



Warszawa, 12/09/2021

Dr hab. n med. Magdalena Winiarska
Zakład Immunologii WUM
Ul. Nielubowicza 5, budynek F
Tel. (4822) 5992172, email: mwiniarska@wum.edu.pl

**RECENZJA rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Urban
pt. „Mutations of early proteins of the complement cascade
– functional characteristics, potential applications”**

Recenzowana praca dotyczy badań nad mutacjami składników drogi klasycznej/lektynowej dopełniacza, ich znaczenia dla rozwoju chorób autoimmunizacyjnych oraz potencjalnego zastosowanie mutantów wczesnych białek kaskady dopełniacza w terapii chorób nowotworowych. Podczas gdy mutacje w ścieżce alternatywnej są dobrze poznanym czynnikiem etiologicznym wielu schorzeń autoimmunologicznych, wiedza na temat mutacji w składnikach drogi klasycznej/lektynowej jest bardzo ograniczona. Z tego względu tematyka podjęta przez doktorantkę jest bardzo ciekawa, praca jest nowatorska, a jej wyniki mogą przyczynić się do lepszego poznania etiologii schorzeń autoimmunologicznych, do poprawy oceny ryzyka, a tym samym znaleźć zastosowanie w diagnostyce i terapii chorób człowieka.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru 2 artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym (J Allergy Clin Immunol oraz Autoimmunity), 1 manuskryptu w trakcie recenzji (Front Immunol) oraz 1 manuskryptu przygotowywanego do publikacji. Zarówno w artykułach, jak i w manuskryptach doktorantka jest pierwszym autorem (2 artykuły, 1 manuskrypt) lub pierwszym równorzędnym autorem (1 manuskrypt).

Na podstawie oświadczenia doktorantki można wnioskować, że doktorantka miała wiodącą rolę w przeprowadzonych badaniach i spełniła jednocześnie kryteria pierwszego autorstwa załączonych



publikacji. Doktorantka zoptymalizowała wiele metod badawczych niezbędnych do produkcji wybranych białek układu dopełniacza i ich mutantów oraz oczyszczania i analizy tych białek. W opublikowanych pracach wykonała również większość eksperymentów z testami funkcjonalnymi oceniającymi kaskadę dopełniacza, takim jak test hemolizy, test cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza (CDC), ocena aktywności konwertazy C3 oraz C5 CP/LP. Doktorantka przeprowadziła również eksperymenty z zastosowaniem cytometrii przepływowej oceniające ekspresję wybranych białek oraz odkładanie czynnika C3b w błonie komórkowej. Była również odpowiedzialna za obróbkę i analizę statystyczną danych oraz przygotowanie tekstu do manuskryptów.

Oprócz załączonych publikacji przedstawiona w jęz. angielskim rozprawa zawiera rozdziały: Wstęp, Cele pracy, Dyskusja.

Wstęp w wystarczający sposób wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Rycina 1 przedstawiająca aktywację kaskady dopełniacza drogą klasyczną i alternatywną jest ważnym elementem, niezbędnym do zrozumienia procesów badanych przez doktorantkę. Natomiast Rycina 2 byłaby zdecydowanie bardziej pomocna, gdyby oprócz zasady działania testu badającego aktywność konwertazy przedstawiała również elementy optymalizacji testu zaproponowane przez doktorantkę oraz opisane w publikacji w *Autoimmunity*.

Z formalnego punktu widzenia, jeśli ryciny były przygotowywane w programie Biorender, taka informacja powinna być zamieszczona w opisie rycin.

Ocena merytoryczna

W ramach realizacji projektu doktorantka dokonała szerokiej analizy funkcjonalnej mutantów białka C2, otrzymanych na podstawie mutacji zidentyfikowanych u pacjentów ze schorzeniami nefrologicznymi. Ustaliła także mechanizmy udziału zmutowanego białka C2 w uszkodzeniu śródbłonna naczyniowego nerek w rozwoju glomerulopatii. Ponadto, na podstawie swoich badań zaproponowała optymalizację testu oraz wprowadzenie kontroli pozytywnych umożliwiających standaryzowanie badań przesiewowych wykrywającym obecność przeciwciał patogennych, będących czynnikiem chorobotwórczym glomerulopatii C3. Opisała także przypadek pacjenta z mutacją białka C2. W kolejnej części projektu doktorantka udowodniła, że mutanty białka C2,



poprzez tworzenie konwertazy klasycznej o wydłużonym czasie półtrwania, mogą zwiększać efekt cytotoksyczny przeciwciał anti-CD20 względem komórek białaczkowych i linii chłoniaków oraz wspomagać w ten sposób skuteczność immunoterapii nowotworów. Prowadząc tak szeroko zakrojone badania Doktorantka wykazała się imponującą znajomością wielu metod eksperymentalnych. Analiza załączonych publikacji wskazuje, że doktorantka bardzo sprawnie posługuje się wieloma metodami biologii molekularnej, dobrze dobiera metody badawcze to realizacji założonych celów, jest dobrze zorientowana w tematyce badawczej, która się zajmuje oraz prowadzi badania, których wyniki stanowią istotny wkład w poszerzenie aktualnej wiedzy na temat układu dopełniacza w rozwoju schorzeń autoimmunizacyjnych.

Komentarze i pytania

1. Jednym z proponowanych przez doktorantkę podejść jest zastosowanie mutantów białka C2 opornych na hamowanie przez inhibitory dopełniacza w celu zwiększenia skuteczności immunoterapii stosowanych w leczeniu chorób nowotworowych – czy taka strategia nie jest niebezpieczna ze względu na powikłania autoimmunizacyjne oraz ryzyko niszczenia prawidłowych komórek oraz tkanek, w szczególności u pacjentów, którzy mają autoprzeciwciała? Jakie rozwiązania możnaby zaproponować, żeby to ryzyko zminimalizować?
2. Komórki nowotworowe mogą charakteryzować się zwiększoną ekspresją białka CD59 – czy mutant C2 będzie również bardziej skuteczny w aktywacji kaskady dopełniacza względem takich komórek?
3. Aktywacja dopełniacza po wlewie rytuksymabu jest częstym działaniem niepożądanym u chorych, które stara się minimalizować poprzez np. wprowadzanie przeciwciał silniej aktywujących proces ADCC niż CDC. Jak w tym kontekście można uzasadnić zastosowanie mutantów C2?
4. Doktorantka zaobserwowała, że zastosowanie mutantów C2 potęguje również indukowanie kaskady dopełniacza przez obinutuzumab czy inotuzumab ozogamicin, które nie mają zdolności indukowania CDC – dlaczego tak się dzieje, czy jest to niespecyficzny efekt? Czy u człowieka mutanty C2 mogłyby również prowadzić do aktywacji dopełniacza przez przeciwciała IgG4?



5. Doktorantka wykonała eksperymenty z wyciszeniem CD20 poprzez zastosowanie techniki siRNA i jednocześnie zaobserwowała wzrost CD59. Czy to jest powtarzalne zjawisko, jaka może być przyczyna takich zmian w ekspresji CD59?
6. Badając aktywność przeciwciał monoklonalnych doktorantka stosowała surowicą pozbawioną składnika C5 (Fig. 2 manuskryptu). W jaki sposób dochodziło do lizy komórek nowotworowych przy braku składnika C5?
7. Dlaczego w eksperymentach z CLL (Fig. 3) zwiększenie stężenia surowicy do 50% nie poprawiało, a czasami wręcz pogarszało skuteczność lizy komórek nowotworowych? Czy te wyniki nie wskazują pośrednio, że dostępność składników układu dopełniacza nie jest jedynym elementem ograniczającym skuteczność lizy komórek nowotworowych w CLL?
8. Czy w eksperymentach z CLL (Fig. 3) została oceniona liza komórek nowotworowych w obecności samego przeciwciała, samej surowicy oraz surowicy suplementowanej odpowiednimi mutantami białka C2?

Podsumowanie

Mimo kilku komentarzy czy uwag krytycznych, wysoko oceniam przedstawioną do oceny rozprawę doktorską. Doktorantka przeprowadziła nowatorskie badania, których wyniki są istotne poznawczo, mogą przyczynić się nie tylko do wyjaśnienia mechanizmów i patogenezy niektórych chorób autoimmunizacyjnych, ale także znaleźć zastosowanie w diagnostyce i terapii chorób człowieka. Doktorantka posiada rozległą wiedzę, umiejętność krytycznej analizy oraz interpretacji otrzymanych danych.

Stwierdzam, że praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Rady Naukowej Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Aleksandry Urban do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na bardzo dobry poziom naukowy prowadzonych badań, istotny wkład tych badań w aktualny stan wiedzy, szeroki zakres podjętych prac oraz opanowanie bardzo złożonego warsztatu metodycznego wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Immunologii Centrum Biostruktury
Department of Immunology Centre of Biostructure Research

Magdalena Winiarska

Magdalena Winiarska