

Wpł 31.03.2017
M. Bożena Obmińska-Mrukowicz
WYDZIAŁ LEKARSKI
Pracownia ds. Nauki

Wrocław, 18. marca 2017.

Prof. dr hab. Bożena Obmińska-Mrukowicz
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. med. Krystyny Okoniewskiej
pt. „Selekcja *in silico* oraz weryfikacja *in vitro* aktywności nowych tregitopów –
polipeptydów o działaniu tolerogennym”

Układ odpornościowy wraz z układem nerwowym i hormonalnym wywiera decydujący wpływ na stan równowagi zdrowotnej organizmu czyli warunkuje jego homeostazę. Do podstawowych funkcji układu immunologicznego należy destrukcja i eliminacja rozpoznanych struktur obcych lub nieprawidłowych struktur własnych (funkcja obronna), zapewnienie nietykalności i ochrony własnym prawidłowym tkankom (funkcja czynnej tolerancji) oraz wywieranie protroficznego wpływu wspierającego procesy regeneracyjne własnych tkanek (funkcja wspomagania). W przypadku upośledzenia funkcji czynnej tolerancji układu immunologicznego dochodzi do rozwoju zróżnicowanych schorzeń o podłożu autoimmunologicznym co skutkuje przewlekłym niszczeniem i eliminowaniem elementów własnych tkanek. Obecnie choroby autoimmunologiczne stanowią istotne zagrożenie cywilizacyjne, ponieważ szacuje się, że schorzenia autoagresyjne obejmują prawie 9,5 % populacji. Standardowa terapia schorzeń o podłożu autoimmunologicznym to stosowanie w sposób przewlekły leków o działaniu immunosupresyjnym co zawsze skutkuje występowaniem istotnych działań niepożądanych. Dużą nadzieją dla skutecznej terapii schorzeń autoagresyjnych jest stosowanie leków biologicznych, do których należą przeciwciała monoklonalne, blokery receptorów cytokinowych czy białka symulujące aktywność naturalnych białek ludzkich, które również nie są pozbawione działań niepożądanych. Jednak leczenie chorób autoimmunologicznych byłoby najskuteczniejsze gdyby było nakierowane na przywrócenie tolerancji immunologicznej na własne antygeny. Dlatego też istotne znaczenie zarówno poznawcze jak i aplikacyjne ma poszukiwanie nowych substancji czynnych, które wykazywałyby zdolność restytucji aktywności funkcjonalnej limfocytów T regulatorowych odpowiedzialnych za kontrolę i hamowanie odpowiedzi

immunologicznej organizmu, których dysfunkcja ilościowa jak i funkcjonalna może prowadzić do rozwoju wielu schorzeń, w tym o podłożu autoagresywnym. Dlatego dużą nadzieją jest możliwość wykorzystania krótkich sekwencji aminokwasowych występujących naturalnie w wielu białkach organizmu człowieka i zwierząt określanych mianem tregitopów, które charakteryzują się wysokim powinowactwem do antygenów zgodności tkankowej klasy I i II (MHC-I i MHC-II) wykazując działanie supresyjne wobec efektorowych limfocytów T. Aktywność tolerogenna tregitopów może wynikać z aktywacji naturalnych komórek T regulatorowych (Treg), stymulacji proliferacji tej populacji komórek, indukcji przez te komórki syntezy i uwalniania interleukiny 10, modulacji aktywności komórek prezentujących antygen (APC) bądź też supresji komórek T efektorowych. O potencjalnej możliwości diagnostycznego i terapeutycznego wykorzystania tregitopów ze względu na wysoką ich aktywność tolerogenną świadczy fakt prowadzenia wielośrodkowych badań nad wykorzystaniem tregitopów jako sekwencji tolerogennych w ograniczaniu reakcji odrzucania przeszczepu, w terapii systemowych schorzeń alergicznych i autoimmunologicznych, do ograniczania reakcji immunologicznej organizmu po stosowaniu leków biologicznych czy też przez eliminację ich obecności z sekwencji białek obecnych w antygenach szczepionkowych prowadząc do wzrostu zarówno immunogenności jak i antygenowości a więc skuteczniejszego uodparniania czynnego.

Dlatego też wybrany przez Doktorantkę problem naukowy stanowiący rozprawę doktorską, który dotyczy możliwości wykrycia i pozyskania nowych struktur tolerogennych, które spełniałyby kryteria umożliwiające do zaliczenia ich do grupy tregitopów oraz eksperymentalnego udokumentowania w badaniach *in vitro* tolerogenicznej aktywności pozyskanych peptydów należy uznać za bardzo ważny, aktualny, nowatorski i oryginalny.

Przedstawiona do oceny praca doktorska lek. med. Krystyny Okoniewskiej obejmuje wraz z wykazem piśmiennictwa i streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów 98 stron maszynopisu. Praca zawiera również 10 tabel, z których trzy pierwsze (tabele 1-3) zawierają informacje dotyczące danych metodycznych, natomiast w kolejnych siedmiu tabelach (tabele 4-10) zostały przedstawione uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań. Oprócz tabel dokumentacja naukowa dysertacji zawiera również 26 rycin, przy czym 22 ryciny przedstawiają uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań, natomiast 4 ryciny stanowią własne opracowania graficzne koncepcji naukowych i celów badawczych oraz schematy ilustrujące kolejność przeprowadzonych prac. Powyższe opracowania graficzne stanowią przeprowadzone przez Doktorantkę przemyślenia i analizy naukowe podjętego tematu badawczego. Są wykonane w sposób niezwykle sugestywny i przekonują czytelnika o

dojrzałości i zrozumieniu przez Doktorantkę podjętych tez badawczych oraz umiejętności ich udowodnienia przez zaprojektowane układy doświadczalne. Bardzo zasadne i pomocne dla czytelnika było umieszczenie po wykazie skrótów wykorzystanych w dysertacji spisu tabel i rycin z podaniem tytułu każdego dokumentu i numeru strony manuskryptu, na której została umieszczona dana tabela czy rycina.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wykorzystane przez Doktorantkę przy pisaniu dysertacji piśmiennictwo w liczbie 132 pozycji jest bardzo aktualne, ponieważ 115 pozycji piśmiennictwa to oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach zagranicznych zamieszczonych w bazie *Journal Citation Reports (JCR)* w okresie ostatnich 20 latach. Jednak o rzeczywistej aktualności podjętych przez Doktorantkę badań stanowi fakt, że 71 oryginalnych prac twórczych bezpośrednio związanych z zagadnieniami przedstawionymi w dysertacji doktorskiej zostało opublikowanych w renomowanych światowych czasopismach naukowych z bazy JCR w latach 2010-2016, przy czym jedynie w pięciu oryginalnych pracach Autorami są polscy badacze, w tym w trzech publikacjach Autorami są Promotor i Doktorantka. Powyższe wskazuje niestety, że prowadzenie przez polskich pracowników naukowych badań dotyczących możliwości pozyskiwania i potencjalnego wykorzystania w terapii schorzeń o podłożu zaburzeń immunologicznych epitopów komórek T regulatorowych są jeszcze niedocenione pomimo ich aktualności, zasadności i innowacyjności. W przedstawionej dysertacji jedynie 1 pozycja piśmiennictwa została opublikowana w języku polskim, przy czym jest to praca przeglądowa, która przedstawia możliwości wykorzystania immunomodulującego działania probiotyków w chorobach przewodu pokarmowego u dzieci co w ograniczony sposób związane jest z tematyką badawczą dysertacji. 14 pozycji piśmiennictwa stanowią dokumenty opublikowane w formie elektronicznej organizacji międzynarodowych związanych pośrednio lub bezpośrednio z medycyną (NIH, EMEA, Biolegend, EpiVax, HLA Matchmarker, Jackson Laboratory, Uniprot Consortium OECD) oraz 3 pozycje stanowią wydawnictwa monograficzne. Po sprawdzeniu danych bibliograficznych kolejnych pozycji piśmiennictwa w PubMed (angielskojęzyczna wyszukiwarka internetowa założona w 1996 roku przez National Center for Biotechnology Information stanowiącego część National Library of Medicine wchodzącego w skład National Institutes of Health) należy zawarte dane bibliograficzne skorygować w następujący sposób: 1) poz. 8 **PloS Neglected Tropical Diseases** 2009, 3(4), e420; 2) poz. 30 **Blood**, 112(8), 3303-3311; 3) poz. 55 **Science** 1992, 256(5065), 1817-1820; 4) poz. 128 **Science Signaling** 2016, 9 (433), ra61. Jest to jedynie uwaga porządkująca, natomiast należy stwierdzić, że wybór cytowanych przez Doktorantkę pozycji piśmiennictwa świadczy o Jej

doskonałym przygotowaniu merytorycznym do podjętego tematu badawczego. Przedstawiona dysertacja zawiera wszystkie rozdziały typowe dla prac doktorskich o charakterze eksperymentalnym czyli jest podzielona na standardowe rozdziały obejmujące wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusję, podsumowanie przeprowadzonych badań i wnioski oraz piśmiennictwo. Rozdziały takie jak wstęp, cel pracy, materiał i metody oraz wyniki badań zawierają odpowiednie podrozdziały. Przed częścią opisową pracy umieszczony został bardzo starannie przygotowany spis treści zawierający oprócz wykazu poszczególnych podstawowych części dysertacji również wykaz skrótów i pojęć stosowanych w dysertacji, spis tabel i rycin oraz streszczenie dysertacji w języku polskim i angielskim. Umieszczenie powyższych załączników do dysertacji było bardzo celowe i pożądane, ponieważ w istotny sposób ułatwia czytelnikowi odbiór danych naukowych zawartych w pracy.

Cel badań wykonanych przez Doktorantkę obejmował trzy koncepcyjnie powiązane zagadnienia, z których każde podzielone zostało na odpowiednie etapy.

Zagadnienie badawcze 1 dotyczyło wyselekcjonowania metodami *in silico* peptydów stanowiących źródło potencjalnych epitopów limfocytów T regulatorowych (tregitopów) wykazujących aktywność supresyjną wobec efektorowych limfocytów T. W pierwszym etapie, który umożliwiał dokonanie selekcji peptydów o właściwościach tolerogennych, było opracowanie matematycznego modelu zależności pomiędzy budową chemiczną tregitopów a siłą wiązania z antygenami zgodności tkankowej klasy I (MHC-I). Prace przeprowadzone w czasie walidacji modelu matematycznego selekcji tregitopów pochodzenia naturalnego pozwoliły określić kryteria włączenia poszczególnych sekwencji aminokwasów, które w kolejnych fazach stanowiły podstawę selekcji tregitopów przeznaczonych do testowania w badaniach *in vitro* na hodowlach komórkowych. W etapie drugim wyszukiwano, a następnie analizowano doniesienia naukowe na temat 88 białek, które pozwalałyby wnioskować o istniejących zależnościach występujących pomiędzy limfocytami T regulatorowymi a określonym białkiem zawierającym krótkie sekwencje aminokwasowe (tregitopy) wykazujące powinowactwo do antygenów zgodności tkankowej klasy I lub II. W tym etapie badań teoretycznych wykorzystując dane z 2015-2016 bazy UniProtKB analizowano fizjologiczną funkcję typowanych białek oraz ich potencjalny udział w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej. W etapie trzecim w oparciu o wyniki uzyskane w etapie drugim przeprowadzono selekcję wąskiej grupy potencjalnych tregitopów przeznaczonych do weryfikacji w badaniach *in vitro*. Korzystając z oprogramowania MarvinSketch 16.9.12

przeprowadzona została analiza podstawowych parametrów fizykochemicznych nowych tregitopów, która została przedstawiona w tabeli 4.

Zagadnienie badawcze 2 dotyczyło opracowania metody weryfikacji funkcjonalnej wyselekcjonowanych metodą *in silico* potencjalnych tregitopów. W etapie pierwszym w sposób wiarygodny dostosowano warunki izolacji limfocytów śledzionowych od samiec transgenicznego szczepu myszy C57BL6Foxp3^{GFP}, który pod promotorem genu Foxp3 (czynn timeranskrypcyjny charakteryzujący komórki T regulatorowe) ma wprowadzone białko zielonej fluorescencji umożliwiając identyfikację populacji limfocytów Treg. Wyizolowane od 30 sztuk myszy limfocyty śledzionowe służyły jako materiał wyjściowy do wysortowania magnetycznej populacji komórek prezentujących antygen APC tj. komórek dendrytycznych (CD11c) i makrofagów (CD11b) oraz limfocytów T CD4+CD25-. Oznaczano wartości bezwzględne populacji limfocytów śledzionowych jak również jak również wysortowanych subpopulacji. W drugim etapie opracowano warunki długoterminowej (6 dniowej) hodowli poszczególnych subpopulacji, które inkubowano z badanymi wyselekcjonowanymi *in silico* tregitopami, które zostały zsyntetyzowane w Gene Cust Europe Laboratoire de Biotechnologie du Luxembourg. Kolejnym etapem, który należy zakwalifikować do badań metodycznych było opracowanie metody barwienia zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego badanych subpopulacji komórkowych, która pozwoliłaby na ocenę wpływu badanych peptydów na proliferację komórek iTreg poprzez wykazanie ekspresji czynn timeranskrypcyjnego Foxp3 oraz sekrecji IL-10 przez komórki CD4+CD25+Foxp3.

Zagadnienie badawcze 3 dotyczyło określenia wpływu wytypowanych sekwencji polipeptydowych (potencjalnych tregitopów) do indukcji proliferacji limfocytów iTreg przez określenie liczby komórek CD4+CD25+Foxp3+ i CD4+CD25+Foxp3+IL-10+ pochodzących z hodowli wysortowanych magnetycznie dwóch typów komórek prezentujących antygen (CD11c i CD11b) oraz komórek CD4+ z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej. Przed analizą cytometryczną oznaczono proliferację komórek iTreg i obecność komórek nTreg przy użyciu mikroskopu odwróconego (NikonTMS)

Należy stwierdzić, że zakres badań podjętych przez Doktorantkę jest bardzo szeroki, o wysokim znaczeniu poznawczym. Doktorantka w sposób bardzo rzetelny i logiczny udokumentowała wybór stosowanych modeli i układów badawczych. Przedstawione przez Doktorantkę wielokierunkowe cele badawcze, wymagały w pierwszej kolejności przeprowadzenia badań *in silico*, których prawidłowe wykonanie umożliwia dostępność oraz perfekcyjne posługiwanie się wysoce specjalistycznymi programami informatycznymi. Z kolei badania przeprowadzone *in vitro* na wyizolowanych mysich hodowlach komórkowych,

w skład których wchodziły populacje wysortowanych magnetycznie komórek układu immunologicznego takich jak komórki dendrytyczne, makrofagi i śledzionowe limfocyty T o funkcji indukująco-wspomagającej wymagały opracowania szeregu układów doświadczalnych, które musiały być zaplanowane i wykonane w odpowiedniej kolejności. W wykonanych układach doświadczalnych Doktorantka posługiwała się nowoczesnymi, powtarzalnymi i uznanymi metodami badawczymi z zakresu immunologii, biotechnologii i biologii molekularnej, które wymagały opanowania w sposób perfekcyjny technik badawczych stosowanych w pracowniach hodowli komórkowych.

Część teoretyczna dysertacji czyli wstęp został opracowany przez Doktorantkę w sposób prawidłowy, a jego układ i treść świadczy o dużej wiedzy Autorki i teoretycznym przygotowaniu do podjęcia powyższego tematu badawczego. W tej części rozprawy doktorskiej Autorka przedstawiła w sposób rzeczowy, zwięzły i aktualny informacje o aktywności biologicznej i roli komórek T regulatorowych w patogenezie chorób autoimmunologicznych, mechanizmie działania epitopów komórek T regulatorowych czyli tregitopów, ich aktywności regulacyjnej w przebiegu chorób autoimmunologicznych oraz o potencjalnej możliwości ich terapeutycznego wykorzystania ze względu na wysoką aktywność tolerogenną m.in. w transplantologii, terapii chorób alergicznych czy autoimmunologicznych.

Duże uznanie budzi opracowanie i przedstawienie rozdziału „Materiał i metody” w którym na samym początku został zamieszczony w formie graficznej schemat kolejno przeprowadzanych etapów badawczych. Następnie w sposób bardzo skrupulatny, ale przejrzysty został przedstawiony matematyczny model selekcji tregitopów, jego struktura oraz zasada i sposób walidacji. Kolejny podrozdział przedstawia przyjęte zasady selekcji białek stanowiących źródło potencjalnych tregitopów. W tym podrozdziale przedstawiono również w sposób graficzny schemat procesu selekcji polipeptydów przeznaczonych do badań *in vitro* na hodowlach odpowiednich subpopulacji komórek immunologicznych wyizolowanych ze śledzion myszy szczepu transgenicznego C57BL6Foxp3^{GFP}. Graficzne przedstawienie metodyki tego etapu badań zdecydowanie ułatwia czytelnikowi zrozumienie sekwencyjności poszczególnych procedur badawczych. Kolejny podrozdział zawiera wykaz i skład mediów hodowlanych i buforów wykorzystanych w badaniach *in vitro* przeprowadzonych na mysich hodowlach komórkowych, następnie przedstawiono przygotowanie do badań wybranych *in silico* peptydów oraz tregitopu 289 o potwierdzonej funkcji regulatorowej, który stanowił kontrolę pozytywną oraz peptydu tolerogennego o nazwie Edratide, którego skuteczności nie zostały potwierdzone w badaniach klinicznych II

fazy, a który w prezentowanych badaniach stanowił kontrolę negatywną. W tym rozdziale przedstawiono również wykaz rozpuszczalników, których rodzaj uwzględniał ładunek cząstkowy badanego peptydu. Zamieszczony został również graficzny schemat ilustrujący poszczególne etapy prowadzonych badań *in vitro*. Następnie przedstawiono opis dotyczący zwierząt laboratoryjnych tj. myszy transgenicznych szczepu C57BL6Foxp3^{GFP}, sposób ich eutanazji, pobierania śledzion, izolację komórek i sposób ich sortowania na odpowiednie populacje z wykorzystaniem odpowiednich kitów, opis prowadzonych poszczególnych hodowli komórkowych z badanymi wyselekcjonowanymi peptydami. Szkoda, że przy tak kompleksowo przeprowadzonych badaniach zdecydowano się na oznaczenie wpływu badanych peptydów tylko w jednym stężeniu 100 ug/ml hodowli. Jako Recenzent przyjmuję za zasadny wybór tej wielkości stężenia, ponieważ jest to wielkość stężenia, przy którym wykazuje swoją aktywność tregitop 289 stanowiący kontrolę pozytywną prezentowanych badań. Jednak wysoce interesujące byłoby zobaczenie czy aktywność biologiczna badanych peptydów nie charakteryzuje się stężenio-zależnością. Kolejno przedstawiono opis barwienia zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego pozwalający na oznaczenie liczby i zdolności proliferacyjnej limfocytów iTreg pod wpływem badanych peptydów oraz zdolność do syntezy i uwalniania przez te komórki IL-10.

Należy stwierdzić, przyjęte w pracy układy doświadczalne i zastosowane metody badawcze stanowią gwarancję uzyskania w pełni wiarygodnych wyników, a zaplanowane i wykonane badania charakteryzują się wysoką oryginalnością, a zastosowane metody badawcze wykonane przez Doktorantkę pozwalają na udokumentowanie założonych celów badawczych. Przeprowadzone przez Doktorantkę prace pozwoliły na zdefiniowanie modelu badawczego, który począwszy od wstępnej selekcji *in silico* poprzez wykonane badania eksperymentalne *in vitro* umożliwiły na pozytywną weryfikację dwóch nowych tregitopów (FSG i WLS) udowadniając ich działanie tolerogenne. Zrealizowanie poszczególnych etapów badań wymagało od Doktorantki nie tylko umiejętności badawczych i laboratoryjnych ale i dużej pracowitości. Dlatego dobór grup i metod badawczych, w tym narzędzi oceny statystycznej uważam za trafny.

Sposób teoretycznego i graficznego opracowania uzyskanych wyników badań jest prawidłowy wnoszą oryginalny wkład do badań nad wyselekcjonowaniem metodami *in silico* peptydów stanowiących źródło potencjalnych epitopów limfocytów T regulatorowych (tregitopów) oraz przeprowadzonych *in vitro* nad wpływem wytypowanych sekwencji polipeptydowych na aktywność proliferacyjną limfocytów iTreg (CD4+CD25+Foxp3+)

przez określenie liczby tych komórek pochodzących z hodowli wysortowanych magnetycznie dwóch typów komórek prezentujących antygen (CD11c i CD11b) oraz komórek CD4+ oraz zdolność komórek Treg do syntezy i uwalniania IL-10.

Również w sposób bardzo rzeczowy, przemyślany, usystematyzowany i rzetelny Doktorantka podejmuje w rozdziale „Dyskusja” polemikę z danymi naukowymi na zrealizowany temat badawczy, które zostały opublikowane przez innych Autorów z wielu przede wszystkim zagranicznych ośrodków naukowych. Świadczy to o znajomości aktualnego światowego piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień naukowych, ale także o umiejętności właściwej interpretacji zjawisk w oparciu o spostrzeżenia innych badaczy.

Dobrze udokumentowane wyniki badań pozwoliły Doktorantce na postawienie 4 prawidłowo skonstruowanych wniosków, które stanowią zadowalającą odpowiedź na założone cele badawcze. Wniosek 5 nie jest stricte wnioskiem z przeprowadzonych badań, natomiast stanowi jedynie istotną wskazówkę o celowości kontynuowania wykonanych badań.

Należy zwrócić również uwagę na fakt, że maszynopis pracy został przygotowany w sposób bardzo staranny, a praca została napisana bardzo poprawnie pod względem językowym.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska lek. med. Krystyny Okoniewskiej zatytułowana „**Selekcja *in silico* oraz weryfikacja *in vitro* aktywności nowych tregitopów – polipeptydów o działaniu tolerogennym**” jest oryginalnym, nowatorskim osiągnięciem Autorki. Ma dużą wartość poznawczą. Założone cele badawcze zostały w pełni osiągnięte i przeanalizowane zgodnie z obowiązującymi standardami.

Uważam, że powyższa praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zawartym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 0365595 z dnia 16.04.2003). Wnoszę o jej przyjęcie i dopuszczenie lek. med. Krystyny Okoniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje również do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Bożena Obmińska-Mrukowicz