

**dr hab. Aneta Szymańska**

Wydział Chemii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 07.09.2016 r.

### Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr INGI RELICH pt. *Synteza fragmentów białek ludzkich zawierających domeny homologiczne z ureazą *H. pylori* i ich zastosowanie w diagnostyce reumatoidalnego zapalenia stawów***

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska wykonana została na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej pod opieką naukową dr hab. Beaty Kolesińskiej, prof. PŁ jako promotora, oraz dr n. med. Dariusza Timlera w funkcji promotora pomocniczego. Taka konfiguracja opiekunów naukowych sugeruje międzydyscyplinarny charakter pracy i oczekiwanie to jest w pełni spełnione. Tematem pracy jest poszukiwanie fragmentów białek ludzkich homologicznych z ureazą bakterii *Helicobacter pylori* w kontekście ich zastosowania w diagnostyce reumatoidalnego zapalenia stawów. Temat jest jak najbardziej aktualny i naukowo interesujący, tym bardziej że etiologia tego schorzenia nie jest do końca poznana, pomimo jego częstego występowania w społeczeństwie i, w większości przypadków, ciężkiego przebiegu prowadzącego do niepełnosprawności i inwalidztwa. Łączenie zakażeń bakteryjnych i ogólnie zaburzeń w mikrobiomie organizmu ludzkiego z szeregiem schorzeń o charakterze autoimmunologicznym zyskuje w ostatnich latach coraz szersze zainteresowanie.

Mgr Inga Relich zaplanowała swoje badania bardzo szeroko i szczegółowo. Ich efektem jest monumentalna rozprawa zawarta na 238 stronach maszynopisu, dodatkowo opatrzona 161 stronnicowym dodatkiem zawierającym szczegółowe opisy procedur eksperymentalnych oraz surowe wyniki (m. in. zdjęcia analiz Dot blot, chromatogramy HPLC i widma masowe), których analiza prezentowana jest w głównej części pracy. Sama dysertacja podzielona jest na sześć rozdziałów: Wprowadzenie, Cel i założenia, Część literaturowa, Badania własne, Część eksperymentalna i Streszczenie. Pracę zamyka spis literatury cytowanej w liczbie 247 pozycji. Na początku umieszczono zaś wykaz publikacji i komunikatów autorstwa mgr Ingi Relich, oraz wykaz stosowanych skrótów i symboli. Jest to układ spotykany w pracach doktorskich i w pełni akceptowalny, chociaż w przypadku tak obszernej objętościowo i tematycznie pracy umieszczenie części opisującej procedury

eksperymentalne przed opisem wyników badań własnych byłoby dużym ułatwieniem w analizie tej ostatniej części przez czytelnika.

Zasadniczą część rozprawy otwiera część literaturowa poprzedzona krótkim rozdziałem przedstawiającym główne cele i założenia pracy, który od samego początku daje przedsmak jej wielotorowości i interdyscyplinarności. W części literaturowej Doktorantka najpierw wprowadza czytelnika w podstawy działania układu immunologicznego, skupiając się głównie na charakterystyce przeciwciał oraz metodach badania (określenia?) struktury epitopów. Omawiane są metody zarówno instrumentalne (rentgenografia, spektroskopia NMR) jak i chemiczne (modyfikacje łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych). Następnie mgr Relich przechodzi do omówienia techniki SPOT jako metody zarówno syntetycznej jak i diagnostycznej, metod badania kompleksów immunologicznych, zagadnienia mimikry molekularnej oraz ureaz bakteryjnych. Lektura tej części pracy, pomimo jej sporej objętości (80 stron) pozostawia pewien niedosyt. Moim zdaniem informacje tu podane są miejscami nazbyt szczegółowe i w części nie do końca korelujące z jej celem i założeniami. Część literaturowa jest najczęściej przeglądem literatury związanej z tematem pracy, niejako do niego wprowadzającym i dającym podstawy o jego pogłębionej analizie. Zbyt rozbudowany, a może nawet wręcz niepotrzebny jest rozdział o modyfikacjach chemicznych aminokwasów. Inne metody badań epitopów można było omówić na nieco „wyższym stopniu ogólności”, opatrując je odniesieniami do stosowanych przykładów. Zalecane byłoby również opieranie się na nieco nowszej literaturze przedmiotu (np. w rozdziale poświęconym technikom NMR zabrakło interesującej pracy przeglądowej Bardelli i wsp. z 2015 roku). Kończący tę część pracy rozdział o ureazach bakteryjnych jest z kolei nieco zbyt skrótowy. Moim zdaniem to on, oraz następujący po nim, nawet nie wyróżnicowany rozdział o powiązaniach między zakażeniami bakteryjnymi, w szczególności bakterią *H. pylori*, z rozwojem chorób autoimmunologicznych, powinien stanowić rdzeń części literaturowej pracy. Dużym niedopatrzeniem w części literaturowej jest brak źródeł literaturowych przy większości ilustracji.

Kolejny, obszerny, niemal 100 stronicowy rozdział zawiera opis wyników badań własnych mgr Ingi Relich. Są one przedstawione w sposób bardzo uporządkowany, niemal linearny co jest bardzo wskazane przy tak dużej ilości danych, ale jednocześnie pokazuje jak systematyczną i dokładną badaczką musi być Doktorantka. Widać to chociażby na przykładzie liczby związków, które mgr Relich wybrała do swoich badań wstępnych. 376 peptydów (15 fragmentów białek bakteryjnych i ludzkich i 361 peptydów ze skanu aminokwasowego fragmentu ureazy *H. pylori*) zsyntezowanych manualnie na nośniku stałym jest liczbą imponującą. Nawet jeśli niektóre etapy pracy można było „zgrupować”, to i tak nakład czasu i pracy koniecznych do wykonania tego zadania jest niemały.

Pewne moje wątpliwości budzą jednak wyniki analiz mających potwierdzić powodzenie zastosowanej metody badawczej. Przy braku danych na temat konfiguracji chromatografu i metody chromatograficznej niepokojące są bardzo krótkie czasy retencji badanych peptydów i ich zaskakująco wysoka czystość. Przy tak wieloetapowej syntezie osiągnięcie takiej czystości jest bardzo trudne, jeśli nie niemożliwe. Jedynie na Rys. 46 (str. 96) podana jest wartość przepływu (0.2 ml/min.) i czas elucji 0.5 min. co daje objętość elucji 0.1 ml buforu. Jak ma się to do objętości martwej kolumny i układu? Podobnie widma masowe mogą być traktowane jako potwierdzające jedynie przy dużej ilości dobrej woli. Przy sugerowanej tak wysokiej czystości preparatu spodziewałabym się, że sygnał od głównej substancji będzie intensywniejszy, a przynajmniej jego relacja do pików tła będzie inna. Dodatkowe utrudnienie w analizie tych danych stanowi też brak informacji na temat parametrów jonizacji próbki i samej analizy.

Nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem ze strony 100: *W przypadku wszystkich epitopów obserwowalam znacznie silniejszą reakcję z surowicami pacjentów (RA) cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów w porównaniu do surowic pochodzących od dawców krwi (D).* Z rysunku 50 wynika, że Epitop 5 daje silniejszą reakcję dla zdrowych dawców, a Epitopy 1, 4, 12 i 14 co najmniej porównywalną. Podobnie w eksperymencie zobrazowanym na Rys. 51 - odpowiedź dla części epitopów wydaje się być porównywalna dla obu badanych zbiorów (zdrowi vs. chorzy). W części podsumowującej badania własne Doktorantka stwierdza, że różnicowanie to było „statystycznie znamienne” (str. 181), jednak w dyskusji wyników brakuje badań statystycznych, ciekawa więc jestem na jakiej podstawie wyciągnięto taki wniosek. Brakuje też informacji o tym jaką kontrolę negatywną zastosowano w tych badaniach. Czy była to jedynie niemodyfikowana celuloza?

W eksperymencie skanu aminokwasowego fragmentu 321-339 podjednostki beta ureazy *H. pylori*. Doktorantka, uzasadniając wybór przedmiotu badań powołuje się na jego podobieństwo do białek ludzkich. Nie podaje jednak ani źródła tej informacji, ani przykładów takich białek. Brakuje również informacji na temat kryteriów jakie przyjęto przy klasyfikacji oddziaływań peptydów z poszczególnych podbibliotek z próbkami surowic. W ilu powtórzeniach wykonano to badanie i jak dokonano klasyfikacji? Wyniki dla pacjentów z RZS i grupy kontrolnej wydają się dosyć podobne, a dla podbibliotek 16-19 pokusiłabym się na stwierdzenie, że w większości przypadków reakcja jest silniejsza dla zdrowych dawców. Analiza tak dużego zbioru danych (matryca 19x19 = 361 pól w 5 stopniowej skali szarości!) nie jest łatwa ani dla eksperymentatora, ani dla recenzenta, można ją było jednak nieco uprościć porównując różnicowo wyniki dla chorych i grupy kontrolnej i prezentując tylko statystycznie znaczące. Pozwoliłoby to być może zauważyć istotne zależności pomiędzy sekwencją peptydu a zdolnością do tworzenia kompleksów z docelowymi przeciwciałami i w

następnych etapach wykorzystać je do krytycznej ewaluacji potencjalnych epitopów białek ludzkich podejrzewanych o wywoływanie reakcji autoimmunologicznej.

Wysoko oceniam dalszą część pracy. Jest ona najbardziej nowatorska, spójna i przynosi ciekawe wyniki. Jedyną moją wątpliwość budzi wykorzystanie w poszukiwaniach sekwencji immunologicznie aktywnych przeciwciał przeciwko ureazie roślinnej Jack bean zamiast bakteryjnej. Doktorantka brała pod uwagę taką możliwość, jednak ostatecznie wybrała te pierwsze. Uzasadnienie nie do końca mnie przekonuje (sugerowana różnorodność genetyczna *H. pylori*) dlatego poproszę o dodatkowy komentarz na ten temat oraz odpowiedź na pytanie czy podjęto próbę walidacji otrzymanych wyników (przynajmniej ich części) przy użyciu przeciwciał przeciwko ureazie *H. pylori*? Dzięki zastosowanej metodzie syntezy SPOT Doktorantka mogła przebadać bardzo dużą liczbę peptydów w kontrolowanych warunkach dzięki czemu możliwe było oznaczenie fragmentów białek zdolnych do tworzenia kompleksów immunologicznych. Wątpliwości nie budzi „skan epitopowy” pierwszych 100 reszt podjednostki alfa ureazy *H. pylori*, a to dzięki wielokrotnemu powtórzeniu syntez tych samych fragmentów w różnych miejscach jednej membrany celulozowej. Szkoda, że metody tej nie powtórzono dla pozostałych badanych domen chociażby tylko ureazy bakteryjnej. Może pozwoliłoby to uniknąć nieczytelnego wyniku jak ten przedstawiony na Rys. 60, gdzie pozytywną reakcję dostrzec można przy dużej dawce dobrej woli i chęci.

Bardzo dobrym zamknięciem tej części pracy byłaby wizualizacja zidentyfikowanych epitopów, a w szczególności tych wyselekcjonowanych do badań z surowicami pacjentów na całej cząsteczce ureazy. Szkoda, że jej zabrakło. Na marginesie – dla wizualizacji zaprezentowanych brak informacji na temat numeru dostępu w bazie PDF, z którego korzystano podczas wizualizacji położenia epitopów w strukturze ureazy. Wiele rysunków (np. 61, 63, 68-73) jest niezbyt czytelnych Są zbyt małe i jednocześnie zawierają za dużo informacji. Zdecydowanie wskazane byłoby usunięcie łańcuchów bocznych „nieistotnych” aminokwasów (spoza epitopu) oraz wyróżnicowanie (np. za pomocą koloru) eksponowanych.

Na uznanie zasługuje również odwaga Doktorantki i podjęcie się próby zsyntezowania trzech kolejnych białek, w tym jednego ponad 1000-aminokwasowego, i przebadania ich dalej. Nawet jeśli synteza została przeprowadzona za pomocą programowalnego urządzenia, to dalsza praca i jej wyniki były już zależne od Doktorantki, jej umiejętności i wiedzy oraz – niewątpliwie - zdolności organizatorskich. Co prawda zrezygnowała ona z wykorzystania zidentyfikowanych przez siebie potencjalnie immunogennych fragmentów w sekwencji ureazy *H. pylori* i oparła się na sekwencji opisanej w literaturze, jednak umiejętnie wplotła swoje wyniki w kolejnych etapach walidacji

wybranych sekwencji białek ludzkich. Dzięki temu praca doktorska może być połączona w logiczną i spójną całość.

Wyniki zaprezentowane w tej części pracy są interesujące. Doktorantka zidentyfikowała kilka fragmentów białka LAF-4 i NEDD4L wykazujących reaktywność w stosunku do surowic pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Stwierdziła ona również istnienie dla kilku związków statystycznie istotnej różnicy w „intensywności tworzenia kompleksów immunologicznych” pomiędzy surowicami pacjentów z RZS a zdrowymi dawcami krwi. Fragmenty te mogą mieć w przyszłości i po dalszym dopracowaniu zastosowanie zarówno diagnostyczne, jak i terapeutyczne.

Część eksperymentalna napisana poprawnym językiem i większość procedur badawczych opisana jest w sposób zadowalający. Pozornie jest ona najmniej rozbudowana w porównaniu do pozostałych części, ale tylko pozornie, ponieważ jej dopełnienie stanowi 161 stronicowy dodatek do pracy w postaci płyty CD, zawierającej tzw. Materiały dodatkowe, o których już wspominałam. W sumie daje to prawie 200 stron informacji. O ile część danych z materiałów dodatkowych może być potraktowana jako uzupełnienie badań własnych, to i tak ilość opisów procedur syntetycznych jest oszałamiająca. Uważam, że bez większej szkody, a nawet z zyskiem w postaci większego uporządkowania treści i ułatwienia lektury i analizy przyszłym czytelnikom pracy część opisów można było pominąć. Jeśli nie były zmieniane żadne parametry (a nie były) wystarczy odwołać się do wcześniejszego opisu. Zaoszczędziłoby to miejsca, papieru i czasu. Zbędne są również moim zdaniem raporty generowane przez syntezytor czy raporty z poszczególnych etapów. Są one powtórzeniem parametrów opisanych w tekście i nie wnoszą nowych informacji. Brakuje za to opisu matryc, na których prowadzono syntezy. Powinny one zostać uzupełnione o deskryptory rzędów i kolumn zgodne z opisami pozycji w tabelach. Zainteresowanie budzi również nigdzie nie opisana zielona kropka na rysunkach pokazujących rozmieszczenie bibliotek peptydów. Ta sama uwaga, tj. brak opisu rzędów i kolumn matryc dotyczy również Materiałów Dodatkowych. Nie ma ich zarówno na rysunkach przedstawiających rozmieszczenie peptydów w syntezie SPOT, jak i zdjęciach matryc po analizach Dot Blot z badanymi surowicami pacjentów i grup kontrolnych. To, oraz brak korelacji między tabelami z części zasadniczej pracy i tymi w Materiałach dodatkowych, zdecydowanie utrudnia analizę wyników. Przykładowo - 123-rzędowa Tabela 29 (str. 155-158) przedstawia sekwencje fragmentów dekapetydowych białka LAF-4 oraz wyniki reakcji immunologicznej. Rozkład peptydów w syntezie SPOT jest przedstawiony na Rysunku 96 i w Tabeli 5 zaś obraz matrycy po analizie Dot Blot na Rysunku 97 w Materiałach Dodatkowych. Brakuje połączenia pomiędzy tymi Rysunkami i Tabelami chociażby w postaci wspólnej kolumny z pozycjami (A1, A2... itd.) odpowiadającymi **opisanej** matrycy SPOT.

Poza tym Rysunek 31 z Materiałów Dodatkowych tożsamy z Rysunkiem 59. z rozdziału Badania własne z głównej części pracy. Podobnie Rysunek 32 z Materiałów Dodatkowych jest tożsamy z Rys. 60. Z powodu braku odpowiednich opisów na tym rysunku jego analiza i wyciągnięcie wniosków jest bardzo trudne, jeśli nie niemożliwe. Rysunek 33 w Materiałach Dodatkowych przedstawiający wyniki analizy Dot blot moim zdaniem nie do końca obrazuje „*rozmieszczenie peptydów zgodne z tabelą 40 oraz rysunkiem 99 przedstawionych w części eksperymentalnej*”. Również przypisanie wyników Dot Blot nie koresponduje z rysunkiem. Nie jest też jasne jakie kryterium przyjęto przy przypisywaniu siły oddziaływań w analizach Dot blot. Przykładowo na Rysunku 144 punkty w 10 rzędzie, kolumna 1 i 2 mają podobną intensywność a jednemu z nich dano jeden, a drugiemu dwa plusy. Dwa plusy ma też zdecydowanie intensywniejsza plama nr 7 w tym samym rzędzie, plamka w rz. 6 kol. 12, rz. 4 kol. 10 i zdecydowanie mniej intensywna plamka w rz. 1, kol. 10.

Praca doktorska mgr Ingi Relich napisana została poprawnym językiem i poddana odpowiedniej korekcie stylistycznej i interpunkcyjnej. W pracy dostrzegłam kilka błędów lub niejasności, które wymieniam poniżej. Część z nich to uwagi natury czysto technicznej, niektóre jednak wymagają komentarza. I tak:

- Doktorantka w całej pracy używa określenia „stopień obsadzenia podłoża”. Tradycyjnie przypadku syntez na nośnikach stałych używa się określenia „stopień osadzenia”;
- Triizopropyllosilan opatrzone skrótem TRIS. Standardowo stosuje się TIS ponieważ TRIS może być mylnie odczytany jako **tris(hydroksymetylo)aminometan**, odczynnik stosowany często w praktyce laboratoryjnej do przygotowywania biokompatybilnych buforów;
- Jeżeli podawane są objętości to podawanie stosunku nie jest potrzebne, tym bardziej, że przy jego podawaniu pomyłona została kolejność odczynników (str. 191.);
- Nieprawidłowa struktura związków 77-80. Powinno być wiązanie podwójne w pozycji 6 pierścienia triazyny;
- Jakie parametry zastosowano podczas poszukiwania homologicznych białek ludzkich za pomocą programu BLAST? Jest to istotna informacja i nie powinna zostać pominięta.
- Jaki był poziom istotności w analizach statystycznych?
- Str. 190 - „*Następnie zmyłam fizycznie osadzony na powierzchni celulozy peptyd za pomocą wody destylowanej (30 ml)*” – czy oznacza to, że peptyd po odszczerpieniu od matrycy działaniem LiOH pozostaje na niej w postaci precypitatu? Jak to obserwowano?
- Rys. 86. Analiza PCA - co odzwierciedlają czynniki 1 i 2 na osiach wykresu analizy PCA?

- Rysunek 40 i 45 są identyczne, ale opatrzone odmiennymi źródłami literaturowymi.
- Ref. 106, 114, 179, 198(a) – brakuje tytułu publikacji
- Ref. 133 – nieprawidłowy tytuł publikacji
- Ref. 180. Jest pozycja (a) co sugeruje obecność co najmniej jednej jeszcze publikacji (b?). Tej zaś brakuje.

Poczynione wyżej uwagi krytyczne nie umniejszają pozytywnego odbioru dysertacji mgr Ingi Relich. Doktorantka zrealizowała postawiony przed sobą cel badawczy. Potwierdziła użyteczność techniki SPOT w wyznaczaniu i mapowaniu sekwencji epitopowych oraz jego kompatybilność z testami immunoenzymatycznymi. Wyznaczyła również sekwencje kilku potencjalnie immunogennych fragmentów białek ludzkich mogących reaktywność krzyżową w stosunku do przeciwciał przeciwko bakteryjnej ureazie *H. pylori*. Wyniki badań mgr Ingi Relich wzmacniają hipotezę o powiązaniach między niektórymi chorobami autoimmunologicznymi, a zakażeniami wirusowymi czy bakteryjnymi. Konieczne są oczywiście dalsze badania, w których z pewnością tak skrupulatna i dobrze zorganizowana młoda badaczka, jaką jest niewątpliwie mgr Inga Relich, znajdzie swoje miejsce. Reasumując - stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska **mgr Ingi Relich** zatytułowana „*Synteza fragmentów białek ludzkich zawierających domeny homologiczne z ureazą H. pylori i ich zastosowanie w diagnostyce reumatoidalnego zapalenia stawów*” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455, z 2014 r. poz. 1198) i wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr Ingi Relich do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Aneta Szymańska