

Gliwice, 30.01.2015

Dr hab. inż. Ilona Wandzik, prof. nzw. Pol. Śl.
Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii
e-mail: ilona.wandzik@polsl.pl
tel. 32 237 20 28

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Anny Dzierzby

pt Badanie właściwości biologicznych glicylowanych struktur węglowodanowych

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
pod kierunkiem **prof. dr hab. Andrzeja Gamiana**

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały współfinansowane z kilku projektów badawczych (POIG.01.01.02-02-003/08, 2P05A 140 30, grant promotorski Pbm73).

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy koniugacji syntetycznych pochodnych cukrowych z cząsteczkami białek nośnikowych. Syntezowane w ramach pracy pochodne cukrowe zawierają fragment N-acetyloglicyny w pozycji C-6 fragmentu cukrowego i są związkami imitującymi epitop lipopolisacharydowy zawierający glicynę. Koniugaty z dwoma białkami nośnikowymi: albuminą wołową i mioglobina końską zostały wykorzystane do immunizacji zwierząt doświadczalnych, w celu uzyskania przeciwciał swoistych wobec endotoksyn, czyli kompleksów lipopolisacharydowych. Z racji tego, że endotoksyny stanowią najważniejszy immunologicznie czynny element strukturalny ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, glikokoniugaty takiego typu jakie zaprezentowane w pracy Pani Katarzyny mogą okazać się użyteczne do opracowania glikokoniugatowych szczepionek nowej generacji. Obecnie uważa się, że szczepionki glikokoniugatowe są jednymi ze skuteczniejszych i bezpieczniejszych.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi środowiska naukowego przyciąga rola glikokoniugatów w rozpoznaniu immunologicznym i choć została ona już stosunkowo dobrze poznana, to nadal wiele kwestii pozostaje do wyjaśnienia. Glikokoniugaty odgrywają dużą rolę nie tylko jako kandydaci na szczepionki, ale również jako narzędzia biochemiczne do śledzenia ich przemian w układzie odpornościowym.

Choć pierwsze szczepionki glikokoniugatowe przeciwko powszechnie występującym zakażeniom bakteryjnym zastosowano na przełomie lat osiemdziesiątych i

dziewięćdziesiątych XX wieku, to dopiero badania ostatnich lat dowodzą, że nie tylko białka, ale także węglowodany są rozpoznawane przez limfocyty T. Fakt ten stymuluje badania nad produkcją szczepionek zawierających różnorodne fragmenty cukrowe. Bowiem im więcej cząsteczek jest rozpoznawanych i przetwarzanych przez limfocyty T, tym silniejsza odpowiedź immunologiczna, a to może być wykorzystane w zapobieganiu nie tylko infekcjom bakteryjnym, ale także chorobom nowotworowym czy wirusowym. Stąd bardzo aktualnym nurtem są badania interdyscyplinarne nad syntezą, izolowaniem, określaniem struktury i rolą rozmaitych reszt oligosacharydowych, w tym również tych, zawartych w bakteryjnych lipopolisacharydach.

W tej tematyce mieści się praca doktorska mgr Katarzyny Dzierzby wykonana pod kierunkiem profesora Andrzeja Gamiana, który posiada wybitne osiągnięcia naukowe w tej dziedzinie. Między innymi osiągnięciem jego grupy badawczej było wykazanie obecności glicyny w endotoksynach bakterii. Kontynuacją tych badań jest przedstawiona do recenzji rozprawa, w której Doktorantka podjęła się oceny biologicznych właściwości syntetycznych pochodnych cukrowych, glicylowanych w pozycji C-6. Recenzowanie tej pracy stanowiło dla mnie bardzo ciekawą lekturę, gdyż Autorce udało się przedstawić wyniki badań własnych na tle badań biologicznych i bioinformatycznych prowadzonych w wiodących grupach, co poparła bardzo bogatym przeglądem literaturowym. Zebrane informacje literaturowe były przydatne do opisanie wyników i przeprowadzenia dyskusji. Na uwagę zasługuje szeroki zakres stosowanej przez Autorkę literatury, łącznie 268 pozycji, z czego blisko 160 dotyczy literatury ostatnich 10 lat.

Tytuł pracy: *Badanie właściwości biologicznych glicylowanych struktur węglowodanowych* dobrze oddaje zawartość rozprawy. Przedłożona praca zawiera 222 strony, 73 rysunki, 17 tabel, 268 odnośników literaturowych.

Doktorantka podjęła się bardzo trudnego wyzwania o charakterze interdyscyplinarnym. Począwszy od zadań syntetycznych (synteza fragmentów cukrowych zawierających N-acetyloglicylowe fragmenty, synteza formylowanych białek, synteza koniugatów), poprzez przewidywanie za pomocą narzędzi bioinformatycznych epitopów konformacyjnych i liniowych do otrzymywania antykoniugatowych przeciwciał mnoklonalnych, a kończąc na badaniu immunoreaktywności tych przeciwciał wobec wybranych lipopolisacharydów. Cały plan wygląda bardzo imponująco i mógłby z powodzeniem być podstawą nie tylko jednej rozprawy. Bardzo wysoko oceniam taki zamysł pracy, niemniej jednak chciałam przedstawić kilka uwag w kolejności takiej jak zostało opisane w przedłożonej rozprawie.

- Autorka nie zastosowała narastającego numerowania odsyłaczy literaturowych
- We wprowadzeniu Autorka nawiązuje do faktu, iż w oligosacharydzie rdzeniowym izolowanym ze szczepów bakterii Gram-ujemnych często obecny jest fragment glicylowy i to jemu przypisuje się udział „w tworzeniu epitopu wspólnego dla wielu szczepów bakteryjnych” (str. 11). W celu pracy czytamy „Wybór struktur

syntetycznych do badań był podyktowany wcześniejszymi wynikami uzyskiwanymi przez zespół prof. Gamiana. N-acetylowany oligosacharyd rdzeniowy wykazywał w koniugacie białkowym wysoką immunogenność, a uzyskana surowica królicza przejawiała szeroką reaktywność z lipopolisacharydami. Dlatego glicynę w dalszych badaniach używano w postaci N-acetylowanej” (str. 46). Rodzi się pytanie: czy jednak nie warto było sprawdzić także zachowanie pochodnych z fragmentem glicylowym, z wolną grupą aminową. Czy Autorka rozważała syntezę takich pochodnych cukrowych? Grupa aminowa w fizjologicznym pH występuje głównie w formie sprotonowanej i może powodować zupełnie inne oddziaływania niż grupa N-acetylowa, która nie ulega protonowaniu i jako neutralna nie uczestniczy w oddziaływaniach elektrostatycznych.

- Rozprawa jest napisana komunikatywnym językiem, co sprawia, że czyta się ją z zainteresowaniem. Pewnym mankamentem w lekturze jest częste opisywanie zjawisk w sposób niepełny, aby za chwilę powrócić do tej samej kwestii i opisać ją po raz kolejny, tym razem ze szczegółami. Jako przykład może posłużyć opis oddziaływania układu immunologicznego z endotoksynami, przedstawiony na stronie 21, paragraf 1 i 3). Ponadto Autorka cytuje inne odniesienia literaturowe do tych samych kwestii. Inny przykład powtórzenia/uzupełnienia można znaleźć na stronie 35/36, gdy wymieniane są białka nośnikowe.
- Na stronie 36 Autorka wymienia kilka białek nośnikowych stosowanych do produkcji licencjonowanych szczepionek glikokoniugatowych. Czy stosuje się również albuminę wołową lub mioglobinę końską? Czym kierowano się podczas doboru tych białek w badaniach zrealizowanych w ramach recenzowanej pracy? Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych pokazała, że jednostki glicylowe na powierzchni mioglobiny końskiej mogą mieć znaczenie w reakcjach immunologicznych (str 181). Czy taka immunoreaktywność opisywana jest w literaturze?
- Moim zdaniem synteza pochodnych cukrowych opisana w części eksperymentalnej w rozdziale 4.1 zyskałaby, gdyby została połączona z wynikami przedstawionymi w rozdziale 5.1, które dotyczyły szczegółów syntetycznych oraz danych fizykochemicznych (skręcalności, temperatury topnienia, opisów widm NMR). Mam kilka uwag do charakterystyki związków: w opisie widma pochodnej **21** na stronie 83 opisane są przesunięcia chemiczne czterech singletów odpowiadających trzem protonom metylowym w grupie acetylowej ($\delta \sim 2$ ppm), dlaczego? Podobna sytuacja ma miejsce dla związku **22**. Z kolei związek **23** w opisie widma posiada jeden singlet odpowiadający grupie N-acetylowej, za to przykładowe widmo przedstawione na rys. 5.8 zawiera kilka sygnałów przy $\delta \sim 2$ ppm, co świadczy o kilku produktach. Jakie to mogły być związki? Konsekwencją tej sytuacji może być otrzymanie finalnego związku **26** również zanieczyszczonego. Uważam też, że dla pełnej charakterystyki analizy ^1H NMR powinny zostać przeprowadzone dodatkowo w rozpuszczalniku aprotycznym, np. $\text{DMSO-}d_6$, aby potwierdzić liczbę protonów z grup OH i NH.

- Ważną częścią rozprawy jest synteza koniugatów pochodnych cukrowych z dwoma białkami nośnikowymi. Białka nośnikowe, zostały uprzednio odpowiednio zmodyfikowane w dwuetapowej procedurze. W pierwszym etapie pierwszorzędowe grupy aminowe poddano reakcji z glicydolem, aby następnie powstały diol utlenić w reakcji z nadjodanem do aldehydu. Pierwszy etap był monitorowany poprzez określenie liczby pierwszorzędowych grup aminowych białka, które nie uległy reakcji za pomocą testu z kwasem 2,4,6-tri-nitrobenzenosulfonowym (TNBS). Uważam, że istotne byłoby również przeprowadzenie analizy ilościowej grup formylowych powstałych w wyniku utleniania diolu.
- Kolejnym etapem pracy badawczej była synteza glikokoniugatów. Odpowiednio formylowane białka łączono z pochodnymi cukrowymi, zawierającymi pierwszorzędową grupę aminową jako podstawnik pierścienia pirydylowego. Dokonano tego przekształcenia w reakcji redukcyjnego aminowania. Reakcja ta polegała na addycji aminy do aldehydu, a następnie redukcji otrzymanej iminy, czyli zasady Schiffa za pomocą cyjanoborowodoru sodu. Finalnym produktem reakcji była nie imina, ale amina drugorzędowa. Na rysunku 2.4 przedstawiona jest imina, brakuje produktu końcowego, ponadto jedna z grup R_1 lub R_2 jest wodorem, gdyż substratem w reakcji był aldehyd, a nie keton. Cyjanoborowodorek jest reduktorem, a nie czynnikiem kondensującym. Otrzymane glikokoniugaty oczyszczano metodą chromatografii żelowej przy wykorzystaniu kolumny HW-55S (Tosoh Bioscience). Autorka podała profile elucji z pomiarem absorbancji przy długości fali $\lambda = 280$ nm oraz zawartością cukru „całkowitego (obojętnego)” w glikokoniugacie (Rys. 5.17-5.23). Proszę o wyjaśnienie czy cukier „obojętny” to jest cukier nie związany kowalencyjnie z białkiem? Czym kierowano się przy wyborze odpowiednich frakcji, czyli takich, które zawierały cukier związany kowalencyjnie? Charakterystyka spektralna wybranych frakcji jednego z koniugatów BSA-Glc/Gly przedstawiona jest w tabeli 5.3. Nie znalazłam w niej jednak potwierdzenia czystości glikokoniugatu. Autorka nie podaje jaki stosunek wartości absorbancji A_{260}/A_{230} należy przyjąć za dopuszczalny, tym samym po analizie danych z tabeli 5.3 czytelnik nie może wyciągnąć wniosku, która z frakcji zawierała najlepiej oczyszczony glikokoniugat BSA-Glc/Gly. Uważam, że cennych informacji na temat struktury otrzymanych glikokoniugatów dostarczyłyby analizy spektralne, np spektrometria mas lub dodatkowo ^1H NMR w przypadku glikokoniugatów z mniejszym z białek, mioglobina końską.
- Autorka opisuje zastosowanie glikokoniugatów z mioglobina do immunizacji myszy (str. 183). Nie znalazłam informacji dlaczego glikokoniugaty z albumina wołową zostały odrzucone z badań immunologicznych.
- Na stronie 172 w pierwszym akapicie prawdopodobnie pomyłkowo zacytowano pracę [182]. Na Rys. 6.1 i 6.2 pomyłkowo opisano przeciwciało monoklonalne jako BSA-Gal/Gly.

Znalazłam w pracy kilka błędów językowych i literowych, ale ogólnie rozprawa jest napisana czytelnie i stylistycznie poprawnie. W tak obszernej pracy trudno nie popełnić błędów czy wtrąceń z żargonu laboratoryjnego.

Jako chemik organik nie potrafię ocenić stopnia złożoności badań biologicznych, wiem natomiast, że część syntetyczna dotycząca syntezy pochodnych cukrowych, modyfikacji białek oraz syntezy glikokoniugatów była bardzo trudnym, pracochłonnym i wymagającym dużego doświadczenia zadaniem. Pomimo uwag polemicznych i krytycznych uważam, że Doktorantka zrealizowała postawione przed sobą cele. Autorka wykazała się niewątpliwie dobrym przygotowaniem merytorycznym, dużą starannością w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej posiadają elementy nowości naukowej i zostały już opublikowane w siedmiu publikacjach naukowych. Na uwagę zasługuje fakt, iż Doktorantka jest współautorką dziewięciu innych publikacji niezwiązanych z realizowanym tematem pracy doktorskiej. To bez wątpienia świadczy o dużym potencjale naukowym Autorki, za co była wielokrotnie nagradzana różnego rodzaju stypendiami i nagrodą zespołową przyznaną przez Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Uważam, że rozprawa doktorska pt *Badanie właściwości biologicznych glicylowanych struktur węglowodanowych* 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 póź. zm.) i z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Anny Dzierzby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. inż. Ilona Wandzik