



POLITECHNIKA ŁÓDZKA INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,

tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Justyny Żygowskiej

Magister Justyna Żygowska swoją pracę doktorską zatytułowaną „Badanie wpływu jonów Cu^{2+} na strukturę, właściwości i oligomeryzację Cystatyny C” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Katedrze Chemii Biomedycznej, pod opieką dr hab. Anety Szymańskiej, prof. UG.

O aktualności tematyki badawczej podjętej w rozprawie świadczy fakt, że amyloidozy, w tym również choroby neurodegeneracyjne stanowią jeden z największych problemów współczesnej medycyny.

Amyloidozy to grupa schorzeń związana z zewnątrz- i/lub wewnątrzkomórkowym odkładaniem się zagregowanych, nieaktywnych biologicznie białek. Nie wiadomo, ilu chorych w Polsce cierpi z powodu amyloidozy, bo nie ma danych oceniających częstość występowania tej przypadłości. Z danych statystycznych w Stanach Zjednoczonych wynika, że częstość choroby wynosi 5,1-12,8 przypadków na milion osób na rok. W 90 proc. przypadków choroba występuje u osób po 50 roku życia.

Złogi białkowe gromadzą się w narządach wewnętrznych, takich jak serce, wątroba, nerki czy mózg, prowadząc do poważnego zaburzenia ich prawidłowej pracy.

Przykładami najczęściej występujących złogów amyloidowych są tzw. płytki starcze (w chorobie Alzheimera) i ciała Lewy'ego (w chorobie Parkinsona). Wskazane przykłady chorób zalicza się do grupy chorób neurodegeneracyjnych. Do grupy tej zalicza się również demencję, zaś najpowszechniejszym rodzajem demencji jest otępienie alzheimerowskie, gdzie uszkodzeniu ulega głównie płat skroniowy mózgu, a szczególnie hipokamp. Dane zgromadzone przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) są zatrważające. Uważa się, że na demencję cierpi 50 milionów ludzi na świecie i co roku przybywa kolejne 10 milionów chorych. Problem jest na tyle ważny, że WHO i Światowe Zgromadzenie Zdrowia w 2017 r. przygotowało i przyjęło plan działania dotyczący walki z demencją.

Obecnie znanych jest około 30 różnych białek tworzących złogi amyloidowe w organizmie człowieka, które powiązane są z różnymi amyloidozami. Cystatyna C (hCC) jest również

białkiem amyloidogennym. Odpowiada za rozwój dziedzicznej angiopatii amyloidowej typu islandzkiego (HCCAA, ang. *Human Cystatin C Amyloid Angiopathy*). W wyniku punktowej mutacji w genie Cystatyny C, następuje zamiana reszty leucyny w pozycji 68 na resztę glutaminy, co skutkuje destabilizacją formy monomerycznej i podatnością do tworzenia złogów w naczyniach krwionośnych mózgu.

Na całym świecie prowadzone są badania mające na celu pogłębienia wiedzy na temat amyloidoz i mechanizmów agregacji białek odpowiedzialnych za rozwój tych chorób. Chociaż nie przeprowadzono tak wielu formalnych badań klinicznych ze względu na rzadkość i różnorodność amyloidoz, to jednak zaproponowano zasady leczenia. Niestety dotychczas nie ma dostępnych leków, które mogłyby specyficznie rozkładać złogi amyloidowe czy też hamować ich tworzenie. Obecnie stosowane terapie mają na celu zahamowanie produkcji białka tworzącego amyloid, przy jednoczesnym wspieraniu funkcji uszkodzonych narządów. Przytoczone powyżej fakty jednoznacznie potwierdzają, że podjęty do realizacji temat badawczy jest wyjątkowo aktualny, a badania w tym obszarze są prowadzone na całym świecie.

Przedstawiona do recenzji praca posiada wielopoziomowy układ, dostosowany do osiągnięcia nadrzędnego celu badań. Celem pracy było zbadanie oddziaływania Cystatyny C z jonami Cu^{2+} oraz sprawdzenie ich wpływu na proces oligomeryzacji białka. W sekwencji hCC obecne są dwie dobrze wyeksponowane reszty histydyny: His86 oraz His90, które powinny charakteryzować się podatnością do oddziaływania z jonami miedzi. Obie zlokalizowane są w labilnym, słabo ustrukturyzowanym fragmencie łańcucha. Celem sprawdzenia czy wspomniane reszty histydyny są zaangażowane w oddziaływania z jonami miedzi, planowano otrzymać: hCC H86A – wariant Cystatyny C z zamienioną resztą His86 na resztę alaniny, hCC H90A – wariant Cystatyny C z zamienioną resztą His90 na resztę alaniny, oraz hCC H86_90A – wariant Cystatyny C z zamienionymi resztami His86 i His90 na reszty alaniny, jak również hCC WT – Cystatyna C typu dzikiego (ang. *Wild Type*). Uzyskanie wszystkich wariantów hCC oraz badania ich zdolności do oddziaływania z jonami miedzi jak też samego procesu oligomeryzacji i fibrylizacji powinno znacząco poszerzyć wiedzę o wpływie Cystatyny C na rozwój chorób neurodegeneracyjnych.

Praca jest dość obszerna, liczy 173 strony. Układ pracy, dostosowany jest do celu badawczego i obejmuje pięć głównych rozdziałów: wprowadzenie, cel pracy, metody badań, procedury, prezentacje i omówienie wyników. Kolejno w pracy zawarte zostało podsumowanie oraz spis cytowanej literatury. Wydaje mi się, że korzystne byłoby uzupełnienie rozprawy o wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Rozdział pierwszy „Wprowadzenie” przedstawia podstawowe dane na temat chorób neurodegeneracyjnych i agregacji białek, roli jonów metali w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, ludzkiej Cystatyny C z uwzględnieniem danych o mechanizmie oligomeryzacji hCC oraz jej oddziaływaniu z jonami metali. Rozdział ten liczy 36 stron i zawiera aż 160 odnośników literaturowych. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność narracji dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędemu celowi pracy. Pozwala to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy.

Rozdział II przedstawia cel pracy, pierwsza część została przedstawiona w sposób klarowny i zasługuje na pochwałę. Jednak w moim odczuciu punkty B-G wskazane jako cele szczegółowe stanowią zbiór różnorodnych metod oczyszczania i charakterystyki białek/polipeptydów i nie są to cele badawcze.

Rozdział III „Metody badań” przedstawia opisy metod badawczych stosowanych w analizie i otrzymywaniu DNA, otrzymywaniu rekombinowanych białek w komórkach bakteryjnych, różnorodne metody analizy białek oraz podstawowe informacje o rentgenografii strukturalnej. Rozdział ten byłby niezwykle interesujący, gdyby opisane metody dotyczyły białek amyloidogennych. Jednak Doktorantka w rozdziale tym przedstawiła bardzo podstawową ich charakterystykę, która ma raczej charakter wiedzy podręcznikowej, a nie dotyczy trudnych w analizie białek amyloidogennych. W moim odczuciu, tak przedstawiony rozdział jest zbędny.

Rozdział IV „Procedury” przygotowany został starannie i nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Rozdział V to „Prezentacja i omówienie wyników”. Doktorantka badania rozpoczęła od przygotowania wektorów ekspresyjnych i biosyntezy w systemie bakteryjnym *E. coli* trzech nowych mutantów Cystatyny C – H86A, H90A oraz H86_90A. Białka zostały oczyszczone, w pełni scharakteryzowane i porównane z hCC typu dzikiego. Badania aktywności inhibicyjnej względem papainy nowych analogów hCC nie wykazały istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami, a białkiem dzikim. Szkoda, że przedstawiając wyniki badań aktywności inhibitorowej, Doktorantka używała różnych skal stężenia inhibitora, dla inhibitora E-64 jest to skala μM , zaś dla analogów hCC $\mu\text{g/ml}$. Badania strukturalne mutantów hCC z wykorzystaniem dichroizmu kołowego nie wykazały istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami, a białkiem dzikim. Natomiast badania CD w gradiencie temperatury pozwoliły na stwierdzenie obniżonej stabilności konformacyjnej

białka H90A, co powodowało podwyższoną jego skłonność do dimeryzacji. W opisie procedur jak też przy prezentacji wyników zabrakło mi informacji odnośnie wyznaczenia pierwszej pochodnej z eliptyczności molowej. Proszę o uzupełnienie tej informacji w trakcie obrony rozprawy doktorskiej.

Technika CD oraz chromatografia sączenia molekularnego zostały wykorzystane do badania wpływu jonów miedzi(II) na strukturę i stabilność konformacyjną analogów hCC. Doktorantka wykazała, że obecność jonów Cu^{2+} nie wpływa na strukturę drugo- i trzeciorzędową białka, jednak wydłużenie czasu inkubacji prowadzi do zainicjowania procesu dimeryzacji dalszej oligomeryzacji w przypadku białek WT oraz H90A. Doktorantka wykazała, też że oddziaływanie z jonami miedzi(II) istotnie obniża stabilność termiczną białek WT oraz H90A. Zmiany konformacyjne obydwu tych białek były obserwowane w temperaturze niższej o 10-15°C w porównaniu do próbek kontrolnych.

Wyniki tych badań wskazują że reszta His86 jest kluczowa w oddziaływaniu Cystatyny C z jonami miedzi(II), jej usunięcie (białka H86A oraz H86_90A) obniżało wrażliwość tych białek na jony metalu.

Do badania oddziaływań analogów hCC z jonami miedzi Doktorantka zastosowała metodę EPR. Wyniki badań EPR wykazały istnienie czterech rodzajów kompleksów tworzonych przez jony miedzi(II). Doktorantka do potwierdzenia oddziaływania jonów miedzi(II) z obiema resztami histydyny w pętli AS zastosowała również metodą NMR. Powinowactwo His90 do jonów miedzi II Doktorantka potwierdziła również w oparciu o badania rentgenograficzne białka WT. Kryształy hCC WT traktowane roztworem miedzi(II) pozwoliły na uzyskanie w obrębie reszty His90 dodatkowej mapy różnicowej. Natomiast przy reszcie His86 Doktorantka nie obserwowała podobnych zmian.

W moim odczuciu bardzo interesujący fragment badań stanowią próby fibrylizacji Cystatyny C w obecności badanych jonów miedzi(II). Doktorantka stosując metody chromatografii SEC, badania pomiaru intensywności fluorescencji (wskaźniki ANS oraz ThT) jak też metodę mikroskopową TEM, wykazała, że jony miedzi(II) nie wpływają na morfologię otrzymanych włókien białkowych, z wyjątkiem białka H90A, które w warunkach łagodniejszego wytrząsania (300 rpm) tworzyło duże, zbite agregaty białkowe, zawierające niewielkie struktury fibrylarne. Zastosowanie wysokiego stężenia białka WT w procesie fibrylizacji pozwoliło na stwierdzenie, że obecność jonów miedzi(II) wpływa na początkowe etapy oligomeryzacji. Struktury protofibrylarne tworzą się wolniej niż w eksperymencie bez jonów miedzi(II). Zatem prawdopodobnie Cu^{2+} stabilizuje dimery lub rozpuszczalne oligomery co prowadzi do opóźnienia agregacji, jednak nie wpływa na strukturę i morfologię tworzących

się fibryli. Jedyna uwaga do tej części badań dotyczy braku informacji, czy w badaniach z barwnikami fluorescencyjnymi wykonywane były eksperymenty stabilności spektralnej ThT oraz ANS w trakcie inkubacji. Z danych literaturowych wiadome jest, że barwniki te są wrażliwe na różnorodne czynniki fizyczne i chemiczne, co może wpływać na ich właściwości fluorescencyjne.

Doktorantka podjęła również próby krystalizacji analogów hCC w obecności jonów miedzi w celu znalezienia miejsca wiążącego. Niestety indukowana Cu^{2+} dimeryzacja i dalsza oligomeryzacja białek prowadziła do strącania osadów białek w kroplach krystalizacyjnych, co uniemożliwiało tworzenie kryształów. Uzyskane zostały jednak trzy struktury krystaliczne dla białek H90A oraz H86_90A bez obecności jonów miedzi. Białko H90A wykrył się w formie monomerycznej i dimerycznej. Do tej pory nie było to osiągnięte dla żadnego innego wariantu hCC. Obie struktury zostały zdeponowane w Białkowej Bazie Danych (kod 7PU2 dla monomeru oraz 7PU3 dla dimeru).

Od strony edytorskiej, Doktorantce nie udało się uniknąć błędów i uchybień. W pracy jest znacząca ilość żargonowych określeń: zlepianie się fibryli, kryształy namoczono, pozostawiać na lodzie, nabiera właściwości optycznych, wyłapywanie źle sfałdowanych markomolekuł, pocięcie łańcucha białkowego. W moim przekonaniu w podpisach Rycin 5 i 6 brakuje szczegółów, które pozwoliłyby czytelnikowi łatwo analizować rysunki. Na wszystkich zdjęciach TEM, skala jest nieczytelna. W pracy brakuje numerów stron (strona 47, 50, 68, 86-88, 147).

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje nie tak często spotykana biegłość zarówno w wykorzystywaniu szerokiego arsenału metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach biologicznych. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na dorobek publikacyjny mgr Justyny Żygowskiej składa się 2 publikacje, z czego 1 publikacja z LF. Wyniki prac badawczych Doktorantka prezentowała na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym (16 komunikatów). Doktorantka brała również udział w realizacji projektów badawczych: projekt nr UMO-2016/21/B/NZ1/02823 finansowany

przez Narodowe Centrum Nauki oraz w czterech projektach Uniwersytetu Gdańskiego, konkurs na projekt Badań Młodych Naukowców.

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Justyny Żygowskiej. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Justyny Żygowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska