

Prof. dr hab. Dariusz Rakus
Zakład Fizjologii Molekularnej Zwierząt,
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Cybulskiego 30
50-205 Wrocław

Wrocław, 05.01.2015

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr **Magdaleny Wezner-Ptasińskiej**

pt. „Konstrukcja i selekcja bibliotek fagowych opartych o powtórzenia bogate w leucynę”

Podstawowym celem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej była próba uzyskania białek o wysokim powinowactwie do konkretnych antygenów w oparciu zrab białkowy białek VLR i przy wykorzystaniu techniki selekcji bibliotek fagowych (techniki „phage display”). Immunoglobuliny kręgowców od około czterdziestu lat są powszechnie wykorzystywane w wielu technikach biologii molekularnej i diagnostyce medycznej, a ostatnimi laty są coraz szerzej stosowane w terapiach medycznych. Metody wytwarzania odpowiednich przeciwciał, o wysokim powinowactwie wobec konkretnego antygeny, są jednak kosztowne i czasochłonne.

Białka VLR (zmienne receptory limfocytów) występują u prymitywnych kręgowców – Agnatha (np. minogi, śluzice) i pełnią funkcje analogiczne do przeciwciał współczesnych kręgowców szczękowych (Gnatostomata). Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań pokazują, że białka te wiążą specyficzne antygeny ze stałymi dysocjacji w zakresie nano- i pikomolarnym i mogą być interesującą alternatywą dla immunoglobulin kręgowców szczękowych (Tasumi et al. 2009; PMID:19625627).

Doktorantka, w trakcie realizacji pracy doktorskiej zaprojektowała, uzyskała nadprodukcję w systemach bakteryjnych, a także oczyściła białko i scharakteryzowała fizyko-chemicznie białko o sekwencji konsensusowej do białek VLR. Wyniki te zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie naukowym *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics* (Wezner-Ptasińska M, Krowarsch D, Otlewski J. (2011) Design and characteristics of a stable protein scaffold for specific binding based on variable lymphocyte receptor sequences. *BBA* 1814(9):1140-5). Publikacja ta potwierdza zarówno istotność badań przeprowadzonych przez mgr Magdalenę Wezner-Ptasińską, jak i opanowanie przez nią zaawansowanych technik inżynierii białka.

Drugi etap pracy Doktorantki miał na celu skonstruowanie i selekcję bibliotek fagowych zawierających warianty białek VLR oddziałujące z wysokim powinowactwem z kilkoma antygenami mającymi, lub mogącymi mieć, istotne znaczenie w diagnostyce i terapiach medycznych, z białkami: S100A7 (kórych nadekspresja jest charakterystyczna dla keratynocytów osób cierpiących na łuszczycę oraz choroby nowotworowe: pęcherza moczowego, gruczołu piersiowego, skóry), antygeny grupowego Lewis y (który to jest nadprodukowany w wielu chorobach nowotworowych), naskórkowego czynnika wzrostu (HER2) oraz lizozymu. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka sama przygotowała (przeprowadziła ekspresję i oczyszczanie) białko S100A7.

Selekcja bibliotek fagowych jest znacznie bardziej niewdzięcznym zadaniem od konstrukcji, izolacji i charakterystyki białka, jako że uzyskanie pozytywnych wyników selekcji jest w dużej mierze niezależne od opanowania technik biologii molekularnej/biochemii. Niestety Doktorantka „padła ofiarą” nieobliczalności tej techniki i nie uzyskała pozytywnych wyników, tzn. nie wyselekcjonowała klonów oddziałujących z antygenem Lewis y i HER2. Brak powodzenia w selekcji fagów względem powyższych antygenów nie umniejsza jakości pracy Pani mgr Magdaleny Wezner-Ptasińskiej. Wydaje mi się jednak, że dyskusja owych negatywnych wyników jest zbyt skromna. Doktorantka co prawda podaje potencjalną przyczynę braku oddziaływania pomiędzy dVLR a antygenem Lewis y, ale jej wyjaśnienia sugerują, iż układ odpornościowy bezszczekowców nie jest w stanie w ogóle rozpoznawać struktur cukrowych. Czy zjawisko takie naprawdę ma miejsce?

Powodzeniem zakończyła się natomiast selekcja fagów w kierunku białka S100A7. Doktorantka uzyskała wariant VLR oddziałujący z S100A7 ze stałą wiązania wynoszącą około $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, co daje nadzieję na dalsze kilkudziesięciokrotne zwiększenie wartości stałej oddziaływania po przeprowadzeniu procedury tzw. dojrzewania powinowactwa.

Pomimo niezyskania przez Doktorantkę końcowego produktu tematu badawczego – białek oddziałujących z wysoka stałą wiązania z badanymi antygenami – część eksperymentalną rozprawy oceniam bardzo wysoko. Świadczy ona bowiem bardzo dobrze o profesjonalizmie oraz znajomości na poziomie eksperckim technik inżynierii białka.

Zadaniem recenzenta jest jednakże nie tylko podkreślanie zalet rozprawy doktorskiej (to uczynili już w stosunku do części wyników Pani mgr Magdaleny Wezner-Ptasińskiej recenzenci renomowanego czasopisma naukowego), ale także wskazanie jej braków.

Moje nieliczne uwagi dotyczą głównie redakcyjnej strony tekstu. I tak:

- wydaje mi się, że korzystnym byłoby pokazanie modelu dVLR z zaznaczonymi resztami aminokwasowymi poddanymi randomizacji;
- dodatkiem znacznie ułatwiającym czytanie rozprawy byłoby umieszczenie skrótów stosowanych w pracy;
- w tabeli na stronie 56 nie mogę znaleźć procentowego udziału konkretnych reszt aminokwasowych występujących w danej pozycji w puli 368 sekwencji;
- w opisie Rys. 5.9 (str. 59) jest błąd: frakcje E1-E15 powinny być zastąpione E1-E5;
- „reszty tyrozynowe”, to termin dosyć powszechnie używany, acz nie do końca prawidłowy – powinno być „reszty tyrozyłowe”;
- stężenie molowe wyrażone jest z definicji w mol/dm³, nie ma więc potrzeby pisać „stężenie molowe wyrażone w mol/dm³” (str. 38);
- pewną niezręcznością, acz powszechnie praktykowaną, jest pisanie „wiązał się do...ze stałą dysocjacji” (np. str. 64);
- na stronie 71 Doktorantka opisując tworzenie bibliotek zauważa, podając rozsądne uzasadnienie, że w randomizacji celowo unikano reszt prolilowych i cysteilowych. Ale, reszty cysteilowe występują w dzikich typach białek VLR w pozycji 61 i 62. Czy nie warto więc było zaryzykować i spróbować mutagenezy w kierunku zarówno reszt prolilowych jak i cysteilowych? Fragment poddawany randomizacji posiada bardzo zmienny skład aminokwasowy, a więc destabilizacja struktury dVLR może w wielu przypadkach nie nastąpić.

Jak wspomniałem już wcześniej z radością powitałbym także odrobinę bardziej rozbudowaną dyskusję przyczyn niepowodzenia w uzyskaniu wariantów VLR oddziałujących z antygenem Lewis y i HER2.

Tekst rozprawy napisany jest dosyć czytelnym językiem, a Wstęp oraz Dyskusja świadczą o gruntownej znajomości zagadnienia i dogłębnym rozumieniu badanego zjawiska. Drobne potknięcia językowe są nieuniknione w tak obszernej pracy. Metody badań zostały dobrane właściwie, ich opis jest poprawny i pozwala na odtworzenie doświadczeń, wyniki są napisane dosyć przejrzysto, a kontekst biologiczny użytych białek i antygenów został zarysowany w stopniu wystarczającym do zrozumienia koncepcji pracy.

Wartym podkreślenia jest także fakt, że podczas wykonywania pracy doktorantka zastosowała liczne i nowoczesne techniki badawcze zarówno biologii molekularnej, jak i analizy fizyko-chemicznej.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Magdaleny Wezner-Ptasińskiej jako bardzo dobrą. Z całą pewnością wnosi ona nowe istotne informacje do wiedzy o mechanizmach konstruowania i oddziaływania białek VLR z antygenami, a potwierdzeniem wartości naukowej pracy Pani mgr Magdaleny Wezner-Ptasińskiej jest publikacja w renomowanym czasopiśmie naukowym. Trudno jest w tej chwili ocenić, czy to właśnie zrąb białkowy VLR będzie wykorzystywany w przyszłości do konstruowania białek oddziałujących z konkretnymi antygenami; niemniej jednak badania wykonane przez Doktorantkę były niezbędnym i wartościowym elementem dużego projektu poszukiwania białek alternatywnych dla przeciwciał kręgowców prowadzonego przez zespół prof. Jacka Otlewskiego.

Wspomniane przeze mnie powyżej nieliczne krytyczne uwagi nie obniżają oceny całości rozprawy. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm. oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Wezner-Ptasińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie i nagrodzenie rozprawy.

Wrocław, 05.01.2015



Dariusz Rakus