

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 59, tel +48-58- 5236056 e-mail: joanna.skorko-glonek@ug.edu.pl

Prof. dr hab. Joanna Skórko-Glonek
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 7.09.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Edyty Żyły
zatytułowanej: „Charakterystyka wybranych inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych”

Recenzja została przygotowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 27. 06. 2023 r.

Recenzowana rozprawa doktorska powstała pod kierunkiem promotorów prof. dr hab. Joanny Berety oraz prof. dr. hab. Grzegorza Dubina.

Rozprawę doktorską stanowi przygotowana w języku polskim praca pisemna o klasycznym układzie, z wyodrębnionymi głównymi częściami: Wstęp (53 str.), Cele naukowe (1 str.), Materiały i metody (23 str.), Wyniki i wnioski (64 str.), Dyskusja (16 str.). Na początku pracy zostało umieszczone „Wprowadzenie” (zawierające listę osiągnięć naukowych Doktorantki, źródła finansowania pracy i uzyskane patenty), spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów. Na końcu rozprawy znajdują się załączniki i spis odnośników literaturowych.

Oceniana rozprawa obejmuje charakterystykę trzech strategii hamowania oddziaływania białek PD-1 i PD-L1, które stanowią kluczowy element negatywnej regulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej. W warunkach zachowanej homeostazy organizmu istnieje równowaga pomiędzy sygnalizacją prozapalną i przeciwzapalną, utrzymywaną przez punkty kontrolne odporności. Komórki nowotworowe zakłócają tę równowagę, promując stan immunosupresyjny, który sprzyja



wzrostowi nowotworu. W celu przezwyciężenia tych stanów immunosupresyjnych stosowane są inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych, które działają poprzez blokowanie działania wybranych szlaków hamujących. Efektywne zahamowanie osi PD-1/PD-L1 w komórkach nowotworowych prowadzi do aktywacji odpowiedzi antynowotworowej. Są dostępne leki anti-PD-1 (niwolumab, pembrolizumab, cemiplimab) i anti-PD-L1 (atezolizumab, awelumab, durwalumab), które zostały zatwierdzone do stosowania w leczeniu wielu nowotworów, co poprawiło wyniki leczenia, a trwałą odpowiedź zaobserwowano nawet po zaprzestaniu terapii. Ich skuteczność jest jednak ograniczona do niewielkiej liczby pacjentów. W związku z tym podjęcie badań zmierzających do poszerzenia wiedzy w zakresie możliwości ingerencji w funkcjonowanie osi PD-1/PD-L1 uważam za zasadne, a uzyskane wyniki mogą potencjalnie znaleźć praktyczne zastosowanie.

Badania Doktorantki skupiły się na charakterystyce wybranych cząsteczek, które mogłyby zaburzyć oddziaływanie białek PD-1 i PD-L1. Na uwagę zasługuje wielopłaszczyznowe podejście do problemu badawczego. Doktorantka nie ograniczyła się do jednej strategii hamowania oddziaływań białek PD-1 i PD-L1, lecz podjęła badania dotyczące trzech różnych grup cząsteczek wykazujących powinowactwo do PD-1 lub PD-L1. Były to (1) białka fuzyjne wiążące się do PD-L1 wydzielane przez bakterie *Salmonella* Typhimurium trzecim systemem sekrecji, (2) aptamery skierowane przeciwko PD-1 lub PD-L1 oraz (3) makrocycliczny peptyd o powinowactwie do PD-L1. Podjęta przez Doktorantkę tematyka wpisuje się w nurt badań intensywnie prowadzonych na całym świecie, których celem jest modulowanie immunologicznych punktów kontrolnych, w tym osi PD-1/PD-L1. Podkreśla to ważność problemu, nie umniejszając jego nowatorskości.

Streszczenie (oraz „Abstract”) w odpowiedni sposób przedstawia tematykę rozprawy i jej cele oraz opisane w rozprawie wyniki.

Dobór zagadnień zawarty we „**Wstępie**” uważam za właściwy, a szczegółowy i przystępny sposób ich przedstawienia umożliwia czytelnikowi zapoznanie się z problemem badawczym podejmowanym w rozprawie i dobrze wprowadza go do dalszych rozdziałów pracy. Pierwsza część wstępu zawiera ogólną charakterystykę rozwoju nowotworu i relacje między komórkami nowotworowymi a układem odpornościowym. Następnie Autorka skupiła się na funkcjonowaniu osi PD-1/PD-L1, włączając proces nowotworzenia. Obszerna część wstępu została poświęcona strategiom immunoterapii przeciwnowotworowej, ze szczególnym naciskiem na te, które zostały wykorzystane w rozprawie.

Podsumowując, rozdział ten porusza zakres tematyczny odzwierciedlający przedmiot badań Doktorantki i zagadnienia poruszane w dyskusji. Do pełnego komfortu zabrakło mi większej liczby schematów, ilustrujących opisane współzależności, zwłaszcza w sekcji 4.3, gdzie występuje szczególne nagromadzenie informacji.

Cele naukowe pracy zostały jasno określone i przedstawione w dedykowanym rozdziale dysertacji. Nadrzędnym celem pracy, zawartym w tytule rozprawy, było przeprowadzenie charakterystyki wybranych inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego, osi PD-1/PD-L1. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na zbyt uogólniony moim zdaniem tytuł rozprawy, który sugerował pracę na więcej niż jednym immunologicznym punkcie kontrolnym. Uważam, że sprecyzowanie bardziej szczegółowego tytułu, wymieniającego oś PD-1/PD-L1, lepiej oddawałoby zakres badań przedstawionych we rozprawie. Wymienione cele szczegółowe obejmowały badania nad systemem

bakteryjnym wydzielającym potencjalnie inhibitorowe białka, charakterystykę aptamerów i makrocyclicznych peptydów jako inhibitorów osi PD-1/PD-L1.

Rozdział „**Materiały i metody**” w sposób wyczerpujący i pozwalający na powtórzenie badań przedstawia zbiór materiałów wykorzystanych w pracy i protokołów wykonanych doświadczeń. Na uwagę zasługuje bogactwo różnorodnych metod, w tym bardzo zaawansowanych, jakie zostały wykorzystane podczas realizacji celów badawczych. Wprawdzie nie wszystkie pomiary były wykonywane osobiście przez Doktorantkę, to jednak przygotowanie materiału, interpretacja wyników i ich dyskusja zostały już przeprowadzone przez Autorkę dysertacji.

W rozdziale „**Wyniki i wnioski**” Doktorantka przedstawiła kolejno rezultaty badań dotyczących trzech strategii hamowania osi PD-1/PD-L1 wraz z wnioskami na końcu każdej z części. Mimo iż badania nie zakończyły się pełnym sukcesem i nie udało się Autorce wydajnie zahamować wyżej wymienionych oddziaływań żadną zastosowaną strategią, powstały bardzo wartościowe wyniki, które mogą stanowić dobry punkt wyjścia do dalszych prób inhibicji osi PD-1/PD-L1.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki uważam:

- (1) uzyskanie i scharakteryzowanie szczepu *S. Typhimurium* LT2 *AfliC AflgK* zdolnego do sekrecji białka fuzyjnego FlgD-HAC-V;
- (2) wykazanie wiązania aptameru L2c2s do białka PD-L1 oraz aptamerów P2c2s i p34 do PD-1 na powierzchni komórek ssaczych, co umożliwia ich wykorzystanie w diagnostyce;
- (3) przeprowadzenie wnikliwej analizy struktury krystalicznej kompleksu makrocyclicznego peptydu p104 z zewnątrzkomórkową dystalną domeną białka PD-L1 i porównanie oddziaływań PD-L1-p104 z uprzednio scharakteryzowanymi oddziaływaniami PD-L1-p101.

Podsumowując tę część pracy uważam, że Pani mgr Edyta Żyła uzyskała bardzo interesujące wyniki, które znacząco pogłębiły wiedzę na temat własności cząsteczek wykazujących powinowactwo do białek PD-1 lub PD-L1, o charakterze potencjalnie inhibitorowym. Rezultaty badań zostały już częściowo opublikowane w dwóch artykułach naukowych; Doktorantka jest pierwszym autorem jednego z nich.

W rozdziale „**Dyskusja**” Doktorantka odniosła się do uzyskanych wyników i przeprowadziła ich bardzo wnikliwą analizę. W pierwszej kolejności Autorka ustosunkowała się do możliwości wykorzystania systemu flagelinowego bakterii *S. Typhimurium* jako układu wydzielającego białka fuzyjne o potencjale terapeutycznym. Bardzo umiejętnie zostały skonfrontowane uzyskane wyniki z bieżącym stanem wiedzy na temat własności użytych szczepów *Salmonella* oraz systemu flagelinowego. Zostały zaproponowane dalsze strategie badań, których efektem końcowym mogłoby być uzyskanie efektu biologicznego w postaci przywrócenia aktywacji limfocytów T. Szkoda, że Doktorantka nie kontynuowała tego wątku badawczego, gdyż wydaje się być obiecujący. Zdaję sobie jednak sprawę, że ograniczenia czasowe związane z prowadzeniem wielowątkowych badań, uniemożliwiły podjęcie dalszych prac nad ulepszeniem modelu *Salmonella*. W kolejnej części „Dyskusji” Autorka odniosła się do charakterystyki użytych w pracy aptamerów ssDNA. Pani mgr Żyła w logiczny i merytoryczny sposób podaje możliwe przyczyny braku zdolności hamowania oddziaływań PD-1 z PD-L1 na powierzchni komórek, mimo ewidentnych interakcji obserwowanych

w układzie oczyszczonych cząsteczek. W związku z brakiem efektu biologicznego względem osi PD-1/PD-L1 Doktorantka proponuje wykorzystanie przebadanych aptamerów jako narzędzi diagnostycznych do identyfikacji PD-1 lub PD-L1 w preparatach. Ostatnim diskutowanym zagadnieniem była charakterystyka biochemiczna i strukturalna makrocyklicznego peptydu p104. Na duże uznanie zasługuje bardzo skrupulatne porównanie oddziaływań p104/PD-L1 z interakcjami występującymi w kompleksie PD-1/PD-L1 i p101/PD-L1.

Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na znajomość tematyki badawczej i umiejętność umieszczenia wyników swoich badań w kontekście danych opublikowanych przez inne zespoły badawcze. Zabrakło mi natomiast krótkiego podsumowania, spinającego wyniki trzech zastosowanych w pracy strategii i ich dyskusję. Oczywiście umieszczanie takiego rozdziału nie jest obowiązkowe, ale pozwala na wypunktowanie najważniejszych osiągnięć i sformułowanie końcowych wniosków.

Liczący aż 537 pozycji rozdział „**Literatura**” zawiera zestaw publikacji związanych z tematyką dysertacji i użytą metodyką. Dobór cytowań uważam za prawidłowy.

Lektura dysertacji nasunęła mi kilka pytań/ komentarzy, które chciałabym poddać dyskusji podczas obrony:

1. Autorka wspomina w tekście, że system flagelinowy T3SS nie jest dokładnie zbadany u *Salmonella*, w związku z czym trudno jest przewidzieć efekty braku poszczególnych składników zaangażowanych w budowę wici. Czy brane były pod uwagę inne systemy transportu białek? Taka alternatywę mogłyby stanowić autotransportery (T5SS), które zawierają domeny tzw. „pasażera”. Czy Doktorantka widziałaby możliwość wprowadzenia białka HAC-V w miejsce domeny „pasażera”, np. analogicznie do Jong et al., 2012 (<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-85>)?
2. Czy była sprawdzana stabilność aptamerów w warunkach prowadzonych doświadczeń? Biorąc pod uwagę efektywne wiązanie się aptamerów do ligandów w układzie oczyszczonych cząsteczek i brak ich efektu biologicznego, czy jest możliwe, że ulegają one degradacji podczas testów z wykorzystaniem linii komórkowych?
3. Czy znając miejsca wiązania (kieszenie wiążące) na powierzchni PD-L1 można byłoby np. metodą modelowania molekularnego sprawdzić czy używane w pracy aptamery „pasują” do tych miejsc? Być może wyjaśniłoby to brak efektu inhibicji oddziaływań PD-1/PD-L1.

Uwagi ogólne

Praca jest napisana w sposób przejrzysty i logiczny, zwięzłe, bez zbędnych dygresji, ale równocześnie z wystarczającą ilością szczegółów. Tekst wzbogacają liczne ryciny (51 w części głównej i 6 w załącznikach) oraz tabele (5 w części głównej).

Z obowiązku recenzenta przedłożonej rozprawy doktorskiej chciałam wskazać pewne błędy, których nie udało się Doktorantce uniknąć podczas przygotowywania dysertacji:

1. Nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniami, że wartość CFU „odpowiada liczbie żywych bakterii” (str. 81) i „nie wszystkie bakterie w zawiesinie obserwowane poprzez pomiar gęstości optycznej są w stanie podjąć podziały na podłożu stałym co sugeruje, że są martwe” (str. 113). Nie wszystkie

żywe komórki bakteryjne są zdolne do namnażania w warunkach eksperymentalnych. Należy tu wymienić bakterie określane jako VBNC (viable but not culturable).

2. Wystąpił błąd podczas numerowania poszczególnych podrozdziałów pracy. Sekcje oznaczone 7.9.1, 7.9.2 i 7.9.3 występują w manuskrypcie trzykrotnie: w części 7.3, 7.7 i w prawidłowym miejscu 7.9.

3. W wykazie skrótów „APC” jest wymienione dwukrotnie i są podane dwa różne rozwinięcia. Skrót PEG, FLP nie zostały wymienione w wykazie, brakuje także ich rozwinięć przy pierwszym zastosowaniu.

4. W tekście występują dość częste błędy edytorskie, interpunkcyjne, żargon laboratoryjny (np. „ukompetentnianie”, „zwirowano”, „stransformowane”) i niepotrzebne zapożyczenia z języka angielskiego (szczególnie często nadużywany termin „target”). Nie jestem przekonana czy termin „awidność” jest właściwie użyty w kontekście oddziaływań aptameru z ligandem. Używa się go raczej do oddziaływań przeciwciał IgG z antygenem.

Na stronie 100 występuje wyrażenie „pod kontrolą promotora białka SifB”; powinno być raczej „pod kontrolą promotora genu *sifB*”.

5. Niektóre ryciny zostały przedstawione w zbyt małym formacie (lub zamieszczone podpisy mają zbyt małą czcionkę), co utrudnia czytelnikowi zapoznanie się z ich treścią. Dotyczy to w szczególności rys. 8A, 16A, 30 i S4B.

Wartość merytoryczną rozprawy oceniam wysoko i wspomniane powyżej uchybienia nie umniejszają wartości pracy. Badania zostały przeprowadzone w sposób kompetentny z zastosowaniem właściwie dobranej metodologii badawczej. Na uznanie zasługuje bogactwo technik, którymi się posługiwała Doktorantka w czasie wykonywania doświadczeń. Przedstawione wyniki są opisane poprawnie i w wielu przypadkach stanowią podstawę do planowania dalszych badań. Przeprowadzona dyskusja świadczy o głębokiej wiedzy Doktorantki i jej umiejętności skonfrontowania rezultatów własnych badań z danymi literaturowymi. Nie mam w związku z tym wątpliwości, iż Pani mgr Edyta Żyła dobrze opanowała warsztat naukowy w zakresie biochemii, biologii molekularnej i mikrobiologii. Przedstawione w rozprawie wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i są cennym uzupełnieniem wiedzy na temat własności cząsteczek oddziałujących z białkami PD-1 i PD-L1, mogących znaleźć zastosowanie w diagnostyce lub jako punkt wyjścia do opracowania cząsteczek o własnościach inhibitorowych.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona rozprawa całkowicie spełnia wszystkie 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 wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Edyty Żyły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy oraz opublikowanie części wyników w dobrych recenzowanych czasopismach naukowych, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Jocunda Stepińska-Głowacka