



Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
Prof. Paweł Kafarski
e-mail: pawel.kafarski@pwr.edu.pl
web: <http://bioorganic.ch.pwr.wroc.pl>



Wrocław 30.05.2019

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny KUNCEWICZ
„Charakterystyka molekularna kompleksu białek HVEM-CD160, jako
potencjalnego celu w immunoterapii”**

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Kuncewicz została wykonana pod opieką Pani prof. Sylwii Rodziejewicz-Motowidło, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Dotyczy ona jednego ze sposobów poszukiwania nowych środków mobilizujących system immunologiczny lub hamujących jego nadaktywność. Tym sposobem jest poszukiwanie substancji oddziałujących z białkami, które nazywane są punktami kontrolnymi układu immunologicznego (nazwa angielska *immune checkpoints* jakoś bardziej do mnie przemawia). Jako model badawczy Doktorantka wybrała, mało jeszcze poznane, białko CD160. Zatem logicznym jest, że pierwszym etapem podjętych badań była próba zdefiniowania struktury przestrzennej tego białka stosując pomysłową kombinację: wymiany ruchliwych i eksponowanych na powierzchni białka atomów wodoru na deuter, a następnie trawienie enzymatyczne otrzymanego, deuterowanego białka i badanie struktur otrzymanych fragmentów za pomocą spektrometrii mas (technika HDX-MS). Po analizie otrzymanych map peptydów można było nie tylko zdefiniować strukturę pierwszorzędową CD160 ale także stwierdzić, które z jego wiązań amidowych nie mają (albo mają utrudniony) kontakt z wodą (rozpuszczalnikiem). Badania te połączone z komputerowo-wspomaganiem modelowaniem struktury białka CD160 pozwoliły na uzyskanie przestrzennej struktury tego białka, której użyto w dalszych studiach. Na szczególne wyróżnienie w tej części pracy zasługuje wykazanie, że białko CD160 jest monomerem (nawet *Wikipedia* pisze o jego multimerycznej strukturze).

Następnym etapem badań była próba definicji przestrzennej kompleksu białka CD160 z białkiem ułatwiającym wejście do komórki wirusa opryszczki (HVEM), jednego z



DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 03.06.2019r
L.dz. 8010-HC/KC-1346/19

czynników martwicy nowotworu. Tutaj Doktorantka zastosowała bardzo kreatywnie technikę HDX-MS (białko HVEM blokuje deuterowanie związanych fragmentów) oraz test immunoenzymatyczny ELISA. Badaniami objęto również wybrane fragmenty HVEM. Jak trudne to były badania pokazuje chociażby niepozorny fragment badań opisanych na stronach 55-56. Badania te dotyczyły technicznego problemu, jaki pojawił się w trakcie przygotowania płytek do testów immunoenzymatycznych. Uzyskane wyniki pozwoliły znów użyć techniki modelowania molekularnego dla wyznaczenia sposobu oddziaływania białek HVEM i CD160. W tej części pracy na szczególną pochwałę zasługuje zbadanie wpływu glikozylacji białka CD160 (jest ono glikoproteina) na wiązanie HVEM. Końcowym i bardzo pracowitym etapem podjętych badań było zastosowanie wiedzy dotyczącej architektury wiązania obu białek do projektowania fragmentów oligopeptydowych zdolnych silnie wiązać białko CD160. Doktorantka otrzymała tu interesujące peptydy, które mogą być uznane za substancje wiodące w dalszym projektowaniu.

Badanie wiązania fragmentów CD160 oraz ich analogów o zrandomizowanej strukturze, z HVEM opisane na stronie 72 dały zaskakujące wyniki – wiążą się one nadspodziewanie dobrze – silniej niż całe białko C160. Czy Doktorantka ma jakąś koncepcję dlaczego uzyskano taki wynik? Czy są planowane dalsze badania tego fenomenu?

Podsumowując można stwierdzić, że w pracy doktorskiej Pani mgr Kuncewicz Świdorskiej pojawia się wiele wątków i wszystkie z nich przyniosły interesujące wyniki. Należy tu też podkreślić, że uzyskane wyniki wymagały bardzo dużego nakładu pracy, kreatywności i umiejętności. Jest też oczywiste, że tak wielowątkowe i trudne badania byłyby nie przeprowadzenia bez pomocy współpracowników z macierzystego Wydziału, których Doktorantka wymienia i im dziękuje.

Praca doktorska ma układ klasyczny i zaczyna się od wprowadzenia czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Ten wstęp literaturowy jest napisany ciekawie i kompetentnie. Ma on typową objętość dla prac doktorskich, to znaczy liczy około 30% tekstu. Na stronie 43 opisane są dane literaturowe dotyczące wiązania fragmentów białka HVEM z białkiem BTLA. Słabo oddziałujące fragmenty pokazały dobrą aktywność *in vivo* (w odróżnieniu od dobrze wiążących się fragmentów). Czy jest jakieś wytłumaczenie tego zjawiska?

Cała praca jest napisana bardzo starannie, czytelnie i ładną polszczyzną. Powoduje to, że czyta się ją dobrze. Na szczególną pochwałę zasługuje niezwykle elegancka redakcja pracy. Nie do wiary jest to, że nie znalazłem ani jednego błędu edytorskiego

– to niezwykle w przypadku prac doktorskich. Zarówno część eksperymentalna jak i opis wyników są bardzo szczegółowe i dobrze pokazują zarówno sposób realizacji badań, jak i ogrom pracy włożony w tę realizację. Szkoda tylko, że nie ma rozdziału poświęconego wnioskom i taką rolę pełni posumowanie wyników – a to nie to samo.

Nie zamierzam też uchylać się od podania kilku uwag krytycznych. I tak:

- używa się terminu „struktura krystaliczna”, a nie krystalograficzna (str. 3);
- zdanie zaczynające się od słów „Płytki streptawidynowe....” jest niejasne (str. 47);
- protestuję przeciw „fleksybilnym” regionom białka (wolę giętkie konformacyjne, str.50);
- powinno być nie ilość, ale liczba wymienionych atomów wodoru (str. 51);
- dynamika molekularna to nie *molecular docking* (str.75);
- czy na pewno Glu45 oddziałuje hydrofobowo z Tyr23. Ich struktury na to nie wskazują (str.89);
- zdecydowanie protestuję przeciw sformułowaniu „Proceedingi” (str.116)
- w końcu: nie miałbym odwagi napisać, że moje badania mogą się przyczynić do rozwoju medycyny (str.53). Entuzjazm Doktorantki wynika pewnie z różnicy wieku jakie nas dzielą i odbieram go pozytywnie.

Te błędy są marginalne i nie mają żadnego wpływu na moją wysoką ocenę wartości rozprawy Pani mgr Katarzyny Kuncewicz, a raczej mają pokazać, że pracę starałem się przeczytać starannie.

Reasumując, przyszło mi recenzować solidną, dobrze napisaną i ciekawą pracę opisującą realizację innowacyjnego i świeżego pomysłu badawczego. Praca ta w pełni spełnia warunki zarówno ustawowe jak i zwyczajowe jakie stawia się pracom doktorskim. Zatem, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kuncewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę zakres wykonanych badań, ich stopień trudności i uzyskane wyniki chętnie zaproponowałbym wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej odpowiednią nagrodą. Niestety Pani mgr Katarzyna Kuncewicz nie spełnia dwóch warunków regulaminu Wydziału Chemii – nie jest Ona pierwszym autorem trzech publikacji, i nie jest autorem trzech publikacji z listy filadelfijskiej gdyż pismo *Oncotarget* (choć jest to bardzo dobre czasopismo) zostało z tej listy usunięte. Trochę szkoda, ale regulamin jest regulaminem.

