



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirsztfelda
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE
ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław
tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71
<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

dr hab. Kazimiera Waśniowska, prof. PAN
Zakład Immunochemii
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
we Wrocławiu

Wrocław, 14.02.2015 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Katarzyny Dzierzby pt.: Badanie właściwości biologicznych
glicylowanych struktur węglowodanowych”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Gamiana

Duże zainteresowanie badaczy poszukiwaniem wspólnych elementów strukturalnych w obrębie cząsteczki LPS dla bakterii Gram-ujemnych wiąże się z ich potencjalnym wykorzystaniem do otrzymania przeciwciał o szerokiej swoistości i wykorzystanie ich do leczenia zakażeń bakteryjnych i diagnostyki. Dlatego też temat, którym zajęła się doktorantka należy uznać za bardzo ważny i aktualny, o dużych walorach poznawczych i praktycznych.

Praca doktorska, napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami, liczy 222 strony w której doktorantka zacytowała 268 pozycji aktualnego piśmiennictwa i przedstawiła 73 ryciny i 17 tabel. Umieściła również w pracy streszczenia w języku polskim i angielskim, spis tabel i rycin oraz spis publikacji doktorantki związanych z tematyką rozprawy.

Wstęp rozprawy jest obszerny i składa się z trzech rozdziałów i kilku podrozdziałów. W pierwszej części Doktorantka przedstawia aktualną wiedzę o budowie lipopolisacharydu bakterii Gram-ujemnych i jego roli w rozwoju ogólnoustrojowej reakcji zapalnej oraz o udziale glicylowanych struktur węglowodanowych w tworzeniu epitopu. W następnych rozdziałach omawia rodzaje szczepionek glikokoniugatowych i wpływ elementów niecukrowych i niebiałkowych na właściwości tych szczepionek oraz zastosowanie metod bioinformatycznych w projektowaniu szczepionek glikokoniugatowych. Całość wstępu napisana jest jasno i czytelnie i stanowi w pełni wyczerpujące wprowadzenie do badań własnych Doktorantki.

Głównym celem pracy doktorskiej było otrzymanie koniugatów białkowo- cukrowych zawierających fragment cukrowy odpowiadający części oligosacharydu rdzeniowego lipopolisacharydu zawierającego podstawnik glicylowy i uzyskanie anty-glikokoniugatowych przeciwciał monoklonalnych rozpoznających różne odmiany epitopu glicylowego.

Do realizacji zadań pracy doktorskiej Doktorantka zastosowała różnorodne metody badawcze: metody syntezy chemicznej związków N-acetyloglicyloowanych mono i disacharydów, metody spektroskopii NMR do potwierdzenia prawidłowej budowy otrzymanych związków; metody ekstrakcji i oczyszczania LPS, modyfikacji i oczyszczania białek nośnikowych; wykrywania, rozdziałów i analizy białek i LPS (elektroforeza w żelu poliakrylamidowym, immunobloting, dot bloting); metody pracy z komórkami i bakteriami oraz metody bioinformatyczne. Większość metod opisano dokładnie podając pochodzenie odczynników i wyszczególniając stosowaną aparaturę. Do tej części rozprawy mam drobne uwagi a mianowicie anglojęzyczny skrót „h” oznaczający godzinę, powinien być zastąpiony skrótem godz., brak jest również wyjaśnienia skrótów HT i RPMI, a także informacji w jaki sposób zamrażano komórki w ciekłym azocie i jaki był skład medium hodowlanego oraz opisu metod bioinformatycznych, które szerzej opisano w Rozdziale Wyniki.

W pierwszej części wyników autorka opisuje syntezę modelowych N-acetyloglicyloowanych pochodnych mono- i disacharydów i ich charakterystykę oraz oczyszczanie białek nośnikowych albuminy surowicy wołowej (BSA) i końskiej mioglobiny, które posłużyły do przygotowania preparatów białkowo-cukrowych. W następnym etapie badań sprawdzano wiązanie otrzymanych glikokoniugatów z króliczymi surowicami odpornościowymi skierowanymi przeciwko koniugatom BSA z N-acetylowanym oligosacharydem rdzeniowym *E. coli* K-12 C600 syntezowanym w różnych warunkach. Glikokoniugaty mioglobinowe reagujące z surowicami króliczymi użyto do immunizacji myszy w celu otrzymania przeciwciał monoklonalnych a glikokoniugaty z albuminą wołową wykorzystano do screeningu przeciwciał monoklonalnych. Ze 144 supernatantów zawierających przeciwciała monoklonalne wyselekcjonowano 7, które poddano dokładnej charakterystyce. Przeciwciała te charakteryzowano poprzez badanie wiązania do zsyntetizowanych glikokoniugatów i LPS wyizolowanego z *S. sonnei*, *H. alvei* i *E. coli* w dot blotingu, immunoblotingu i teście ELISA. Doktorantka wykonała olbrzymią pracę nie ustrzegła się jednak pewnych błędów lub nieścisłości, zbyt duża ilość tabel i rycin nie zawsze zawierających istotne dane powoduje że wyniki są przedstawione zbyt szczegółowo i w związku z tym stają się one mniej przejrzyste.

Uwagi do tej części pracy są następujące:

Str. 92, -93 ryc 5.11- 5,13 w podpisach pod rysunkami odwołuje się Pani do Ryc.5.5 zamiast do Ryc. 5.10; na stronie 155 do metody 4.7.5, której nie ma w części metodycznej a na str. 158. do tabeli 5.15, której brak jest w tekście rozprawy doktorskiej.

Str. 93. „Największą czystość (ponad 90%) preparatu BSA uzyskiwano we frakcjach oznaczonych jako 70-72 (kolor czerwony i zielony na Rys 5.14 co koresponduje z najwyższą wartością absorbancji ” z ryciny 5.14 wynika, że absorbanca wymienionych frakcji wcale nie jest najwyższa

Str. 97 ryc.5.16 czy na żel nanoszona była taka sama ilość preparatów obraz elektroforetyczny wskazuje, że preparaty te mogły się różnić ilością nanoszonych próbek?

Str. 99 w tabeli 5.2 podano objętość eluentu poszczególnych koniugatów białko-cukrowych i zawartość w nich białka w mg co utrudnia porównanie preparatów, przedstawienie procentowej zawartości białka w tych preparatach byłoby bardziej czytelne.

Str. 115 w zdaniu zaczynającym się od „Niektóre aminokwasy tworzą epitop konformacyjny”....występuje brak zgodności pomiędzy tekstem i odwołaniem w tabeli 5.4 jak również brak tabeli 4.5 do której również jest odwołanie w tekście, podobna rozbieżność pomiędzy tekstem i tabelą występuje na stronie 123.

Str. 148 w tabeli 5.8 podano stężenie przeciwciał w supernatantach, które doktorantka oznaczała spektrofotometrycznie, supernatant jest medium zebrany z hodowli komórek hybrydoma w skład którego wchodzi zazwyczaj płodowa surowica bydłęca, kolumna ta oznacza więc stężenie białek w supernatancie a nie przeciwciał

Str. 158 „stężenie białka było zbliżone w supernatantach zawierających pożądane przeciwciała monoklonalne (tabela 5.15)” –brak tabeli 5.15

Proszę o wyjaśnienie następujących określeń: „stężenie początkowe antygeny” i „stężenie początkowe supernatantu” występujące w tabelach 5.9-5.11. oraz „względna immunoreaktywność $\Delta 492\text{nm}$ ” (oś y) na rycinach 5.24-5.26 i „immunoreaktywność 492nm ” (oś y) na rycinach 5.63-5.67. Dlaczego podane są różne wartości długości fali przy której odczytywana była absorbanca w teście ELISA (492nm i 490nm na ryc 5.34-5.57)?

Doktorantka porównuje wiązanie 5 otrzymanych monoklonalnych przeciwciał do preparatów LPS bakterii *S. sonnei*, *H. alvei* i *E. coli* i mioglobiny w trzech rozcieńczeniach w teście ELISA i przedstawia to w postaci słupków na rycinach 5.63 -5.67. Więcej informacji na temat swoistości i siły wiązania tych przeciwciał dostarczyłoby przedstawienie wyników w postaci krzywych wiązania, z których można by również odczytać miano przeciwciał.

Jaki cel miało porównanie wiązania przeciwciał do badanych preparatów z udziałem drugorzędowych przeciwciał anty-IgM i anty-IgG?

Język pracy nie jest najładniejszy bardzo często doktorantka używa sformułowania, że klony wykazywały immunoreaktywność lub specyficzność jest to niepoprawne sformułowanie, to nie klony reagowały z odpowiednimi antygenami ale przeciwciała monoklonalne przez nie

wytworzone np. str 137, 139, 142, 144, 146. W opisie wyników doktorantka nie uniknęła powtórzeń opisu metod np. str. 141 i 152

Mimo wymienionych dotąd uwag krytycznych, praca posiada niewątpliwe zalety.

Jedną z nich jest zaprojektowanie i synteza związków cukrowych zawierających podstawione resztą N-acetyloglicyny pochodne 1-tioglikozydów, których budowa została potwierdzona analizami NMR. Na uwagę zasługuje również wykorzystanie techniki dynamicznego rozpraszania światła (DSL) do określenia jednorodności i czystości białek nośnikowych. Synteza stabilnego związku zawierającego reszty glicyny jako analogu potencjalnego epitopu umożliwiła przygotowanie koniugatów białkowo-cukrowych, które użyto do immunizacji myszy w celu uzyskania przeciwciał monoklonalnych. Do osiągnięć doktorantki należy zaliczyć otrzymanie, w wyniku żmudnej selekcji, kilku przeciwciał monoklonalnych swoistych wobec struktur występujących w lipopolisacharydach.

Otrzymane wyniki doktorantka poddała krytycznej i wielopłaszczyznowej dyskusji w odniesieniu do wyników własnych oraz uzyskanych przez innych autorów. Wykazała się przy tym bardzo dobrą znajomością piśmiennictwa i szeroką wiedzą w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością obiektywnej oceny wartości własnych badań.

Wnioski kończące pracę wynikają z przeprowadzonych badań i odpowiadają postawionym celom.

Wniosek końcowy

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej stwierdzam, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jest solidnie wykonana i zawiera istotne elementy nowości naukowej, a krytyczne uwagi nie dotyczą istoty badań naukowych, a tylko sposobu ich omawiania. Doktorantka wykazała wszechstronną znajomość omawianych zagadnień, samodzielność myślenia oraz bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Dierzby spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz. 595, z późn.zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kazimiera Waśniowska