



Wrocław, 25.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Żygowskiej pt. „Badanie wpływu jonów Cu²⁺ na strukturę, właściwości i oligomeryzację cystatyny C”

Praca doktorska Pani mgr Justyny Żygowskiej została wykonana na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Gdańskiego w Katedrze Chemii Biomedycznej. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Aneta Szymańska, prof. U.G. zaś promotorem pomocniczym Pani dr Marta Orlikowska.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa poświęcona jest istotnemu zagadnieniu, jakim jest agregacja białek amyloidogennych, która to prowadzi do chorób neurodegeneracyjnych. Mimo ogromu prac badawczych realizowanych na całym świecie nie opracowano dotąd leków hamujących procesy patologiczne. Wynika to z wysokiego stopnia złożoności procesów zachodzących w ludzkim mózgu a także wysokiej wrażliwości tkanki nerwowej. Sam proces agregacji białek jest zależny od ogromnej ilości czynników biologicznych, fizycznych jak i chemicznych. Nie zostały one dotąd w pełni poznane. Badania umieszczone w ocenianej pracy rzucają nowe światło na proces agregacji, w tym wypadku cystatyny c, akcentując istotny wpływ środowiska na tenże proces. Celem rozprawy było zbadanie wpływu stężenia białka, intensywności wytrząsania, temperatury, rodzaju buforu, pH a przede wszystkim jonów Cu(II) i przy okazji jonów Zn(II) na proces agregacji cystatyny c. Zbadania wpływu jonów Cu(II) i Zn(II) podyktowane było licznymi obserwacjami obecności tych pierwiastków w złogach amyloidowych a także wpływem samych jonów na proces asocjacji, oligomeryzacji czy utleniania badanych białek amyloidogennych. Wybór cystatyny c jak obiektu badań związany był zarówno z profilem naukowym grupy badawczej, w której Doktorantka realizowała swój projekt a także z tym, że białko to wykazuje naturalne tendencje do dimeryzacji czy oligomeryzacji. Tendencja ta zależna jest w sporej mierze od mutacji, które występują w tym białku. Przykładowo zamiana Leu68 na glutaminę powoduje destabilizację białka skutkującą fibrylizacją i odkładaniem się złogów w naczyniach krwionośnych w przypadku angiopatii amyloidowej typu islandzkiego (HCCA). Sam mechanizm fibrylizacji cystatyny c jak i czynniki wpływające na ten proces nie zostały do końca poznane. Nie przeprowadzono między innymi badań oddziaływania z jonami metali. Zaobserwowano jednakże, że cystatyna b nazywana również stefiną b posiadająca dużą homologię sekwencyjną jak i strukturalną do cystatyny b i silnie oddziałuje z jonami Cu(II). Ponadto zauważono, że dodatek jonów Cu(II) powoduje w tym wypadku destabilizację formy monomerycznej ale jednocześnie

spowalnia proces fibrylogenezy. Mając na uwadze te obserwacje oraz fakt, że cystatyna c posiada dwie reszty histydyny (His86 i His 90) w słabo ustrukturyzowanym regionie białka, Autorka w swojej pracy obok białka typu dzikiego otrzymała szereg mutantów, które pozwoliły jest sprawdzić wpływ poszczególnych reszt histydyny na kompleksację Cu(II) jak i tendencje do fibrylizacji cystatyny c. Co istotne, do tej pory przeprowadzono badania wstępne na peptydzie będącym fragmentem nieustrukturyzowanego regionu (85-94 reszty aminokwasowej), które wykazały, że w ów peptyd w pH fizjologicznym chętnie tworzy kompleksy z jonami Cu(II). Szkoda, że wyniki te nie zostały umieszczone w rozprawie a jestem wręcz przekonany, że zostały zrealizowane przez grupę badawczą Promotora lub samą Doktorantkę tuż przed realizacją projektu.

Rozprawa Doktorantki jest długim dziełem liczącym aż 173 strony i została przygotowana w klasycznym układzie pracy eksperymentalnej zawierającej wprowadzenie (wstęp) i następujący po nim cel pracy, metody badań, procedury oraz i omówienie wyników. Rozprawę wieńczy podsumowanie i spis cytowanej literatury liczący 210 pozycji. Praca zawiera również wykaz używanych skrótów ale brak jest w niej streszczenia czy spisu ilustracji i tabel, których ilość też jest imponująca przyczyniając się do całościowego rozmiaru pracy: 81 rycin i 31 tabel.

Wstęp pracy liczący 34 strony jest dobrze przygotowanym rozdziałem pod względem zawartości i struktury a także dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Zawiera on najistotniejsze informacje na temat chorób neurodegeneracyjnych a także agregacji białek. Przy okazji wprowadza czytelnika w zagadnienie metod laboratoryjnych stosowanych przy badaniu agregacji. Sporą część wstępu Autorka poświęciła roli jonów metali w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych skupiając się mocno na jonach Cu(II) i Zn(II) a także chorobie Alzheimera i Parkinsona. Osobny rozdział poświęcony został bohaterce rozprawy czyli ludzkiej cystatynie c. Można znaleźć tu najważniejsze informacje o funkcji i budowie/strukturze cystatyny c, mechanizmie oligomeryzacji a także mało zbadanym oddziaływaniu z jonami metali. Szczególnie obrazowy jest tu akapit o występowaniu i przyczynach zachodzenia angiopatii amyloidowej typu islandzkiego. To, czego mi brakuje we wstępie, jak i zresztą na dalszych kartach dysertacji, to podstawowych informacji na temat właściwości koordynacyjnej miedzi i białek z nią oddziałujących – to dość istotna kwestia przy opisie tworzących się kompleksów. Nie każdy czytelnik musi wiedzieć, że reszty histydynowe tworzą silne kompleksy lub jakie inne donory białkowe chętnie tworzą wiązania koordynacyjne. Jak wygląda geometria czy struktura owych kompleksów? Praca jest dość ogólna pod względem stałych oddziaływania metal-białko. Pojęcie silny czy słaby jest bardzo relatywne i zmienia się znacząco gdy mówimy o jonach Cu(II) czy Zn(II). Z reguły każdy peptyd czy białko oddziałuje z Cu(II), lecz nie oznacza to, że takie kompleksy tworzone są w warunkach fizjologicznych. Pomijając te braki, wstęp dobrze wprowadza czytelnika w temat rozprawy i bardzo dobrze uzasadnia cele pracy, które zostały postawione przez Autorkę w kolejnym, trzystronicowym rozdziale. Jego objętość można by skrócić usuwając powtórzenia i niepotrzebny wstęp skupiając się na samych celach. Do czterech białek badanych

w pracy dorzuciłbym mutant występujący u chorych na HCCA. Tu jednak domyślam się, że jego otrzymanie w postaci monomerycznej może być bardzo trudne lub wręcz niewykonalne. Proszę tu Doktorantkę o komentarz.

Rozdział Metody badań zawiera zwięzły opis stosowanych przez Doktorantkę metod i stanowi przydatne uzupełnienie całej rozprawy. Jednakże biorąc pod uwagę długość pracy, rozdział ten mógł być zdecydowanie krótszy a Autorka powinna w nim skupić się głównie na samej metodyce wykorzystywanej w badaniu agregacji białek czy oddziaływaniach z jonami metali. Opis elektroforezy, mutagenezy czy nadprodukcji białek i ich oczyszczania zdecydowanie mógłby zostać usunięty z tego rozdziału lub fragmentami przeniesiony do kolejnego, w którym Autorka opisuje wykorzystanie tych metod. Same procedury nie budzą zastrzeżeń i są przygotowane bardzo rzetelnie. Już z opisu procedur widać ogrom włożonej pracy w realizację projektu. Jedyne, co przykuwa wzrok to brak miejscami informacji o pochodzeniu pewnych odczynników i materiałów biologicznych (np. papaina – tu też brak informacji o aktywności enzymu). Nie ma też podanych składów niektórych buforów, a zamiast tego używane są jedynie skróty.

Opis rezultatów Autorka rozpoczęła od przygotowania wektorów i nadprodukcji białek, następnie ich izolacji i oczyszczania po czym przeszła do charakterystyki uzyskanych protein. Sposób realizacji poszczególnych etapów pracy jak i wyniki nie budzą większych zastrzeżeń. Jedyne pod niektórymi zdjęciami żeli brak jest informacji jakiego białka one dotyczą. Autorka pisze, że białka po wstępnym oczyszczaniu z użyciem chromatografii jonowymiennej były odsalane a bufor wymieniany – nie podano jednak na jaki. Następnie preparaty poddano liofilizacji. Przed kolejnym etapem oczyszczania, były one rozpuszczane w buforze elucyjnym do chromatografii SEC, którym był według Autorki był octan amonu. Zważywszy na to, że octan amonu nie jest buforem i preparat zawierał składniki użytego wcześniej buforu mniemam, że pH tego roztworu było faktycznie nieznanne. Nie ma to jednak większego znaczenia, gdyż białko po sączeniu molekularnym było już czyste i znajdowało się jedynie w roztworze octanu amonu. Rycina 40 i 41 nie są ze sobą w pełni zbieżne. Frakcje na żelu zostały właściwie ponumerowane, brak jest jednak numeracji czy podanego zakresu czasu retencji na chromatogramie. Wszystkie otrzymane białka zostały ostatecznie oczyszczone do wysokiego stopnia czystości, co zostało potwierdzone z użyciem spektrometrii mas. Widma masowe są wręcz podręcznikowe a uzyskane masy zgadzają się bardzo dobrze z masami teoretycznymi. Zastanawiam się, czy Doktorantka mierzyła też widma dimerów na dalszym etapie badań i czy uzyskane masy odzwierciedlały dimer lub czy dimer ulegał dysocjacji w warunkach pomiarowych (czysta ciekawość)? Mam też pewne zastrzeżenia do „gładzenia” widm CD i jak mi się wydaje również przebiegów eliptyczności w gradiencie temperatury. O ile to pierwsze jest stosowane dość często do widm o słabej jakości to druga czynność jest nietypowa. Zmiany eliptyczności można z powodzeniem fitować do odpowiednich funkcji, co pozwala uzyskać precyzyjnie wartości temperatur topnienia wraz z błędem. Przy takim podejściu niepotrzebne jest sporządzanie pochodnych eliptyczności, które niekoniecznie

precyzyjnie wskazują temperatury topnienia. Chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na nieco uproszczoną analizę ilościową procesu dimeryzacji białek. Doktorantka analizowała postęp dimeryzacji w różnych warunkach eksperymentalnych poprzez rozdział monomeru i dimeru z zastosowaniem sączenia molekularnego. Zawartość dimeru była określana na podstawie pól powierzchni pików chromatograficznych. Właściwa analiza uwzględnić powinna różnicę w molowych współczynnikach absorpcji monomeru i dimeru. Zastosowane przez Doktorantkę podejście zawyża bowiem procentowy udział dimeru. Nie ma to jednak większego znaczenia dla wyciąganych wniosków gdyż podejście to jest realizowane konsekwentnie i rezultaty są odnoszone do wszystkich białek.

Kolejny etap rozprawy to opis badań oddziaływania białko-metal. W pierwszym podejściu poszczególne białka były inkubowane z Zn(II) i Cu(II), a następnie analizowane pod względem zawartości dimeru. Uzyskane dane pokazały, że tylko Cu(II) wpływa na proces oligomeryzacji. Stąd też Zn(II) został pominięty w dalszych badaniach. Analiza porównawcza inkubacji białek z jonami Cu(II), zgodnie z oczekiwaniami, ukazała, że najmniejszy postęp w dimeryzacji/oligomeryzacji obserwowany był dla białka H86_90A sugerując tym samym istotność obu reszt histydyny w wiązaniu miedzi i następczych procesach asocjacji białka. Badania zmian konformacji białek nie pokazały zmian w strukturze drugorzędowej pod wpływem jonów Cu(II). Dopiero analiza struktury trzeciorzędowej ukazała drobne zmiany w przypadku WT i mutantu H90A. Podobne różnice między białkami zaobserwowano również analizując widma CD w funkcji temperatury. Wskazuje to, że wiązanie Cu(II) obniża stabilność cząsteczki cystatyny c, przy czym obie reszty histydyny mają nieco odmienny wpływ na proces oligomeryzacji. Różnica ta jest jeszcze lepiej widoczna na widmach EPR, które ukazały dwa typy kompleksów w białku dzikim. Mutacja His86 nie wpływa na typ I lecz eliminuje typ II. Usunięcie zaś His90 eliminuje typ I i II na korzyść typu III-ego. Widmo białka H86_90A jest identyczne z widmem wariantu H90A a obecność sygnałów od akwakompleksu Cu(II) wskazuje na obniżenie powinowactwa do tego metalu. Wyniki te wskazują na to, że reszta His90 bierze udział w dwóch typach kompleksu I i II. Reszta His86 natomiast bierze udział w koordynacji typu II razem z His90. Analiza ta jest bardzo przekonująca i zbieżna z innymi obserwacjami. To, czego tu brakuje to wskazanie typu koordynacji na podstawie parametrów widm EPR. Jasne różnice w typach I-III są bowiem związane z inną ilością atomów azotu w sferze koordynacyjnej. Brak tej analizy nie wpływa jednak na konkluzję wyciągniętą na podstawie analizy porównawczej WT z mutantami. Skoro typ dziki wykazuje tendencje to tworzenia różnych kompleksów z Cu(II) to czy może on tworzyć również biskompleks? Widma EPR zostały wykonane tylko w stosunku 1:1. Co ukazuje widmo z nadmiarem białka nad miedzią?

Najbardziej enigmatyczną częścią badań nad oddziaływaniem cystatyny c z Cu(II) to badania NMR. W badaniach tych wykorzystano mutant V57G znakowany azotem ^{15}N . Wybór tego białka gwarantuje obecność monomeru w trakcie długich pomiarów, co zostało wykazane we wcześniejszych badaniach. Widma ^1H - ^{15}N HSQC, których brak w pracy wskazują według Autorki na małe różnice pomiędzy białkiem związanym i nie związanym z Cu(II) sugerując tym samym jedynie drobne zmiany w strukturze białka w trakcie

kompleksowania. Ponadto poszerzenie linii rezonansowych dla grup amidowych w zakresie Glu67-Phe96 ma wskazywać na bliskość z jonem paramagnetycznym. Rysunek 64 jednakże nie przedstawia tego regionu a wskazuje na ugrupowania amidowe w dalszej części białka, jako te z poszerzonym sygnałem. Te dwie informacje są w sprzeczności ze sobą. Proszę tu o komentarz.

Kolejna część rozprawy to opis wpływu Cu(II) na fibrylizację cystatyny c, który realizowany był w różniących się od siebie warunkach eksperymentalnych. Zmiennymi stosowanymi w tej analizie było stężenie białka, pH, intensywność wytrząsania próbki białka oraz długość inkubacji. Brak lub postęp fibrylizacji badany był z użyciem chromatografii SEC, fluorometrycznie z zastosowaniem barwników ANS i tioflawiny T a także z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Rozdział ten jest naszpikowany ogromną ilością wykresów, zdjęć, tabel i licznych wartościowych obserwacji, które Doktorantka dokonała podczas realizacji projektu. Wnioski z tej analizy wskazują generalnie na to, że wszystkie zmieniane parametry środowiskowe mają wpływ na przebieg oligomeryzacji cystatyny c. Zmiany te nie w każdym jednak wypadku prowadzą do fibrylizacji. Wpływ Cu(II) też jest różny w zależności od panujących warunków. Ze względu na ilość pomiarów i zastosowanych zmiennych proszę Doktorantkę o zebranie obserwacji i konkluzji w jasną w odbiorze tabelę (lub schemat) i prezentację jej podczas obrony.

Ostatnim etapem badań prezentowanych w ocenianej rozprawie była krystalizacja białek i analiza uzyskanych struktur krystalicznych. Autorka postawiła sobie za zadanie aby wykrył i wykrył analizowane białka w postaci wolnej i związanej z metalem. Zdecydowana większość testowanych warunków krystalizacji powodowała jednak szybkie wytrącanie białka z roztworów albo w postaci zagregowanej lub w postaci zdenaturowanej. Ostatecznie obrona strategia polegała na znalezieniu warunków krystalizacji bez dodatku Cu(II) a następnie na podjęciu prób krystalizacji w tych samych warunkach z małą ilością miedzi, poniżej stosunku 1:1 w celu spowolnienia niepożądanych procesów. Podejście to zakończyło się sukcesem tylko w przypadku mutantu H86A. Reszta białek została wykryta w postaci wolnej od metalu a białko dzięki było namaczane w roztworze miedzi po wcześniejszym wykryciu. Ze względu na stosunkowo niską rozdzielczość danych dyfrakcyjnych Autorka skupiła się jedynie na porównaniu map gęstości elektronowych otrzymanych dla wszystkich czterech białek skupiając się głównie na fragmentach zawierających reszty histydyny 86 i 90. Porównanie to wykazało brak różnicy w okolicy reszty His86 pomiędzy mapami dla kryształu niemoczonego i moczonego w Cu(II). Zmiany były jednak widoczne w sąsiedztwie reszty His90, co zostało zaprezentowane na Rycinie 78 w postaci dodatkowej chmury elektronowej pochodzącej od hydratowanego jonu Cu(II). Dalsza analiza pokazała, że po wygenerowaniu cząsteczek symetrycznych reszta His86 jest przesłania przez reszty Tyr42 i Arg51, co utrudniało dostęp Cu(II) do His86. Najistotniejsze pytanie jakie nasuwa się w świetle uzyskanych danych w roztworze i kryształach dotyczy przyczyn różnicy w roli poszczególnych reszt histydyny w kompleksowaniu Cu(II). Proszę o komentarz w tej sprawie w kontekście samego oddziaływania jak i wpływu Cu(II) na proces oligomeryzacji.

Uzyskane przez Doktorantkę dane dyfrakcyjne pozwoliły także na uzyskanie i udokładnienie dwóch struktur: mutantu H90A oraz mutantu H86_90A. Białko H86_90A jak i jedna z form H90A wykryłizowało w postaci dimerycznej dzięki trójwymiarowej wymianie domen. Wymiana ta jednak okazała się strukturalnie odmienna w jednym i drugim wypadku. Czy wiadomo dlaczego? Białko H90A wykryłizowało również w postaci monomerycznej a uzyskana struktura jest jedną z najbardziej rozdzielczych. Co więcej, uzyskanie struktury monomerycznej i dimerycznej jednego wariantu cystatyny c w tych samych warunkach nie udało się jak dotąd nikomu wcześniej. Zdecydowanie rzuca ono nowe światło na mechanizm dimeryzacji.

Poza uwagami umieszczonymi wyżej, nie mam zasadniczych zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej rozprawy. Pracę czyta się z przyjemnością mimo, że opisuje ona niełatwe w realizacji i prezentacji badania z zastosowaniem różnych technik pomiarowych. Cała praca napisana jest poprawnym językiem choć Autorka nie uniknęła pewnych błędów gramatycznych i zwyczajowych (jak np. pisanie miedzi (II) a nie miedzi(II)). Jednym z ciekawszych błędów jakie udało mi się znaleźć w pracy to „octan uracylu” zamiast octan uranylu na stronie 84. Nie jestem też zwolennikiem stosowania jednostki rpm (ang. *revolutions per minute*) przy opisie prędkości rotacji bez precyzyjnej informacji o rotorze. Prędkości powinny być zapisywane w postaci jednostki rcf (albo $\times g$, ang. *relative centrifugal force*). Wymienione błędy, choć pojawiają się w całej pracy, nie wpływają na bardzo pozytywny odbiór całej rozprawy, walorów naukowych a także bardzo przystępnego, choć długiego, sposobu przekazywania informacji i opisu licznych wyników. Czytając rozprawę widać ogrom pracy Doktorantki jaką włożyła w realizację swojego projektu, który z pewnością dostarczał wielu frustracji. Należy również zwrócić uwagę na to, że Pani Justyna wykorzystywała wiele różniących się od siebie technik i procedur badawczych. Nie często spotyka się wachlarz metod zaczynający się od mutagenezy, poprzez nietrywialne badania spektroskopowe a skończywszy na mikroskopii elektronowej, nie wspominając już o jądrowym rezonansie magnetycznym czy krystalografii. Żałuję więc, że dostarczony mi regulamin wyróżniania doktoratów na Wydziale Chemicznym U.G. nie pozwala mi złożyć formalnego wniosku o wyróżnienie ocenianej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. Justyny Żygowskiej spełnia wymogi ustawowe, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki jak i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr. Justyny Żygowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

