



<http://www.il.waw.pl>
Dyrekcja: (+48-22) 851-43-69
(+48-22) 851-44-96
Fax: (+48-22) 841-06-52

Gł. Księgowy: (+48-22) 851-43-76
w.130

Biuro Organizacji
Badań Kontrolnych
i Naukowych: (+48-22) 841-36-51
w.338

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Marka Gryzika

„Wpływ toksyny bakteryjnej listeriolizyny O oraz jej mieszanin z przeciwciałem anti-CD20 na ludzkie limfocyty oraz limfocytarne linie komórkowe”

Choroby nowotworowe należą do jednej z najczęstszych przyczyn zgonów we współczesnym społeczeństwie. Dlatego poszukiwanie nowych leków oraz terapii przeciwnowotworowych nieodmiennie przyciąga uwagę grup badawczych i firm farmaceutycznych. Poszukiwanie nowych terapii przeciwnowotworowych nie ogranicza się do poszukiwania nowych substancji aktywnych. Bada się też interakcje występujące między znanymi lekami przeciwnowotworowymi a substancjami pochodzenia naturalnego. Jedną z metod leczenia nowotworów jest tzw. immunoterapia bierna, w której stosuje się przeciwciała skierowane przeciw antygenom znajdującym się na powierzchni komórek nowotworowych. Cechą charakterystyczną tej grupy leków jest rozpoznawanie antygenów nowotworowych TAAs (tumor-associated antigens), które występują na powierzchni komórek nowotworowych. W ostatnich latach wprowadzono do lecznictwa wiele przeciwciał, w szczególności skierowanych przeciw pojedynczemu epitopowi, tzw. przeciwciał monoklonalnych.

Główny cel pracy mgr Marka Gryzika dotyczył zbadania możliwości zastosowania listeriolizyny O, oraz jej kombinacji z chimerycznym przeciwciałem monoklonalnym rytuksymabem, w leczeniu chłoniaka limfocytarne/przewlekłej białaczki limfocytarnej (SLL/CLL). Pomimo licznych prób jak dotąd nie udało się ustalić optymalnego sposobu postępowania terapeutycznego w CLL, której przebieg może odbywać się w sposób łagodny (wiążący się z wieloletnim okresem przeżycia) lub agresywny (znacznie skracającym okres przeżycia). Zatem, pomimo istotnego postępu w leczeniu CLL cały czas jest zapotrzebowanie na nowe leki i systemy terapeutyczne.

Listeriolizyna O, należąca do hemolizyn zależnych od cholesterolu, jest głównym czynnikiem patogenezy listeriozy, choroby wywoływanej przez bakterie Gram-dodatnie *Listeria monocytogenes*. W zależności od warunków, białko to może wykazywać odmienne

właściwości. Może aktywować szlaki biochemiczne promujące przeżycie komórki (np. szlak NF- κ B), ale także indukować apoptotyczną (poprzez aktywację kaspazy-1) czy też nekrotyczną (poprzez rozszczelnienie błony komórkowej) śmierć komórki. Rytuksymab (RTX) jest przeciwciałem monoklonalnym anti-CD20, swoiście wiążącym się z błonowym antygenem CD20. Antygen CD20 występuje na limfocytach B w ponad 95% przypadków wszystkich chłoniaków nieziarniczych z komórek B. Efektywność kliniczna rytuksymabu może być oszacowana na poziomie 50-75%, w zależności od typu schorzenia (dane kliniczne Kliniki Hematologii i Onkologii WUM).

Jako cel molekularny badanych substancji określono zatem antygen CD20, występujący na limfocytach pre-B oraz na dojrzałych limfocytach B. Dlatego badania były prowadzone na białaczkowej linii nowotworowej Raji, posiadającej wysoką ekspresję antygeny CD20 oraz na kontrolnej linii białaczkowej limfocytów T Jurkat.

Przebadany został wpływ listeriolizyny O, rytuksymabu (RTX) oraz ich kombinacji na komórki linii Raji i Jurkat, inkubowane *in vitro* i *in vivo*, oraz na komórki limfocytów B i T pochodzące z krwi obwodowej osób zdrowych oraz osób ze zdiagnozowaną białaczką B-CLL. Doktorant przyjął założenie, że dołączenie toksyny bakteryjnej do przeciwciała monoklonalnego mogłoby selektywnie zwiększyć cytotoksyczność kombinacji względem komórek nowotworowych. Wykonano modyfikację cząsteczki rytuksymabu umożliwiającą powstanie, wobec jonów niklu, połączenia między zmodyfikowanym przeciwciałem - rytuksymabem-NTA (otrzymanym poprzez przyłączenie kwasu nitrylotrioctowego umożliwiającego wiązanie biopolimerów posiadających ugrupowanie sześciu histydyń) - i zmodyfikowaną toksyną (listeriolizyną-6His). Połączenie takie mogłoby posłużyć do transportu listeriolizyny do epitopu specyficznego dla przeciwciała monoklonalnego, gdzie mogłoby nastąpić uwalnianie toksyny. Należy jednakże stwierdzić, że pomimo szeregu prób nie udało się stwierdzić istnienia trwałego połączenia rytuksymabu z listeriolizyną O.

W wyniku prowadzonych prac stwierdzono, że listeriolizyna O wykazywała podobne działanie cytotoksyczne zarówno dla limfocytów B (linia Raji) jak i dla limfocytów T (linia Jurkat) (Ryc. 19-20 str. 97-98). Zmodyfikowana cząsteczka przeciwciała (rytuksymab-NTA) charakteryzowała się większą cytotoksycznością niż mieszanina złożona z wolnych cząsteczek listeriolizyny oraz rytuksymabu. Eksperymenty wykonane w obecności białek dopełniacza z osocza wyizolowanego z pełnej krwi otrzymanej od zdrowych ochotników wykazały, że cytotoksyczność rytuksymabu była zdecydowanie większa wobec komórek linii Raji niż wobec komórek linii Jurkat (Ryc. 27, str. 111). Wspólne podanie listeriolizyny oraz przeciwciała monoklonalnego RTX *in vitro* zwiększało cytotoksyczność mieszaniny zarówno

względem komórek linii Raji jak i linii Jurkat (szacując na podstawie wartości LD₅₀, Tabela 25, str. 139). Efekt ten nasilał się wobec jonów niklu, zarówno wobec niemodyfikowanego, jak i modyfikowanego rytuksymabu. Dla komórek linii Raji najmniejsze wartości LD₅₀ uzyskano dla układów rytuksymab-listeriolizyna-Ni⁺² oraz rytuksymab-NTA-listeriolizyna-Ni⁺² (odpowiednio 1,7 µl i 2,6 µl). Odpowiednie wartości dla komórek linii Jurkat wynosiły 2,8 µl i 7,3 µl, co wskazuje na selektywność układu rytuksymab-NTA-listeriolizyna-Ni⁺² wobec limfocytów B. W ten sposób doktorant wykazał słuszność przyjętego założenia o celowości wykorzystania połączenia listeriolizyny z rytuksymabem w leczeniu chłoniaka limfocytarnego/przewlekłej białaczki limfocytarnej (SLL/CLL). Prace te należałoby jednak kontynuować w kierunku otrzymania trwałego połączenia rytuksymab-NTA-listeriolizyna-6His, jako być może bardziej selektywnego czynnika cytotoksycznego.

Wyniki uzyskane dla komórek inkubowanych w jamie otrzewnej myszy NSG wskazywały na większą toksyczność mieszanin listeriolizyny i rytuksymabu wobec komórek linii Raji niż wobec komórek linii Jurkat. Cytotoksyczność kombinacji rytuksymabu i listeriolizyny O - w porównaniu z samym rytuksymabem - względem limfocytów B osób zdrowych była nieznacznie mniejsza, podczas gdy dla osób chorych zależna była od pacjenta.

Swoją rozprawę poprzedził Doktorant wstępem literaturowym dotyczącym ogólnej charakterystyki przewlekłej białaczki limfocytowej oraz charakterystyki listeriolizyny O, antygeny CD20 oraz traw lipidowych. Należy podkreślić bogaty warsztat metodyczny Doktoranta, który zastosował takie metody jak analizę immunocytochemiczną, western blot, cytometrię przepływową w połączeniu z różnymi testami badania żywotności komórek, chromatografię wykluczenia (sączenie molekularne) oraz chromatografię powinowactwa. Metody te zostały zastosowane do takich obiektów badawczych jak komórki nowotworowe (Raji, Jurkat) hodowane *in vitro*, komórki nowotworowe podawane zwierzętom laboratoryjnym oraz limfocyty B izolowane od osób zdrowych oraz od osób ze zdiagnozowaną białaczką B-CLL. Doktorant wykonał ogromną ilość badań eksperymentalnych, wykazując się przy tym bardzo dobrą znajomością stosowanych technik. W rezultacie powstała ogromna praca zawierająca bardzo dużą ilość interesujących wyników. Praca jest przejrzysto napisana i posiada ładną szatę graficzną.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na kilka niedociągnięć. Wydaje się, że Rycina 41 jest częścią Ryciny 43 a Rycina 42 jest częścią Ryciny 44. Ryciny 43 i 45 dotyczą (podobnie jak i Ryciny 44 i 46) dotyczą tych samych zagadnień i powinny być przedstawiane i analizowane jako jeden wykres, co znacznie ułatwiłoby analizę otrzymanych wyników. Przedstawiony na str. 139 wniosek wskazujący, że obecność jonów niklu w

wariantach rytuksymab-NTA zmniejsza cytotoksyczność mieszanin poprzez kompleksowanie niklu przez grupę NTA, nie wydaje się być w pełni uzasadnionym, przynajmniej dla linii Raji. Z danych przedstawionych w Tabeli 25 (str. 139) wynikach, że dodatek jonów niklu w każdym przypadku zwiększał cytotoksyczność mieszaniny (np. cytotoksyczność RTX-NTA 6,6 μ l, cytotoksyczność RTX-NTA-Ni⁺² 3,4 μ l).

W konkluzji chciałbym stwierdzić, że Doktorant posiada zarówno odpowiednią wiedzę ogólną jak też i odpowiednią znajomość warsztatu badawczego. Jego badania oparte są o najnowsze dane literaturowe. W trakcie wykonywania swojej pracy Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością zagadnień związanych z badaniem wpływu leków na komórki normalne i nowotworowe a uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w zrozumienie molekularnych mechanizmów oddziaływań lek-receptor farmakologiczny.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki wymienione w ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003. Rezultaty swoich badań przedstawił Doktorant w 2 pracach opublikowanych w *Int. J. Immunopathol. Pharmacol* (*impact factor* ~1,5) oraz w krajowym czasopiśmie recenzowanym *Folia Hist. Cytobiol.* Ponadto były prezentowane na 2 międzynarodowych i 10 krajowych konferencjach naukowych.

Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego o dopuszczenie mgr Marka Gryzika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie wnoszę o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy. Zawiera ona szereg bardzo ciekawych elementów i sprawia wrażenie napisanej przez autora, który posiada głęboką znajomość diskutowanych zagadnień.

Warszawa, 9.05.2017.

Kierownik
Zakładu Biologii Komórki
Prof. dr hab. Zdzisław Chilmonczyk