

dr hab. Przemysław Płociński, prof. UŁ

Łódź, 15.04.2025 r.

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

tel.: (048) 042 635 56 06

e-mail: przemyslaw.plocinski@biol.uni.lodz.pl

Recenzja

Rozprawy Doktorskiej

mgr inż. Marty Piotrowskiej

pt. „Badania strukturalne receptorów sygnałowych HVEM i CD160”

wykonanej pod kierunkiem promotorki Prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło

oraz promotorki pomocniczej dr Marty Orlikowskiej

w Katedrze Chemii Medycznej

w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia naukowego doktora

w dyscyplinie nauki chemiczne

przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy łącznie 213 stron maszynopisu i została opracowana w formie monografii. Praca ma klasyczny, przejrzysty układ, obejmujący wprowadzenie teoretyczne, wprowadzenie celu pracy, opis metod badawczych w postaci obszernej części doświadczalnej, rozdział z wynikami i ich analizą, dyskusję otrzymanych wyników a także podsumowanie, wykaz dorobku naukowego i bibliografię. Przejrzystość redakcyjna, układ graficzny rycin i tabel, a także poprawność językowa świadczą o wysokim poziomie staranności redakcyjnej. Szczególne uznanie budzi bardzo rozbudowany i szczegółowy

wstęp teoretyczny zawierający siedem obszernych podrozdziałów, który ukazuje dobre rozeznanie autorki w zakresie badanej tematyki łączącej immunologię, biologię molekularną oraz biologię strukturalną.

Głównym tematem badań Pani mgr inż. Marty Piotrowskiej jest białko **HVEM** (Herpesvirus Entry Mediator, znane też jako TNFRSF14), które odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, pełniąc funkcję receptora dla białek z rodziny TNF (czynniki martwicy nowotworów, *ang. Tumor Necrosis Factor*). HVEM jest obecne na komórkach prezentujących antygen ale i na niektórych typach komórek nowotworowych. Jego zdolność do łączenia się zarówno z ligandami stymulującymi (np. LIGHT, LT α) jak i hamującymi (np. BTLA, CD160) sprawia, że działa jako molekularny „przełącznik” odpowiedzi immunologicznej, równoważąc aktywację i hamowanie limfocytów T oraz komórek NK (limfocyty cytotoksyczne NK, *ang. Natural Killer*). Z kolei **CD160** to glikoproteina produkowana i obecna głównie na powierzchni cytotoksycznych limfocytów T (CD8⁺) oraz na komórkach NK, gdzie uczestniczy w modulacji ich aktywności. CD160 wiąże się m.in. z HVEM, co skutkuje najczęściej sygnałem hamującym, sprzyjającym utrzymaniu tolerancji immunologicznej i zapobieganiu nadmiernej aktywacji układu odpornościowego. Zaburzenia w funkcjonowaniu badanych przez Doktorantkę białek wiązane są z chorobami autoimmunologicznymi, nowotworami oraz przewlekłymi infekcjami.

Punkty kontrolne układu odpornościowego stanowią jedno z najważniejszych pól badawczych współczesnej immuno-onkologii. Układ białek HVEM/ CD160 jest istotny dla aktywacji limfocytów o aktywności cytotoksycznej. Zrozumienie mechanizmów molekularnych oddziaływań tego układu receptorowego z ich ligandami może przyczynić się do opracowania nowych form terapii przeciwnowotworowej, zwłaszcza w zakresie projektowania inhibitorów peptydowych lub przeciwciał monoklonalnych. Tematyka badań idealnie wpisuje się w aktualne kierunki rozwoju biotechnologii i chemii biomedycznej.

Celem głównym pracy doktorskiej było strukturalne scharakteryzowanie pary ligand - receptor HVEM i CD160, oddzielnie, oraz ich kompleksu. Pomimo opublikowania struktury krystalicznej domeny zewnątrzkomórkowej białka CD160(27-144) oraz kompleksu HVEM/CD160 przez inną grupę badawczą w trakcie trwania prac eksperymentalnych będących podstawą przygotowania ocenianej monografii, Doktorantka nie zaprzestała swoich badań, dodatkowo rozszerzając je o badania nad kompleksami białka HVEM z potencjalnymi inhibitorami.

Cztery cele szczegółowe dotyczyły odpowiednio: 1) opracowania i optymalizacji metod ekspresji oraz oczyszczania białek, 2) określenia struktury krystalicznej białek HVEM(39-199) i CD160(27-157), 3) analizy oddziaływań białka HVEM z peptydowym inhibitorem kompleksu HVEM/BTLA z wykorzystaniem metod rentgenografii strukturalnej oraz 4) określenia struktury przestrzennej białek HVEM(39-199) i CD160(27-157) w roztworze metodą małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS).

Autorka przyjęła ambitny i oryginalny plan eksperymentalny, obejmujący poszukiwanie warunków krystalizacji białek, analizę ich skłonności do oligomeryzacji oraz ocenę zdolności wiązania ligandów – potencjalnych inhibitorów badanego układu receptorowego. Testowane inhibitory peptydowe stanowiły krótkie fragmenty naturalnych ligandów CD160 tj. gD, BTLA oraz HVEM.

Doktorantka zastosowała zestaw metod eksperymentalnych typowych dla badań z zakresu biologii strukturalnej. W pracy wykorzystano między innymi produkcję rekombinowanych białek w trzech różnych systemach ekspresyjnych, techniki chromatograficzne i elektroforetyczne (w tym SDS-PAGE), metody analityczne oparte na rozpraszaniu światła (DLS), dichroizmie kołowym (CD) oraz promieniowaniu rentgenowskim o małym kącie rozpraszania (SAXS). Ponadto przeprowadzono analizy krystalograficzne z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej, testy immunoenzymatyczne (ELISA), a także badania elektrochemiczne, takie jak spektroskopia impedancyjna. Na szczególne uznanie zasługuje interdyscyplinarny charakter pracy oraz umiejętność autorki do skutecznej integracji szerokiego spektrum technik badawczych w celu rozwiązania złożonego problemu biologicznego.

Rozdziały poświęcone opisowi i dyskusji uzyskanych wyników badań obejmują łącznie ponad 70 stron maszynopisu i zawierają liczne ryciny, tabele oraz schematy. Wyniki są przedstawione w sposób klarowny, logicznie uporządkowany i odpowiednio zinterpretowany. Wysoka jakość opracowania graficznego danych dodatkowo ułatwia ich odbiór. Autorka wykazała, że dimer i trimer HVEM mają zróżnicowane właściwości fizykochemiczne oraz tendencje do tworzenia kompleksów. Z kolei CD160 odzyskane w postaci glikozylowanej z komórek HEK293 wykazywało niską stabilność i skłonność do agregacji. Wszystkie wyniki zostały precyzyjnie omówione i zestawione z aktualną literaturą.

Rozprawa mgr inż. Marty Piotrowskiej stanowi nowatorski wkład do badań nad mechanizmami regulacji odpowiedzi immunologicznej. Zarówno zastosowane podejście

metodologiczne, jak i opracowane wyniki mają potencjał aplikacyjny i mogą posłużyć jako punkt wyjścia do rozwoju nowych terapii celowanych. Praca świadczy o dużej samodzielności badawczej oraz głębokim zrozumieniu zagadnień biochemii strukturalnej i immunologii molekularnej.

Na krytykę zasługują pewne drobne, lecz znaczące aspekty pracy, które dotyczą zarówno warstwy merytorycznej, jak i językowo-edytorskiej. Praca doktorska mgr inż. Marty Piotrowskiej niewątpliwie została opracowana z dużą starannością metodologiczną, jednak miejscami ujawnia się brak równowagi pomiędzy obszernym opisem eksperymentalnym a pogłębioną analizą biologicznego znaczenia uzyskanych wyników. Chociaż autorka podejmuje ambitną próbę rekonstrukcji strukturalnej receptorów HVEM i CD160, to uzyskane dane – mimo że cenne – pozostają fragmentaryczne, bez domknięcia pełnego modelu krystalograficznego kompleksu. W rozdziałach poświęconych oddziaływaniom receptor–ligand brakuje wyników z użyciem ilościowych technik analizy interakcji, takich jak izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC) czy powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR), co ogranicza możliwość porównania uzyskanych efektów z aktualnym stanem wiedzy w immunologii strukturalnej. W pracy, autorka używa nazwy gatunkowej *Pichia pastoris*, która, choć jeszcze spotykana w literaturze, jest obecnie uznawana za przestarzałą. Zalecana i zaakceptowana nazwa drożdżaka wykorzystanego do ekspresji białek przez Doktorantkę to *Komagataella phaffii*. Warto, aby Doktorantka uwzględniła tę aktualizację nomenklatury, szczególnie w przyszłych publikacjach wyników swojej pracy naukowej, co zapewni zgodność z obecnie obowiązującymi standardami taksonomicznymi. Ponadto, opis dotyczący krzywej przeżywalności komórek (str.102 rozprawy) powinien jaśniej wskazywać, że chodzi o wyznaczenie minimalnego skutecznego stężenia selekcyjnego antybiotyku, które pozwala na całkowitą eliminację komórek niezawierających plazmidu, przy jednoczesnym przeżyciu komórek z prawidłowo zintegrowanym genem oporności na puromycynę.

W warstwie językowej i narracyjnej zauważalne są niekonsekwencje stylu. Fragmenty o dużej precyzji terminologicznej współwystępują z wypowiedziami o charakterze subiektywnym, co nieco zakłóca spójność tekstu akademickiego. Chociaż użycie form osobowych takich jak „przeprowadziłam”, „zbadłam” czy „rozdzieliłam” nie stanowi błędu językowego, nie jest ono typowe dla stylu obowiązującego w tekstach naukowych. W piśmiennictwie akademickim tego typu konstrukcje są zazwyczaj zastępowane formami bezosobowymi, takimi jak „przeprowadzono”, „zbadano” czy „rozdzielono”, które podkreślają obiektywny i neutralny charakter relacji badawczej. Podpisy rycin niekiedy różnią się czcionką i formatowaniem a część

ilustracji (szczególnie te przedstawiające chromatogramy) jest słabo czytelna lub pozbawiona legendy (np. str.143, str.154, str.174).

Pomimo powyższych uwag, nie sposób pominąć znaczącego nakładu pracy eksperymentalnej, który w połączeniu z interdyscyplinarnym charakterem badań stanowi silny fundament do dalszego rozwoju naukowego. Praca ta — choć w kilku aspektach wymagająca dopracowania — wnosi istotny wkład do poznania strukturalnych mechanizmów działania receptorów immunologicznych i może stanowić wartościowy punkt wyjścia do dalszych, pogłębionych analiz funkcjonalnych.

Na osobną uwagę zasługuje dorobek naukowy Doktorantki. Autorka posiada jedną pierwszoautorską publikację oryginalną w czasopiśmie *European Journal of Medicinal Chemistry*, co jest wartością pozytywną, ale jej aktywność publikacyjna poza tą pozycją jest ograniczona. Pozostałe osiągnięcia obejmują współautorską publikację w czasopiśmie *Protein Expression and Purification* oraz znaczną aktywność konferencyjną – doktorantka prezentowała wyniki badań na 24 konferencjach, w tym trzykrotnie w formie wystąpień ustnych, co świadczy o dużym zaangażowaniu w prezentację wyników swoich badań w środowisku naukowym. Na uwagę zasługuje także aktywny udział doktorantki w krajowych projektach badawczych, w szczególności w projekcie SONATA kierowanym przez dr Martę Orlikowską. Doktorantka wykazała się samodzielnością, kierując dwoma projektami realizowanymi w ramach programu „Badania Naukowe Służące Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich”, co dodatkowo potwierdza jej inicjatywę i niezależność badawczą.

Zainteresowanie tematem oraz pewien niedosyt poznawczy budzą kilka kwestii szczegółowych, które stanowią podstawę do poniższych pytań skierowanych do Doktorantki:

1. Czy różne formy oligomeryczne HVEM wykazują zróżnicowane powinowactwo do poszczególnych ligandów? Jakie mogą być potencjalne konsekwencje funkcjonalne tej zmienności w kontekście fizjologii lub patologii?
2. Czy w toku prac rozważano wykorzystanie systemów ekspresyjnych opartych na komórkach owadzych (np. Sf9), celem uzyskania glikozylowanej formy CD160 o lepszej jakości strukturalnej i funkcjonalnej?

3. Czy i jakie są planowane dalsze kroki badawcze zmierzające do uzyskania modelu krystalograficznego kompleksu HVEM/CD160 przez zespół badawczy? Czy przewidziano strategię obejmującą np. stabilizację kompleksu lub jego mutagenezę?

4. Jakie są potencjalne możliwości aplikacyjne uzyskanych wyników? W jaki sposób oceniana jest ich praktyczna przydatność oraz ewentualna opłacalność wdrożeniowa w kontekście biomedycznym lub terapeutycznym?

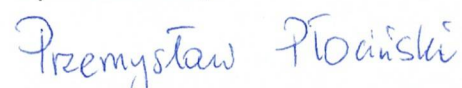
Podsumowanie

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska pt. „Badania strukturalne receptorów sygnałowych HVEM i CD160”, przygotowana przez Panią mgr inż. Martę Piotrowską, bezsprzecznie spełnia zarówno ustawowe, jak i merytoryczne kryteria stawiane tego rodzaju pracom. Autorka wykazała się wysokim stopniem samodzielności, bardzo dobrą znajomością zaawansowanych technik badawczych oraz zdolnością do krytycznej analizy i syntezy danych eksperymentalnych. Uzyskane wyniki posiadają istotną wartość poznawczą, a także potencjał aplikacyjny w kontekście badań translacyjnych.

Doktorantka zrealizowała ambitny plan badawczy, osiągając postawione sobie cele. Pomimo drobnych uwag o charakterze technicznym i interpretacyjnym, rozprawa stanowi znaczący i oryginalny wkład w rozwój badań nad molekularnymi mechanizmami regulacji układu odpornościowego, w szczególności dotyczącymi punktów kontrolnych istotnych w patogenezie chorób autoimmunologicznych i nowotworowych, z udziałem białek HVEM i CD160.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2023 r. poz. 742). Wniosuję o dopuszczenie mgr inż. Marty Piotrowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem,



dr hab. Przemysław Płociński, prof. UŁ

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki

Łódź, 15.04.2025 r.