

Prof. dr hab. Wojciech Rypniewski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Centrum Badań Biokrystalograficznych
Zespół Struktury i Funkcji Biomolekuł
e-mail: wojtekr@ibch.poznan.pl
tel: 61-8528503
fax: 61-8520532

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Osińskiego
pt. „Determination of the spatial structure and comparative analysis of selected inhaled allergens and their complexes with antibodies”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotorskim prof. Janusza Bujnickiego z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie oraz z Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, a także pod kierunkiem prof. Władka Minora z Wydziału Fizjologii Molekularnej i Fizyki Biologicznej Uniwersytetu Virginia w USA. Tematem rozprawy są badania strukturalne trzech alergenów: z roztocza kurzu domowego (Der p 1), z karaczana prusaka (Bla g 4) oraz z pleśni *Alternaria alternata* (Alt a 1). Pierwszy z alergenów jest proteinazą cysteinową, drugi lipokalina, czyli jednym z białek służących do transportowania małych hydrofobowych cząsteczek, trzeci alergen jest białkiem o nieznannej funkcji.

Obecność nieszkodliwego antygeny normalnie wywołuje bezobjawową reakcję systemu odpornościowego na poziomie przeciwciał typu IgG. Natomiast nadwrażliwość alergiczna zazwyczaj związana jest z wytworzeniem przeciwciał IgE oprócz IgG. Dochodzi wówczas do reakcji organizmu, która, zależnie od rodzaju alergenu, może przybierać różne formy. W niniejszym przypadku mamy do czynienia z alergenami wziewnymi wywołującymi astmę. Alergie są plagą ostatnich pokoleń, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Mamy do czynienia z rozwijającą się epidemią, której przyczyny są słabo poznane. Badanie struktury alergenów i ich oddziaływań z przeciwciałami są zatem istotnym elementem szerszego nurtu badań służących zrozumieniu mechanizmów prowadzących do alergii i terapii, która polega na odczulaniu systemu odpornościowego względem alergenów.

Cele badań zostały zdefiniowane na stronie 28, za wstępem. Doktorant dla każdego z trzech badanych alergenów stawia odmienne cele. W przypadku białka z roztoczy chce określić molekularne mechanizmy specyficznego oddziaływania alergenu z trzema monoklonalnymi przeciwciałami i porównać wyniki dla tego alergenu z pokrewnym alergenem z innego roztocza. W przypadku alergenu z karaczana doktorant chciał zbadać strukturę białka i określić co jest ligandem tej lipokaliny. Doktorant podjął się też rozwiązania struktury trzeciego z alergenów i porównania jej ze strukturą podobnych białek. Uważam, że problem jaki doktorant podjął się rozwiązać jest ambitny, interesujący z poznawczego punktu widzenia i dotyczy ważnego obszaru badań. Zatem teza naukowa postawiona przez doktoranta jest wartościowym tematem rozprawy doktorskiej.

Układ i edycja rozprawy. Rozprawa liczy około 130 stron wraz z obszerną bibliografią i jest podzielona na rozdziały w sposób tradycyjny. Po części literaturowej przedstawione są cele, metodyka badań, wyniki, dyskusja, a następnie podsumowanie. Rozprawa napisana jest w języku angielskim w sposób treściwy i przystępny, stylistycznie na dobrym poziomie. Jako

nieistotne pomijam drobne błędy językowe. Tekst jest starannie ilustrowany. Podsumowując stwierdzam, że doktorant wykazuje umiejętność właściwego przedstawienia uzyskanych wyników. Dobrze oceniam styl i przejrzystość rozprawy oraz jej poziom edytorski.

Część literaturowa. Wstęp jest treściwym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Najpierw przedstawiony jest problem alergii, w szczególności gdy towarzyszy jej astma, po czym doktorant omawia molekularne podstawy reakcji immunologicznej. Następnie pokrótce omawia organizmy i wydzielane przez nie alergeny, które są tematem rozprawy. Bibliografia liczy 23 strony odnośników literaturowych i obejmuje prace zarówno badawcze jak i metodologiczne w zakresie stosownym do tematyki rozprawy. Po zapoznaniu się z częścią literaturową dobrze oceniam teoretyczną wiedzę doktoranta w zakresie dyscypliny naukowej, której dotyczy temat rozprawy.

Metodyka badań jest przedstawiona pokrótce w odniesieniu do badanych alergenów. Dla białka z roztoczy (Der p 1) opisane są pomiary dyfrakcyjne, rozwiązanie i analiza struktury krystalograficznej oraz narzędzia bioinformatyczne ogólnodostępne a także wykonane przez doktoranta. W przypadku alergenu z karaczana (Bla g 4) wykorzystano dane krystalograficzne innych autorów, więc w metodologii opisane są dalsze etapy obróbki danych strukturalnych, a dalej zaawansowane techniki analizy sekwencji genetycznych i filogenezy tego białka. Dla alergenu z pleśni *Alternaria* opisane jest rozwiązanie struktury za pomocą anormalnego rozpraszania promieni Rentgena na kryształach nasączonych bromkiem tantalum oraz dalsza obróbka krystalograficzna. Dalej znów mamy analizę sekwencji pod kątem ewolucji tego białka w porównaniu z pokrewnymi białkami. Stwierdzam, że opis prac metodologii jest dostatecznie dokładny, aby wyniki eksperymentalne doktoranta uznać za wiarygodne.

Przechodzę do omówienia wyników badań mgr Tomasza Osińskiego. Doktorant oczyścił, wykrystalizował i rozwiązał struktury dwóch kompleksów białka z roztoczy (Der p 1) z fragmentami przeciwciał monoklonalnych. Rozwiązał też strukturę jednego z tych fragmentów przeciwciał. Następnie przeprowadził bardzo szczegółową analizę wszystkich trzech badanych przez siebie struktur, dodając do porównania skądinąd znany kompleks tego samego białka z innym przeciwciałem. Następnie doktorant poszerzył zakres analizy o inne kompleksy antygenów z przeciwciałami znajdujące się w bazie danych PDB. Paratopy, czyli części zmienne przeciwciała, wiążące epitopy na antygenie, charakteryzują się przede wszystkim zmiennością – zarówno chemiczną jak i strukturalną. Wynika to z ich natury. Czytając tę część rozprawy zastanawiałem się, co konkretnego może wynikać z porównania tak różnorodnych struktur. Po analizie jednak nastąpiła pewna synteza. Na przykład obserwacja, że przeciwciała specyficzne dla białek konkretnego gatunku roztoczy oddziałują z antygenem większą powierzchnią niż przeciwciała niespecyficzne dla konkretnego gatunku. Doktorant sporządził też statystyki występowania poszczególnych reszt aminokwasowych po stronie epitopu i po stronie paratopu i zauważył, że częstość występowania reszt aminokwasowych w tych obszarach jest inna niż średnia częstość występowania poszczególnych reszt aminokwasowych na powierzchni białek. To są interesujące obserwacje. Warto tu odnotować, że doktorant nie ogranicza się do wykorzystywania dostępnych narzędzi bioinformatycznych, ale buduje również własne. To szczególnie ważne w dzisiejszej dobie, kiedy mamy z jednej strony niespotykane wcześniej bogactwo oprogramowania, a z drugiej strony naukowców, którzy ograniczają się do gotowych narzędzi i są bezradni wobec nieprzewidzianych sytuacji. Chciałbym tu zapytać doktoranta, jaka jest jego zdaniem przyszłość badań oddziaływań między alergenem i przeciwciałem i jak można by wyniki takich badań wykorzystać w medycynie.

Drugi projekt, czyli badanie struktury lipokaliny z karaczana polegał na analizie struktury tego białka i zidentyfikowaniu tyraminy jako liganda. Doktorant porównuje strukturę różnych lipokalin i określa obszary konserwatywne. Próbuje wywnioskować na podstawie tych porównań, które obszary powierzchni mogą być epitopami. Bada też ewolucję i filogenetykę tej rodziny białek i przedstawia argumenty na rolę tyraminy jako fizjologicznego liganda tej lipokaliny. Zaintrygowała mnie wzmianka, że niniejsza analiza jest reinterpretacją wcześniejszych wyników innych autorów. Przeczytałem tę wcześniejszą pracę i obejrzałem wyniki, żeby zobaczyć na czym polegała reinterpretacja. Otóż wcześniejsi autorzy błędnie określili symetrię kryształu i zignorowali wyraźną gęstość elektronową tyraminy. Zamiast tego, z niezrozumiałych dla mnie przyczyn, usiłowali zadokować w miejscu wiązania hormonu juvenilny. Dobrze, że są naukowcy, którzy krytycznie patrzą na wyniki swoich kolegów po fachu i są gotowi je zweryfikować.

Trzeci z projektów polegał na rozwiązaniu struktury alergenu z pleśni *Alternaria*. Doktorant dokonał tego metodą anomalnego rozpraszania promieni Rentgena używając kryształu nasączonego bromkiem tantalum. Struktura tego białka jest niepodobna do innych znanych białek a jego funkcja jest nieznana. Doktorant wykonał analizę sekwencji, znajdując w innych gatunkach grzybów podobne geny, również o nieznanej funkcji. Doktorant zaznaczył na powierzchni swojej struktury obszary konserwatywne i zaproponował je jako cele dla projektowanych przeciwciał. Mnie jednak nie daje spokoju niewiedza o funkcji tego białka. Chciałbym, żeby pan Osiński podzielił się swoimi przypuszczeniami bądź spekulacjami na ten temat.

Wyniki badań wchodzące w skład niniejszej rozprawy zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach. Doktorant jest pierwszym autorem publikacji w *J. Immunol.*, który posiada współczynnik wpływu (IF) 4.922 (2014). Inne prace, w których doktorant jest współautorem ukazały się w *J. Allergy Clin. Immunol.* (IF=11.476), *J. Biol. Chem.* (IF=4.573) oraz *Mol. Immunol.* (IF=2.973). Doktorant jest też współautorem sześciu modeli strukturalnych zdeponowanych w banku danych PDB.

Podsumowując, oceniam niniejszą rozprawę wysoko. Doktorant bardzo dobrze sprostał wyzwaniom. Mgr Tomasz Osiński dysponuje pogłębioną wiedzą w obszarze bioinformatyki i krytalografii. Rozwiązał postawiony problem samodzielnie i przy użyciu właściwej do danego zadania metody. Wykazał się dużą starannością i wnikliwością w dążeniu do naukowego celu. Rozprawa w pełni spełnia wymogi formalne stawiane w tej mierze pracom doktorskim, dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biologii UAM o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu.

Z uwagi na sukces w publikowaniu wyników a także z uwagi na przeprowadzenie pogłębionej analizy przy pomocy wykonanych przez siebie narzędzi bioinformatycznych wnoszę o wyróżnienie tego doktoratu.

Wojciech Kępciewicz

Poznań, 15 grudnia 2015 roku