



UNIwersytet GDAŃSKI



IN MARI VIA TUA



Prof. UG, dr hab.
Piotr Mucha

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Wita Stwosza 63, Gdańsk 80-308
tel. 0585235432, e-mail: piotr.mucha@ug.edu.pl

Gdańsk, 14.10.2014r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Emilii Iłowskiej zatytułowanej „Badania motywu zamka sterycznego („steric zipper”) w sekwencji ludzkiej cystatyny C”

Praca doktorska mgr Emilii Iłowskiej wykonana została w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr hab. Anety Szymańskiej. Celem jaki postawiła przed sobą Doktorantka, było scharakteryzowanie fragmentów i analogów cystatyny C zaangażowanych w tworzenie zamka sterycznego, struktury może promować agregację i fibrylizację ludzkiego białka cystatyny C (hCC), które w konsekwencji prowadzą do jednej z odmian chorób amyloidogennych zwanej dziedziczną amyloidową angiopatią mózgową (HCCAA).

Trwający od ponad wieku gwałtowny rozwój technologiczny przyczynił się do znacznego wydłużenia życia ludzkiego ale równocześnie doprowadził do demograficznego starzenia się społeczeństw. Trudne do przecenienia zjawisko wydłużania życia ludzkiego ma również swoje „ciemne strony” związane m.in. z pojawianiem się patologicznych zmian degeneracyjnych w starzejącym się organizmie. Na temat ich etiologii wiadomo niewiele, jednakże stwierdzono, że jednym z czynników je wywołujących są choroby degeneracyjne zwane amyloidozami. Obecnie stają się one jednym z najpoważniejszych problemów zdrowotnych i społecznych starzejących się społeczeństw. Amyloidozy stanowią grupę chorób, w których główną rolę odgrywa nieprawidłowe fałdowanie białek pozakomórkowych. Proces ten przebiegający równoległe lub alternatywnie do prawidłowego/fizjologicznego fałdowania łańcucha białkowego, generuje nierozpuszczalne i jednocześnie toksyczne agregaty białkowe odkładane w tkankach w postaci tzw. złogów amyloidowych.

Mózg będący nadrzędnym organem odpowiedzialnym za koordynowanie funkcji życiowych całego organizmu (a jednocześnie jedynym organem, którego nie potrafimy przeszczepić), starzejąc się staje się coraz bardziej podatny na zmiany degeneracyjne powodowane przez amyloidozy. Będące ich efektem białkowe złogi amyloidowe uszkadzają neurony i tkankę mózgową, co prowadzi do zaburzeń funkcji psychomotorycznych, a w konsekwencji do

 **DZIEKANAT**
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 15.10.2014
L.dz. 8010-WCH/IP-1391/2014

przedwczesnej śmierci. Oprócz amyloidozy krwotocznej (HCCAA) powodowanej przez cystatynę C, innymi chorobami o podłożu amyloidogennym są choroba Alzheimera czy encefalopatie gąbczaste (np. choroba Creutzfeldta-Jakoba), związane z patologiczną aktywnością białek prionowych.

Mimo wieloletnich badań, wiedza na temat etiologii i molekularnych mechanizmów rządzących rozwojem amyloidoz jest wysoce niezadowolająca. Poznanie mechanizmów ich powstawania oraz poszukiwanie i synteza substancji hamujących ich rozwój, stają się globalnym wyzwaniem dla wielu laboratoriów na całym świecie. Z całą pewnością ważnym odkryciem w tej dziedzinie było rozwiązanie struktur krystalograficznych dimeru cystatyny C i jej mutantów przez Zespół prof. Jaskólskiego, w których to badaniach uczestniczył macierzysty Zespół Doktorantki. Wyniki tych eksperymentów pozwoliły zaproponować mechanizm trójwymiarowej wymiany domen, jako siłę napędową procesów dimeryzacji i agregacji tego białka.

Cystatyna C jest powszechnie występującym w płynach ustrojowym inhibitorem proteinaz cysteinowych. Szczególnie duże stężenie cystatyny C obserwuje się w płynie mózgowo-rdzeniowym, gdzie pełni ona funkcję kontrolną dla procesów proteolitycznych zachodzących ośrodkowym układzie nerwowym. Fizjologiczną strukturą cystatyny C jest monomer, który dominuje u natywnej formy białka. Pojedyncza mutacja L68Q charakterystyczna dla silnie izolowanych genetycznie niektórych zbiorowisk ludzkich (np. Islandczyków) powoduje gwałtowny wzrost tendencji cystatyny C do agregacji i fibrylizacji, co początkowo prowadzi do powstawania patogenicznego dimeru wykazującego dużą skłonność do tworzenia fibryli amyloidowych, a w konsekwencji do rozwinięcia się HCCAA. Wiedza na temat struktury molekularnej struktury i mechanizmów tworzenia się patogenicznych form cystatyny C jest niewielka aczkolwiek wiadomo, że w ich powstawanie zaangażowana jest wymiana domen przestrzennych pomiędzy oligomeryzującymi cząsteczkami białka.

Pani mgr Emilia Iłowska włączyła się w nurt badań nad wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów prowadzących do powstawania oligomerycznych, patogenicznych form cystatyny C. Głównym obiektem badań doktorantki były wybrane fragmenty i peptydowe analogi ludzkiej cystatyny C promujące agregację i fibrylizację tego białka i potencjalnie zaangażowane w tworzenie motywu strukturalnego tzw. zamka sterycznego.

Recenzowana rozprawa napisana jest na 171 stronach. Jej układ jest typowy dla dysertacji z dziedziny nauk chemicznych. Praca zawiera 8 rozdziałów, wśród których znajdują się wprowadzenie tzw. część literaturowa (32 strony), cel pracy (2 strony), metodyka badań (14 stron), część eksperymentalna (19 stron), omówienie wyników (61 stron) oraz podsumowanie (2 strony), literatura (10 stron) i załączniki w postaci chromatogramów SEC (3 strony). Praca finansowana była ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego oraz Narodowego Centrum Nauki, co pokazuje umiejętność doktorantki zdobywania funduszy na realizację własnych projektów badawczych.

Dysertacja mgr Emilii Hłowskiej napisana jest poprawnym językiem, ze zrozumieniem opisywanych problemów oraz dużą starannością edytorską. Liczba drobnych błędów edytorskich jest niewielka. Tzw. część literaturowa zawiera opis procesów i mechanizmów agregacji białek, w tym strukturę i rolę zamka sterycznego w tym procesie. Są to chyba najciekawsze i najbardziej wartościowe merytorycznie fragmenty wprowadzenia do dysertacji. W rozdziale tym scharakteryzowany jest także przedmiot badań doktorantki - cystatyna C. Całość jest bogato ilustrowana starannie wykonanymi rysunkami i schematami umożliwiającymi łatwe przyswojenie prezentowanej przez doktorantkę treści.

Celem doktorantki było zweryfikowanie hipotezy, że cystatyna C zawiera motyw zamka sterycznego będącego strukturą promującą agregację i fibrylizację białka. W tym celu Doktorantka zsyntezowała na stałym nośniku, oczyściła i scharakteryzowała odpowiednie fragmenty cystatyny C i ich analogi. Syntezy peptydów (wykonane manualnie, automatycznie w systemie przepływu ciągłego oraz z użyciem promieniowania mikrofalowego) są dokładnie opisane. W większości wypadków doktorantka uzyskała dobre bądź bardzo dobre wydajności syntezy. W wypadkach pojawienia się problemów z syntezą określonej sekwencji, Doktorantka skutecznie modyfikowała metodologię syntezy w celu rozwiązania pojawiających się problemów. Zsyntezowane związki zostały scharakteryzowane metodami potwierdzającymi ich tożsamość (HPLC, MALDI/ESI MS). Ta część rozprawy pokazuje duże doświadczenie Doktorantki zarówno w syntezie i oczyszczaniu peptydów, jak i stosowaniu technik analitycznych służących ich charakterystyce. Poprosiłbym jednak o skomentowanie stwierdzenia zawartego na str. 50, że „zastosowanie promieniowania mikrofalowego zmniejsza możliwość racemizacji” w kontekście faktu, że synteza mikrofalowa prowadzona jest w podwyższonej temperaturze. Doktorantka badając zaprojektowane i zsyntezowane

przez siebie peptydy oznaczyła ich właściwości agregacyjne i zdolności do tworzenia fibryli amyloidowych, wykorzystując w tym celu chromatografię wykluczenia sterycznego (SEC), kolorymetrię z użyciem tioflawiny T (ThT) i transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM). Wyniki tych eksperymentów zostały uzupełnione o badania dichroizmu kołowego (CD).

Stosując powyższe techniki Doktorantce udało się zaobserwować powstawanie dimerów bądź struktur oligomerycznych wyższego rzędu u badanych peptydów oraz skorelować te obserwacje z sekwencją i warunkami w jakich prowadzone były eksperymenty. Ich wyniki pokazują, że zaprojektowane peptydy, zarówno sekwencje natywnej hCC, jak i jej analogi wykazują skłonność do agregacji i fibrylizacji. Materiał doświadczalny uzyskany przez doktorantkę w ramach tych badań jest bardzo obszerny. Jednakże nie we wszystkich wypadkach dane eksperymentalne uzyskane przez Doktorantkę przy zastosowaniu różnych technik eksperymentalnych (dotyczące tego samego peptydu badanego w identycznych warunkach) korelują ze sobą. W jaki sposób można wytłumaczyć fakt, że wykorzystując SEC, u większości badanych peptydów zaobserwowano jedynie niewielkie ilości struktur oligomerycznych, natomiast obrazowanie TEM (wykonane w tych samych warunkach) pokazuje bardzo efektywne i szybkie tworzenie się agregatów i fibryli peptydowych. Podobny brak korelacji widać w eksperymentach SEC i kolorymetrycznych z ThT dla pep4 i 9 (rys 69 d,i oraz rys 73). W jaki sposób Doktorantka tłumaczy duży spadek intensywności w czasie, piku przypisanego monomerom peptydów w eksperymentach SEC (np. rys 71g str 105), przy równoczesnym braku obecności (lub jedynie ich niewielkich ilości) wyższych form oligomerycznych. Doktorantka pisze, że w eksperymentach SEC obserwowała pojawienie się dimerów m.in. dla pep9 (str. 102) wraz ze wzrostem czasu inkubacji. Na rys 69 (str. 102) widać coś zupełnie przeciwnego. W jaki sposób można wytłumaczyć ten fakt?

Istotną częścią pracy są wykonane przez Doktorantkę badania krystalograficzne poświęcone otrzymywaniu kryształów zsyntezowanych peptydów i ich analizie dyfraktometrycznej. Ta część dysertacji pokazuje duże doświadczenie w technikach hodowli kryształów i badaniach krystalograficznych jakie nabyła Doktorantka w trakcie prowadzenia swoich badań. Także umiejętność aplikowania o „czas naświetlania” i zdobywania funduszy na prowadzenie badań krystalograficznych w największych ośrodkach europejskich (HZB, ESRF i DESY) dysponujących wysoce specjalistyczną i unikalną aparaturą badawczą jakimi są synchrotrony, uważam, za przejaw operatywności i inicjatywy Doktorantki.

Spośród zaprojektowanych przez Doktorantkę peptydów będących przesuniętymi względem siebie o jedną resztę aminokwasową (w kierunku C-końca) fragmentami hCC, tylko fragmenty hCC 55-60 (pep4), 59-64 (pep8) i 60-65 (pep9) wykazywały silną tendencję do agregacji. Wśród nich najsilniejszymi właściwościami agregacyjnymi wykazywał się pep4 ($Q^{55}IVAGV^{60}$). Pozostałe peptydy wykazywały niewielką lub umiarkowaną tendencję do agregacji. Obserwacje te potwierdziły, co zauważa Doktorantka w swojej pracy, że w sekwencji hCC istnieją obszary sprzyjające/promujące procesom agregacji i fibrylizacji.

Niestety pomimo dużej dozy włożonej pracy i sporych sukcesów, jakie osiągnęła Doktorantka w hodowli kryształów peptydów, żaden z nich nie umożliwił przeprowadzenia analizy strukturalnej, której celem byłoby zaobserwowanie hipotetycznego motywu zamka sterycznego. W tym miejscu poproszę Doktorantkę o wyjaśnienie, jakie są główne przyczyny braku rozpraszania promieniowania rentgenowskiego przez kryształ? Może zamiast optymalizować warunki krystalizacji dla wszystkich badanych peptydów, należało raczej cały wysiłek skupić na znalezieniu warunków hodowli „efektywnych” (dających obraz dyfrakcyjny umożliwiający analizę strukturalną) kryształów najsilniej agregujących peptydów pep 4 i 9? Doktorantce udało się uzyskać ciekawe i istotne w badaniach nad agregacją hCC informacje przy użyciu technik takich jak SEC, kolorymetria z użyciem ThT i TEM czy CD. Jednak niepowodzenie badań dyfrakcyjnych nie pozwoliło wyciągnąć ostatecznych wniosków na temat struktury przestrzennej badanych struktur oligomerycznych i dać odpowiedź na obecność hipotetycznego zamka sterycznego w hCC. Ze względu na dużą dynamikę konformacyjną, tak małe (krótkie) peptydy jakie badała Doktorantka, są trudnym i niewdzięcznym obiektem badań krystalograficznych. W tym kontekście za spory sukces Doktorantki należy uznać otrzymanie ich w formie krystalicznej.

Jednakże jak pokazuje niniejsza dysertacja, nawet uzyskanie kryształu nie gwarantuje możliwości rozwiązania struktury przestrzennej. Czy Doktorantka rozważała pomysł zastosowania większych, dłuższych peptydów w badaniach krystalograficznych, uzyskanych poprzez zduplikowanie lub zmultiplikowanie sekwencji badanych peptydów, a następnie oznaczenie struktury powtarzającego się fragmentu? W tym miejscu recenzji chciałbym poprosić Doktorantkę o wyjaśnienie faktu zmiany grupy przestrzennej kryształu pep9 (z H3 na C2) w trakcie procesu udokładniania struktury.

Doktorantka podjęła się także określenia metodami teoretycznymi wpływu poszczególnych reszt aminokwasowych w sekwencji amyloidogennej na tendencję do agregacji. Na podstawie obliczeń energii Rosetta wysnuła wnioski na temat właściwości agregacyjnych analogów sekwencyjnych pep4 (hCC(55-60)). Badania Doktorantki (SEC, ThT, TEM) dotyczące wpływu „scramblingu”-zamiany pozycji reszt aminokwasowych w pep4 pokazały, że jego właściwości agregacyjne są w jakimś stopniu zależne od sekwencji, chociaż trudno znaleźć i zrozumieć reguły rządzące taką korelacją. Z opisu sposobu generowania sekwencji typu „scramble” i eksperymentów z użyciem peptydów z takimi sekwencjami, nie wynika dlaczego właśnie te sekwencje zostały wybrane do badań. „Scrambling” 6-cio aminokwasowego peptydu pep4 (Q⁵⁵IVAGV⁶⁰) zawierającego jedno powtórzenie (V⁵⁷, V⁶⁰), generuje ponad 100 sekwencji. Dlaczego do badań wybrano właśnie pięć (4 typu scramble+mutant hCC V57N) prezentowanych w pracy? Pytanie to nasunęło się w kontekście tabeli zawierającej wartości energii Rosetta przypisane peptydom typu „scramble”. Energie są zbliżone dla wszystkich znajdujących się w tabeli peptydów z wyjątkiem pep10, a największa różnica pomiędzy skrajnymi jej wartościami jest niewielka i wynosi 1.5 kcal/mol. Wszystkie powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy eksperymentalnej, jaką wykonała doktorantka w trakcie realizowania swojego tematu badawczego. Mają jedynie charakter polemiczny (w niektórych wypadkach otwarty) i ich celem jest uzyskanie od Doktorantki dodatkowych, uzupełniających informacji dotyczących zaprezentowanych badań.

Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć kilka mankamentów dysertacji. W spisie skrótów doktorantka umieściła wzór cyjanku potasu KCN, który skrótem nie jest. W opisie skrótu HIV brakuje określenia „ludzki”, PBS ma błędną nazwę „bufor fosfornowy”, skrót DX na str. 52 jest niezdefiniowany. W dysertacji znalazłem też kilka niezręcznych sformułowań: białko prionowe z „organizmu drożdżowego” (str 10) czy ...tworząc niekończący się łańcuszek (str. 13), piki pseudomolekularne (str. 87).

W pracy jest również kilka błędów formalnych i merytorycznych. Oznaczenie mg/l nie jest oznaczeniem stężenia molowego (str. 33). W kilku miejscach w dysertacji, proces syntezy wiązania peptydowego błędnie nazywany jest przez Doktorantkę sprzęganiem. Do jakiego typu reakcji należy? Rysunki 33 i 49 (str. 45 i 65) są identyczne. Stwierdzenie (str. 58), że

białka to peptydy zbudowane z kilkudziesięciu aminokwasów jest niepoprawne, podobnie jak określenie heksapeptydów małymi białkami.

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne wynikają z obowiązku recenzenta dokonania rzetelnej oceny dysertacji i w żadnym stopniu nie umniejszają wartości pracy, jaką doktorantka włożyła w przeprowadzone przez siebie badania. Nie umniejszają także wartości naukowej zawartej w niej wyników, stanowiących ważny i oryginalny wkład w badania nad procesem agregacji i fibrylizacji cystatyny C. Połączenie w dysertacji części syntetycznej dotyczącej syntezy peptydów z szerokim spektrum technik eksperymentalnych umożliwiających badanie procesów agregacji jest niezwykle wartościowym i efektywnym podejściem w badaniach molekularnych podstaw patogenezy białek amyloidogennych.

Przedstawione przez Doktorantkę wyniki badań, pokazują ją jako młodego, lecz doświadczonego badacza. Potrafiącego samodzielnie rozwiązywać postawione przed nim problemy. Na szczególne podkreślenie zasługuje zaprezentowana umiejętność posługiwania się wieloma technikami analitycznymi i analizy strukturalnej biomolekuł.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki mimo iż nie udzielają jednoznacznej odpowiedzi na temat jednego z aspektów mechanizmu inicjującego agregację cystatyny C, istnienia w jej strukturze motywu zamka sterycznego, wykazują elementy nowości naukowej i charakteryzują się wysokimi walorami poznawczymi. Dostarczają nowych faktów na temat amyloidogennych właściwości badanych fragmentów tego białka, które mogą być pomocne w wyjaśnieniu molekularnych podstaw patogenicznego fałdowania się łańcucha cystatyny C oraz w projektowaniu inhibitorów tego procesu. Przedstawione recenzji uwagi mają głównie charakter polemiczny i dyskusyjny, i nie w żadnej mierze nie obniżają dużej wartości naukowej rozprawy. Recenzowana dysertacja przygotowana została na wysokim poziomie merytorycznym, a zawarte w niej wyniki stanowią oryginalny i istotny wkład do nauki.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana dysertacja spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach i tytule naukowym i wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Emilii Hłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.