

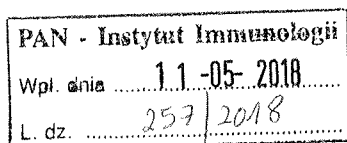


Wydział Lekarski  
Katedra i Zakład Fizjopatologii  
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk  
tel./ fax. 058 349-15-10



Kierownik: Prof. dr hab. med. Jacek M. Witkowski

e-mail: jawit@gumed.edu.pl



Gdańsk, 5 maja 2018

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr inż. Mikołaja Kłossowicza pt. **Ograniczona proteoliza białka adaptorowego LAT: nowy mechanizm regulacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej limfocytów T**

Procesy wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów w limfocytach badane są przez wiele zespołów na całym świecie już od około trzech dekad. Nie znaczy to jednak, pomimo nagromadzenia ogromnej liczby obserwacji opisanych w literalnie tysiącach publikacji, że na ten temat wiadomo już wszystko.

Transdukcja sygnałów w limfocytach T, pomiędzy receptorem dla antygeny (TCR) współistniejącym z kompleksem CD3 a, ostatecznie, odpowiednimi genami ulegającymi transkrypcji na potrzeby skutecznej odpowiedzi immunologicznej, wymaga sprawnej, zorganizowanej czasowo i przestrzennie bezpośredniej interakcji pomiędzy około 30 białkami. Białka te należą głównie do rodziny kinaz białkowych, są wśród nich fosfatazy, fosfolipazy, liczne czynniki transkrypcyjne itp. Osobną, zróżnicowaną grupę stanowią tzw. białka adaptorowe – jak sama nazwa wskazuje pełniące rolę łączników pomiędzy białkami o innym przeznaczeniu. Łączniki te nie są jedynie biernymi klamrami; potrafią zarówno aktywować jak i inaktywować wiążące się do nich białka, ostatecznie wpływając na wielkość i czas trwania sygnałów rozpoczętych przez kontakt TCR/CD3 z prezentowanym epitopem. W oczywisty sposób ma to znaczenie dla efektywności odpowiedzi limfocytów T na pobudzenie antygenowe; zaburzenia czynności białek adaptorowych obserwowano zarówno w przypadku niedoborów odporności adaptatywnej, jak też jej nieprawidłowego natężenia i „kierunku” leżącego u podstaw nadwrażliwości i chorób autoimmunizacyjnych. Wreszcie, białka adaptorowe mogą stać się – w drodze mutacji – onkogenami i prowokować rozwój nowotworów (np. chłoniaków).

Będąc przedmiotem badań włączonych do ocenianej rozprawy białko LAT należy do kategorii białek adaptorowych w limfocytach T i jego główna funkcja polega na połączeniu aktywnego kompleksu TCR/CD3 (i towarzyszących kinaz) z dalszymi elementami ścieżki transdukcji sygnału.

Wydawałoby się, że w związku z tą – pojęciowo stosunkowo prostą – funkcją o białku LAT wiemy już wszystko, zwłaszcza, że opisane zostało już prawie dokładnie 20 lat temu (Zhang i wsp., Cell. 1998 Jan ; 92(1):83-92. Okazuje się jednak, że pewne zagadnienia pozostały otwarte. Jednym z nich jest mechanizm kontroli nad ilością i aktywnością LAT w stymulowanych limfocytach. Od dawna wiadomo, że powstające w trakcie aktywacji kompleksy LAT/SLP76 ulegają endocytozie, po czym LAT podlega ubikwitylacji i degradacji w proteasomach. Doktorant zajął się jednak inną możliwością – ograniczoną proteolizą białka LAT jako sposobem na spowodowanie zmiany jego aktywności, a w konsekwencji siły i czasu trwania transdukowanego sygnału. Takie podejście jest nowatorskie i ciekawe. Recenzentowi, zajmującemu się od ponad dwóch dekad zjawiskami ograniczonej proteolizy w normalnych i białaczkowych limfocytach jest ono szczególnie bliskie. **Dlatego uważam podjęcie przez mgra Kłossowicza tej tematyki badawczej za w pełni uzasadnione.**

Rozprawa napisana jest w zasadniczo typowym układzie, chociaż zwracają uwagę pewne odmienności w stosunku do standardu, jak np. 10-stronicowa (!) lista stosowanych odczynników, czy też lista wykorzystanego w badaniach sprzętu laboratoryjnego, Tabela 6.1 zawierająca „statystyki publikacji” (?) czyli liczbę wykorzystanych publikacji, stron internetowych, podział na literaturę obcojęzyczną i krajową czy też liczebność prac opublikowanych w ostatniej dekadzie i wcześniej) a także umieszczony na końcu spis tabel i rycin zamieszczonych w pracy. Inną, trochę irytującą, odmiennością jest **brak jednoznacznie, skrótowo sformułowanych wniosków** do jakich doprowadziły doktoranta wyniki przeprowadzonych badań; jest tylko 20-stronicowy rozdział „Dyskusja i wnioski”, ale samych wniosków brak. **Bardzo proszę doktoranta o ich sformułowanie i przedstawienie podczas publicznej obrony.**

Zwraca uwagę pewna dysproporcja objętości poszczególnych formalnych części rozprawy. I tak, Wstęp zajmuje 47 stron, rozdział Materiały i metody aż 40 stron (!), Wyniki (których zwykle jest najwięcej) to tylko 33 strony i wreszcie wspomniana już Dyskusja zaledwie 20 stron. Wstęp jest praktycznie kompletnym, erudycyjnym podsumowaniem obecnej wiedzy na temat białka LAT (co jest oczywiste; tu znajdują się przesłanki do podjętych badań). Te informacje pochodzą z bogatego zasobu literatury fachowej na temat LAT (baza PUBMED zwraca około 800 tytułów; warto tu wspomnieć, że lista pozycji literatury wykorzystanych w rozprawie liczy aż 278 tytułów; nieco ponad połowa z ich pochodzi z ostatniej dekady). Wg recenzenta ta część Wstępu mogłaby się stać materiałem dla pracy przeglądowej doktoranta. Uzasadniona jest także część wstępu dotycząca wewnątrzkomórkowych mechanizmów degradacji białek. Wstęp zawiera jednak także – moim zdaniem zbyt rozbudowaną – informację o zjawisku apoptozy czy też o regulatorowych limfocytach T (Treg). W odniesieniu do tych ostatnich, we wstępie znajdujemy podrozdział o prowokacyjnym tytule „Limfocyty T regulatorowe – komórki w stanie permanentnej anergii?” (str. 65). I tu mam zastrzeżenie merytoryczne. Anergia limfocyta, jak sam doktorant definiuje na str 66, to „brak zdolności do wzbudzenia jakiegokolwiek odpowiedzi po rozpoznaniu antygenu”. Natomiast limfocyty

Treg są jak najbardziej aktywne; m.in., ulegają namnożeniu w schyłkowej fazie odpowiedzi, produkują cytokiny przeciwzapalne, granzymy i perforyny - nazwanie ich - choćby prowokacyjne - permanentnie anergicznymi jest błędem (zresztą autor nie wyjaśnia tej koncepcji w tekście, a raczej wskazuje na „znaczące różnice” pomiędzy Treg i anergicznymi limfocytami; po co więc prowokacja?).

Podsumowując - przeczytanie Wstępu nie naprowadza czytelnika na możliwe cele podjętych badań, natomiast „rozcieńcza” informację istotną przez dodanie informacji niepotrzebnej.

Tu trzeba niestety wspomnieć o **słabej jakości językowej rozprawy**, widocznej szczególnie właśnie we Wstępie. Zawiera on dosłownie dziesiątki, jeśli nie setki „literówek” (np. „kinezy” zamiast „kinazy”, „integracji” zamiast „interakcji”, „śladowanymi” zamiast „składanymi”, „udział proteasom w tworzenia” zamiast „udział proteasomu w tworzeniu” , „spektrofotometr” zamiast „spektrofotometr” itd), niepoprawne użycia terminu „ilość komórek” (powinno być „liczba”, komórki są policzalne), liczenie komórek za pomocą (nieznanej) „komory Burcknera” – powinno być Bürckera, a także „chorób autoagresywnych” – powinno być „chorób z autoagresji” chociaż i ta nazwa jest obecnie słusznie wypierana przez „choroby autoimmunizacyjne”. W tekście pojawiają się dziwne sformułowania (np. „przeszukanie przez limfocyt T całej komórki” na str 25) itd. Ponadto, we Wstępie czasami pojawiają się nowe terminy bez ich zdefiniowania (np. „sygnałsom” – termin zawarty już w tytule podrozdziału 1.3.3.1 na str. 31 i kluczowy dla zrozumienia roli LAT nie jest formalnie zdefiniowany). W zamieszczonym we wstępie Rysunku 1.3 (dotyczącym porównania sekwencji aminokwasowych białek LAT u ssaków) wymienione są: człowiek, bydło, mysz i szczur. Pół biedy z człowiekiem, gdyż aktualnie mamy tylko jeden gatunek ludzki – *Homo sapiens*; natomiast pozostałe trzy określenia są zbyt ogólnikowe (zwłaszcza „bydło”) - powinny być użyte nazwy gatunkowe (np. w różnych gatunkach „bydła” porównywane sekwencje mogą – teoretycznie - być różne). Także przygotowanie referencji nie ustrzegło się od błędu: na str. 144 cytowana jest praca „Alamet et al. 1997”, której nie ma na liście cytowanych publikacji. Co ciekawe, także w publikacji (Kłossowicz i wsp. 2013) w której znajdują się opisane w rozprawie wyniki (do tej sprawy wróć poniżej) znajdujemy poprawną referencję do pracy „Alam et al. 1997”, ale samej publikacji brak wśród referencji (dla zainteresowanych: chodzi o ciekawą pracę Specific Activation of the Cysteine Protease CPP32 during the Negative Selection of T Cells in the Thymus. Antoine Alam, Michel Y. Braun, Franca Hartgers, Sylvie Lesage, Luchino Cohen, Patrice Hugo, François Denis, Rafick-Pierre Sékaly J Exp Med. 1997 Nov 3; 186(9): 1503–1512, której zacytowanie jest jak najbardziej uzasadnione.

**Wszystko to sprawia wrażenie, że rozprawa została napisana, ale nie przeczytana przed drukiem w celu „wyłapania” takich błędów.**

Jeśli chodzi o (jak wspomniałem, bardzo rozbudowany) opis materiałów i metod stosowanych w pracy, to zabrakło mi (strona 85) informacji o zgodzie odpowiedniej komisji ds. etyki w badaniach naukowych na pozyskanie krwi obwodowej zdrowych dawców. W tym samym punkcie 3.1.5.3. brakuje także informacji, w jaki sposób uzyskano z krwi oczyszczone limfocyty T. Ponadto,

stwierdzenie dotyczące etyki badań na zwierzętach (uzyskania zgody KE na takie badania) dotyczy wyłącznie myszy (jak wynika z poprzedzającego je opisu). Natomiast w pracy uzyskano materiał także od niesprecyzowanej liczby kotów, psów, świń (domowych) i krów (patrz wyniki na Rysunku 4.2). Czy istnieje zgoda odpowiedniej KE na te badania? Dalej, na liście sprzętu (str. 87-88) o podtytule „Hodowle komórkowe/cytometria/mikroskopia” NIE wymieniono żadnego cytometru (o rodzaju użytego instrumentu dowiadujemy się później z tekstu). Po co zamieszczać niekompletną listę? To kolejny dowód braku staranności edytorskiej i/lub wielkiego pośpiechu przy pisaniu rozprawy.

Ponadto, opisy metod nie zawierają praktycznie jakichkolwiek odniesień do źródeł tychże. Stwarza to wrażenie, że doktorant sam opracował wszystkie te metody, co oczywiście nie może być prawdą. Brak takowych odniesień nie pozwala na stwierdzenie poprawności użytej metody i jej dostosowania do celu badań, a opisy często są zbyt skrótowe. Na przykład opis transformacji bakterii metodą elektroporacji (str. 99) wydaje się urwany w połowie. Dowiadujemy się z niego o samej elektroporacji, a następnie o wysianiu bakterii na pożywkę, ale już nie o selekcji bakterii które uległy transformacji od tych, które nie stransformowały, ani też o wydajności tej techniki w tym konkretnym przypadku. Podobnie słaby jest opis analizy cytofluorymetrycznej (str. 101-2). Nie dowiadujemy się z niego, ile komórek analizowano z kolejnej próbki, jakie były konfiguracje przeciwciał do barwień (wspomniany w tym opisie cytometr FACS<sup>Sort</sup><sup>™</sup> może równocześnie ocenić tylko trzy kolory fluorescencji (zieloną, żółtą i czerwoną) wzbudzonej laserem argonowym (linia 488 nm). Nie podano, jakiej kontroli izotypowej użyto. W przypadku barwień białek wewnątrzkomórkowych w opisie wspomniano, że proces utrwalania/permeabilizacji komórek prowadzono przez 20h (str. 102) –co z pewnością jest niemożliwe! Wreszcie, mam dużą wątpliwość odnośnie użycia cytometru FACS<sup>Sort</sup> do oceny fluorescencji przeciwciał czy aneksyny V związanej z fluorochromem APC, gdyż fluorescencja APC praktycznie nie wzbudza się pod wpływem niebieskiego światła 488nm. Albo więc wyniki są nieprawdziwe, albo używano innego cytometru. Jakiego? Z odpowiedniej części publikacji (Kłossowicz i wsp. 2013) dowiadujemy się, że były to bardziej odpowiednie do tego zadania cytometry FACS<sup>Calibur</sup> lub Fortessa. Którego z nich użyto do oceny wiązania APC-Aneksyny do komórek??

Dalej, kluczowe badanie procesu degradacji LAT w aktywowanych mysich limfocytach T (opis metody str. 109) wykonano po najwcześniej 16 godzinach stymulacji anty-CD3 i anty-CD-28 i kolejnych 4 godzinach inkubacji z mającym wywołać apoptozę AICD przeciwciałem anty-Fas. **Dlaczego stosowano tak długi okres tej ostatniej inkubacji? Czy został on dobrany na podstawie pilotowych doświadczeń, w których użyto różnych czasów ekspozycji na anty-Fas?**

Ponieważ rozprawy doktorskie często są źródłem takich „technicznych” informacji, metodyka powinna być w nich opisana bardzo starannie (albo, jak wspomniałem, wsparta odniesieniem do prac źródłowych; obydwu zabrakło w ocenianej rozprawie). Jedyna referencja w „Materiałach i metodach” to zacytowanie pozycji [20] na stronie 101. Abstrahując od zmienionej konwencji zapisu

referencji w tekście (pozostałe to nazwisko autora i rok publikacji), na liście cytowanych w rozprawie referencji w poz. 20 znajdujemy pracę Berget dotyczącą rozpoznawania egzonów!

Sformułowane przez doktoranta cele pracy obejmują charakterystykę procesu degradacji LAT a także jego izoformy z zachowanym fragmentem peptydowym odpowiadającym intronowi i6 (LAT<sub>i6</sub>), w tym identyfikację enzymów degradujących, kinetykę procesu degradacji w kontekście apoptozy, a także opracowanie metody pomiaru procesu degradacji LAT w pojedynczych komórkach T. Dodatkowym celem było zbadanie wpływu ww fragmentu peptydowego obecnego w izoformie LAT<sub>i6</sub> na funkcje tego białka. **Cele te, chociaż nie do końca wynikające ze Wstępu, są uzasadnione niedoborami wiedzy w tej dziedzinie i zostały przez doktoranta zrealizowane.**

**I tak, w jednojądrzastych komórkach ludzkiej krwi obwodowej (PBMC) doktorant wykazał obecność nie tylko oryginalnej izoformy LAT, ale także zawierającej transkrybowany intron izoformy LAT<sub>i6</sub>.** Wykazał też, że obydwie izoformy występują w różnych proporcjach w PBMC pochodzących od myszy, kota, psa, świni i krowy, przy czym mysz ma tylko LAT, zaś krowa – wyłącznie LAT<sub>i6</sub>. **Nie jest jasne (gdyż w rozprawie brak takiej informacji) jakich starterów użył doktorant do reakcji RT-PCR dla materiału zwierzęcego;** z Rys. 1.3 wynika, że sekwencja intronu 6 u człowieka i u „bydła” różni się znacznie. Samo pokazanie na Rys. 4.1.A obszarów obejmowanych przez startery F1, R1, oraz R2 nie wystarcza. **Pomimo, że sekwencje te można znaleźć w Tabeli 1 będącej suplementem do pracy Kłossowicz i wsp. 2014, poproszę o ich prezentację w trakcie publicznej obrony z pokazaniem różnic sekwencji.**

Dalej, analizując różne sekwencje intronu i6, doktorant wykazał, że **poziom ekspresji izoformy LAT<sub>i6</sub> zależy od liczby obecnych w obszarze i6 powtórzeń motywów poliguaninowych będących wzmacniaczami splicingowymi (ISE GGG).**

Z kolei, **dekodując sekwencję aminokwasów zakodowaną w intronie 6, autor wykazał jej względne wzbogacenie w glicynę (20% aminokwasów kodowanych przez intron) częściowo skojarzoną w dwie pary z resztami z tryptofanu, a także w prolinę.** Dalsza informatyczna analiza tej sekwencji doprowadziła autora do konstatacji, że ten fragment białka LAT<sub>i6</sub> może stanowić dodatkowe miejsce dokowania dla kinazy ERK2, która nie łączy się z kanoniczną formą LAT. Obecność peptydu i6 ma także powodować brak miejsca wiążącego inną niezmiernie istotną w transdukcji sygnałów w limfocytach T kinazę – LCK. Sugerowałoby to nieco inną strukturę sygnałosomu w przypadku Lat i LAT<sub>i6</sub>. **Wprawdzie autor zastrzega, że nie posiada potwierdzeń doświadczalnych takich zmian w sygnałosomie, proszę o zaprezentowanie porównawcze sygnałosomu LAT (na bazie Rys. 1.2) i możliwego „sygnałosomu LAT<sub>i6</sub>” z ewentualnym omówieniem czynnościowych skutków zmiany w trakcie publicznej obrony.** Autor wykazał natomiast (techniką transfekcji odpowiednich plazmidów do komórek HEK), że komórki eukariotyczne mogą w ogóle dokonywać efektywnej

produkcji białka LAT<sub>i6</sub>, co poprzedziło doświadczalną próbę określenia komórkowej lokalizacji obydwu izoform. Te ostatnie badania wykazały, że LAT<sub>i6</sub>, podobnie jak LAT, lokalizuje się w błonie komórkowej. Do badań tych wykorzystano ciekawą linię komórek pochodnych Jurkat – JCaM2, oryginalnie LAT<sup>-/-</sup>, do której wtransfekowano geny białek fuzyjnych LAT-ZsGreen i LAT<sub>i6</sub>-ZsGreen co umożliwiło obserwację komórkowego rozmieszczenia tych form. Rozwinięciem tych obserwacji było wykazanie, że LAT oraz LAT<sub>i6</sub> lokalizują się specyficznie we frakcji nierozpuszczalnej w detergentach niejonowych (tratew lipidowych lub mikroklastrów) – to również sugeruje funkcjonalność LAT<sub>i6</sub>.

Kolejny aspekt badań zawartych w rozprawie to próba wykazania udziału białka LAT<sub>i6</sub> w aktywacji limfocytów T. Technika mikroskopii fluorescencyjnej wykazano lokalizację LAT oraz LAT<sub>i6</sub> w synapsach immunologicznych pomiędzy komórkami JCaM2 wyposażonymi w LAT-ZsGreen lub LAT<sub>i6</sub>-ZsGreen a ziarnami stymulującymi pokrytymi przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD28. Natomiast techniką cytometrii przepływowej wykazano identyczny poziom aktywacji obydwu tych typów komórek pod wpływem antyCD3 i anty-CD28 oceniany przez wzrost ekspresji markera wczesnej aktywacji – CD69. Może to świadczyć to o funkcjonalnej identyczności LAT oraz LAT<sub>i6</sub> (pomimo różnic w wiązaniu klnaz wspomnianej powyżej). Zastrzeżenie recenzenta budzi tu zawarte w rozprawie stwierdzenie (str. 127), że wyniki badań wskazują na pełną funkcjonalność LAT<sub>i6</sub> w limfocytach T, podczas gdy komórki Jurkat, dodatkowo modyfikowane (linia JCaM2) to wyprowadzona z szybko rosnącej ostrej białaczki z limfoblastów T, wysoce heterogenna (co najmniej oligoklonalna) linia komórkowa, w której transdukcja sygnałów przebiega inaczej (co najmniej z inną dynamiką) niż w nienowotworowych limfocytach T człowieka. **Proszę o dowód, lub przynajmniej propozycję doświadczenia, pozwalającego na wykazanie, iż LAT<sub>i6</sub> działa tak samo w ludzkich nienowotworowych limfocytach T krwi obwodowej jak w ww liniach komórek nowotworowych.**

Dalej, zgodnie z założonymi celami, doktorant zajął się mechanizmami degradacji izoform LAT i LAT<sub>i6</sub>. Wykazał, że LAT<sub>i6</sub> charakteryzuje się znacznie (o około 1/3) krótszym okresem półtrwania, a także, że degradacja LAT w komórkach JCaM2 wyposażonych w LAT lub LAT<sub>i6</sub> nie jest skutkiem aktywności proteasomów (Rys. 4.14) i zachodzi poczynając od C-terminalnego końca cząsteczki, co zainspirowało go do szukania innych mechanizmów proteolitycznej degradacji izoform LAT. Obserwacja degradacji LAT do fragmentów 17, 23 i 28 kDa w mysich tymocytach stymulowanych anty-CD3 i anty-Fas, lub eksponowanych na deksametazon lub etopozyd, a także w spoczynkowych (błędnie określanych jako „naiwne”, traktowanych proapoptotycznymi związkami etopozydem i staurosporyną) i aktywowanych anty-CD3/anty-CD28 oraz indukowanych anty-Fas limfocytach T z mysich węzłów chłonnych (czyli w komórkach ulegających programowanej śmierci AICD/apoptozie) dała doktorantowi asumpt do sprawdzenia, czy enzymami odpowiedzialnymi za tę ograniczoną proteolizę LAT nie mogą być kaspazy.

Pierwszym dowodem na słuszność takiej hipotezy było ustalenie obecności w cząsteczkach LAT sekwencji oligopeptydowych będących ewolucyjnie konserwowanymi miejscami cięcia przez

kaspazy oraz granzym B (Rys. 4.18A), a kolejnym – wykazanie zahamowania degradacji LAT przez swoiste inhibitory kaspaz i granzymu B. **Poszerzenie tej analizy sekwencji o ustalenie przybliżonych mas cząsteczkowych peptydów pochodnych LAT, uzyskanych w wyniku cięcia w podanych miejscach, dalej uwiarygodniłoby tezę o udziale kaspaz w degradacji LAT, gdyby te masy były zbliżone do obserwowanych (17, 23 i 28 kDa); niestety autor nie przeprowadził takiej analizy – poproszę o jej przeprowadzenie i prezentację podczas publicznej obrony.** Autor wspomina wprawdzie w dyskusji (str 161) że fragment 17 kDa może być skutkiem cięcia w miejscu DEDD, ale nie pokazuje danych. Na Rys. 4.18B autor przedstawia przykładowy wynik doświadczenia, w którym proteolizę LAT w tymocytach mysich indukowaną deksametazonem próbowano zahamować działaniem inhibitorów oligopeptydowych określanych skrótami zVAD, zIETD oraz zVDVAD. **Opisując go, autor stwierdza, że inhibitor swoisty dla kaspazy 8 oraz granzymu B, określany jako z IETD, ogranicza degradację LAT co domyślnie ma być dowodem na udział obydwu tych proteaz w degradacji LAT. Jednak bez analizy densytometrycznej wyników tych doświadczeń przy odpowiedniej liczbie ich powtórzeń (a w rozprawie nie ma informacji, ile takich powtórzeń wykonano) obserwacja bardzo niewielkiej zmiany wielkości prążków odpowiadających peptydowi 17 i 23 kDa w porównaniu do kontroli nie uprawnia do takiej interpretacji. Poproszę o przedstawienie takiej analizy podczas publicznej obrony.** Jedynym skutecznym inhibitorem degradacji LAT w tymocytach wystawionych na działanie deksametazonu jest zVAD. Niestety, ten inhibitor jest BARDZO nieswoisty – oprócz kaspaz, hamuje także działanie innych peptydaz cysteinowych, między innymi katepsyn i kalpain. Może więc to któreś z tych proteaz degradować LAT, zwłaszcza że obydwie rodziny (w szczególności kalpainy) potrafią produkować długie fragmenty ciętych białek? Sprawdzenie tej hipotezy wymagałoby zastosowania innych swoistych inhibitorów, najlepiej techniki interferencji RNA, będącej najbardziej efektywnym sposobem na zmniejszenie aktywności badanego enzymu w żywych komórkach, albo też próby degradacji czystego LAT czystym enzymem określonego typu w układzie 1:1 in vitro. Zarówno białko LAT (rekombinowane) jak i preparaty różnych kaspaz, katepsyn, granzymów i kalpain są komercyjnie dostępne. **O ile to technicznie możliwe, proszę o przeprowadzenie i zaprezentowanie wyników doświadczenia, w którym rekombinowany LAT poddano działaniu kaspazy 8 lub granzymu B w czystym układzie in vitro.**

Kolejne ciekawe obserwacje doktoranta to stwierdzenie iż fosforylacja LAT in vitro zapobiega przynajmniej częściowo jego degradacji w komórkach traktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, anty-Fas lub etopozydem. Co interesujące, udokumentowana fosforylacja LAT w trakcie aktywacji tymocytów i limfocytów T za pomocą anty-CD3 nie czyni go odpornym na degradację. Autor słusznie interpretuje tę różnicę jako możliwy efekt selekcji na etapie różnicowania tymocytów.

Ostatnim doświadczalnym składnikiem rozprawy jest zaprezentowanie cytometrycznej metody oceny degradacji LAT w pojedynczych tymocytach/limfocytach T i wykorzystanie jej do

wykazania udziału kaspaz w tym procesie oraz porównania procesu degradacji w tymocytach CD4+CD8low (potencjalnie zawierających nTreg). Autor wykorzystuje tu przeciwciało M-19, rozpoznające C-terminalny odcinek LAT, który, jak pamiętamy, jest odcinany najwcześniej. Jest to bardzo pomysłowe podejście. Przedstawiona metoda rzeczywiście pozwala na ocenę utraty LAT z badanych komórek i dobrze koreluje z badaniami techniką Western blot, jest więc przydatnym narzędziem badawczym. Cytogramy ekspresji białek LAT otrzymane w komórkach kontrolnych oraz indukowanych deksametazonem w obecności lub bez wspomnianych inhibitorów ( Rys. 4.23; zVAD itd.) różnią się w przewidywany sposób. Podobnie jak w przypadku badań techniką WB jedynie zVAD i częściowo zLETD hamuje degradację LAT; moje zastrzeżenia odnośnie interpretacji tych wyników się nie zmieniają. W szczególności, autor dodał do panelu inhibitor kaspazy 3 – zDQMD, kaspazy 3 i 7 – zDEVD oraz kaspazy 9 – zLEHD; żaden z nich nie zapobiegł degradacji LAT w obecności deksametazonu. **Degradacja w tych warunkach została natomiast znacznie zredukowana przez działanie cykloheximidu. Jak autor interpretuje ten wynik, który nie został przedyskutowany w rozprawie?** Z kolei Rysunek 4.24A zawiera przykładowe wyniki oznaczenia degradacji LAT w subpopulacji mysich tymocytów o wspomnianym fenotypie CD4+CD8low. Jak łatwo zauważyć, odsetek tych tymocytów, które utraciły LAT, wyniósł 19.3% w próbie kontrolnej i 37.1% w próbie stymulowanej anty-CD3 i wartości te dotyczą komórek negatywnych względem ekspresji FoxP3. Obecne w tych samych próbkach tymocyty FoxP3+ nie wykazały degradacji LAT w warunkach doświadczenia, co pozwoliło autorowi na słuszną aczkolwiek źle sformułowaną konkluzję, że są one „niewrażliwe na degradację LAT”. Wrażliwym jest coś na czynnik wywołujący zmianę w tym czymś, a nie na efekt tej zmiany. W tym konkretnym przypadku badane komórki były niewrażliwe na stymulację anty-CD3ε, w innych tymocytach prowadzącą do degradacji LAT. Dalsze badanie tej ciekawej populacji (Rys. 4.24B) wykazało, że jest to heterogenna grupa komórek o różnym fenotypie antygenów aktywacyjnych i związanych z różnicowaniem tymocytów CD24 i CD69. Niestety utrudnieniem zrozumienia tych wyników jest pojawienie się dwóch paneli (dot-plotów) pokazujących ekspresję TCRβ oraz CD69 w tymocytach FoxP3+, opisanych jako LAT+CD4+CD8low, przy czym odsetkowe wartości czterech wyróżnionych na tych panelach populacji są różne. Podobnie w dolnym rzędzie plotów, w którym pokazano ekspresję CD3ε vs CD24, te same dwa ostatnie ploty domyślnie oznaczone jako LAT+CD4+CD8low wykazują dramatycznie różne odsetki (np. wyróżniona subpopulacja CD3ε+CD24+ stanowi 88% na jednym i tylko 13% na drugim panelu. **Bardzo proszę o wyjaśnienie tych różnic w trakcie publicznej obrony.**

Rozprawę kończy stosunkowo krótka dyskusja (rozdział 5, zatytułowany Dyskusja i Wnioski, ale jak już wspomniałem niezawierający sformułowanych wniosków). Zasadniczo poprawnie przedyskutowano w niej własne wyniki w kontekście literatury. Pozostają jednak pytania, na które nie znalazłem tutaj odpowiedzi. I tak, byłoby bardzo interesujące gdyby autor podał informację, jaki odsetek normalnych mysich tymocytów i limfocytów T, a także ludzkich limfocytów T, zawiera białko



izoformy LATi6, czy jest ona współwyrażana w tych komórkach z kanoniczną formą LAT? Na stronie 152 w Dyskusji znajdujemy (niestety) informację, że próba uzyskania przeciwciała „anty-i6” zakończyła się niepowodzeniem. Bez takiego narzędzia uzyskanie powyższej informacji jest trudne, ale nie niemożliwe; można wysortować określoną interesującą populację limfocytów (np. Treg), a następnie sprawdzić techniką WB (może po rozdzieleniu białek techniką ogniskowania izoelektrycznego, a nie tylko prostym PAGE) czy w komórkach występują obydwie formy i w jakiej proporcji, używając standardowych przeciwciał anty-LAT. Wykazanie tej obecności pozwoliłoby na dociekanie o funkcji LATi6 w badanych komórkach. Obecność białka LATi6 w komórkach transfekowanych jego genem nie stanowi tu dowodu, że tak samo będzie w natywnych limfocytach T. Te doświadczenia udowadniają jedynie, że MOŻE ono być obecne oraz, że w takim przypadku powinno się lokalizować do trawów błonowych GEM. Mam nadzieję, że autor rozważy powyższe jako propozycję dalszych badań tego ciekawego zagadnienia.

Ciekawe są rozważania odnośnie możliwej roli izoformy LATi6 jako czynnika przyspieszającego zakończenie części inicjacyjnej procesu transdukcji sygnału od TCR/CD3. W tym kontekście warto by było (pod warunkiem posiadania odpowiednich narzędzi) porównać poziom białka LATi6 w różnych stanach chorobowych (nienowotworowych), w których aktywacja limfocytów T (bądź tworzenie Treg) jest zaburzone. Podobnie, bardzo ważne (jako potencjalne nowe mechanizmy prawidłowej, a także zaburzonej kontroli nad transdukcją sygnału w limfocytach T) są badania degradacji LAT. Z pewnością powinny one być kontynuowane, z wykorzystaniem różnych populacji limfocytów T ex vivo, preferencyjnie ludzkich, nie tylko w warunkach wymuszonej apoptozy ale w trakcie prawidłowej odpowiedzi na stymulację poliklonalną lub antygenową. Do tych badań z pewnością bardzo przydatnym narzędziem będzie cytometryczna metoda oceny degradacji LAT.

Jak wspomniałem, lista pozycji literatury wykorzystanych w rozprawie to aż 278. To bardzo imponująca liczba; niestety tyżką dziegciu może być, że przeliczenie pierwszych wystąpień danej pozycji w tekście pracy (głównie we Wstępie i Dyskusji, ponieważ jak wspomniałem w rozdziałach dotyczących metod i wyników autor nie odwoływał się do żadnych referencji) zwraca zaledwie 254 prac; **wygląda więc na to, że około 20 prac (dopuszczając błąd zliczenia) nie zostało w ogóle zacytowane w rozprawie!** To niestety kolejny dowód edytorskiej niestaranności i pośpiechu podczas przygotowania rozprawy.

**Niestety, mam także pewne zastrzeżenia formalne.** Otóż, większość badań zaprezentowanych w rozprawie, zostało opublikowane już w latach 2013-14, podczas gdy rozprawa pochodzi z roku 2018. Z trzech prac, w 2 doktorant jest pierwszym autorem (1: Kłossowicz M, Marek-Bukowiec K, Arbulo-Echevarria MM, Ścirka B, Majkowski M, Sikorski AF, Aguado E, Miazek A. Identification of functional, short-lived isoform of linker for activation of T cells (LAT). Genes Immun.

2014 Oct;15(7):449-56. doi: 10.1038/gene.2014.35. Epub 2014 Jul 10. PubMed PMID: 25008862. 2: Kłossowicz M, Scirka B, Suchanek J, Marek-Bukowiec K, Kisielow P, Aguado E, Miazek A. Assessment of caspase mediated degradation of linker for activation of T cells (LAT) at a single cell level. J Immunol Methods. 2013 Mar 29;389(1-2):9-17. doi: 10.1016/j.jim.2012.12.004. Epub 2012 Dec 20. PubMed PMID:23261919.), zaś w trzeciej, a chronologicznie pierwszej (García-Blesa A, Kłossowicz M, López-Osuna C, Martínez-Florensa M, Malissen B, García-Cózar FJ, Miazek A, Aguado E. The membrane adaptor LAT is proteolytically cleaved following Fas engagement in a tyrosine phosphorylation-dependent fashion. Biochem J. 2013 Mar 15;450(3):511-21. doi: 10.1042/BJ20121135) jest drugim autorem. Prace te zostały wymienione przez doktoranta na nienumerowanej stronie przed spisem treści, natomiast praktycznie nie ma do nich odniesień w tekście pracy.

Z prac tych pochodzi większość wyników, przedstawionych na rys. 4.1– 4.24, z wyjątkiem wyników analiz bioinformatycznych (Rys. 4.3 i Tab. 4.2, Rys. 4.6, 4.7, 4.8), wyniku oceny ekspresji białka izoformy LATI6 w transfekowanych komórkach HEK293T (Rys. 4.9), Rys. 4.16C pokazującego kinetykę degradacji LAT w aktywowanych mysich limfocytach T pod wpływem indukcji anty-Fas, i wreszcie Rys. 4.23B, gdzie zilustrowano wpływ cykloheximidu hamujący degradację LAT w tymocytach. Te „nowe” wyniki są ciekawe, ale są jedynie uzupełnieniem tych już zamieszczonych w pracy a pochodzących z publikacji. Ilustracje 4.1-4.24 są więc w większości bezpośrednimi kopiami ilustracji z ww publikacji, w których jedynie spolszczono opisy. W przypadku pracy Garcia-Blesa i wsp. dowiadujemy się z niej, że doktorant wykonywał zawarte w niej badania na tymocytach oraz na komórkach linii VL3-3M2 i tylko te wyniki z tej publikacji są zamieszczone w rozprawie. Nie wiadomo natomiast, które wyniki zawarte w pozostałych dwóch pracach były otrzymane przez doktoranta, a jeśli część była innego autorstwa, to czy miał on zgodę współautorów na ich wykorzystanie w rozprawie? Ponadto, w rozprawie znajdujemy co najmniej niektóre zdania, będące bezpośrednim tłumaczeniem z ww prac; np. na str. 144 zdanie „Ponieważ zaledwie 0.07% tymocytów...” jest bezpośrednim tłumaczeniem odpowiedniego zdania z publikacji Kłossowicz i wsp Imm Meth 2013. Sprawia to wrażenie ograniczonego, ale jednak autoplagiatu.

#### **Moje pytania są więc następujące:**

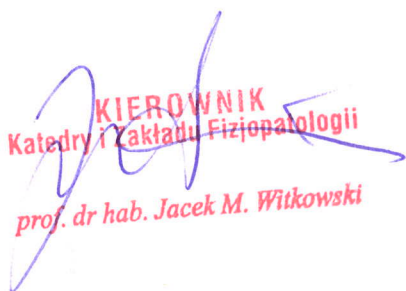
- Dlaczego zaprezentowaną rozprawę doktorską dzieli około 4 lat od opublikowania przeważającej części zawartych w niej wyników w trzech publikacjach?
- Dlaczego doktorant nie podjął próby obrony na podstawie „zszywki” tych trzech prac opatrzonej krótkim tekstem omówienia?
- Jaki był rzeczywisty wkład badawczy doktoranta w prace, w których był on pierwszym autorem? (Zwyczajowo, powinien przekraczać 50%)

- Czy doktorant miał zgodę wszystkich krajowych i zagranicznych współautorów trzech ww prac na ich wykorzystanie w swojej rozprawie doktorskiej?

### Konkluzja

Podsumowując, rozprawa doktorska mgra inż. Mikołaja Kłossowicza ma walor interesującego, ważnego poznawczo i potencjalnie klinicznie tematu, została zasadniczo poprawnie wykonana od strony metodycznej (jak oceniam, głównie przez niego samego) i pozwoliła na poczynienie nowych i interesujących obserwacji, co potwierdza fakt opublikowania znacznej większości z nich. Natomiast sama rozprawa napisana jest bardzo niestarannie. Pewne wątpliwości stwarza interpretacja wyników, zwłaszcza w odniesieniu do kluczowych obserwacji udziału różnych proteaz w degradacji LAT. Powyżej sformułowałem także moje wątpliwości dotyczące strony formalnej przedstawionej do recenzji rozprawy. Mimo tych i innych zawartych w recenzji powyżej uwag merytorycznych, edytorskich, a także formalnych uważam, że rozprawa zasadniczo spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk. Warunkiem mojej pełnej akceptacji rozprawy jako podstawy do ubiegania się doktoranta o stopień doktora nauk będzie uzyskanie wyjaśnień odnośnie wszystkich ww kwestii.

Dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN warunkowy wniosek o dopuszczenie mgra inż. Mikołaja Kłossowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
**KIEROWNIK**  
**Katedry i Zakładu Fizjopatologii**  
*prof. dr hab. Jacek M. Witkowski*