



Politechnika Łódzka

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej



Łódź, 08.04.2025

Dr hab. inż. Bartosz Sekuła
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
e-mail: bartosz.sekula@p.lodz.pl
tel.: 42 631-34-41

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Piotrowskiej „Badania strukturalne receptorów sygnałowych HVEM i CD160”

Rozprawa doktorska mgr inż. Marty Piotrowskiej została wykonana pod kierunkiem promotorskim prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło oraz dr Marty Orlikowskiej w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Badania opisywane w rozprawie dotyczą komponentów układu immunologicznego – białka receptorowego CD160 oraz jego liganda, białka HVEM. Są to białka stanowiące punkt kontrolny układu odpornościowego, zapewniający jego równowagę poprzez zahamowanie aktywacji limfocytów T CD4⁺. Doktorantka wskazuje oddziaływanie HVEM/CD160 jako jeden z potencjalnych celów immunoterapii nowotworów poprzez zastosowanie inhibitorów blokujących powstawanie kompleksu, a więc pobudzających odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym.

Za główny cel pracy doktorantka obrała ustalenie struktury przestrzennej białek HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ i CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾ oraz ich kompleksu. Cel ten uzupełniają dodatkowe cele szczegółowe zakładające: (1) opracowanie wydajnej metody ekspresji i oczyszczania obu białek, (2) znalezienie warunków, w których wzrastają kryształy badanych białek, (3) przeprowadzenie badań strukturalnych białka HVEM z potencjalnym inhibitorem, oraz (4) określenie struktur przestrzennych białek w roztworze za pomocą małokątowego rozpraszania promieniowania X (SAXS). W mojej ocenie, podjęty problem badawczy jest ambitny i podejmuje istotne dla nauki zagadnienia. Zatem teza naukowa postawiona przez doktorantkę jest wartościowym tematem rozprawy doktorskiej. Należy również

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
90-537 Łódź, ul. Stefanowskiego 2/22, budynek A2
tel. 42 631-34-42, w5i51@adm.p.lodz.pl,
www.binoz.p.lodz.pl
Adres do korespondencji:
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116



podkreślić trudność podjętego przez doktorantkę zadania – białka HVEM oraz CD160 są białkami eukariotycznymi, które przechodzą szereg modyfikacji potranslacyjnych. Jednocześnie są to białka fizjologicznie zakotwiczone w błonie komórkowej. Czynniki te generalnie stwarzają wiele trudności w otrzymaniu stabilnej próbki do badań, zwłaszcza strukturalnych, w których wymagana jest stosunkowo duża ilość materiału biologicznego o wysokim stopniu homogenności. W swoich badaniach doktorantka wykorzystała funkcjonalne fragmenty białek, które odpowiedzialne są za tworzenie kompleksu.

Rozprawa doktorska ma klasyczny układ. Na początku przedstawiony jest wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dalej, we wstępie teoretycznym przybliżona jest tematyka prezentowanej pracy oraz wykorzystana metodologia, przybliżające czytelnikowi prowadzone badania. Część wstępu literaturowego napisana jest w sposób zrozumiały i świadczy o dobrej znajomości tematu. Tekst podparty jest licznymi rysunkami i schematami, oraz rozbudowaną bibliografią. Część metodyczna natomiast napisana jest w sposób dość powściągliwy. W mojej ocenie opis metod jest miejscami zbyt ogólny. Stosowane skróty myślowe mogą wprowadzać czytelnika w błąd, jak chociażby: „transformacja wektora ekspresyjnego do komórek E. coli na płytkach agarowych” (strona 56); „każdy punkt na obrazie to ugięta wiązka promieniowania, która przeszła przez kryształ i została zarejestrowana przez detektor” (strona 77); czy też „przy użyciu oprogramowania obliczana jest mapa gęstości elektronowej cząsteczki w kryształach oraz symetria grupy przestrzennej” (strona 78). Część dotycząca biologii strukturalnej, będącej fundamentem dla postawionego celu pracy mogłaby być lepiej przedstawiona. Brak jest opisu metod określenia struktury makromolekuł (zarówno krystalicznych, jak również z wykorzystaniem SAXS). Nie mogę zgodzić się również ze stwierdzeniem ze strony 67 mówiącym o tym, że skład buforu nie ma wpływu na rozdział w chromatografii wykluczenia.

Po wstępie teoretycznym przedstawiony jest cel pracy, a dalej znajduje się część doświadczalna, obejmująca niemal 40 stron, na których prezentowane są wykonane eksperymenty. Omówienie wyników oraz dyskusja stanowią osobne rozdziały, w których w logiczny sposób zestawiono najważniejsze rezultaty. Sposób prezentacji opracowanych protokołów jest dobrze udokumentowany, pozwalając na ewentualne odtworzenie doświadczeń. Doktorantka szczegółowo opisuje swoją pracę na trzech układach ekspresyjnych, optymalizację warunków hodowlanych, protokoły oczyszczania

oraz ponownego fałdowania białek. Obszerny opis świadczy o włożonym nakładzie pracy w uzyskanie stabilnych próbek badanych białek. Opracowane protokoły pozwoliły na uzyskanie preparatu białka CD160 wykazującego lepsze właściwości od białka komercyjnego. Plusem rozprawy jest wykorzystanie różnych metod w badaniu właściwości fizykochemicznych białek oraz ich wzajemnego oddziaływania w obliczu trudności z uzyskaniem kryształów białek o odpowiedniej jakości. Przeprowadzone badania wykazały, że glikozylacja białka HVEM nie wpływa istotnie na wiązanie z jego ligandami oraz że białko zachowuje aktywność biologiczną nawet po odzyskaniu z frakcji nierozpuszczalnej poprzez ponowne fałdowanie. Podobnie jest z białkiem CD160, które zdolne jest do tworzenia kompleksu z HVEM nawet w przypadku braku modyfikacji potranslacyjnych. Są to cenne obserwacje w perspektywie dalszych badań nad cząsteczkami blokującymi powstawanie kompleksu HVEM/CD160. Liczne próby krystalizacyjne podjęte przez doktorantkę niestety nie doprowadziły do uzyskania struktury kompleksu HVEM⁽³⁹⁻¹⁹⁹⁾ i CD160⁽²⁷⁻¹⁵⁷⁾. W trakcie prowadzonych badań struktura tego kompleksu została opublikowana w 2019 przez inną grupę realizującą badania w tym samym obszarze. Mimo tego doktorantka nie porzuciła badań, rozszerzając je o zbadanie oddziaływań z potencjalnymi peptydowymi inhibitorami tworzenia kompleksu HVEM z jego ligandami. Rozprawę kończy syntetyczne podsumowanie najważniejszych osiągnięć pracy, po którym zamieszczono wykaz dorobku naukowego doktorantki oraz spis cytowanej literatury.

W trakcie lektury części wynikowej nasunęły mi się następujące pytania:

- (1) Doktorantka wskazuje na istotne problemy z agregacją białek w czasie eksperymentów SAXS. Czy doktorantka ma pomysł/hipotezę, jak można poradzić sobie z agregatami białkowymi w SAXS?
- (2) Dane dyfrakcyjne dla białka HVEM w układzie jednoskośnym zostały przeprocesowane do rozdzielczości 3,36 Å z akceptowalnymi statystykami. Jest to rozdzielczość, przy której możliwe jest rozwiązanie struktury białka. Nie znalazłem jednak w dyskusji informacji na temat próby rozwiązania struktury HVEM. Czy podjęte zostały takie działania?
- (3) Zastanawia mnie jaki był kąt β dla kryształu trimery HVEM. Bliskość stałych sieciowych b i c mogłaby sugerować wyższą symetrię kryształu. Czy było to sprawdzane?

- (4) Doktorantka prezentuje niskorozdzielczy model struktury HVEM uzyskany w eksperymencie SAXS. Brak jest dyskusji na temat tego, jak podobny jest ten model do struktury krystalicznej. Czy doktorantka podjęła próby nałożenia dostępnej struktury krystalicznej HVEM na uzyskany niskorozdzielczy model SAXS?

Mimo przytoczonych przeze mnie uwag oraz występujących w pracy drobnych błędów edycyjnych moja ocena przedstawionej rozprawy jest pozytywna. Uważam, że dotyczy ona istotnych problemów, jest ciekawa i wnosi dodaną wartość merytoryczną dla bieżącego stanu wiedzy. Wyniki zgromadzone do rozprawy zostały opisane w dwóch artykułach naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w których doktorantka jest pierwszym autorem. Zaprezentowane zostały na licznych wystąpieniach konferencyjnych, w tym dwóch wystąpieniach ustnych wygłoszonych przez doktorantkę. Doktorantka wykazała się również aktywnością w obszarze pozyskiwania funduszy na prowadzenie badań – uzyskała dofinansowanie trzech grantów wewnętrznych Uniwersytetu Gdańskiego.

Podsumowując, rozprawa mgr inż. Marty Piotrowskiej spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów postępowania awansowego.

Dr hab. inż. Bartosz Sekuła