



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
UNIWERSYTET GDAŃSKI

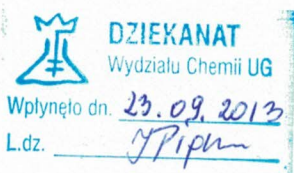
dr hab. Adam Lesner, prof. UG

ul. Wita Stwosza 63, 80-952 Gdańsk
tel. +48-58-523 5095
fax +48-58-523 5012
e-mail: adas@chem.univ.gda.pl

Ocena pracy doktorskiej mgr Anny Śladewskiej

**pt. „Identyfikacja miejsc oddziaływań ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami
monoklonalnymi z wykorzystaniem techniki spektroskopii mas”**

Powstawanie i kumulacja złogów agregatów różnych białek jest elementem etiologii całej grupy chorób (tzw. amyloidoz), do których zalicza się między innymi: chorobę Alzheimera, Parkinsona, chorobę Creutzfeldta-Jakoba (czyli mózgową encefalopatię gąbczastą w tym BSE, ang. bovine spongiform encephalopathy), jak również chorobę Huntingtona. Pomimo różnic w sekwencji aminokwasowej i strukturze przestrzennej białek prekursorowych, budowa i organizacja fibrylarnych amyloidów jest zbliżona i przyjmuje strukturę rozbudowanej beta kartki. Ich powstawanie to proces wieloetapowy przebiegających poprzez asocjację rozfałdowanego białka i tworzenie agregatów globularnych, następnie protofibrili, aby ostatecznie utworzyć fibryłę. Według części danych literaturowych proces ten jest odwracalny w każdym ze stadiów. Wspólną cechą charakteryzującą wszystkie agregaty jest również wyjątkowa trwałość i odporność na działanie enzymów proteolitycznych. Mimo intensywnych wysiłków wielu grup badawczych nad poszukiwaniem skutecznych sposobów zapobiegania lub walki z już istniejącym schorzeniem do tej pory nie opracowano efektywnej metody terapeutycznej. Do najbardziej obiecujących terapii eksperymentalnych prowadzących do obniżenia stężenia amyloidów należą zwiększenie aktywności białek opiekuńczych, ubikwitynacja protofibrili i ich degradacja w proteosomie, wyciszanie genów agregujących białek, czy też stosowanie niskocząsteczkowych inhibitorów procesu agregacji. Jednak żadna z tych metod, z uwagi na określone skutki uboczne



nie znalazła szerszego zastosowania terapeutycznego. W chwili obecnej pokłada się nadzieje w terapiach spersonalizowanych lub ograniczonych tylko do jednego typu choroby. Jednym z kluczowych środków stosowanych w tego typu terapii są przeciwciała monoklonalne, których rolą jest wzmocnienie lub indukcja odpowiedzi immunologicznej ludzkiego organizmu.

W tę ważką tematykę włączyła się mgr Anna Śladewska z Katedry Chemii Medycznej, której kierownikiem jest dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło, profesor nadzwyczajny UG, pełniąca jednocześnie funkcję promotora rozprawy. W tym miejscu chciałbym dodać że część badań Doktorantka wykonała w trakcie swojego pobytu w Uniwersytecie w Konstancji w ramach stypendium w grupie prof. Martina Scheffera. Przedstawiona mi do recenzji praca liczy 155 stron maszynopisu napisana została w języku angielskim i składa się z następujących części: wprowadzenia (26 stron), wyników i ich dyskusji (74 strony), materiałów i metod (29 stron) oraz podsumowania (4 strony), spisu literatury i załączników zawierających stosowane skróty. Pierwszy rozdział zawierający syntetyczne omówienie zagadnień związanych z działaniem systemu immunologicznego człowieka, ze szczególnym naciskiem na właściwości i rodzaje przeciwciał stanowi interesującą lekturę. Doktorantka nie uniknęła jednak błędów językowych i licznych powtórzeń, których kwintesencja znajdują się na stronie 4 w paragrafie 1.2. zatytułowanym „Immune system”, w którym zdanie zaczynające się od słów „Two basic.....” zawiera wielokrotne (4) sformułowanie „immune system”. Host defence system czy defence mechanism to jedne z dwóch synonimów tego określenia znanych recenzentowi.

W kolejnej części wstępu Autorka opisuje cystatyny, jako grupę białek będących silnymi inhibitorami proteinaz cysteinowych. Ten fragment tekstu stanowi interesujący przegląd tej grupy białek. W dalszych rozdziałach mgr Anna Śladewska omawia podstawy teoretyczne stosowanych przez siebie technik eksperymentalnych głównie spektrometrię mas białek i ich kompleksów. Rozdział napisany jest bez zarzutu, przybliży czytelnikowi zagadnienia związane z proteomiką i metodologią analizy biocząsteczek. Całość, co warto podkreślić, jest ilustrowana licznymi rysunkami i schematami, co znacznie ułatwi lekturę tego fragmentu rozprawy. W kolejnym rozdziale 1.8 w części Introduction dość niespodziewanie pojawiają się cele pracy, które zdaniem recenzenta powinny stanowić jasno wyodrębnioną część rozprawy, a nie stanowić część wstępu. Cele pracy są jasno zdefiniowane i ambitne.

Wyniki i ich dyskusja, zdecydowanie najciekawsza część rozprawy, stanowi ponad połowę całej jej objętości. Doktorantka opisuje w niej przeprowadzone eksperymenty w sposób jasny i klarowny. Konsekwentnie analizuje otrzymane wyniki i na ich podstawie proponuje nowe doświadczenia. Mgr Śladewska z dużą wprawą przedstawia etapy identyfikacji epitopów ludzkiej Cystatyny C rozpoznawanych przez komercyjnie dostępne przeciwciało monoklonalne Cyst13. Jak wykazano, między innymi w przedstawionych w pracy eksperymentach, białko to w dużej mierze hamuje proces tworzenia agregatów przez CysC. Doktorantka pokazała antyagregacyjny efekt działania przeciwciał anty CysC analizując kinetykę tworzenia dimerów tego białka metodami elektroforezy żelowej. Kolejnym etapem badań prowadzonych przez mgr Śladewską była identyfikacja fragmentu cystatyny C oddziałującego bezpośrednio z przeciwciałem. W tym celu przeprowadziła szereg eksperymentów polegających na inkubacji cystatyny C z immobilizowanym na nośniku (sefariozie) przeciwciałem anty CysC (Cyst13). Następnie otrzymany kompleks został poddany trawieniu wybranymi enzymami proteolitycznymi (trypsyna, chymotrypsyna, pronaza, Lys-C i Glu-C). Fragmenty cystatyny C silnie związane z przeciwciałem nie ulegały proteolizie i po elucji z nośnika zostały poddane identyfikacji technikami spektrometrii mas. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę różniły się istotnie w zależności od zastosowanej do badań proteiny. W wypadku zastosowania trypsyny i chymotrypsyny w etapie końcowym otrzymano C-końcowe fragmenty cystatyny C, lecz o różnych długościach łańcucha peptydowego hCC(93-120) lub hCC(86-120). We frakcji końcowej zidentyfikowano ten fragment pochodzący ze środka łańcucha CysC hCC(54/55-90). W wyniku inkubacji próbki z pronazą, która w istocie jest mieszaniną różnych enzymów proteolitycznych pochodzenia bakteryjnego, zidentyfikowano jeden 16-to aminokwasowy peptyd hCC(101-117). Trawienie specyficznymi enzymami Lys-C i Glu-C nie powiodło się. Nie bardzo rozumiem, dlaczego w buforze lizującym dla trypsyny zabrakło CaCl_2 , obecność jonów wapnia jest niezbędna do stabilności tej proteiny, jego brak skutkuje silną autolizą trypsyny, co w efekcie może powodować obecność dodatkowych jonów autolitycznych tego enzymu w analizie MS.

Kolejnym etapem badań prowadzonych przez Doktorantkę była synteza na fazie stałej fragmentów cystatyny C które zostały zaprojektowane na podstawie struktur wyizolowanych peptydów. Związki te syntetyzowano na drodze syntezy chemicznej w fazie stałej, z wykorzystaniem niestandardowej strategii depsiptydów. Ten celowy wybór metody syntezy

obniżał potencjał agregacyjny otrzymanych peptydów. Otrzymane depsipeptydy w środowisku zasadowym ulegały przekształceniu w formę amidową. W wyniku syntezy otrzymano peptydy, które następnie naniesiono na kolumnę powinowactwa wypełnioną złożem z immobilizowanym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko cystatynie C. Nie wszystkie otrzymane tą drogą peptydy wiązały się z przeciwciałem. Właściwość tą wykazywały tylko te stanowiące fragment C-końca cystatyny C. Peptydy hCC(55-70) i hCC(55-75) pochodzące z środkowej części cząsteczki nie oddziaływały z przeciwciałami. W wyniku tych badań ustalono, że minimalnym fragmentem sekwencji CysC (syntetyczny epitop), który efektywnie oddziaływał z przeciwciałem jest hCC(105-114). Otrzymany analog tego związku zawierający resztę Seryny w miejsce Cysteiny również wykazywał silne powinowactwo do badanego przeciwciała. Wykonany skaning alaninowy, czyli synteza panelu peptydów modyfikowanych w poszczególnych pozycjach resztami alaniny dla peptydu hCC(105-114) potwierdził, że wszystkie reszty aminokwasowe biorą udział w oddziaływaniach z przeciwciałem i że ten epitop jest epitopem liniowym.

Uwagi dotyczącej tej części rozprawy:

- resztę Ala trudno uznać za resztę izosteryczną w stosunku do Cys (rys 43).
- chymotrypsyna nie jest enzymem niespecyficznym (str 88)

Tą część rozprawy, mimo powyższych uwag, Recenzent uważa za starannie zaprojektowaną i wykonaną. Na podkreślenie zasługuje opanowanie przez Doktorantkę technik syntezy chemicznej i oczyszczania peptydów i jednocześnie zaawansowanych procedur biochemicznych pracy z białkami. Osobiście uważam ten interdyscyplinarny model rozwoju młodego naukowca za wzorcowy.

W kolejnych rozdziałach Autorka opisuje badania konformacyjne wykonane technikami dichroizmu kołowego i protonowego rezonansu jądrowego dla deka-peptydu i jego dłuższych o dwie lub cztery reszty analogów. Zdaniem recenzenta tego typu badania mają sens dopiero wtedy, kiedy peptyd przyjmuje konformację aktywną oddziaływującą z ligandem (przeciwciałem). Tak krótkie peptydy w roztworze wodnym i jego modyfikacjach przyjmują cały szereg struktur, subtelnie różniących się energią, które nie sposób zinterpretować w oderwaniu od kontekstu biologicznego.

Ostatnim zadaniem, który mgr Ślądowska podjęła było identyfikacja fragmentu przeciwciała Cyst13 które jest bezpośrednio zaangażowane w oddziaływanie z hCC. W tym celu zostały przeprowadzone eksperymenty z bliskiej Recenzentowi dziedziny, jaką jest proteomika. Autorka rozprawy z powodzeniem wykonała analizę mas przeciwciała i jego fragmentów przy użyciu spektrometrii mas. Wyniki zostały poddane obróbce przy pomocy zaawansowanych algorytmów z wykorzystaniem dostępnych białkowych baz danych. Ten fragment pracy oceniam wysoko i bez wątpienia był dla chemika syntetyka wyzwaniem, któremu Doktorantka sprostała.

Rozdział: Materiały i Metody, w którym opisane są procedury przeprowadzone przez Autorkę, ma dwa oblicza. Z jednej strony Recenzent odnosi wrażenie, że jest to uporządkowany spis eksperymentów ułożonych chronologicznie, który jednak po starannej lekturze okazuje się zbiorem protokołów. Najbardziej rażący jest brak konsekwencji w edycji tej części rozprawy. Opisy niektórych eksperymentów o wysokiej wartości naukowej zaprezentowane są w punktach, by stronę dalej podobny opis jest ich pozbawiony i stanowi tekst jednolity.

Uwagi szczegółowe:

Strona 108 stężenia masowe podane zostały niekonsekwentnie wiersz 11 od góry w wymiarze ug/ul, wiersz 20 już mg/ml.

Strona 115 brak wyjaśnienia akronimu NMI

Strona 116. Recenzent nie rozumie znaczenia słów reakcja pozytywna i reakcja negatywna w opisie testów Kaisera i chloranilowego. Ponadto taki test, nie służy do oznaczania wydajności (ang. efficacy), lecz kompletności reakcji acylowania grupy aminowej.

Poniższe uwagi nie mają jednak wpływu na moją wysoką ocenę rozprawy, lecz jedynie wskazują że dysponując tak interesującymi wynikami, należy też dołożyć wszelkiej staranności w opisie eksperymentów.

Spis pozycji cytowanej literatury liczy sobie 326 pozycji i nie zawiera większych błędów. Godny podkreślenia jest fakt zamieszczenia w odnośnikach także tytułów prac, co znacznie ułatwia lekturę tekstu rozprawy.

Podsumowując muszę stwierdzić, że miałem przyjemność zapoznać się z wynikami niezwykle ciekawej pracy, której interdyscyplinarność jest godna podkreślenia. Bardzo wysoko oceniam, jakość pracy laboratoryjnej oraz liczbę przeprowadzonych eksperymentów, które reprezentują wysoki poziom naukowy. Prezentacja uzyskanych przez Doktorantkę wyników i sposób ich dyskusji niezwykle interesująca.

Stwierdzam z całym przekonaniem, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Anny Ślądewskiej spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim i stawiam wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Adam Lesner

Gdańsk 23 września 2013