



POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

dr hab. Beata Kolesińska, prof. PŁ,

tel: 42-631-31-49; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Martyny Prądzińskiej

Magister Martyna Prądzińska swoją rozprawę doktorską zatytułowaną „Charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Praca została zrealizowana pod opieką dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło, prof. UG, zaś promotorem pomocniczym była dr Paulina Czaplewska.

Przedstawiona do recenzji praca posiada złożoną, wielopoziomową strukturę, konsekwentnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w grupie badawczej Promotora, który można określić jako poszukiwanie molekularnych zależności pomiędzy budową przestrzenną peptydów i białek, a ich funkcją biologiczną. W grupie peptydów/białek, które są przedmiotem badań znajdują się związki tworzące nierozpuszczalne agregaty pozakomórkowe, odkładające się w tkankach w postaci fibryli amyloidowych. Tworzenie złożeń amyloidowych wiązane jest z takimi chorobami jak: choroba Alzheimera (AD), choroba Parkinsona (PD), choroba Creutzfeldta-Jakoba (CJD), czy choroba Huntingtona (HD). Poznanie mechanizmów prowadzących do powstawania toksycznych fibryli jest niezwykle istotne dla diagnostyki, zapobiegania i zwalczania wszystkich amyloidoz. Głównym obiektem badań, wykorzystanym do poznania na poziomie molekularnym podstaw amyloidoz, jest białko cystatyna C oraz jego mutanty. Z pełnym przekonaniem można więc wyrazić opinię o aktualności i o wysokiej randze tematyki podjętej w rozprawie.

Uzyskane wyniki badań zostały opisane w pracy liczącej 128 stron. Układ pracy, jest standardowy i obejmuje pięć głównych rozdziałów: Przegląd literaturowy, Cel pracy, Część eksperymentalną, Omówienie wyników, Podsumowanie oraz Bibliografię. Część referatową pracy stanowi 38 stronicowy zbiór esejów prezentujących przeglądy literaturowe stanowiące wprowadzenia do kolejnych tematów badawczych rozwijanych w rozprawie. Obejmują one zagadnienia dedykowane:

- ludzkiej cystatynie C,

- immunoglobulinom,
- metodom identyfikacji epitopów.

Materiał literaturowy obejmuje w sumie 132 pozycje. Jest on głęboko przemyślany i prezentuje najważniejsze publikacje, co pozwoliło na rzetelną i dogłębną prezentację stanu wiedzy. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność narracji dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Pozwala to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy.

Cel pracy został postawiony po wprowadzeniu literaturowym, dającym uzasadnienie dla wszystkich jego elementów składowych, na tle współczesnego stanu badań. Celem nadrzędnym rozprawy była charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z autoprzeciwciałami oraz monoklonalnym przeciwciałem Cyst10. Osiągnięcie celu nadrzędnego, możliwe było poprzez realizację szeregu zadań badawczych obejmujących:

- 1) izolowanie naturalnie występujących autoprzeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej cystatynie C z frakcji IgG,
- 2) charakterystyka kompleksu anty-hCC NAb - cystatyna C z wykorzystaniem elektroforezy dwuwymiarowej, technik chromatograficznych oraz spektrometrii mas,
- 3) identyfikacja epitopów rozpoznawanych przez anty-hCC NAb metodą wycinania i ekstrakcji epitopów oraz techniką wymiany proton/deuter sprzężonej z MS,
- 4) badanie powinowactwa wyselekcjonowanych epitopów względem anty-hCC NAb
- 5) zbadanie wpływu wyizolowanych i scharakteryzowanych autoprzeciwciał na proces dimeryzacji ludzkiej cystatyny C.

Podobny zakres prac badawczych przewidziany był w badaniach, gdzie Doktorantka zamierzała stosować monoklonalne przeciwciało Cyst10. Ostatni etap prac miał obejmować porównanie zdolności oddziaływania ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami Cyst10 oraz Cyst28 (charakterystyka epitopów rozpoznawanych przez Cyst28 nie była przedmiotem prac badawczych Doktoranki), co miało na celu poznanie czynników hamowania dimeryzacji hCC przez testowane przeciwciała.

Pierwszy etap badań obejmował otrzymanie ludzkiej cystatyny C z wykorzystaniem elektrokompetentnych komórek *E. coli*, izolowanie białka oraz jego charakterystykę. Uzyskane białko zostało wykorzystane do izolowania autoprzeciwciał z frakcji immunoglobulin G. Wyizolowane autoprzeciwciała zostały scharakteryzowane elektroforetycznie w warunkach redukujących, zaś ich stężenie zostało wyznaczone spektrofotometrycznie. Charakterystyka anty-hCC NAb uzupełniona została również o

analizy RP-HPLC oraz sączenie molekularne. W oparciu o wyniki trawienia wyizolowanych autoprzeciwciał Doktorantka wykazała, że mają one charakter poliklonalny i zawierają głównie podklasę IgG1. Na uznanie zasługują wartościowe eksperymenty określające skład glikanów połączonych z anty-hCC NAbs, oraz stwierdzenie, że najczęściej występujące reszty cukrowe obejmują: FA2G1, FA2, FA2G2. Kolejny etap badań obejmował identyfikację epitopów rozpoznawanych przez wyizolowane anty-hCC NAbs. Badania te obejmowały dwie techniki proteolityczne (wycinanie i ekstrakcja epitopu), wymianę proton/deuteron oraz dodatkowo wspierane były badaniami teoretycznymi z wykorzystaniem algorytmów: *EliPro*, *Bepipred* oraz *Kolaskara* i *Tongaonkara*. Badania teoretyczne wykazały, że fragmenty hCC oddziałujące z poliklonalnym anty-hCC NAbs zlokalizowane są w całej cząsteczce białka. Podobny wynik uzyskany został w eksperymencie z wykorzystaniem fragmentów hCC pod działaniem trypsyny. Tu również peptydy obejmujące niemalże całe białko posiadały zdolność oddziaływania z autoprzeciwciałami. Uzyskane wyniki zostały potwierdzone z użyciem syntetycznych fragmentów hCC (testy powinowactwa) jak również ich analogów zawierających resztę biotyny (testy immunoenzymatyczne). W oparciu o eksperymenty wycinania epitopu pronazą, wyznaczone zostały trzy fragmenty hCC charakteryzujące się zdolnością oddziaływania z autoprzeciwciałami: fragment 53-63 zlokalizowany w pętli L1, fragment 101-115 (pętla L2) oraz fragment 92-99 (nić β 3). Jednak wyniki eksperymentu wymiany proton/deuteron nie były do końca zgodne z danymi uzyskanymi metodą wycinania epitopu, w tym przypadku zidentyfikowane zostały fragmenty 41-48 oraz 65-73. Podobne eksperymenty wykonane zostały z użyciem monoklonalnego przeciwciała Cyst10. Wyznaczony został ciężar cząsteczkowy przeciwciała oraz ciężar cząsteczkowy po usunięciu glikanów. W sposób nie budzący zastrzeżeń scharakteryzowane zostały reszty cukrowe glikoproteiny. Najczęściej występującymi jednostkami cukrowymi są: FA2, FA2G1, FA2G2 oraz FA1. Również w przypadku monoklonalnego przeciwciała Cyst10 badania nad identyfikacją fragmentów hCC oddziałujących z przeciwciałem nie dały jednoznacznego wyniku. W oparciu o technikę wycinania i ekstrakcji epitopu zidentyfikowane zostały fragmenty 60-70 (w nici β 3), 96-102 (w nici β 4) oraz 101-111 (w pętli L2), zaś w oparciu o wymianę proton/deuteron znalezione zostały fragmenty 53-61 (w pętli L1) oraz 101-112 (w pętli L2). Pokrywanie się wyników z różnych technik eksperymentalnych obserwowano więc jedynie dla C-końcowego fragmentu białka (101-111/112).

Doktorantka podjęła również próbę określenia wpływu wyizolowanych autoprzeciwciał anty-hCC NAbs oraz przeciwciała Cyst10 na dimeryzację hCC. Jednak w przypadku anty-hCC NAbs nie udało się jednoznacznie określić jego wpływu na dimeryzację białka, gdyż

zawartość dimeru hCC była identyczna zarówno bezpośrednio po zmieszaniu białka z przeciwciałem jak i po 3 dniach inkubacji. W przypadku Cyst10 obserwowano znacznie mniej trwały kompleks z hCC w porównaniu do kompleksu z przeciwciałem Cyst 28.

Lekturę tekstu rozprawy uznaję za wielce stymulującą do głębszych przemyśleń. Wśród pytań, które mi się nasunęły chciałabym postawić cztery następujące:

1. Która technika wyznaczania struktury epitopu jest najbardziej uniwersalna a jednocześnie właściwa, a tym samym rekomendowana do badań?

2. Co może być przyczyną obserwowanych tak zróżnicowanych wyników badań wyznaczania struktur fragmentów hCC oddziaływujących zarówno z autoprzeciwciałami przeciwciałami anti-hCC NAb jak i przeciwciałem monoklonalnym Cyst10?

3. Czy przedstawione w tabeli 17 fragmenty hCC oddziaływujące z przeciwciałem Cyst10 stanowią rzeczywiście epitop nieciągły, czy może ta obserwacja wynika raczej z faktu, że przeciwciało posiada zdolność oddziaływania z podobnymi strukturalnie fragmentami białka, co korespondowałoby ze znanym zjawiskiem mimikry molekularnej skutkującej błędnym rozpoznawaniem antygenów (autoantygenów) przez przeciwciała (autoprzeciwciała)?

4. Czy wpływ warunków eksperymentalnych otrzymywania przeciwciała Cyst10 nie mógł mieć wpływu na jego zdolność oddziaływania z różnymi fragmentami hCC?

W niektórych miejscach rozprawy, Doktorantka w sposób bardzo ogólnikowy omawia wyniki badań, lub nawet je pomija. Przykładowo, w podrozdziale 1.4 dotyczącym teoretycznego przewidywania epitopów w ludzkiej cystatynie C, podana jest informacja, że jako prawdopodobne epitopy, wyznaczone zostały fragmenty hCC spełniające następujące warunki: minimalna wartość dla reszty aminokwasowej $-0,5$, maksymalna odległość 6\AA . Dla osoby nie zajmującej się modelowaniem epitopów przedstawiony opis jest mało czytelny i trudny do interpretacji.

W pracy zabrakło tabeli charakteryzującej zsyntezowane fragmenty hCC oraz ich biotynylowane analogii, w części eksperymentalnej przedstawiona jest jedynie ogólna procedura syntetyczna.

Niestety, Doktorantka nie ustrzegła się przed dość licznymi błędami edytorskimi, przykłady przedstawione są poniżej:

str. 11, Doktorantka pisze, „U niektórych cystatyn”, powinno być chyba w niektórych cystatynach,

str. 12, jest „Cystatyn biorą udział”, a powinno być, cystatyny biorą udział,

str. 14, lizosom, stanowi jedno słowo, błędny jest więc zapis „w lizo somie”
str. 15, jest „Cystatyna C jest inhibitorem proteaz cysteinowy”
str. 21, jest „Wszystkie z przebadanych przeciwciała hamowały proces dimeryzacji hCC”,
str. 23, jest „Wyprodukowane przez króliki przeciwciała było oligoklonalne”,
str. 71, jest „Zarejestrowane chromatografy”
str. 106, jest „Zastosowałam procedurę była identyczna do tej stosowanej”

Doktorantka nie ustrzegła się od dość licznych sformułowań żargonowych jak i mało precyzyjnych określeń. Przykładowo: ochłodzona wirówka (str. 51); namoczona żywica (str. 64); „miejsca trawienia enzymu, które znajdują się w sekwencji epitopu w tej metodzie są chronione przed działaniem enzymu” (str. 86), taki zapis wskazuje, że trawiony pod działaniem enzymu jest enzym, a nie białko, podobnie w zdaniu „gdyż ich powstawanie zależy od miejsca cięcia enzymu w sekwencji białka” (str. 86).

Przykładami nieprecyzyjnych określeń są: „Najwięcej hCC znajdowało się we trakeji tris i jednocześnie była ona najmniej zanieczyszczona” (str. 66), „zawierające białko oczyszczone w największym stopniu” (str. 68), „w celu uzyskania całkowicie czystego białka” (str. 68), itd.

Moje zastrzeżenia budzi również wielokrotne przedstawianie struktury ludzkiej cystatyny C (PDB:3NX10) (Rysunek, 60, 58, 48, 45, 11, 6), które różnią się jedynie wprowadzonymi słownie wskazaniem określonych domen lub epitopów, gdzie ich opis zawarty jest w tekście, tak więc wydaje się, że można było przedstawić jeden rysunek struktury hCC, na którym wskazane byłyby wszystkie elementy strukturalne (fragmenty helikalne, pętle oraz struktury β).

Przytoczone uwagi krytyczne oraz kwestie dyskusyjne nie podważają warstwy merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy. Dysertacja daje wyczerpujące i kompetentne odpowiedzi na szereg niezmiernie ważnych i aktualnych pytań. Dokumentuje kompleksy molekularne hCC z autoprzeciwciałami anti-hCC NAbs oraz przeciwciałem monoklonalnym Cyst10, charakteryzuje stosowane przeciwciała z bardzo precyzyjnym opisem fragmentów cukrowych. Opracowanie prezentuje próby wykorzystania różnorodnych technik badawczych do określenia fragmentów hCC oddziałujących ze stosowanymi przeciwciałami oraz badanie zależności pomiędzy zdolnością oddziaływania obydwu przeciwciał z hCC w funkcji podatności białka do tworzenia dimerów. We wszystkich przypadkach wnioskowanie jest dobrze uzasadnione materiałem eksperymentalnym. Analiza wyników eksperymentów jest krytyczna co wzbudza zaufanie do wyciąganych wniosków.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór bardzo ambitnego tematu badań w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami badań o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, trudny, interdyscyplinarny charakter wykonanych prac niezbędnych dla zrealizowania wszystkich zadań badawczych. Na szczególne uznanie zasługuje nie tak często spotykana biegłość zarówno w wykorzystywaniu szerokiego arsenału metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach biologicznych. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań opublikowane zostały w latach 2012-2016 w czasopismach indeksowanych w JCR. Na opublikowany dorobek mgr Martyny Prądzińskiej, który tematycznie związany jest z rozprawą doktorską składają się 4 artykuły opublikowane w czasopismach indeksowanych w JCR. Wyniki prac badawczych Doktorantka prezentowała na licznych konferencjach krajowych oraz zagranicznych (16 posterów, 3 komunikaty ustne). Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym z późn. zm. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Martyny Prądzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Beata Kolesińska

