



Dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil, prof. UMCS
Katedra Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin, 17.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Edyty Żyły pt. „Charakterystyka wybranych inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych” wykonanej w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz w Pracowni Krystalografii Białek Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Berety oraz prof. dr hab. Grzegorza Dubina

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod tytułem „Charakterystyka wybranych inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych” koncentruje się na zagadnieniu poszukiwania nowych immunoterapii przeciwnowotworowych skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1. Wspomniany punkt kontroli immunologicznej posiada ogromne znaczenie kliniczne. PD-1 jest obecny na powierzchni aktywnych limfocytów T i B, komórkach NK i makrofagocytach. Integracja PD-1 z jego ligandem PD-L1, zlokalizowanym m.in. na powierzchni limfocytów T i B, makrofagów oraz komórkach dendrytycznych prowadzi do ograniczania aktywacji limfocytów T cytotoksycznych i zahamowania proliferacji. Aktywacja osi PD-1/PD-L1 jest obserwowana w wielu typach nowotworów, sprzyjając ich rozwojowi. Blokowanie wspomnianej osi poprzez stosowanie inhibitorów immunologicznych jest jednym z ważniejszych osiągnięć immunoterapii ostatnich lat i strategią, z którą wiąże się wielkie nadzieje na przyszłość. Prym w tym zakresie wiodą przeciwciała monoklonalne. Jednak wysokie koszty pozyskania, nie zawsze satysfakcjonująca farmakokinetyka oraz penetracja tkanki guza, jak również pojawiające się skutki uboczne, powodują ograniczenia w wykorzystaniu przeciwciał terapeutycznych oraz obniżenie skuteczności leczenia. Poszukuje się więc alternatywnych sposobów i związków blokujących wspomnianą oś. Dlatego też badania podjęte przez Doktorantkę precyzyjnie wpisują się w ten nurt badań.



W pracy przedstawiono trzy alternatywne strategie oparte o aktywne i pasywne mechanizmy immunoterapii przeciwnowotworowej skierowanej przeciwko osi PD-1/PD-L1.

Pierwsza z nich oparta została na wykorzystaniu systemu flagelinowego bakterii *Salmonella enterica* serotyp Typhimurium, jako wektora do sekrecji białka HAC-V, stanowiącego zmodyfikowaną domenę PD-1. Doktorantka wykazała, iż tylko fuzyjne białko FlgD-HAC-V w zmutowanych bakteriach szczepu dzikiego LT2 ulega sekrecji, co w znacznym stopniu ogranicza skuteczność terapeutyczną zaproponowanej metody.

Druga strategia miała na celu określenie zdolności wiązania dwóch nowych aptamerów do białek PD-1 i PD-L1 na powierzchni wybranych komórek *in vitro*. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania potwierdziły tę właściwość, jednak nie wykazały efektu biologicznego hamowania tworzenia kompleksu PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym. Ponieważ przebadane aptamery nie wywoływały efektu cytotoksycznego, zaproponowano ich alternatywne wykorzystanie w diagnostyce i obrazowaniu.

Trzecia zaproponowana strategia opierała się na wykorzystaniu makrocyklicznego peptydu p104 wiążącego białko PD-L1. Doktorantka jednoznacznie potwierdziła tworzenie kompleksu pomiędzy wspomnianymi białkami oraz jego hamujące właściwości na osi PD-1/PD-L1 w układzie komórkowym *in vitro*. Analiza strukturalna ujawniła, że kompleks utrzymywany jest dzięki siłom oddziaływań hydrofobowych oraz elektrostatycznych.

Badania podjęte przez mgr Edytę Zając zostały dobrze przemyślane, zaplanowane i konsekwentnie zrealizowane z wykorzystaniem adekwatnych metod badawczych. Na podkreślenie zasługuje umiejętne i logiczne wykorzystanie posiadanych danych, jak również odwaga i ryzyko w podejmowaniu kolejnych działań naukowych w celu modyfikacji i ulepszenia strategii terapeutycznych.

Analizując formalną stronę rozprawy doktorskiej mgr Edyty Zając, została ona przygotowana bardzo starannie i przejrzyście. Układ pracy jest poprawny oraz zawiera typowy dla tego typu opracowania podział treści. Rozprawa liczy 230 stron i składa się z dziewięciu głównych rozdziałów (1. i 2. Streszczenie w języku polskim i angielskim, 3. Wykaz skrótów, 4. Wstęp, 5. Cele naukowe, 6. Materiały i metody, 7. Wyniki i wnioski, 8. Dyskusja, 9. Załączniki). Całość kończy spis literatury. We wstępie Doktorantka w bardzo interesujący sposób przedstawiła wszystkie najważniejsze zagadnienia niezbędne do przybliżenia podjętej tematyki badawczej oraz właściwej interpretacji otrzymanych rezultatów. Tekst został wzbogacony rysunkami, co stanowi dodatkowy atut estetyczny i poznawczy. Metodyka badań została



dobrana adekwatnie do nakreślonego celu i umożliwiła uzyskanie niezbędnych danych, potwierdzających postawione tezy. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz zastosowanych eksperymentów, obejmujący poziom genetyczny, białkowy oraz komórkowy. Opis wyników jest jasny i klarowny. Został prawidłowo podzielony na trzy części, odpowiadające trzem zaproponowanym strategiom. Umieszczenie syntetycznego podsumowania po każdej z nich, celnie punktuje najważniejsze osiągnięcia. Dyskusja została napisana bardzo dojrzałe, z dużą dozą krytycyzmu. Doktorantka bardzo wnikliwie porównuje uzyskane rezultaty z doniesieniami innych badaczy. Świadczy to o rozległej wiedzy, dobrej znajomości zagadnień opisywanych w pracy, o kreatywnym myśleniu i ciekawości naukowej. Literatura wykorzystana do napisania pracy jest niezwykle obszerna i obejmuje aż 537 pozycji bibliograficznych.

Praca doktorska mgr Edyty Zając reprezentuje wysoki poziom merytoryczny, jednak w trakcie jej czytania zauważyłam kilka błędów i nieścisłości, które z racji funkcji Recenzentki chciałabym przedstawić.

- (1) W pracy pojawia się zwrot ekspresja białka, który jest niepoprawny. Ekspresji ulega gen kodujący określone białko. W przypadku proteiny możemy mówić o jej ilości lub poziomie.
- (2) W rozdziale Materiały i metody brak opisu techniki Western Blot, której wyniki zaprezentowano na Rysunku 11, str.105. Brak danych o warunkach transferu i reakcji identyfikacji białek na membranie, ilości białka nanoszonego na żel, rodzaju i stężeniach zastosowanych przeciwciał. Czy poziom DnaK oraz HAC-V był badany na tej samej membranie?
- (3) Na Rysunkach 1-4 należałoby umieścić dodatkowe informacje dotyczące rodzaju zaprezentowanych komórek oraz poszczególnych organelli komórkowych. Opisy pod rysunkami powinny być bardziej szczegółowe, a skróty dodatkowo wyjaśnione, aby uniknąć konieczności ich szukania w tekście rozprawy.
- (4) W wykazie angielskich skrótów powinno znaleźć się angielskie, jak i polskie wyjaśnienie.
- (5) W pracy pojawiają się drobne błędy edytorskie oraz liczne powtórzenia.

Pomimo wskazania kilku nieścisłości chciałabym podkreślić, iż rozprawa doktorska przygotowana przez mgr. Edytę Zając jest bardzo wartościowym opracowaniem z zakresu badań nad nowymi terapiami immunologicznymi wykorzystywanymi w leczeniu nowotworów. Prezentuje wysoki poziom naukowy.



Znacząco poszerza wiedzę o możliwości wykorzystania makrocyklicznych peptydów klasy III w projektowaniu i optymalizacji immunoterapii skierowanych przeciwko osi PD-1/PD-L1, co stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauk biologicznych. Uzyskane wyniki stanowią dobrą podstawę do dalszych badań nad możliwością ich praktycznego wykorzystania.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymagania 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 przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Edyty Zając do dalszych etapów przewodu doktorskiego, rekomendując jednocześnie wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Kierownik Katedry
Joanna Jakubowicz-Gil
Dr hab. Joanna Jakubowicz-Gil, prof. UMCS

