



Łódź, 30.08.2021.

Prof. dr hab. Anna Świerko
Instytut Biologii Medycznej PAN,
Pracownia Immunobiologii Zakazań,
ul. Lodowa 106
93-232 Łódź
e-mail: aswierko@cbm.pan.pl

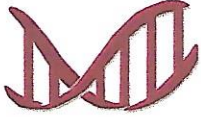
Ocena rozprawy doktorskiej Mgr Aleksandry Urban

Mutations of early proteins of the complement cascade- functional characteristics, potential applications

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter spójnego tematycznie zbioru artykułów w języku angielskim, w skład którego wchodzi dwie prace oryginalne – w tym jedna opublikowana w *Journal of Allergy and Clinical Immunology* ocenianego jako najlepsze czasopismo w kategorii *Allergy*. Uzyskane wyniki zaprezentowano także w postaci dwóch manuskryptów – w tym jednym w trakcie recenzji. We wszystkich tych pracach Pani mgr Aleksandra Urban jest pierwszym autorem. Na uwagę zasługuje też bogaty dorobek naukowy doktorantki niezwiązany bezpośrednio z rozprawą doktorską, obejmujący według bazy PubMed kolejne trzy prace doświadczalne, również opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania IF.

Rozprawa obejmująca opublikowane prace jak i przygotowane manuskrypty poprzedzona została przygotowanymi w języku angielskim typowymi rozdziałami, jak Streszczenie, Cele ogólne, Wprowadzenie i Dyskusja. Rozdział Wprowadzenie zawiera syntetyczny opis przedmiotu pracy – konwertaz drogi alternatywnej i klasycznej/lektynowej. Autorka wskazała na podobieństwa między wchodzącym w ich skład czynnikiem B oraz czynnikiem C2 dopełniacza, wyjaśniła wpływ mutacji typu nabycia funkcji („gain of function”, GOF) genów czynnika B i C2 na aktywność/stabilność konwertaz. Autorka opisała również znaczenie autoprzeciwi ciała C3NeF w stabilizacji konwertazy C3 i zwróciła uwagę na możliwość nabycia podobnej aktywności przez inne czynniki dopełniacza w wyniku mutacji ich genów.

Na tle tych informacji Autorka przedstawiła szczegółowe cele swej pracy w postaci trzech obszarów badawczych:



- poszukiwanie i analiza zależności genotyp-fenotyp wariantów genetycznych typu „gain of function” czynnika C2 dopełniacza i wyjaśnienie ich znaczenia w związanych z układem dopełniacza chorobach o podłożu autoimmunologicznym
- weryfikacja możliwości zastosowania wariantów czynnika C2 tworzących konwertazy o wydłużonej stabilności w celu zwiększenia efektywności opartych na immunoterapiach chorób nowotworowych wykorzystujących przeciwciała cytotoksyczne
- analiza możliwości wykorzystania wariantu czynnika B tworzącego konwertazę o zwiększonej trwałości jako wzorca w bazujących na ocenie stabilizacji konwertazy C3 testach funkcjonalnych do detekcji C3NeF

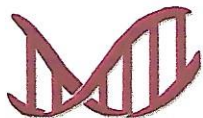
Realizacja tych celów szczegółowych została udokumentowana zwięzłym opisem uzyskanych wyników już opublikowanych lub zawartych w przygotowanych manuskryptach. Biorąc pod uwagę ograniczoną wiedzę na temat genetycznych podstaw syntezy białka C2 dopełniacza, należy podkreślić nowatorski charakter prezentowanej pracy a także przejrzystość, spójność i logiczność realizowanych etapów badań.

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych w trakcie pracy należy zaliczyć:

1. identyfikację u pacjentów z atypowym zespołem hemolityczno-mocznicowym (aHUS) lub glomerulopatią C3G mutacji zmiany sensu typu „gain of function” genu C2, prowadzących do powstania wariantów S250C i R249C w domenie von Willenbranda fragmentu C2a i warunkujących zwiększoną aktywność konwertazy drogi klasycznej, co wynika prawdopodobnie ze zwiększonej oporności na inhibicyjne działanie CD55. Należy również podkreślić wykonanie modelowania molekularnego białka C2 i C2b z umiejscowieniem regionu 243-250 i zaznaczeniem reszt 249 i 250.

W tym miejscu chciałabym zapytać Doktorantkę czy są dostępne dane literaturowe na temat możliwego mechanizmu oddziaływań CD55 z domeną von Willebranda białka C2? Moją uwagę zwrócił też wariant R243C, który jako jedyny nie był trawiony przez C1s i nie tworzył aktywnej konwertazy. Czy są jakieś wskazówki mogące wytłumaczyć ten przypadek?

2. wykazanie nasilenia indukowanej białkiem C-reaktywnym depozycji C3b na komórkach śródbłonna kłębuszków nerkowych w obecności wariantów S250C i R249C (ale nie formy dzięki białka C2), co sugeruje ich współdziałanie w rozwoju reakcji zapalnej w wyniku np. infekcji



Ze względu na moje zainteresowania naukowe, chciałabym zapytać Doktorantkę, czy w badaniach rozważano zastosowanie fikoliny-3 – silnego aktywatora lektynowej drogi dopełniacza, którego niemal 100% koekspresję z C4d wykryto w okołokanalikowych naczyniach włosowatych w przeszczepach nerek, wiążącego się do komórek apoptotycznych, o podwyższonym poziomie w chorobach z autoimmunizacji i chorobach nowotworowych, indukującego powstanie autoprzeciwciał i mogącego tworzyć kompleksy z naturalnymi Ab?

3. wykazanie *in vitro* (w tym na komórkach izolowanych od pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową), iż w obecności wariantów GOF białka C2 dochodzi do wzmocnienia cytotoksycznego działania przeciwciał anti-CD20 co sugeruje możliwość ich zastosowania w immunoterapii białaczek.

W badaniach cytotoksyczności używano surowicy normalnej lub surowic pozbawionych składnika C2 czy C5. Chciałabym zapytać, czy w trakcie badań porównano aktywność wariantów w środowisku osocza?

*Doktorantka, w zadaniu 2 wskazuje na plany weryfikacji przydatności otrzymanych wariantów pojedynczych i złożonych do zwiększania skuteczności terapeutycznej przeciwciał anti-CD20 w badaniach *in vivo*. W załączonym manuskrypcie nie ma jednak wyników tego typu badań. Bardzo proszę o ustosunkowanie się do tej kwestii.*

4. wykazanie, iż wariant K323E czynnika B tworzy konwertazę o wyższej aktywności niż konwertaza C3 formowana w obecności autoprzeciwciała C3NeF i potwierdzenie, że tego typu warianty mogą znaleźć zastosowanie jako kontrola pozytywna/standard w testach służących detekcji C3NeF.

Rozdział Dyskusja jest formą podsumowania i interpretacji otrzymanych wyników w kontekście dobrze dobranych danych literaturowych. Jest on napisany umiejętnie, co potwierdza dużą wiedzę Autorki w zakresie tematyki prowadzonych badań.

Należy podkreślić, że kierowany przez Prof. Marcina Okroja Zespół, w którym praca była realizowana reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i warsztatowy. To niewątpliwie pomogło Doktorantce. Niemniej jednak należy docenić Jej umiejętność planowania doświadczeń, krytycznej analizy i interpretacji wyników oraz łatwość operowania różnorodnymi technikami laboratoryjnymi.



Podsumowując:

Rozprawa zatytułowana **“Mutations of early proteins of the complement cascade- functional characteristics, potential applications”** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymagania dotyczące rozpraw doktorskich zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym, z prawdziwą przyjemnością, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne przy Uniwersytecie Gdańskim z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Urban do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na bardzo szeroki zakres przeprowadzonych badań i wartość uzyskanych wyników, potwierdzoną rangą publikacji włączonych do rozprawy, zwracam się także z wnioskiem o jej wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku,

Anna Świerzko