

Prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: +48-71-3757212
e-mail: zbigniew.szewczuk@chem.uni.wroc.pl

Wrocław, 2019-04-03

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Rafalik z tytułem „Badanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z monoklonalnym przeciwciałem HCC3”

Ludzka cystatyna C (hCC) jest białkowym inhibitorem proteinaz cysteinowych, występującym w różnych płynach ustrojowych człowieka. Uważa się, że hCC jest zaangażowana w patofizjologiczne procesy dimeryzacji i tworzenia amyloidu, co może prowadzić do szeregu zaburzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera lub dziedziczna angiopatia amyloidowa. Jednym ze sposobów zapobiegania powstawania amyloidu jest immunoterapia. HCC3 jest jednym ze znanych przeciwciał monoklonalnych wiążących się z hCC i hamującym dimeryzację cystatyny C *in vitro*. Należy oczekiwać, że identyfikacja reszt aminokwasowych uczestniczących w oddziaływaniu hCC z HCC3 umożliwi nie tylko poznanie mechanizmów zaburzeń neurodegeneracyjnych, ale również może ułatwić racjonalne poszukiwanie skutecznych leków przeciwko chorobom neurodegeneracyjnym.

Mgr Monika Rafalik włączyła się w nurt tych badań i pod kierunkiem dr hab. inż. Aleksandry S. Kołodziejczyk, prof. UG, wykonała pracę doktorską dotyczącą badania oddziaływań ludzkiej cystatyny C z monoklonalnym przeciwciałem HCC3 w zakresie identyfikacji epitopu i paratopu. Praca została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W moim przekonaniu, problematyka badawcza podjęta w pracy doktorskiej mgr Moniki Rafalik jest oryginalna, aktualna i trafna zarówno z naukowego jak i utylitarnego punktu widzenia.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Rafalik, zawierająca 155 stron, została podzielona na rozdziały typowe dla prac doktorskich z chemii: *Wprowadzenia* (37 stron), *Celu pracy* (1 strona), *Części eksperymentalnej* (32 strony), *Omówienie wyników* (49 stron) i *Podsumowania* (2 strony). Doktorantka przedstawiła również swój *Dorobek naukowy* oraz zamieściła *Spis rysunków, tabel i wykresów*, *Wykaz stosowanych skrótów* oraz *Bibliografię* (199 pozycji). Wprawdzie układ pracy doktorskiej mgr Moniki Rafalik, i struktury podziału treści należy uznać za prawidłowe, lecz zalecałbym uzupełnienie recenzowanej rozprawy o streszczenia pracy w języku polskim i angielskim.

We *Wprowadzeniu* Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje o cytostatynach, ze szczególnym uwzględnieniem ludzkiej cytostatyny C. Następnie omówiła przeciwciała, ich budowę chemiczną, biosyntezę i zastosowania w medycynie. Kolejny rozdział został poświęcony *metodom identyfikacji miejsc wiążących między antygenem a przeciwciałem*. Niewątpliwie, rozdział *Wprowadzenie* zawiera wiele cennych informacji i świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki. W rozdziale tym Autorka wykazała się umiejętnością prawidłowego korzystania ze źródeł literaturowych. Został on napisany prostym językiem, starannie i treściwie, przez co będzie zrozumiały dla szerokiego grona czytelników, jednakże niekiedy przedstawione w nim uproszczenia prowadzą do drobnych nieścisłości. Z drugiej strony tekst *Wprowadzenia* jest krótki, pomimo dużej ilości informacji niezbędnych do wyjaśnienia celu pracy i użytych w niej metod badawczych.

Celem recenzowanej pracy doktorskiej była charakterystyka kompleksu ludzkiej cytostatyny C z monoklonalnym przeciwciałem HCC3. Zadanie badawcze przedstawione w celu pracy było niełatwe do wykonania, gdyż wymagało przeprowadzenia szeregu dobrze przemyślanych wielokierunkowych badań, i opanowania wielu nowoczesnych metod badawczych, takich jak: syntezy peptydów, spektrometrii mas, chromatografii, elektroforezy, izolowania i oczyszczania peptydów i białek, przeprowadzania testu ELISA i stosowania metod teoretycznych. W mojej opinii problem naukowy, którego rozwiązania podjęła się Autorka, został poprawnie sformułowany a metody badawcze były trafnie dobrane.

Z kolejnych rozdziałów wynika, że badania zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, a następnie fachowo opisane. Metodą "wycinania i ekstrakcji"

przeprowadzoną na kompleksie hCC-HCC3 Doktorantka zidentyfikowała miejsca epitopowe hCC, a następnie potwierdziła swoje odkrycie na podstawie analizy wymiany H/D w hCC-HCC3 oraz analizy powinowactwa syntetycznych fragmentów epitopowych hCC, za pomocą chromatografii powinowactwa i testu immunoenzymatycznego. Ponadto Doktorantka scharakteryzowała budowę chemiczną przeciwciała HCC3 i jego obszary paratopowe, za pomocą spektrometrii mas i metod obliczeniowych.

Ze szczególnym uznaniem odnoszę się do niewątpliwego sukcesu Doktorantki jakim było odkrycie nieciągłości epitopu hCC. Doktorantka na ogół bardzo szczegółowo omówiła zastosowane metody i wyniki swoich badań. Na uwagę zasługuje krytyczny sposób interpretowania wyników i ostrożne wyciąganie wniosków, co świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki.

W mojej opinii, uzyskane wyniki wykonanych badań są bardzo wartościowe i ciekawe, a cel pracy został osiągnięty. Natomiast ilość, różnorodność i wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań zasługuje na wyróżnienie. Na uwagę zasługuje też niemały dorobek naukowy Doktorantki, obejmujący dwie dobre publikacje i jedenaście komunikatów konferencyjnych.

Przechodząc do oceny formalnej rozprawy, pragnę podkreślić jej estetyczny wygląd a zwłaszcza pomysłowe i konsekwentnie przedstawiane schematy eksperymentów (np. na rysunkach 29, 31-34), które pozwalają łatwo prześledzić etapy poszczególnych badań.

W recenzowanej rozprawie znalazło się kilka drobnych błędów literowych i nietrafnych sformułowań oraz nieścisłości, które niekiedy utrudniały jej czytanie. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre z nich:

- Str. 47. Określenie "średnie masy m/z peptydów" jest niepoprawne.
- Str. 51. Z przedstawionego schematu syntezy peptydu nie wynika, że Doktorantka stosowała amidową żywicę typu TentaGel Ram.
- Str. 84. Zdanie " Masa cząsteczkowa $[M+H]^+$ ludzkiej cystatyny C wyznaczona spektrometrycznie dla otrzymanego preparatu wynosi 13343,00 Da, co odpowiada teoretycznej masie cząsteczkowej tego białka.." jest niepoprawne.
- Rysunek 38. Podpis pod rysunkiem nie jest zrozumiały, gdyż Autorka nie wyjaśniła, co oznacza skrót "MS ES+". Z pewnością nie jest to widmo ESI-MS uzyskane dla

cystatyny C. Przydałyby się informacje na temat metod jonizacji przy każdym z zaprezentowanych widm MS.

- Ze strony 92 wynika, że Doktorantka sekwencjonowała przeciwciała na podstawie analizy produktów trawienia tego białka za pomocą trypsyny, Glu-C i Lys-C. Jak wyjaśnić na podstawie specyficzności tych proteaz pojawienie się peptydów o sekwencjach: LASGVPARF i CGCKPCL wśród produktów proteolizy tych przeciwciał?
- Z tabeli 7 wynika zbyt duża różnica pomiędzy obliczonymi i zmierzonymi wartościami m/z . Czyni to wynik całej analizy wątpliwym. Uważam jednak, że Doktorantka prawidłowo zidentyfikowała otrzymane peptydy. Aby wyjaśnić przyczynę tych różnic, należałoby sprawdzić czy obliczone wartości m/z dotyczyły monoizotopowych czy uśrednionych mas jonowych. Porównywanie mas uśrednionych z monoizotopowymi byłoby błędem.
- Str. 104-105. Mam wątpliwości, czy dokonany przez Doktorantkę wybór sekwencji analogów syntetycznych fragmentów hCC, w których zastąpiono reszty cysteinowe resztami serynowymi, a ponadto pozostawiono wolne N-końcowe grupy aminowe, był racjonalny.
- Str. 105 Stwierdzenie: " Brak sygnałów m/z we frakcjach..." jest niepoprawne.

Powyższe uwagi nie podważają wysokiej wartości merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją wysoką ocenę tej pracy. Wiele z moich uwag należy traktować jako zagajenie do dyskusji, na którą liczę podczas obrony pracy doktorskiej mgr Moniki Rafalik.

Biorąc pod uwagę istotne wyniki uzyskane przez Doktorantkę i bardzo dobre opanowanie zarówno technik analitycznych jak i syntezy, recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr Moniki Rafalik zatytułowana „*Badanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z monoklonalnym przeciwciałem HCC3*” stanowi cenny wkład naukowy i spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym. Dlatego stawiam wniosek do Rady

Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Rafalik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2. Nowak