


WYDZIAŁ CHEMII	
Wpłynęło	8.05.2017
Wystało	
Nr ewid. 8010-	WCH/AW - 818 / 17
Podpis	

Prof. dr hab. Maciej Kozak
Zakład Fizyki Makromolekularnej UAM
ul. Umultowska 85
61-614 Poznań
mkozak@amu.edu.pl

Poznań, 4 marca 2017 r

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Martyny Prądyńskiej
“Charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z
przeciwciałami”

Ludzka cystatyna C (HCC) jest niewielkim białkiem, które reguluje aktywność proteaz sulfhydrylowych (cysteinowych). Białko to cechuje się szeregiem innych właściwości, dlatego od około 50 lat badana jest z wykorzystaniem szerokiego spektrum metod biochemicznych i biofizycznych. Badania te skupiają się nad rozpoznaniem roli jaką HCC pełni w procesach amyloidogenezy oraz nad wykorzystaniem tego białka jako markera istotnych procesów biochemicznych. Należy podkreślić, że także od kilku dziesięcioleci liczna grupa badaczy z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego zajmuje się badaniami biochemicznymi i strukturalnymi szerokiej grupy peptydowych inhibitorów proteaz cysteinowych w tym ludzkiej cystatyny C.

Warto także dodać, że ludzka cystatyna C, pomimo iż struktura jej formy natywnej oraz serii mutantów została poznana, nadal stanowi atrakcyjny obiekt badań. Jak już wcześniej wspomniałem, w ostatnim okresie HCC wykorzystywana jest jako ważny marker dysfunkcji nerek, indykatorem poważnych zaburzeń filtracji kłębuszkowej, a w szczególności niedawno zdefiniowanego przez Prof. Andersa Grubba z Uniwersytetu w Lund tzw. „syndromu kurczących się porów” (ang. *shrunk pore syndrome*). Charakterystyczną cechą tego białka jest też jego labilność konformacyjna, która objawia się podatnością HCC na dimeryzację, a w dalszych etapach także oligomeryzację poprzez mechanizm przestrzennego przetrzutu domen (ang. *3D domain swapping*). Zjawisko to związane jest z predyspozycjami tego białka do tworzenia złożeń amyloidowych. W związku z tym prowadzone są intensywne badania immunologiczne mające na celu opracowanie przeciwciał selektywnych wobec różnych form oligomerycznych ludzkiej cystatyny C, które posłużyć mogą do wiązania i selektywnego usuwania oligomerów cystatyny C lub mogą także stanowić komponenty nanosystemów do ich detekcji. W szerszym kontekście obejmującym strategię poszukiwań potencjalnych leków chorób neurodegeneracyjnych, w tym również amyloidozy typu islandzkiego, znalezienie możliwości spowolnienia lub całkowitego zahamowania procesu dimeryzacji/oligomeryzacji

HCC z wykorzystaniem selektywnych wobec HCC monoklonalnych przeciwciał stanowi najlepszą perspektywę.

Na tym tle, definiującym nieco rolę i znaczenie HCC, wybór tematyki badań mgr Martyny Prądyńskiej w ramach jej pracy doktorskiej zatytułowanej „Charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami”, przygotowanej pod kierunkiem Prof. UG dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło w Pracowni Chemii Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego jest moim zdaniem bardzo trafny i dobrze umotywowany.

Praca doktorska, którą otrzymałem do oceny zredagowana została w klasycznej formie manuskryptu o objętości 129 stron, z podziałem na sześć rozdziałów. Rozprawa zilustrowana została sześćdziesięcioma rysunkami oraz siedemnastoma tabelami. W pierwszym rozdziale, liczącym 38 stron, mgr Prądyńska przedstawiła przegląd dotychczasowego stanu badań nad ludzką cystatyną C i przeciwciałami oraz metodyką identyfikacji epitopów. Rozdział ten Autorka podzieliła na trzy logiczne części, z których pierwsza obejmuje szczegółowe omówienie struktury i funkcji ludzkiej cystatyny C oraz specyficznych zdolności do agregacji, jakimi cechuje się to białko. W kolejnej części szeroko scharakteryzowała immunoglobuliny. Pewien niedosyt budzi tu brak informacji na temat intensywnie badanej w ostatnich latach grupy przeciwciał jakimi są charakterystyczne dla wielbłądowatych zredukowane przeciwciała (pozbawione łańcuchów lekkich), które wykorzystuje się do produkcji zmodyfikowanych nanoprzeciwciał typu nanobodies. Układy te stanowią niezwykle atrakcyjne i stabilne komponenty do wytwarzania nowych leków biologicznych. Trzecia część tego rozdziału zawiera wyczerpujące omówienie metodyki identyfikacji i izolacji epitopów, ze szczególnym naciskiem na metody zastosowane w pracy.

W drugim rozdziale dysertacji mgr Prądyńska sformułowała ogólny cel prowadzonych badań, jako „charakterystykę molekularną kompleksu ludzkiej cystatyny C z autoprzeciwciałami oraz z monoklonalnym przeciwciałem Cyst10”. Tak sformułowany cel pracy postanowiła osiągnąć z pomocą serii dobrze zaplanowanych i powiązanych ze sobą eksperymentów biochemicznych oraz biofizycznych, które pozwolę sobie w tym miejscu bezpośrednio zacytować:

- „- opracowanie protokołu izolacji naturalnie występujących autoprzeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej cystatynie C z komercyjnej frakcji IgG;
- charakterystyka anty-hCC NAb z wykorzystaniem elektroforezy dwuwymiarowej, sączenia molekularnego, wysokosprawnej chromatografii cieczowej i spektrometrii mas;
- identyfikacja epitopów dla anty-hCC NAb metodą wycinania i ekstrakcji epitopu oraz sprawdzenie powinowactwa wyznaczonych fragmentów za pomocą testów powinowactwa i testów immunoenzymatycznych;
- identyfikacja epitopów dla anty-hCC NAb metodą wymiany proton/deuteron połączonej z analizą za pomocą spektrometrii mas;
- zbadanie wpływu wyizolowanych autoprzeciwciał na proces dimeryzacji ludzkiej cystatyny C;
- charakterystyka przeciwciała Cyst10 z wykorzystaniem spektrometrii mas;
- wyznaczenie stałej dysocjacji kompleksu hCC-Cyst10 metodą termoforezy mikroskalowej;

- identyfikacja epitopu dla przeciwciała Cyst10 metodą wycinania i ekstrakcji epitopu oraz sprawdzenie powinowactwa wyznaczonych fragmentów za pomocą testów powinowactwa i testów immunoenzymatycznych;
- identyfikacja epitopu dla przeciwciała Cyst10 metodą wymiany proton/deuteron połączonej z analizą za pomocą spektrometrii mas,
- porównanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami Cyst10 i Cyst28 w celu poznania mechanizmu hamowania dimeryzacji hCC przez przeciwciała.”

Trzeci rozdział rozprawy, liczący 15 stron i podzielony na 7 części, zawiera szczegółową metodykę prowadzonych eksperymentów, począwszy od ekspresji i oczyszczania próbek HCC, poprzez izolację autoprzeciwciał oraz ich charakterystykę, identyfikację epitopów, skończywszy na badaniach wpływu autoprzeciwciał na proces dimeryzacji HCC.

Rozdział czwarty liczący 46 stron, obejmuje prezentację i omówienie wyników badań, został logicznie podzielony na dwie części. Pierwsza część obejmuje wyniki badań autoprzeciwciał przeciw ludzkiej cystatynie C, druga wyniki badań oddziaływań HCC z monoklonalnym przeciwciałem Cyst10. W pierwszej części na szczególną uwagę zasługują metodyczne badania nad identyfikacją epitopów rozpoznawanych przez autoprzeciwciała przeciw ludzkiej cystatynie. Pomimo, że ostatecznie identyfikacja epitopów wykazała, że badane autoprzeciwciała stanowią najprawdopodobniej mieszaninę przeciwciał poliklonalnych, które wiążą różne epitopy. Zgadzam się z zaproponowaną przez mgr Prądyńską interpretacją, że brak zbieżności wyników uzyskanych metodą HDX-MS i testów immunoenzymatycznych związany może być z różnicą ruchliwości analizowanych białek. W drugiej części dotyczącej charakterystyki przeciwciała Cyst10, wartym podkreślenia jest analiza stałej dysocjacji kompleksu Cyst10 z ludzką cystatyną C.

W rozdziale piątym mgr Prądyńska zawarła podsumowanie uzyskanych wyników oraz porównanie epitopów dla przeciwciał Cyst10 i Cyst28 zidentyfikowanych dwoma metodami (metodą wycinania/ekstrakcji oraz metodą HDX-MS). Podsumowanie kończy fragment zawierający krótki opis dorobku naukowego doktorantki. Warto odnotować, że autorka opublikowała wyniki swoich badań w postaci czterech prac w czasopismach indeksowanych w bazie *Web of Science*, a w trzech z nich jest pierwszym autorem.

Ostatni rozdział zawiera spis zacytowanych w pracy odnośników literaturowych, który obejmuje 137 pozycji. Pracę zamyka krótki, dwustronicowy aneks, w którym zawarte zostały wyniki identyfikacji epitopu za pomocą wymiany proton/deuteron.

Ocena strony merytorycznej pracy.

Tematyka badań wybrana została bardzo trafnie. Obiekty badań nie należały do łatwych, warto więc podkreślić, że Doktorantka dobrze przemyślała i zaplanowała wszystkie eksperymenty. Do identyfikacji i analizy epitopów rozpoznawanych przez autoprzeciwciała antyHCC zastosowała szereg metod, zarówno teoretycznych (przewidywanie epitopów) jak i biochemicznych. Pomimo, że nie udało się dla tych autoprzeciwciał określić jednego lub kilku

epitopów, zastosowana przez mgr Prądyńską metodyka ich identyfikacji nie budzi moich zastrzeżeń. Z refleksją podeszła do rozbieżności w wynikach identyfikacji epitopu z pomocą metod biochemicznych i wymiany proton/deuteron. Izolaty autoprzeciwciał z mieszaniny immunoglobulin G z surowicy zdrowych ludzi mają niewątpliwie charakter poliklonalny. Przemawia za tym pośrednio także dość szerokie spektrum zidentyfikowanych przez Doktorantkę glikanów. Zbyt pobieżne jest moim zdaniem stwierdzenie, zawarte na stronie 98, że autoprzeciwciało w początkowej fazie eksperymentu, który miał określić wpływ autoprzeciwciał na proces dimeryzacji ludzkiej cystatyny, przyspiesza dimeryzację HCC, a następnie już nie działa w ten sam sposób. W trakcie publicznej obrony warto byłoby rozwinąć ten temat. Czy warunki eksperymentu mogły mieć wpływ na taki wynik? Docenić należy też kompleksową analizę epitopu oraz właściwości kompleksu z HCC, przeprowadzoną dla komercyjnego przeciwciała Cyst10. Jedyna krytyczna uwaga lub raczej sugestia dotycząca dalszych badań, która mi się nasunęła podczas lektury części eksperymentalnej manuskryptu to fakt, że oprócz porównania z Cyst28 warto byłoby też porównać selektywność z przeciwciałami selektywnymi wobec kowalencyjnie stabilizowanych form ludzkiej cystatyny C otrzymanymi w grupie profesora Andersa Grubba. Tym bardziej, że zespół Prof. Rodziewicz-Motowidło od wielu lat współpracuje z kolegami z Lund i uzyskanie tych przeciwciał do badań porównawczych nie powinno stanowić problemu.

Przechodząc natomiast do oceny realizacji postawionego na wstępie przez mgr Prądyńską celu pracy, w mojej ocenie udało się jej go w zrealizować. Do najważniejszych wyników uzyskanych przez Autorkę zaliczam:

- potwierdzenie poliklonalności autoprzeciwciała antyHCC,
- identyfikację glikanów w wyizolowanych autoprzeciwciałach dla podklas IgG1 oraz IgG2/3,
- określenie właściwości kompleksu z HCC z przeciwciałem Cyst10,
- identyfikacja potencjalnego epitopu dla Cyst10.

Uwagi krytyczne

Pomimo wysokiej wartości pracy mgr Prądyńska podczas redakcji manuskryptu nie ustrzegła się pewnych nieścisłości, które z obowiązku recenzenta jestem zobligowany przedstawić.

Strona 52 - Autorka w podrozdziale dotyczącym oczyszczania cystatyny C stosuje niejednorodną konwencję opisu stosowanych kolumn chromatograficznych. W pierwszym zdaniu opisu podaje tylko nazwę złoża stosowanego do chromatografii jonowymiennej, brak parametrów kolumny. Natomiast już w dalszej części, w opisie sączenia molekularnego, oprócz złoża podaje też szczegółowe parametry kolumny (SuperdexTM 75 10/300 GL). Podobna sytuacja pojawia się na kolejnej stronie, gdzie brak szczegółowych informacji na temat mikrokolumny (Mobitec).

Autorka włączyła do manuskryptu kilka rysunków z opisami w języku angielskim. Moim zdaniem opisy te powinny zostać przetłumaczone. Całość pracy jest w języku polskim, więc konwencja ta winna dotyczyć także rysunków. Niniejsza uwaga dotyczy między innymi rysunków: 34 (str. 75), 47 (str. 95), 50 (str. 100), 52 (str. 103) oraz 59 na stronie 111.

Strony 128-129. Wykresy ilustrujące eksperymenty wymiany proton/deuteron połączonej ze spektrometrią mas zawarte w załączniku do pracy są w mojej ocenie mało czytelne. Rozumiem, że autorka chciała przedstawić wyniki w skondensowanej formie, jednak powiększenie wykresów o około 100% zwiększyłoby objętość o 2-3 strony, a wykresy byłyby bardziej czytelne.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Praca napisana jest dobrym językiem i została bogato zilustrowana rysunkami i diagramami. Warto podkreślić, że uzyskane wyniki zostały przedstawione starannie, zarówno od strony graficznej jak i redakcyjnej. Szczególnie użyteczne w interpretacji wyników są rysunki przedstawiające lokalizację epitopów w obrębie struktury przestrzennej HCC. Przedstawione wcześniej uwagi krytyczne dotyczące prezentacji danych nie umniejszają ogólnego dobrego odbioru pracy. Warto też podkreślić, że Autorka dobrze przeprowadziła korektę manuskryptu, więc błędy edytorskie (literówki) pojawiają się stosunkowo rzadko.

Podsumowanie

W mojej ocenie podjęta przez mgr Prądyńską tematyka badawcza obejmująca charakterystykę oddziaływań ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami jest w perspektywie potencjalnych zastosowań biomedycznych ważna i aktualna. Autorka w pełni zrealizowała założone cele badawcze. W mojej ocenie prezentacja uzyskanych wyników jest jasna i nie budzi moich wątpliwości. Wyniki, nawet te negatywne, zostały wyczerpująco omówione i przedyskutowane. Wartym podkreślenia jest też fakt, że wyniki opublikowane zostały także w trzech pracach w uznanym czasopiśmie naukowym (*Amino Acids*).

Pomimo przedstawionych wcześniej uwag krytycznych uważam, że praca jest na wysokim poziomie naukowym. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a w pracach tych mgr Prądyńska jest pierwszym autorem (lub posiada wkład równoważny z pierwszym autorem). Biorąc także pod uwagę szczegółowe wymagania dotyczące wyróżnień prac doktorskich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego stwierdzam, że w mojej ocenie można uznać pracę za wyróżniającą.

Reasumując, praca doktorska mgr Martyny Prądyńskiej spełnia zarówno zwyczajowe jak i formalne wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365). Wobec powyższego, wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Martyny Prądyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

