

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kuncewicz p.t. „Charakterystyka molekularna kompleksu białek HVEM-CD160, jako potencjalnego celu w immunoterapii”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska opisuje badania nad charakterystyką strukturalną białka CD160, kompleksu CD160-HVEM oraz próbę uzyskania peptydowych inhibitorów oddziaływania tych białek. Praca została przygotowana w Katedrze Chemii Biomedycznej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło, prof. UG oraz dr Marty Spodzieja, promotora pomocniczego.

Rozprawa została przygotowana w języku polskim w formie zamkniętego opracowania. We wstępie autorka zaprezentowała realizowaną tematykę w bardzo szerokim kontekście całego układu immunologicznego. Wstęp ten jest doskonałym przykładem jak lekkim, ciekawym i przystępnym językiem można przedstawiać zagadnienia bardzo rozbudowane i skomplikowane, nie tonąc w nadmiarze szczegółów i zawiłości. Co ciekawe, mimo tak szerokiego, a tym samym z konieczności bardzo uogólnionego podejścia, autorka ustrzegła się znaczących nieścisłości lub nadmiernych uproszczeń. Wyjątkiem jest tu jedynie trochę zbyt zawężona definicja antygeny podana we wstępie do podrozdziału 1.2, nie wpływa to jednak na czytelność dalszej części opracowania. Ogólny opis roli układu immunologicznego zawężony jest w kolejnych podrozdziałach do roli limfocytów T i związanych z tym mechanizmów, a następnie do przedstawienia roli immunologicznych punktów kontrolnych – tematu pracy doktorskiej. Autorka charakteryzuje po krótko klasy strukturalne tych białek, a następnie przechodzi do bardziej szczegółowego omówienia konkretnych białek stanowiących temat rozprawy. Następnie autorka przechodzi do opisu roli punktów kontrolnych układu immunologicznego w chorobach nowotworowych i wykorzystania tych białek jako celów terapeutycznych – umiejscawiając tym samym swoje badania w kontekście medycznym. Ostatnia część wstępu przybliży stosowaną w pracy metodologię badawczą i jest to jedyny fragment tej części rozprawy który wydaje mi się zbędny. Chromatografia powinowactwa i testy ELISA to metodologia o tak ugruntowanej pozycji w dziedzinie badań, że nie wydaje mi się konieczne poświęcanie im miejsca w wstępie do rozprawy doktorskiej. Odpowiednim miejscem jest tutaj raczej część „Materiały i metody”, gdzie przecież została zawarta np. informacja o równie skomplikowanej syntezie peptydów, itp. Powyższa uwaga nie umniejsza znacząco jakości pracy – stanowi bardziej wskazanie nieścisłości w kompozycji.

Wstęp jest ilustrowany odpowiednio dobranym materiałem graficznym pomagającym usystematyzować podane w opisie informacje.

Zaletą pracy jest bardzo jasne zdefiniowanie celów badawczych i prowadzenie części opisującej wyniki (a więc i samych badań) odpowiednio do przedstawionych celów. Parafrazując za rozdziałem „Cel pracy”, autorka dąży do uzyskania:

- (1) charakterystyki strukturalnej białka CD160
- (2) charakterystyki strukturalnej kompleksu CD160 – HVEM
- (3) uzyskania peptydowych inhibitorów formowania kompleksu.

Pierwszy z postawionych celów pracy autorka analizuje przede wszystkim metodą HDX-MS. Na początku prostymi metodami biochemicznymi określa stopień oligomeryzacji CD160, następnie optymalizuje sposób przygotowania map peptydowych (w tym przypadku wskazana byłaby jednak dalsza optymalizacja celem uzyskania jeszcze lepszego pokrycia sekwencji) i analizuje wymianę H/D dla wolnego białka. Równolegle współpracownicy prowadzą modelowanie homologiczne białka. Konkluzją jest ogólna zgodność modelu *in silico* z danymi eksperymentalnymi (w pracy brakuje mi rysunku pokazującego tę zgodność – np. struktury pokolorowanej „mapami cieplnymi” wymiany H/D).

Drugi cel pracy analizowany jest przy wykorzystaniu podobnej metodologii. Test wiązania ELISA pozwala na określenie wpływu glikozylacji na wiązanie CD160/HVEM. Metoda HDX-MS pozwala wyznaczyć fragmenty białka CD160 odpowiedzialne za wiązanie (brakuje mi tutaj analogicznej analizy dla białka HVEM). Równolegle, modelowanie molekularne pozwala na stworzenie modelu oddziaływania który potwierdzają dane HDX-MS i inne zebrane dane (ponownie, w pracy brakuje rysunku zbiorczo podsumowującego zebrane wyniki, np. poprzez zaznaczenie na modelu strukturalnym fragmentów odpowiedzialnych za oddziaływanie wyznaczonych innymi metodami). Równolegle autorka analizuje oddziaływanie przez „fragmentację” białka CD160 na krótkie peptydy, z założeniem iż wybrane z nich będą naśladować wiązanie całego białka. Założenie, iż krótkie peptydy, fragmenty  $\beta$ -kartek, mogą naśladować wiązanie odpowiednich fragmentów białka wydało mi się bardzo „na wyrost”. Choć autorka przytacza dość jednoznaczne wyniki wskazujące na taką właśnie konkluzję, myślę, że dla uzyskania pełniejszego dowodu należałoby uwzględnić jeszcze dodatkowe kontrole i eksperymenty przeprowadzone komplementarnymi metodami. Wątpliwość ta wynika głównie z faktu, iż w swoich badaniach analizuję podobnie słabe oddziaływania i wiem jak w przypadku związków o niskim powinowactwie łatwo przez długi czas pozostawać w błędnym przekonaniu co do wiązania danego związku, nawet pomimo zastosowania szeregu komplementarnych metod zdających się wskazywać, iż taka konkluzja jest poprawna.

Realizując trzeci cel postawiony sobie w pracy autorka projektuje i syntetyzuje szereg peptydów – fragmentów białek CD160, BTLA i gD, a następnie analizuje ich wpływ na tworzenie kompleksu CD160/HVEM przy pomocy kompetycyjnego testu ELISA. Ogólną konkluzją tej części prac jest stwierdzenie, że jedynie wybrane, stabilizowane mostkami dwusiarczkowymi peptydy są skutecznymi inhibitorami. Jest to wynik znaczący. Autorka osiąga prostymi metodami wynik (cząsteczkę) umożliwiającą przyszłą kontynuację tych niezwykle ciekawych badań w kierunku optymalizacji jej potencjału inhibicyjnego, a w dalszej przyszłości być może także i terapeutycznego. Wynik ten jednak jednocześnie wskazuje, iż wyniki badania bezpośredniego wiązania krótkich peptydów w punkcie poprzednim wymagają być może rewizji (peptydy takie powinny wykazywać aktywność inhibicyjną, co nie zostało wykazane w pracy – peptydy były testowane i nie hamowały oddziaływania). Bardzo brakuje także ilościowego określenia powinowactwa zidentyfikowanych cząsteczek i choćby podstawowej analizy SAR (ang. structure-activity relationship). Dane te pozwoliłyby na ocenę wartości uzyskanych związków pod kątem ich dalszego rozwoju.

Podsumowując, pomimo pewnych uwag które tutaj wyraziłem – bardziej jako kierunek dalszych prac, niż zastrzeżenia do rozprawy, przeprowadzona analiza daje przejrzysty wstępny obraz oddziaływania CD160/HVEM i dostarcza pierwszych znanych inhibitorów tego oddziaływania. Stanowi to niewątpliwą wartość przedstawionej rozprawy. Przeprowadzone badania wymagają kontynuacji, modele potwierdzenia metodami strukturalnymi, a inhibitory optymalizacji powinowactwa. Jednak podstawy zostały ustanowione, a kontynuacja badań

jest, jak rozumiem, tematem prac podejmowanych w Katedrze w której doktorantka realizowała swoje badania.

W tym miejscu nasuwa mi się pytanie, jak doktorantka widzi kontynuację swoich prac (przez siebie lub innych członków grupy)? Jakie eksperymenty można by wykonać w bliższej i dalszej przyszłości by potwierdzić / rozszerzyć uzyskane wyniki? Wyniki, które w szerszej perspektywie należy traktować raczej jako wyniki wstępne, niż wyczerpujący opis podjętego problemu. Jakie doktorantka widzi ograniczenia w przeprowadzonych już doświadczeniach i jak można by się do nich odnieść eksperymentalnie?

Poza kwestiami merytorycznymi, bardzo podoba mi się fakt, że dla zapewnienia ciągłości wyводу, autorka nie obawia się wykorzystać w swojej pracy fragmentów opracowań współpracowników (oczywiście odpowiednio oznaczonych w tekście). Praca doktorska to praca naukowa. W dziedzinie badań reprezentowanej przez doktorantkę normą jest praca zespołowa. Dość często jednak można spotkać się z opinią, iż prace doktorskie powinny opisywać jedynie dokonania indywidualne. Oczywiście ważny jest w nich przede wszystkim wkład głównego autora, jednak powinny one stanowić merytoryczną całość i stosunkowo często spotykane, nienaturalne oddzielanie w tekście dokonań indywidualnych od zespołowych psuje jedynie kompozycje tekstu, który staje się pofragmentowany i nieczytelny. Nie ma to miejsca w przypadku tej pracy.

Dyskusja jest w dużej mierze powtórzeniem opisu wyników. Nie jest to jednak zarzut, a raczej odwrotnie. Rozdział ten pomaga usystematyzować wyniki przedstawione w poprzednim rozdziale. Osobiście wolę połączenie tych dwóch rozdziałów w jeden, co pomaga uniknąć powtórzeń, jednak przyjętym dla tego typu opracowań wzorem jest właśnie ten zastosowany przez doktorantkę. Literatura przedmiotu jest w temacie badań dość ograniczona, a uzyskane wyniki prezentują zagadnienie całkowicie nowe, dlatego uważam iż doktorantka bardzo dobrze wybrnęła z problemu konstrukcji klasycznej dyskusji wyników.

Rozdział dotyczący metodologii jest zwięzły. Jest to jego niewątpliwą zaletą, gdyż jednocześnie w sposób wyczerpujący prezentuje zastosowane w rozprawie procedury badawcze.

Podsumowując ocenę rozprawy, przedstawione do recenzji opracowanie stanowi spójną całość prezentującą ciekawe podejście do podejmowanego zagadnienia. Niewątpliwe osiągnięcia, w postaci modelu struktury CD160 i kompleksu CD160/HVEM popartych danymi eksperymentalnymi oraz przede wszystkim uzyskaniem peptydowych inhibitorów tego oddziaływania, stanowią istotny postęp w dziedzinie badań. Jednocześnie, szereg poruszanych tematów wymaga dalszego, bardziej szczegółowego opracowania.

Równolegle do ogólnie wysokiej oceny przedstawionej pracy, mam także kilka uwag. Nie są to uwagi krytyczne, a raczej sugestie które mam nadzieje pozwolą w przyszłości pełniej rozwinąć badania w interesującym obszarze. Nie wpływają one w żadnym stopniu negatywnie na ocenę pracy, a wynikają z obowiązku recenzenta który traktuje jako wyrażenie opinii i wskazanie potencjalnego kierunku rozwoju / ulepszenia. W moim odczuciu przeprowadzone eksperymenty stanowią minimum tego co można obecnie zrobić by odpowiedzieć na postawione pytania i wymagają w wielu kwestiach dalszego opracowania. Oczywiście stawiane pytania są bardzo szerokie i pełna odpowiedź na nie mogłaby stanowić temat więcej niż jednego doktoratu, niektóre jednak kwestie mogłyby być niewielkim nakładem pracy lepiej rozwinięte. Np. w analizie HDX-MS pokrycie niektórych fragmentów białka jest niewielkie (lub

brak go w ogóle). Autorka podejmuje kroki w kierunku optymalizacji procedury, niemniej są one ograniczone. Zastosowanie jeszcze innych metod trawienia, warunków rozdziału i analizy MS powinno pozwolić na znacznie lepsze pokrycie sekwencji. Testy wiązania peptydów są przeprowadzone metodami ELISA i testów powinowactwa, które nie pozwalają na wyznaczenie stałych dysocjacji. Istnieje szereg komplementarnych metod takich jak FRET, HTRF, MST, ITC, SPR, FP, NMR i inne, które pozwalają wyznaczyć ilościowo parametry oddziaływania w roztworze. W tej pracy byłoby to szczególnie istotne z uwagi na problemy ze specyficnością opracowywanych testów ELISA. Wybrane metody komplementarne warto byłoby wykorzystać do charakterystyki najlepszych opracowanych inhibitorów. Określenie czy dana cząsteczka stanowi rzeczywisty inhibitor czy jedynie cząsteczkę interferującą z danym rodzajem testu jest nietrywialne i często zdarza się, że przez długi czas rozwija się inhibitory konkretnego testu (konkretnych testów), a nie rzeczywistego oddziaływania. Jest to fakt znany i nie wynikający z błędnej interpretacji danych, a raczej z braku odpowiednio specyficznych testów w ogólności. Dalej, detekcję w teście powinowactwa można by łatwo rozszerzyć do LC-MS co pozwoliłoby na (pół-)ilościowe oszacowanie wiązania. Warto byłoby podjąć analizę mutacyjną najlepszych inhibitorów by uzyskać choć wstępne dane do dalszej racjonalnej optymalizacji. Oczywiście w szerszej współpracy badania można by rozszerzyć znacznie bardziej, jednak wychodzi to już poza zakres pojedynczego doktoratu.

Autorka pracy jest współautorem trzech publikacji naukowych, w tym pierwszym autorem jednej z nich. Jest to wystarczający dorobek na tym etapie kariery naukowej. Ponadto, swoje wyniki prezentowała na szeregu konferencjach naukowych. W trakcie doktoratu odbyła także krótki staż na Uniwersytecie Wrocławskim. Informacje te nie są przedmiotem recenzji, jednak, poza samymi badaniami przedstawionymi w rozprawie, dobrze świadczą o aktywności naukowej doktorantki.

Podsumowując, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr Katarzynę Kuncewicz jest dobrze przygotowana, ciekawa i spójna merytorycznie. Badania zostały przeprowadzone w sposób kompetentny, z zastosowaniem właściwie dobranej metodologii badawczej. Uzyskane wyniki zostały poprawnie zinterpretowane technicznie oraz właściwie skontrastowane ze stanem wiedzy. Wnioski wyciągnięte przez autorkę są wyważone, brak w nich nadmiernej przesady i nadinterpretacji.

**Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kuncewicz spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Według mojej oceny dorobek naukowy kandydatki w pełni uzasadnia nadanie jej stopnia naukowego doktora. Dlatego wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani magister Katarzyny Kuncewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



dr hab. Grzegorz Dubin, prof. UJ  
Kierownik Grupy Badawczej  
Krystalografii Białek MCB UJ