

Dr hab. Dorota Ścieglińska
Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów
Narodowy Instytut Onkologii im. M. Curie-Skłodowskiej - Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-102 Gliwice

Gliwice, 09.08.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Jagody Mantej

pt. „Badanie immunomodulacyjnych właściwości zewnątrzkomórkowych białek szoku termicznego w kontekście rozwoju i terapii wybranych chorób autoimmunologicznych”

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej wpisuje się w nurt badań nad rolą białek szoku termicznego w modulacji odpowiedzi immunologicznej. W ujęciu klasycznym białka HSP są traktowane jako wewnątrzkomórkowe białka opiekuńcze odpowiedzialne za utrzymanie proteostazy, do zaburzenia której dochodzi w efekcie działania rozmaitych stresorów środowiskowych, w tym warunków panujących w tkance objętej stanem zapalnym. Zwiększona produkcja białek HSP jest elementem mechanizmów adaptacji komórek do stresu. Podczas stresu nasila się również wydzielanie białek HSP do przestrzeni pozakomórkowej, zarówno w postaci wolnej, jak też jako składniki egzosomów. Te zewnątrzkomórkowe białka HSP mogą uczestniczyć w sygnalizacji międzykomórkowej, wykazując przy tym właściwości immunogenne i immunomodulujące. Jednak zrozumienie roli zewnątrzkomórkowych HSP w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej jest niepełne i wciąż wymaga dalszych badań.

Punktem wyjścia do badań zawartych w ocenianej pracy stały się wyniki wcześniejszych prac Promotora rozprawy, Pana prof. Stefana Tukaja. Przeprowadzone na potrzeby tej rozprawy prace doświadczalne koncentrują się nad lepszym poznaniem roli pozakomórkowych białek HSP w patogenezie oraz przebiegu chorób autoimmunologicznych. Pani mgr Jagoda Mantej w pracy doktorskiej podjęła się zbadania wpływu wysoce konserwowanego ewolucyjnie zewnątrzkomórkowego białka HSP70 na przebieg chorób autoimmunologicznych skóry takich jak łuszczyca oraz nabyte pęcherzowe oddzielanie się naskórka. W badaniach wykorzystwała mysie modele tych chorób oraz materiał pochodzący od pacjentów. Poszukiwała też potencjalnie przydatnej klinicznie zależności pomiędzy stanem chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, a odpowiedzią humoralną na wybrane kluczowe białka HSP. Sprawdzała również, czy infekcja wirusem SARS-Cov-2 może zwiększyć reakcję autoimmunologiczną organizmu wycelowaną w białka HSP. Wybrany temat doktoratu uważam za ważny i mogący mieć znaczenie praktyczne.

Ocena formalna pracy

Praca przedstawiona jako rozprawa doktorska liczy 80 stron, zawarto w niej stronę tytułową, informację o źródłach finansowania, podziękowania, spis treści, streszczenia wyników prac oryginalnych w języku polskim oraz angielskim wraz z listą piśmiennictwa liczącą 14 pozycji, cztery publikacje doświadczalne, oświadczenia współautorów prac, oraz wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Podstawę rozprawy stanowią cztery publikacje oryginalne opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej, z których dwie ukazały się w *Cell Stress and Chaperones*, a dwie kolejne odpowiednio w *Experimental Dermatology* i *Frontiers in Immunology*. Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych prac wynosi około 20 punktów. W jednej publikacji mgr Mantej jest pierwszym autorem, w trzech kolejnych równorzędym pierwszym autorem. Zgodnie z zamieszczonym oświadczeniem, Jej indywidualny wkład merytoryczny w powstanie prac polegał na udziale w planowaniu doświadczeń, przeprowadzeniu eksperymentów, analizie i interpretacji wyników. Istotna rola mgr Mantej w prowadzonych badaniach znajduje potwierdzenie w oświadczeniach współautorów. Muszę jednak zauważyć, że w oświadczeniach brak informacji o udziale Doktorantki w pracach nad przygotowaniem manuskryptów publikacji. Oceniając całość przedstawionych wyników, oraz biorąc pod uwagę wiodącą rolę mgr Mantej w realizacji prac doświadczalnych, uznaję że przedstawiona praca może stanowić podstawę uzyskania stopnia naukowego doktora.

Ocena merytoryczna pracy

W pierwszej z przedstawionych prac mgr Mantej wraz ze współautorami poszukiwali zależności pomiędzy poziomem przeciwciał anti-HSP60, HSP70 oraz HSP90 w surowicy pacjentów, a nasileniem objawów reumatoidalnego zapalenia stawów. Doktorantka znalazła wyższy poziom tych przeciwciał w grupie chorych, jednakże stan ten nie korelował z aktywnością choroby lub stopniem zniszczenia stawów. Zaobserwowała natomiast, że humoralna reakcja autoimmunologiczna przeciwko białkom HSP60, HSP70 i HSP90 może potencjalnie modulować poziom mediatorów stanu zapalnego.

Drugą w kolejności pracę poświęcono próbie wyjaśnienia, czy infekcja wirusem SARS-CoV2, może potencjalnie wywoływać autoimmunizację poprzez stymulację humoralnej odpowiedzi anti-HSP. Przyjęto założenie, że na drodze mimikry molekularnej immunogenne białka wirusowe mogą zwiększać poziom przeciwciał nakierowanych na zewnątrzkomórkowe białka HSP. Mgr Mantej uzyskała wyniki przemawiające przeciwko wstępnie postawionej hipotezie analizując poziom przeciwciał anti-HSP60, HSP70, HSP90 w surowicy osób zaszczepionych szczepionką mRNA Pfizer, chorych po bezobjawowym lub łagodnym przebiegu zakażenia oraz osób seronegatywnych pod względem obecności przeciwciał anti-SARS-CoV-2. Tu nasuwa mi się pytanie, czy znane są dane pokazujące zależność pomiędzy surowicznym poziomem przeciwciał anti-HSP a podatnością na infekcję SARS-Cov-2, lub przebiegiem choroby COVID-19?

W trzeciej pracy mgr Mantej posłużyła się mysim modelem łuszczycy poszukując efektu terapeutycznego wywoływanego przez zewnątrzkomórkowe białko HSP70. W tej spójnej pracy

pokazano, że immunizacja myszy rekombinowanym białkiem HSP70, w szczególności pochodzenia roślinnego (z tytoniu), ma działanie przeciwzapalne. Efekt ten powiązano z ekspansją dwóch podtypów regulatorowych limfocytów T, z towarzyszącym spadkiem poziomu prozapalnych limfocytów Th17. Co interesujące, dootrzewnowa iniekcja przeciwciał anti-HSP70 również hamowała rozwój łuszczycy, co połączono z obniżeniem poziomu prozapalnych limfocytów Th17. Bardzo ciekawa jest obserwacja, że najsilniejsze działanie przeciwzapalne wykazywało rekombinowane białko Hsp70 pochodzenia roślinnego. Podobny efekt roślinnego Hsp70 pokazano w pracy z 2018 roku autorstwa Seifarth i współpracowników. Wspomniani Autorzy obserwowali wyhamowanie procesu zapalnego w mysiej skórze przy jednoczesnej naskórnej aplikacji imikwimodu oraz kremu z białkiem Hsp70 z lucerny. Ciekawi mnie, co sądzi Doktorantka o możliwości stosowania kremów z rekombinowanym roślinnym białkiem Hsp70 jako produktów do leczenia łuszczycy? Chciałam też zapytać, jak Doktorantka wytłumaczy wyższą aktywność przeciwzapalną roślinnego Hsp70 w porównaniu z preparatami ludzkiego oraz mysiego białka HSP70 (HSPA1)?

W czwartej pracy mgr Mantej pokazała, że pozakomórkowe białko HSP70 (HSPA1) może być uwikłane w procesy patofizjologiczne w nabytym pęcherzowym oddzieleniu się naskórka. Z użyciem mysiego modelu tej rzadkiej choroby autoimmunologicznej Doktorantka pokazała, że dootrzewnowe podanie preparatów ludzkiego rekombinowanego białka HSP70 pogarsza objawy chorobowe oraz nasila reakcje prozapalne. W doświadczeniach z użyciem ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej stymulowanych przeciwciałami anti-CD3/28 oraz ludzkich neutrofilii stymulowanych immunokompleksami specyficznymi dla nabytego pęcherzowego oddzielenia się naskórka również pokazano prozapalne właściwości zewnątrzkomórkowego HSP70.

W swojej pracy doktorskiej mgr Mantej, stosując dwa różne modele chorób autoimmunologicznych, wykazała niezwykle ciekawy przeciwstawny efekt immunomodulacyjny zewnątrzkomórkowego HSP70. Wyniki te są bardzo intrygujące, gdyż pokazują że ostateczny wpływ pozakomórkowego HSP70 na modulowanie stanu zapalnego i reakcji komórek układu odpornościowego może być zależny od wielu czynników i trudny do kontrolowania. Wiadomo, że zewnątrzkomórkowe HSP70 samo może modulować odpowiedź immunologiczną w sposób plejotropowy – jako antygen, jako nośnik immunoaktywnych peptydów, jako ligand receptorów na powierzchni komórek biorących udział w mechanizmach odporności wrodzonej i nabytej. Może ono być internalizowane przez komórki prezentujące antygeny, jak też może modulować odpowiedź immunologiczną jako składnik egzosomów. Ponieważ Doktorantka wnioskuje, że HSP70 może być wykorzystany jako czynnik terapeutyczny lub też jako cel terapeutyczny w leczeniu chorób autoimmunologicznych, chciałam zapytać, jak mogłaby wyglądać realizacja tego postulatu uwzględniając przy tym bezpieczeństwo pacjentów? Innymi słowy, czy efektem niepożądanym leczenia łuszczycy nie będzie innego typu reakcja autoimmunologiczna w skórze pacjentów, lub w innych narządach odległych?

W swoich badaniach mgr Mantej zastosowała szeroki wachlarz prawidłowo dobranych metod eksperymentalnych. Stosowała rekombinowane białka HSP70 (mysie, ludzkie oraz roślinne)

produkowane w oparciu o konstrukt ze zoptymalizowanymi kodonami w bakteryjnym systemie zapewniającym uzyskanie preparatów pozbawionych immunogennych endotoksyn. Wykorzystała dobrze opisany myszy model łuszczyca oraz nabytego pęcherzowego oddzielania się naskórka. Ponadto prowadziła hodowle in vitro ludzkich immortalizowanych keratynocytów, ludzkich oraz mysich komórek krwi oraz mysich komórek śledziony. Do oceny poziomu przeciwciał anti-Hsp wykorzystała autorskie testy immunoenzymatyczne, a testy komercyjne użyła badając poziom innych wybranych białek pozakomórkowych (interleukiny, HSP70, przeciwciała anti-SARS-Cov2). Metodą Western blot oceniła wewnątrzkomórkowy poziom białek MMP9 oraz HSP90. Metodami cytometrii przepływowej posłużyła się do immunofenotypizacji populacji limfocytów oraz oceny surowiczego poziomu wybranych cytokin. Badała wzrost komórek oraz poziom wydzielania reaktywnych form tlenu. Zestaw zastosowanych metod dopełnia właściwie dobrana analiza statystyczna. Warto podkreślić, że w doświadczeniach stosowano odpowiednie kontrole jak np. immunizacja myszy owoalbuminą, czy podawanie im odpowiednich przeciwciał izotypowych jako kontroli negatywnej.

Zamieszczone w pracy doktorskiej omówienie wyników powyższych badań zostało przedstawione w formie streszczenia na nieco ponad czterech stronach standardowego maszynopisu. Tak oszczędny sposób prezentacji założeń, celu, wyników oraz wniosków pracy pozostawia u mnie, jako czytelnika, spory niedosyt. Z obowiązku recenzenta pracy, wobec informacji o braku udziału mgr Mantej w przygotowaniu opisowych części manuskryptów w/w prac zgłaszam moją niepewność co do stopnia rozeznania Doktorantki w tematyce prowadzonych badań. Lakonicznie sformułowany przez nią wniosek końcowy, że zewnątrzkomórkowe białka HSP mogą stanowić zarówno czynnik patofizjologiczny w rozwoju chorób autoimmunologicznych, jak też cel terapeutyczny można wysnuć de facto w oparciu o dane z wcześniejszego piśmiennictwa. Co miała na myśli Doktorantka pisząc, cytując: „białka Hsp mogą stanowić (...) czynnik terapeutyczny w rozwoju chorób autoimmunologicznych”?

Dojrzałość naukową badacza dobrze pokazuje sposób w jaki odnosi się on do wyników własnych badań, czy jest w stanie wskazać ich mocne i słabe strony, a także zarysować kierunki dalszych badań. Niestety, nie znalazłam takiego krytycznego podejścia w materiałach przygotowanych przez Doktorantkę. Dlatego uprzejmie proszę, aby Doktorantka podczas obrony pracy doktorskiej odniosła się do powyższych uwag, w szczególności prezentując obszerniejsze wnioski z własnych badań oraz perspektywy dalszych prac.

Reasumując, pomimo przedstawionych zastrzeżeń uważam, że praca doktorska mgr Jagody Mantej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U.: z 2022 poz. 574). W związku z tym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Jagody Mantej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dorota Kujawa