

Dr dr hab.med. Lukasz Krokowicz

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Onkologii Gastroenterologicznej

Uniwersytetu Medycznego im K. Marcinkowskiego w Poznaniu

**Ocena rozprawy doktorskiej magistra Víctor Urbiola-Salvador**

**pt. „Proteomics characterization of immune responses in inflammation and cancer”.**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Master of Science Víctor Urbiola-Salvador „**Proteomics characterization of immune responses in inflammation and cancer**” dotyczy niezwykle ciekawego zagadnienia jakim jest proteomika kliniczna w ocenie odpowiedzi immunologicznej w raku jelita grubego. Rak jelita grubego to najczęstszy nowotwór złośliwy przewodu pokarmowego, zgodnie z przewidywaniami w 2035 roku zachoruje na niego 1,3 miliona mężczyzn i 1,08 miliona kobiet. Wysoka umieralność i zachorowalność na raka jelita grubego powoduje, że duże znaczenie mają badania naukowe mające na celu znalezienie biomarkerów klinicznych umożliwiających wcześniejsze wykrycie pacjentów narażonych na raka jelita grubego. Rak i przewlekłe choroby zapalne zwiększają swoją częstość występowania i są coraz częstszymi przyczynami zgonów. Zapalenie związane z rakiem stało się ważną cechą charakterystyczną raka, szczególnie w przypadku raka jelita grubego (CRC), podczas gdy brak równowagi między prozapalnymi i supresyjnymi komórkami odpornościowymi i białkami przyczynia się do rozwoju różnych chorób. Pomimo dużych postępów w diagnostyce i leczeniu, takich jak immunoterapie w przypadku raka,

większość pacjentów nie wykazuje całkowitej odpowiedzi i rozwija lekooporność za pośrednictwem alternatywnych mechanizmów immunosupresyjnych. Głębsze zrozumienie skomplikowanych sieci odpowiedzi immunologicznych zaangażowanych w choroby konieczne jest, aby można byłoby te choroby wcześniej rozpoznać i leczyć. Rozwój proteomiki klinicznej umożliwia wysokoprzepustową kwantyfikację białek, może także umożliwić scharakteryzowanie odpowiedzi immunologicznych w kontekście zapalenia i raka. Jej wynikiem może być identyfikacja nowych regulatorów odpornościowych i odkrycie potencjalnych biomarkerów. Zakażenie SARS-CoV-2 powoduje ostry stan zapalny, który może rozwijać się w zaostrzonych odpowiedziach immunologicznych, zwłaszcza u pacjentów z chorobami współistniejącymi, takimi jak przewlekłe choroby zapalne i nowotwory. Zakażenie SARS-CoV-2 może powodować ciężkie objawy charakteryzujące się ogólnoustrojowym stanem zapalnym i zaostrzoną odpowiedzią immunologiczną. Co więcej, u pacjentów z COVID-19 z istniejącymi wcześniej przewlekłymi chorobami zapalnymi istnieje większe ryzyko wystąpienia powikłań patologicznych.

Temat pracy uważam za bardzo dobrze dobrany, aspekty związane z proteomiką kliniczną i jej zastosowanie w poszukiwaniu biomarkerów raka jelita grubego mogą mieć istotne znaczenie kliniczne. Uzasadnieniem wyboru tematu jest również fakt, iż magister Víctor Urbiola-Salvador pracuje w uznanym Ośrodku Akademickim czyli Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Pod względem formalnym praca doktorska opiera się o pięć opublikowanych publikacji:

1. Proteomics approaches to characterize the immune responses in cancer.

2. Plasma Proteomics Elucidated a Protein Signature in COVID-19 Patients with Comorbidities and Early-Diagnosis Biomarkers.
3. Plasma Proteomics Unveil Novel Immune Signatures and Biomarkers upon SARS-CoV-2 Infection.
4. Mass spectrometry proteomics characterization of plasma biomarkers for colorectal cancer associated with inflammation.
5. Plasma protein changes reflect colorectal cancer development and associated inflammation.

oraz jeden, nieopublikowany manuskrypt:

Deep proteomics characterization of colorectal cancer tumor microenvironment enriched in CD4+ T cells.

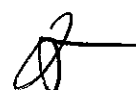
We wszystkich pracach opublikowanych (w czasopismach posiadających Impact Factor) oraz nieopublikowanym manuskrypcie magister Víctor Urbiola-Salvador jest pierwszym autorem. Jego wkład autorski w cykl publikacji nie ulega wątpliwości. Chciałbym również zwrócić uwagę na duże zaangażowanie naukowe Doktoranta, wykonanie tak obszernych i skomplikowanych badań wymagało ogromu pracy i poświęconego czasu.

Przedstawione w cyklu publikacje zostały poddane szczegółowej recenzji przez niezależnych ekspertów, co wynika z wymogów stawianych czasopismom recenzowanym. Aspekty związane z metodyką badań, poprawnością metod statystycznych, prezentacją wyników czy też ich dyskusją nie wymagają więc oceny krytycznej i należy przyjąć, iż ich poprawność jest dostatecznie zweryfikowana.

Całość cyklu tworzy bardzo spójną całość, identyfikacja i scharakteryzowanie białek związanych z przewlekłym stanem zapalnym i transformacją nowotworową za pomocą proteomiki klinicznej ze szczególnym uwzględnieniem białek związanych z układem

odpornościowym związanych z podzbiorami komórek T CD4+ i innymi komórkami odpornościowymi może mieć duże znaczenie praktyczne. Wydaje się, że proteomika ułatwi odkrywanie biomarkerów, a także identyfikację nowych regulatorów odpowiedzi immunologicznej wywoływanej przez komórki T. Te nowe regulatory mogą być potencjalnymi celami immunoterapii w przewlekłych chorobach zapalnych i leczeniu raka, jego diagnostyce i prognozowaniu. Zakażenie SARS-CoV-2 powoduje zaostrenie odpowiedzi immunologicznej i ostry stan zapalny, co u pacjentów z przewlekłymi chorobami zapalnymi może zwiększać ryzyko wystąpienia ciężkich objawów po zakażeniu SARS-CoV-2 oraz śmiertelność. Pomimo dużego postępu w immunopatogenezie SARS-CoV-2 od czasu wybuchu epidemii COVID-19, konieczne jest lepsze zrozumienie odpowiedzi immunologicznej SARS-CoV-2 i biomarkerów.

W pierwszej części rozprawy doktorskiej zastosowano podejścia proteomiki ortogonalnej, spektrometrii masowej i technologii PEA (proximity extension assay) do badania próbek osocza od pacjentów z COVID-19 cierpiących na wcześniejsze choroby współistniejące jak i bez nich oraz odpowiednich kontroli w celu określenia zmian białek osocza związanych z zakażeniami SARS-CoV-2, czasu zakażenia i specyficznych odpowiedzi anti-SARS-CoV-2. Obie technologie wykazały, że pacjenci z COVID-19 cierpiący na choroby współistniejące mieli wspólną sygnaturę białkową charakteryzującą się zmianami w białkach wrodzonej odporności, w tym układu dopełniacza i białek ostrej fazy, takich jak  $\alpha$ -2-antyplazmina, które mogą przyczyniać się do komplikacji procesu krzepnięcia po przebytej chorobie COVID-19. Wykryto kluczowe białka odpornościowe, w tym CD4 wraz z powiązаныmi białkami, takimi jak CD28 i przeciwdrobnoustrojowe BST2. Ponadto białka związane z przebudową i uszkodzenia tkanek, takie jak MATN2 i COL6A3 oraz białka macierzy zewnątrzkomórkowej ECM1 i keratyny K22E, mogą być nowymi biomarkerami wczesnego wykrywania. Kilka z nich nie zostało wcześniej zgłoszonych, w tym podwyższone RBP2 i obniżona ekspresja RNF41 w COVID-19.



Diagnostyka raka jelita grubego bazuje głównie na programie badań przesiewowych, które opierają się na kosztownej i inwazyjnej kolonoskopii, podczas gdy prognoza dotycząca przeżycia jest głównie określana poprzez stadium guza w momencie oceny histopatologicznej po operacji. Wydaje się, że biomarkery obecne w krwi są obiecującą alternatywą dla poprawy diagnostyki i prognozowanego czasu przeżycia pacjentów z rakiem jelita grubego. W drugiej części rozprawy doktorskiej, wcześniej zoptymalizowane podejścia proteomiczne zostały zastosowane do próbek osocza z wielośrodkowej kohorty CRC i zdrowych kontroli w celu określenia zmian białkowych zaangażowanych w rozwój CRC, progresję i stan zapalny związany z rakiem. Wykryte na podstawie MS zmiany białkowe u pacjentów z CRC były związane z metabolizmem cholesterolu, w tym APOC2 związanym z postępem CRC, kilkoma członkami rodziny SERPIŃ i układem dopełniacza, w tym C5, C1QB, a także C4B i C8A, związanymi ze stanem zapalnym związanym z rakiem i postępem CRC. Co ważne, zwiększone stężenie C5 w CRC zostało potwierdzone w dodatkowej kohorcie. Ponadto po raz pierwszy wykryto zwiększone stężenie prozapalnych LBP i SAA4 w CRC, podczas gdy białko ostrej fazy LRG1 i ceruloplazmina były powiązane ze stanem zapalnym związanym z rakiem. Analiza PEA wykazała zmiany białek w osoczu również związane ze stanem zapalnym, takie jak MDK, białka związane z aktywowanymi szlakami sygnałowymi Th17 i onkogennymi na poziomie ogólnoustrojowym. Doktorant wykrył zwiększone stężenie atraktantów limfocytów typu T CXCL9 i CCL23 w osoczu CRC co zostało potwierdzone w dodatkowej kohorcie CRC. IFNG $\gamma$ , IL17C i IL32 były powiązane z wczesnymi stadiami CRC, podczas gdy ACP6, FLT4 i MANSC1 były powiązane z późnymi stadiami, co czyni je obiecującymi biomarkerami prognostycznymi.

W ostatniej części, wysokoprzepustowa analiza proteomiczna oparta o MS była wykorzystana do określenia zmian białek komórek odpornościowych w mikrośrodowisku guza (TME) w tkankach CRC i pasujących tkankach niezmiennych nowotworowo wzbogaconych w komórki T CD4 + i inne komórki odpornościowe. Profile ekspresji białek w tkance CRC odzwierciedlały trwające procesy nowotworowe i zaburzenie integralności

tkanki w obrębie TME CRC, w tym zaburzenie cyklu komórkowego i innych cech charakterystycznych raka, takie jak angiogeneza, dysregulacja apoptozy, macierzystość komórek rakowych i przebudowa pozakomórkowa. Co ważne, odkryto złożoną sieć zwiększonej ekspresji białek odpornościowych w TME CRC z prozapalnymi i białkami wrodzonej odporności S100A12, S100A8 i S100A9, a także mediatorami immunosupresyjnymi, takimi jak CD276, PVR i NT5E. Co więcej, ekspresja białek wskazywała na wysoką heterogeniczność immunologiczną komórek ze współlistnieniem wysokiego poziomu fibroblastów związanych z rakiem (CAF) produkujących FGF2 wraz z ekspresją monocytów/makrofagów prezentujących białko odpornościowe punktu kontrolnego ICOSL, z czego oba zostały powiązane z progresją CRC po raz pierwszy. Ponadto, wyższa zawartość Treg, aktywowanych komórek tucznych i limfocytów typu B, a także redukcja komórek plazmatycznych IgA i komórek NK CD56 zostały przewidziane w TME CRC. Co ciekawe, zwiększona ekspresja białek kaskady dopełniacza w CRC potwierdziła wyniki analizy osocza CRC, co sugeruje ich właściwości immunosupresyjne w TME. Przewidziana ilość Treg była skorelowana z aktywną prezentacją MHCII z GILT, która może pośredniczyć w odpowiedziach tolerogennych i immunosupresyjnemu przeprogramowaniu metabolicznemu poprzez pozbawienie tryptofanu (KYNU, IDO1, AHR), argininy (ARG1) i tauryny (SLC6A6). Oprócz nowych potencjalnych regulatorów odpornościowych w obrębie CRC TME, MCEMP1 może odgrywać istotną rolę w adhezji i migracji komórek mieloidalnych i limfocytów typu T, zwłaszcza Treg.

Wszystkie powyżej przedstawione prace prezentują bardzo wysoki poziom naukowy i kliniczny. Są one podsumowaniem wieloletnich doświadczeń proteomiką kliniczną.

Chciałbym pogratulować Doktorantowi osiągniętych wyników i formy ich przedstawienia. Analizowane zagadnienie jest bardzo istotne klinicznie i może mieć znaczenie w poszukiwaniu nowych biomarkerów chorób nowotworowych. Prezentowane prace są pracami w pełni oryginalnymi, jednymi z pionierskich w skali krajowej i światowej.



Rangę prac podnosi ich prezentacja przez Autora na dwóch konferencjach naukowych: na Young Science Congress III (Gdansk, 2023) prezentacja pt V. Plasma proteomics unveil novel complement and proinflammatory proteins involved in colorectal cancer oraz na Annual congress of the European Association for Cancer Research 2024 (Rotterdam, 2024) prezentacja zatytułowana Mass spectrometry-based proteomics uncover novel plasma biomarkers for colorectal cancer associated with inflammation. Doktorant za swoje badania dostał też nagrodę Awards Prize of the Dean of Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG&MUG 2023.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska przyczyniła się do scharakteryzowania białek związanych z odpowiedziami immunologicznymi w stanach zapalnych i nowotworach. Nowe białka osocza związane z zakażeniem SARS-CoV-2 w przypadku przewlekłych stanów zapalnych i w CRC dostarczają nowych spostrzeżeń na temat rozwoju choroby. Dane wygenerowane w ramach niniejszej pracy dyplomowej mogą ułatwić opracowanie nowych biomarkerów klinicznych poprzez dalsze badania walidacyjne w większych i bardziej zróżnicowanych kohortach w celu oceny ich wykonalności w zastosowaniach klinicznych. Szeroka charakterystyka CRC TME z wysoką infiltracją immunologiczną ujawniła wiele białek związanych z komórkami i układem odpornościowym, które mogą być nowymi regulatorami odporności. Dalsze badania funkcjonalne mogą ułatwić określenie podstawowych mechanizmów molekularnych zaangażowanych w odpowiedzi immunologiczne TME CRC.

Uważam, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi posiadanej wiedzy w dyscyplinie biotechnologii oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim **określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach**



i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz 1669 ze zm.).

Wobec powyższego wnioskuję do wysokiej Rada Dyscypliny Biotechnologia z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie magistra Victora Urbiola-Salvador do dalszych etapów pracy doktorskiej. Postuluję również wyróżnienie ocenianej przez mnie pracy.

Dr hab.med. Łukasz Krokowicz

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Onkologii Gastroenterologicznej  
Uniwersytetu Medycznego im K. Marcinkowskiego w Poznaniu

