



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Dr hab. Izabela Nowak, prof. PAN
Kierownik Laboratorium Immunogenetyki
i Immunologii Tkankowej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirsfelda
Polskiej Akademii Nauk
ul. R. Weigla 12
53-114 Wrocław

Wrocław, 16.08.2022 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Marii Łęckiej

”Otrzymywanie przeciwciał IgY specyficznych wobec białka tNOX i jego wybranych epitopów”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Chemii Organicznej i Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Marcina Sieńczyka. Praca składa się z kilku klasycznych rozdziałów, takich jak: Wstęp, Cel pracy, Badania własne, Podsumowanie i wnioski, Materiały, Metody. Brakuje mi rozdziału Dyskusja, w którym Doktorantka odniosłaby swoje wyniki badań do prac innych autorów, choć w rozdziale „Badania własne” cytowane jest piśmiennictwo potwierdzające kolejne etapy pracy eksperymentalnej. Następnie praca zawiera wykazy tabel i rysunków, a także skrótów. Na końcu pracy znajdują się: literatura oraz streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim. Doktorantka zamieściła również swój dorobek naukowy. Praca zawiera 52 rysunki i 10 tabel. Wykaz piśmiennictwa obejmuje 146 pozycji literatury, głównie anglojęzycznej do roku 2021, z czego tylko 53 pozycje literaturowe pochodzi z ostatnich 10 lat. Niestety Doktorantka nie ustrzegła się wielu błędów edytorskich, stylistycznych i przede wszystkim nie podała numeracji stron, co bardzo utrudniło mi lekturę i ocenę tej pracy. W celu weryfikacji tych błędów mogę przekazać Doktorantce wersję pdf pracy z zaznaczonymi błędami.

Pod względem merytorycznym temat pracy doktorskiej jest aktualny i bardzo ważny, bowiem dotyczy otrzymywania przeciwciał klasy Y specyficznych wobec markerów nowotworowych, tzn. białka ENOX2 i jego wybranych epitopów oraz ich potencjalnego wykorzystania w projektowaniu testów diagnostycznych. Pierwszą częścią pracy jest wprowadzenie, w którym opisano zastosowanie markerów biologicznych w diagnostyce chorób nowotworowych. Następnie szczegółowo scharakteryzowano białka z rodziny ENOX, w tym ENOX2 oraz przeciwciała klasy Y wraz z ich potencjalnym zastosowaniem w diagnostyce nowotworowej. Wybranie przez Doktorantkę białka ENOX2 do badań zawartych w niniejszej pracy było dobrze przemyślane i uzasadnione, ponieważ jego obecność stwierdzono na powierzchni niemalże wszystkich komórek nowotworowych oraz w surowicy pacjentów, co czyniło z niego atrakcyjny, uniwersalny marker biologiczny do celów diagnostycznych. Ponadto zewnątrzkomórkowa lokalizacja ENOX2 sprzyjała wykorzystaniu tego białka również jako potencjalnego celu terapeutycznego, w konstruowaniu szczepionek, a także zastosowaniu innych możliwych terapii celowanych, np. hamowania aktywności katalitycznej ENOX2, która stymuluje proliferację komórek nowotworowych. Dodatkowo, odkrycie tkankowo specyficznych wariantów transkrypcyjnych białka ENOX2 pozwoliło na stworzenie nieinwazyjnego testu diagnostycznego wykrywającego nowotwór w określonych tkankach. Należy również podkreślić, że immunizacja kur i wybranie nieinwazyjnej metody izolacji przeciwciał IgY z żółtek jaj, skierowanych przeciwko białku ENOX2 jest niewątpliwie zaletą tej metody.

Cele pracy są jasno zdefiniowane i dotyczą: immunizacji kur peptydowymi koniugatami i rekombinowanym białkiem ENOX2 oraz izolacji specyficznych przeciwciał Y skierowanych przeciwko białku ENOX2 i jego wybranym epitopom, następnie analizy biochemicznej otrzymanych przeciwciał Y, detekcji białka ENOX2 w komórkach linii nowotworowych i surowicach pacjentów chorych na nowotwory oraz opracowania prototypu testu diagnostycznego do wykrywania białka ENOX2 w próbkach biologicznych.

Doktorantka, aby zrealizować cele pracy zastosowała wiele metod badawczych począwszy od analizy *in silico* sekwencji oraz struktury białka ENOX2 (programy PEP-FOLD3, Predicted Antigenic Peptides oraz metoda GOR), dzięki której wytypowano fragmenty białka do immunizacji zwierząt w celu uzyskania specyficznych przeciwciał. Następnie przeprowadzono syntezę organiczną peptydów oraz analizę za pomocą spektrometrii masowej i dichroizmu kołowego. Ich oczyszczanie przeprowadzono metodą HPLC. Do izolacji przeciwciał zastosowano metodę strąceniową, a ich oczyszczanie przeprowadzono metodą chromatografii powinowactwa. Inne zastosowane metody do charakterystyki przeciwciał to: ELISA, Western blot, Dot blot, mikroskopia fluorescencyjna oraz immunohistochemia.

Jednakże mam kilka uwag dotyczących rozdziału „Badania własne”:

- Niestety niektóre rysunki są mało czytelne. Doktorantka jest niekonsekwentna w przedstawieniu wyników na wykresach. Czasami podaje odchylenia w postaci tzw. wąsów (np. Rysunek 22), czasami nie (np. Rysunek 19). Rysunek 24 – Doktorantka pisze, że wykres przedstawia index ELISA (EI) wraz z odchyleniami standardowymi (SD),

które w wersji papierowej pracy nie są widoczne. Dopiero w wersji pdf po odpowiednim powiększeniu mogłam przyjrzeć się temu rysunkowi.

Niemniej jednak należy podkreślić, że bardzo dobrym pomysłem było umieszczanie schematycznych rysunków dotyczących przeprowadzania eksperymentu lub metody obok właściwych wyników.

- Czasami Doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki stwierdzeniami niepopartymi danymi literaturowymi, np. w podrozdziale 3.10.1: „Badane próbki charakteryzowały się zróżnicowaną specyficznością wobec antygeny w stosunku do kontroli negatywnej (klgY) przy czym próbki 2-3 oraz 4-5 wykazywały się wysoką specyficznością wobec docelowych antygenów. Obserwowane różnice w specyficzności analizowanych próbek wynikają m.in. z różnic osobniczych szczepionych zwierząt.” A wystarczyłoby zacytować pozycje literaturowe 61 i 81, które Doktorantka uwzględniła już w podrozdziale 1.4.2. We fragmencie: „Mimo, że to koniugaty KLH prezentują na swojej powierzchni więcej cząsteczek peptydu niż BSA, przeciwciała anty-ENOX2(483-505)-BSA i anty-ENOX2(483-496)-BSA wykazują wyższy sygnał absorpcyjny wobec antygeny (Rysunek 24). Jedną z prawdopodobnych przyczyn może być wpływ białka nośnikowego na konformację peptydów lub sama immunogenność białka nośnikowego”, powinno być zacytowane piśmiennictwo potwierdzające to stwierdzenie. Podobnie, wiele podanych informacji wymaga wprowadzenia piśmiennictwa popierającego te informacje, np. w podrozdziale 3.10.2 Analiza specyficzności oraz awidności przeciwciał IgY: „Zastosowanie dawek przypominających nie tylko zwiększa produkcję specyficznych przeciwciał, ale wpływa również na proces ich dojrzewania”. Być może dla Doktorantki to wydaje się oczywiste, niemniej jednak dla czytelnika, który nie jest ekspertem w tej dziedzinie już niekoniecznie.
- Doktorantka opisując Rysunek 26 i 31 błędnie nazwała koniugaty anty-ENOX2(483-505)-BSA jako anty-ENOX2(485-505)-BSA.
- Tytuł Tabeli 5 powinien brzmieć: „Sekwencje aminokwasowe wybranych epitopów białka ENOX2”, a nie – „W tabeli przedstawiono sekwencje aminokwasowe wybranych epitopów białka ENOX2”.

Bardzo wartościowym wynikiem tej pracy w moim odczuciu jest udowodnienie, że przeciwciała anty-ENOX2(483-505)-BSA/KLH tracą zdolność oddziaływania z docelowym antygenem poddany denaturacji termicznej oraz redukcji w obecności β -merkaptopetanolu. Peptydowy fragment białka ENOX2(483-505) był zdolny do przyjmowania stabilnej struktury drugorzędowej w formie skoniugowanej z białkiem nośnikowym, a przeciwciała wygenerowane przy użyciu koniugatów ENOX2(483-505)-BSA/KLH rozpoznawały epitopy konformacyjne. Ponadto, otrzymane parametry limitu detekcji białka ENOX2(292-610) oraz miana analizowanych przeciwciał (rozdział 3.14) pozwoliły na ich wykorzystanie w opracowaniu prototypu testu diagnostycznego służącego do wykrywania białka ENOX2 w surowicy lub moczu pacjentów. W rozdziale 3.15 opisano modyfikacje otrzymanych przeciwciał Y peroksydazą chrzanową, pochodnymi biotyny oraz izotiocyanianem

fluoresceiny. Wyniki analizy porównawczej przeciwciał Y przedstawione na Rysunku 37 (podrozdział 3.15.4) jednoznacznie wskazują przewagę przeciwciał nieznakowanych nad znakowanymi w metodach ELISA i Western blot. Rozdział 3.16 to projektowanie testów *sandwich* ELISA do detekcji białka ENOX2 z wykorzystaniem przeciwciał IgY specyficznych wobec peptydowych fragmentów ENOX2 oraz ENOX2(292-610). W pierwszym zaproponowanym teście, mimo możliwości detekcji białka ENOX2(292-610) w próbce, wartość EI we wszystkich analizowanych wariantach była zaledwie około dwukrotnie wyższa od 1,2, co może być niewystarczającą wartością, aby jednoznacznie wskazać na obecność docelowego antygeny. Drugi wariant testu *sandwich* ELISA również nie pozwolił na potwierdzenie zdolności detekcji białka ENOX2(292-610) w próbkach przy zastosowaniu przeciwciał Y anti-ENOX2(292-610). Jednakże ostatecznie przydatność zaprojektowanych testów do pomiaru ENOX2 w próbkach sprawdzono przez wykrywanie białka ENOX2 w lizatach aż 6 różnych linii komórek nowotworowych z wykorzystaniem przeciwciał anti-ENOX2(483-496)-BSA IgY oraz anti-ENOX2(292-610) IgY (rozdział 3.17) oraz analizę próbek od osób zdrowych i pacjentów z potwierdzoną chorobą nowotworową (rozdział 3.18). Analiza lizatów linii komórkowych z wykorzystaniem przeciwciał anti-ENOX2(483-496)-BSA IgY i anti-ENOX2(292-610) ujawniła obecność prążków odpowiadającym białkom o masie cząsteczkowej 70 kDa, co świadczyło najprawdopodobniej o obecności przeciwciał anti-BSA IgY. Również na membranie inkubowanej z przeciwciałami kontrolnymi IgY w większości próbek obecny był sygnał dla białka o masie około 70 kDa, który mógł utrudniać detekcję białka ENOX2 ze względu na zbliżoną masę tych białek. Jak wyjaśnia Doktorantka koniecznym byłoby usunięcie z mieszaniny przeciwciał specyficznych wobec BSA z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa lub powtórzenie immunizacji kur z potwierdzonym brakiem obecności przeciwciał Y anti-BSA.

Gdyby zaprojektowane testy były specyficzne można by je zastosować do badań przesiewowych w kierunku wykrywania chorób nowotworowych lub monitorowania postępów terapii. Z uwagi na to, że wyniki uzyskane dla testu *sandwich* ELISA były niemiarodajne (Rozdział 4.15), Doktorantka zdecydowała o zastosowaniu metody Western blot do detekcji białka ENOX2 w próbkach surowicy pacjentów z rakiem prostaty. Dodatkowo, do detekcji ludzkiej albuminy surowiczej HSA zastosowano przeciwciała anti-BSA IgY (5 µg/ml) otrzymane po immunizacji kur białkiem BSA, rozpoznające zarówno BSA, jak i HSA. Było to bardzo logicznym i zasadnym krokiem wykluczającym niespecyficzne oddziaływania przeciwciał anti-ENOX2 z obecnymi w surowicy białkami BSA i HSA. Analiza ta, podobnie jak w przypadku analizy lizatów linii komórek nowotworowych, ujawniła obecność prążków odpowiadających białkom o masie cząsteczkowej 70 kDa. W związku z czym metodą Western blot nie jest możliwe testowanie surowic pacjentów oraz lizatów komórek nowotworowych w celu potwierdzenia obecności białka ENOX2 jako markera nowotworowego. Jednym z ostatnich etapów pracy eksperymentalnej było potwierdzenie użycia przeciwciał anti-ENOX2(483-505)-BSA i anti-ENOX2(483-496)-BSA do wykrywania białka ENOX2 na powierzchni komórek 4 linii nowotworowych oraz kontrolnej w mikroskopii fluorescencyjnej. Analiza detekcji białka ENOX2 na powierzchni komórek nowotworowych z zastosowaniem

przeciwciał Y wykazała obecność sygnału fluorescencyjnego jedynie w przypadku wykorzystania nieznakowanych specyficznych przeciwciał Y. Szkoda, że przeprowadzona analiza mikroskopowa nie pozwoliła na jednoznaczne potwierdzenie specyficznego oddziaływania przeciwciał Y z białkiem ENOX2 na powierzchni komórek nowotworowych. Niewątpliwie kontynuacja badań w tym kierunku jest zasadna. Dopełnieniem badań była immunohistochemiczna analiza preparatów tkankowych z zastosowaniem przeciwciał anti-ENOX2 IgY w celu oceny przydatności tychże przeciwciał w analizie immunohistochemicznej wycinków nowotworowych jelita grubego, wątroby, migdałka gardłowego oraz grasicy. Barwienie i zdjęcia preparatów wykonano w Histopatology Laboratory, Department of Pathology, UTHealth, McGover Medical School. Niestety, analiza barwionych preparatów (Rysunki 49-52) sugeruje oddziaływanie przeciwciał Y z różnorodnymi typami komórek (w tym z komórkami układu immunologicznego i hepatocytami), co może świadczyć o niespecyficzności uzyskanych przeciwciał anti-ENOX2, dlatego też jednoznaczne rozróżnianie komórek, z którymi wiążą się IgY w technice immunohistochemicznej również jest niemożliwe.

Dorobek naukowy Doktorantki to 4 prace oryginalne opublikowane w recenzowanych czasopismach z tzw. współczynnikiem wpływu, w których jest ona raz czwartym i piątym autorem i dwukrotnie siódmym autorem publikacji. Jedynie w jednej opublikowanej w Pracach Naukowych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej jest pierwszym autorem. Doktorantka ponadto prezentowała 2 doniesienia konferencyjne, natomiast jest współautorem imponującej liczby patentów (6). Na uwagę zasługuje również liczba odbytych staży naukowych: 2-krotnie w Stanach Zjednoczonych (The University of Texas i The University of Chicago), raz w Danii (Technical University of Denmark) i raz na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. Wskazuje to na dużą chęć i potrzebę Doktorantki na poszerzanie swojej wiedzy i rozwój naukowy. Część wyników zawartych w pracy doktorskiej była efektem przeprowadzenia 4 prac dyplomowych. Jeśli Doktorantka sprawowała merytoryczny i techniczny nadzór nad pracami, wskazuje to na jej dobre umiejętności dydaktyczne i laboratoryjne.

Pomimo uchybień edytorskich widocznych po lekturze tej pracy oraz uzyskania nie w pełni zadowalających wyników z pracy eksperymentalnej należy podkreślić, że Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego tematu i wykonała ogrom pracy. W sposób logiczny i merytoryczny przechodziła do kolejnych etapów pracy eksperymentalnej i osiągnięcia założonych celów. W sposób adekwatny do uzyskanych wyników wyciągnęła wnioski. W mojej opinii praca doktorska mgr inż. Marii Łęckiej spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.), dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,