



prof. dr hab. Michał Dadlez
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa
tel. 0-22 5923470-75
e-mail: michald@ibb.waw.pl

Warszawa, 31.08.2013

Recenzja rozprawy doktorskiej p. mgr Anny Śladowskiej pt. „Identyfikacja miejsc oddziaływania ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami monoklonalnymi z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas”

Praca p. mgr Anny Śladowskiej jest poświęcona mapowaniu miejsc/obszarów oddziaływania w układzie antygen białkowy przeciwciało monoklonalne. Antygenem jest tu docelowo patogenny mutant cystatyny C L68Q którego obecność powoduje amyloidozę w naczyniach krwionośnych prowadząc do choroby zwanej dziedziczną angiopatią amyloidową związana z cystatyną C (HCCAA). Jednym ze sposobów blokowania procesu patologicznej agregacji jest wykorzystanie odpowiednich przeciwciał. Takie przeciwciała mogą być stosowane terapeutycznie, ale też mogą stanowić podstawę dalszych badań nad tworzeniem niskocząsteczkowego inhibitora agregacji. Dokładna charakterystyka oddziaływań samej cystatyny C (hCC) z przeciwciałem monoklonalnym Cyst13 jest zatem uzasadnionym celem podjętych badań przedstawionych w pracy doktorskiej.

Napisana w języku angielskim praca została zorganizowana w klasycznym układzie typowym dla prac eksperymentalnych. Wszystkie zwyczajowo przyjęte elementy pracy są obecne, z tym że rozdział Materiały i Metody umieszczono na końcu pracy, pozostałe elementy są umieszczone w standardowej kolejności. Pracę kończy obszerny spis literatury adekwatny do pojętego tematu oraz lista użytych skrótów.

Wstęp rozpoczyna dwustronicowa, czyli z konieczności telegraficzna, prezentacja ogólnych informacji o układzie odpornościowym, tematem pracy są przeciwciała jako narzędzie biotechnologiczne, więc jest to uzasadnione. Dalsza część wstępu, dotycząca własności strukturalnych przeciwciał, metod mapowania miejsc oddziaływania antygen-przeciwciało oraz podejść eksperymentalnych stosowanych w immunoterapii jest również bardzo skrótowa. Lakoniczność opisu ilustruje na przykład opis pod rysunkiem nr 6, gdzie zaczerpnięte z publikacji



innych autorów schematy zawierają elementy nie opisane w tekście ani w podpisie, pozostawiając nierozszyfrowane kryptonimy (IgNAR, Camel IgG) domyślności czytelnika. Rys. 8,9,10 również wyglądają na skopiowane z sieci lub publikacji, lecz źródła nie podano.

Opis staje się bardziej rozbudowany gdy Autorka przybliży się do bezpośredniego obiektu swoich badań to jest do grupy białek z rodziny cystatyn, inhibitorów proteaz cysteinowych z klasy C1 i opisu ich charakterystycznych cech strukturalnych. Druga część wstępu jest poświęcona krótkiej prezentacji metod używanych w badaniach struktur białkowych i kompleksów białkowych ze szczególnym uwzględnieniem spektrometrii mas jako głównej metody użytej w pracy. Autorka poświęca relatywnie dużo miejsca opisowi procesu pomiaru mas cząsteczkowych i realizacji technicznych spektrometrów mas. Natomiast rozdział 1.6.3 zaplanowany jako prezentacja obszarów aplikacyjnych MS w bioanalizie jest zaskakująco skrótowy i skupiający się mało istotnych procedurach, takich jak procedura „masowego odcisku palca”, rzadko już używana do identyfikacji białek w złożonych mieszaninach i jeszcze rzadziej do identyfikacji modyfikacji potranslacyjnych, czy wspomnienie o stosowaniu żeli 2D PAGE z pominięciem obecnie szeroko stosowanych metod bezżelowej analizy złożonych mieszanin białek. Zaskakuje brak opisu analizy fragmentacyjnej MS/MS peptydów, podstawowego przy dzisiaj powszechnie dostępnych hybrydowych spektrometrach mas narzędzia w identyfikacji białek i ich modyfikacji, tym bardziej że analiza widm MS/MS stanowi znaczną część pracy. Uświadamiając sobie zapewne ten brak Autorka zamieszcza trochę informacji ogólnych na temat MS/MS dużo dalej w tekście w rozdziale gdzie prezentowane są rezultaty (str. 85), ale nie jest to właściwe miejsce. Zatem ta część wstępu, zatytułowana „Application areas of MS in bioanalysis” nie spełnia swojego zadania, nie oddaje obecnego stanu rzeczy. Podobnie, w następnym rozdziale, poświęconym zastosowaniu MS do mapowania epitopów białkowych metoda podstawowa „epitope excision” jest jedynie wymieniona, bez wyjaśnienia na czym ona polega, wyjaśnia się jedynie jej wariant „epitope extraction” i nie jest jasne czym obie się różnią. Oba są dalej w pracy używane, tym bardziej część wstępu poświęcona ich prezentacji powinna je jasno prezentować. Dopiero na str. 34 (w obrębie rozdziału „rezultaty”) pojawia się wyjaśnienie rys 18,19 (brak źródła).

Podczas prezentacji celu pracy wyróżniono cztery cele szczegółowe zrealizowane w pracy: badanie procesu blokowania dimeryzacji cystatyny przez przeciwciało Cyst13, identyfikacja epitopu hCC i jego paratopu w kontekście przeciwciała Cyst13 oraz analiza strukturalna epitopu hCC.

Sekcję „rezultaty” zaczyna rozdział poświęcony własnościom cystatyny C, którego bardziej właściwym miejscem wydaje się część wprowadzająca, nie zawiera on bowiem prezentacji



żadnych rezultatów. Z kolei część rezultatów pomieszczono w rozdziale Materiały i metody (Tabele 15-17); jeśli uznano te dane za dodatkowe to właściwym dla nich miejscem byłaby osobna sekcja typu „Supplementary Material”. Motyw niewłaściwej lokalizacji elementów tekstu jest częsty w pracy.

Właściwą sekcję rezultaty rozpoczyna prezentacja wyników badań wpływu obecności w roztworze przeciwciał Cyst13 i IgG2b(k) na powstawanie dimeru hCC śledzonych z zastosowaniem żeli białkowych. Z tekstu (str. 32) wynika, że stosowano żele agarozowe, w podpisach pod rysunkami 16, 17 nie podano ani jakiego typu są to żele, ani jak barwione, a w sekcji metodycznej opisano tylko żele białkowe PAGE, należałoby to doprecyzować. Poza tym z tekstu nie wynika czy to doświadczenie czymś się różni w stosunku do już opublikowanego przez innych rezultatu podsumowanego na rys. 15? Czy to tylko ponowna weryfikacja, tej informacji brakuje. Dla oceny tych rezultatów przydałoby się densytometria, zwłaszcza rys 16 B. W obecności Cyst13 (ale nie IgG2b) pojawiają się na żelach formy o masie większej niż dimer, należałoby to skomentować. W rezultacie Autorka potwierdziła obserwację literaturową o wpływie obecności dwu typów p-ciał na spowolnienie dimeryzacji hCC, uważanej za etap wstępny dalszej patogennej agregacji.

Jako wstęp do mapowania epitopu hCC testowano złożę z immobilizowanym przeciwciałem, mierząc w użyciu MS, obecność cząsteczek białka we frakcji „wash” i frakcji elucyjnej. Ponieważ elucja zakłada drastyczną zmianę pH, doświadczenie zilustrowane na rys. 22 nie wyklucza wiązania niespecyficznego ze złożem. Czy wykonano kontrolę negatywną wiązania do złoża przed immobilizacją p-ciał? Podobną kontrolę negatywną można byłoby rozważyć przy właściwych eksperymentach mapowania epitopu, być może wątpliwości interpretacyjne wzmiankowane na str 53,65 można byłoby wtedy rozstrzygnąć. Autorka zidentyfikowała obszar epitopowy używając dwu komplementarnych strategii „wycinania/ekstrakcji” z identyfikacją związanych do p-ciał peptydów przez spektrometrię mas. Optymalizując warunki rozpuszczalności, denaturacji, redukcji i blokowania cystein dla efektywności trawienia trypsyną ustaliła na wstępie, że kompleks natywnego hCC z p-ciałem jest najlepszym punktem wyjścia do badań. Następnie analizowała zestawy peptydów w frakcji związanej do p-ciał immobilizowanych na złożu powstałe w wyniku trawienia czterema proteazami, albo przed nałożeniem na złożę albo po rekonstrukcji kompleksu. Uzyskała spójny dla obu podejść rezultat wskazujący jednoznacznie na obszar epitopu osłaniany w kompleksie. Oddziaływanie dla jednego z kandydackich obszarów potwierdziła z zastosowaniem syntetycznych peptydów, dokonała też podstawowej charakterystyki strukturalnej tych peptydów. Alaninowa analiza skaningowa wzdłuż sekwencji peptydu wykazała brak pozycji dominujących stałą oddziaływania.



Lokalizacja paratopu w obrębie sekwencji przeciwciała Cyst13 podobną metodą nie dała zadowalających rezultatów ze względu na stabilność proteolityczną wyizolowanych lekkich i ciężkich łańcuchów przeciwciał. Wykonano zamiast tego szereg analiz MS sekwencji peptydów uzyskanych przez trawienie pięcioma proteazami zdenaturowanych w żelu PAGE łańcuchów przeciwciał. Dało to komplementarny zestaw peptydów i duże, prawie całkowite pokrycie sekwencji białek. Większość sekwencji peptydowych zidentyfikowano znajdując je w istniejących bazach danych, jedynie kilka wymagało analizy sekwencyjnej *de novo*. Interesujące byłoby dowiedzieć się z pracy jak wyszukiwano, spośród dużej prawdopodobnie ogólnej liczby skanów MS/MS, widma kandydackie, które poddano takiej analizie i ile takich analiz wykonano zanim udało się znaleźć sekwencje z obszaru CDR? Najważniejsze dla pracy przypisania sekwencji w obrębie CDR są zilustrowane widmami MS/MS, które pozwalają pozytywnie ocenić jakość dopasowania i wiarygodność przypisania. Jednakże w przypadku przypisania pozostałych sekwencji peptydów znalezionych w bazach danych nie podano miary statystycznej użytej do oceny wiarygodności podanych przypisań, Autorka stwierdza jedynie że zostały przypisane z użyciem odpowiedniego programu, co nie jest wystarczające. Programy przeszukań baz danych, takie jak MASCOT, etc. podają zazwyczaj wszystkie przypisania, te o dużej wiarygodności i te o małej, bez oceny wiarygodności przypisania nie można odróżnić jednych od drugich. W każdym programie takie narzędzia oceny są, Autorka o nich nie wspomina także w części Metody (ta część jest w kwestii analizy danych bardzo lakoniczna) nie wiadomo zatem jakie przyjęto kryteria odrzucania sekwencji przypisanych do niskiej jakości widm. Nawet jeżeli program nie proponuje takiej analizy (jak na przykład ProteinProspector), lub jej algorytm nie został przez producenta ujawniony (jak np. MASCOT) można łatwo wykonać przeszukiwanie względem zrandomizowanej bazy danych i wyznaczyć rzeczywistą wartość FDR dla danego dopasowania. Bez takiej analizy trudno ocenić podane rezultaty dotyczące pokrycia całkowitej sekwencji przeciwciał.

Drobne uwagi:

Użycie „hydrophobic bonds” (str. 2) jest kontrowersyjne, należałoby to przetłumaczyć jako „wiązania hydrofobowe”, a takie nie istnieje. Zazwyczaj używa się „hydrophobic interactions”, co również niezbyt dobrze oddaje istotę efektu hydrofobowego. Kontrowersyjne jest również stwierdzenie, że to wiązania wodorowe są najważniejszym typem wiązania niekowalencyjnego, Autorka nie podaje tu żadnego argumentu.

Przy prezentacji danych z MALDI-MS nie podano szacowania spodziewanej dokładności pomiaru masy dla użytego spektrometru, w rezultatach w Tabeli 5 różnice między wartością oczekiwaną a zmierzoną zaczynają być duże (1.3 Da i 2.6 Da dla masy ok. 4 kDa).



Tabela 7 podanych podaje sekwencje badanych peptydów a nie wyniki eksperymentów powinowactwa, jak stwierdzono w tytule.

Na str. 58 - czy sprawdzono jaki jest status cystein, czy w 100 % tworzą one wewnątrzcząsteczkowy mostek dwusiarczkowy, a nie międzycząsteczkowy, obserwowany w krótszym peptydzie?

Wytknięte z obowiązku recenzenta niedostatki rozprawy nie zmieniają faktu, że mgr Anna Śladowska uzyskała w toku studiów doktorskich istotne rezultaty, które mogą przyczynić się do uzyskania w przyszłości nowego leku. Prawie wszystkie założone w pracy cele zostały osiągnięte, a badania p. mgr Śladowskiej będą niewątpliwie kontynuowane przez jej następców. Praca spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, co pozwala wnioskować o dopuszczenie mgr Anny Śladowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Michał Dadlez