INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Prof. dr hab. Marcin Czerwiński

Wrocław, 10.04.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Klausa
"Innowacyjne odczynniki do diagnostyki grup krwi. Badanie właściwości mysich przeciwciał IgG3 oraz IgM wywołujących hemaglutynację"

Przeciwciała monoklonalne stanowią najszybciej rozwijającą się gałąź przemysłu farmaceutycznego. Dotyczy to przede wszystkim przeciwciał terapeutycznych, stosowanych w celowanych immunoterapiach, ale równie intensywnie badane są przeciwciała diagnostyczne. Ponadto, chociaż aglutynacja jest powszechnie stosowaną metodą laboratoryjną, to o jej podstawach molekularnych wiemy stosunkowo niewiele. Dlatego temat pracy doktorskiej Tomasza Klausa uważam za aktualny i bardzo interesujący.

Oceniana praca jest kompilacją trzech publikacji: dwie ukazały się w Scientific Reports, a jedna w Frontiers in Immunology. We wszystkich publikacjach Tomasz Klaus jest pierwszym autorem, a z zamieszczonego w opracowaniu rozdziału „Opis wkładu w przygotowanie publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej" wynika, że jego udział w przygotowaniu wszystkich trzech publikacji był kluczowy. W krótkim wstępie, zatytułowanym „Opis celów, najważniejszych wyników i wyciągniętych wniosków", Autor przedstawia podsumowanie otrzymanych wyników.

Ze względu na to, że wyniki będące podstawą pracy doktorskiej zostały już ocenione przez recenzentów wymienionych czasopism, pozwolę sobie przedstawić tylko krótkie omówienia najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej Tomasza Klausa. Autor postanowił zmierzyć się z problemem degradacji mysich przeciwciał klasy IgM w czasie ich przechowywania, i wykazał, że jest ona wynikiem nieenzymatycznej degradacji ciężkiego łańcucha przy reszcie Asn209. Jeżeli ta reszta zostanie podstawiona przez inny aminokwas, to takie przeciwciało staje się znacznie bardziej stabilne i oporne na proteolizę. Odkrycie to może mieć fundamentalne znaczenie dla diagnostycznych odczynników opartych o mysie przeciwciała klasy IgM: niewielka modyfikacja może znacznie wydłużyć ich trwałość (inna sprawa, czy producenci odczynników będą takim wydłużeniem zainteresowani).

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Drugim ważnym osiągnięciem Tomasza Klausa jest rozwiązanie zagadki aglutynacji erytrocytów przez mysie przeciwciała klasy IgG3. Autor wykazał, że przeciwciało tej klasy, rozpoznające ludzki antygen grupowy B, aglutynuje erytrocyty B w stężeniu podobnym do stężenia przeciwciał monklonalnych klasy IgM rozpoznających ten sam antygen. Przeprowadzona przez Autora analiza rekombinowanych przeciwciał, których domeny wymienione na pochodzące z przeciwciał innych klas wykazała, że zdolność do aglutynacji zależy od obecności domeny CH2: jej obecność jest niezbędna do oligomeryzacji przeciwciał IgG3, a także zwiększa powinowactwo wobec antygenów. Wymiana domeny CH2 w cząsteczce przeciwciała innej klasy na domenę CH2 klasy IgG3 powoduje, że tak otrzymane przeciwciało aglutynuje erytrocyty w stopniu zbliżonym do przeciwciała klasy IgG3. W podsumowaniu, Autorowi udało się zarówno zmodyfikować przeciwciała klasy IgM, czyniąc je bardziej odpornymi na proteolizę, jak też wykazać, że przeciwciała klasy IgG3 mogą zastąpić przeciwciała klasy IgM w badaniach diagnostycznych polegających na określaniu aglutynacji. Jest to na pewno bardzo ważne osiągnięcie, niemniej uważam, że tytuł „Innowacyjne odczynniki do diagnostyki grup krwi" jest trochę przesadzony. Angielska wersja (Biobetter reagents for blood typing) też nie brzmi dobrze. Określenie „biobetter" jest tutaj o tyle mylące, że stosuje się raczej w odniesieniu do „ulepszonych" wariantow leków biologicznych niż odczynników diagnostycznych.

Nie mam merytorycznych uwag do pracy doktorskiej (zwłaszcza że recenzje wykonali recenzenci czasopism), ale uważam, że Autor mógł zastosować do badania aglutynacji bardziej nowoczesne metody polegające na użyciu żelowych mikrokolumn. Takie kolumny, rutynowo używane w stacjach krwiodawstwa, umożliwiają bardziej obiektywną ocenę stopnia aglutynacji oraz standaryzację otrzymanych wyników. Ponadto, interesujące byłoby porównanie wiązania przeciwciał oraz ich wariantów w cytofluorometrii przepływowej, zwłaszcza w połączeniu z ilościową oceną liczby miejsc wiążących przeciwciało. Nie bardzo się też mogę zgodzić z uwagą zawartą we wcześniejszej publikacji w Sci. Rep na temat opisanego przez Rasamolisolo M i współpr., (Vox Sang 1997, 72: 185-191) przeciwciała 2H12 (swoistość: glikoforyna A). Jak wykazaliśmy, przeciwciało to nie rozpoznaje „wystającego" (protruding) N-końca glikoforyny A, ale fragment obejmujący reszty aminokwasowe 38-45, który znajduje się dość blisko błony komórkowej. Tak więc fakt, że przeciwciało 2H12 aglutynuje erytrocyty należy

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

interpretować jako jeszcze jeden dowód wyższości przeciwciał IgG3 nad przeciwciałami innych klas.

Moje drobniejsze uwagi są następujące:

1. Str. 7. Opis aglutynacji jest niezbyt precyzyjny, ponieważ aglutynacja może mieć miejsce również w wyniku zmieszania roztworu erytrocytów (a więc nie krwi) z roztworem przeciwciała. Niekoniecznie musi to być kropla (jak pisze Autor).
2. Str. 7. Raczej odpowiedź odpornościowa a nie immunologiczna (po angielsku mówimy immune response).
3. Str. 8. „Przeciwciała IgM mają bardzo złożoną budowę. Białka te mają w strukturze dziesiątki mostków disiarczkowych i są bardzo bogato glikozylowane." Nie są to zbyt precyzyjne określenia.
4. Str. 11. „Przecinanie IgM" też nie jest najlepszym sformułowaniem.

Lektura dysertacji nasunęła mi kilka pytań, o ustosunkowanie się do których chciałbym prosić Autora:

1. Jaka może być przyczyna proteolitycznej degradacji ciężkiego łańcucha przeciwciał IgM?
2. Jaki może być molekularny mechanizm oligomeryzacji przeciwciał klasy IgG3? Czy Autor dopuszcza ewentualną rolę fragmentu zawiasowego w tym procesie?
3. Przed laty otrzymałem w bakteryjnym systemie ekspresyjnym rekombinowane fragmenty Fab rozpoznające ludzką glikoforynę A, które zawierały dodatkowo fragment zamka leucynowgo z drożdżowego czynnika transkrypcyjnego GCN4. Takie fragmenty tworzyły dimery w roztworze i aglutynowały erytrocyty w stężeniu zbliżonym do stężenia dwuwartościowego przeciwciała (Czerwiński M i współpr., Transfusion 2002, 42: 257-264). Zauważyłem jednak, że fragmenty Fab niezawierające tego fragmentu również również aglutynowały erytrocyty, chociaż w znacznie wyższym stężeniu. Jaka może być tego przyczyna, skoro fragmenty Fab nie zawierają fragmentu CH2 (a jedynie region zawiasowy) i są teoretycznie jednowartościowe?

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Podsumowanie

Pracę doktorską Dr Tomasza Klausa oceniam bardzo wysoko. Autor wykazał się dużą wiedzą i znajomością wielu technik laboratoryjnych, a przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i składam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Tomasza Klausa do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na opublikowanie rozprawy w renomowanych czasopismach, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
Laboratorium Glikobiologii
Prof. dr hab. Marcin Czerwiński