanotuneli prowadzi do przeprogramowania komórek białaczkowych, zwiększenia ich właściwości inwazyjnych oraz rozwoju oporności na imatynib. Istotnym osiągnięciem pracy jest również szczegółowa analiza ultrastruktury nanotuneli oraz krytyczna ocena metod stosowanych do ich identyfikacji.

Rozprawa prezentuje **bardzo dobrą znajomość aktualnego stanu wiedzy** z zakresu biologii przewlekłej białaczki szpikowej, mikrośrodku nowotworowego oraz komunikacji międzykomórkowej. Świadczy o tym zarówno obszerne i dobrze przygotowane wprowadzenie, jak i dojrzała dyskusja uzyskanych wyników, w której Doktorantka trafnie odnosi własne obserwacje do aktualnych doniesień literaturowych.

Przedstawione badania potwierdzają również umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Doktorantka zaplanowała i zrealizowała złożony projekt badawczy, wykorzystując szeroki wachlarz nowoczesnych metod eksperymentalnych. Uzyskane wyniki zostały poddane krytycznej analizie oraz właściwie zinterpretowane.

W mojej ocenie rozprawa stanowi również **oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.** Doktorantka nie tylko scharakteryzowała nowy mechanizm komunikacji pomiędzy komórkami zrębu szpiku kostnego i komórkami przewlekłej białaczki szpikowej, ale również przedstawiła dane wskazujące na biologiczne konsekwencje tego procesu. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę dotyczącą mechanizmów lekooporności oraz wskazują potencjalne kierunki rozwoju nowych strategii terapeutycznych. Przedstawiona rozprawa świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki, potwierdza jej umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz

wnosi oryginalny wkład do badań nad komunikacją pomiędzy komórkami nowotworowymi i mikrośrodowiskiem szpiku kostnego.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny **rozprawa doktorska Pani mgr Laury Turos-Korgul spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce**. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorski charakter uzyskanych wyników, bardzo szeroki zakres zastosowanych metod badawczych, wysoki poziom wykonania doświadczeń, spójność przedstawionego projektu oraz wartość poznawczą uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Laury Turos-Korgul.

Agnieszka Mowrod