

Prof. UAM dr hab. Maciej Kozak
Zakład Fizyki Makromolekularnej UAM
ul. Umultowska 85
61-614 Poznań
mkozak@amu.edu.pl

Poznań, 8 października 2014 r

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Emilii Łowskiej *Badania motywu zamka sterycznego ("steric zipper") w sekwencji ludzkiej cystatyny C*

Wraz z wydłużaniem się średniej długości życia człowieka rośnie prawdopodobieństwo występowania chorób neurodegeneracyjnych. Najczęściej choroby neurodegeneracyjne kojarzone są z chorobą Alzheimera czy Parkinsona. U podstaw molekularnych powstawania tych schorzeń leżą zmiany konformacji cząsteczek białka. Stąd często określa się też te choroby mianem chorób konformacyjnych. Do chwili obecnej udało się zidentyfikować około 30 różnych białek, odpowiedzialnych za powstawanie chorób konformacyjnych. Jednym z nich jest powszechnie znany inhibitor proteaz cysteinowych – ludzka cystatyna C. Struktura przestrzenna tego białka określona została już kilkanaście lat temu, stając się kanonicznym przykładem mechanizmu przestrzennego przetrzutu domen (ang. „domain swapping”). Warto podkreślić, że znaczący wkład w badania strukturalne tego białka miał zespół badaczy z grupy Profesora Mariusza Jaskólskiego z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN oraz grupy Profesora Zbigniewa Grzonki z Uniwersytetu Gdańskiego, czego wynikiem było opublikowanie struktury dimeru natywnej formy ludzkiej cystatyny C. Dalsze badania selektywnych mutantów HCC kontynuowane były między innymi przez dr hab. Anetę Szymańską, która skupiła się na analizie mutacji punktowych HCC w pozycji 57. Jednakże, pomimo poznania struktury przestrzennej form dimerycznych HCC oraz licznych jej monomerycznych mutantów nadal wiele aspektów, związanych z tendencją do oligomeryzacji HCC, pozostaje niewyjaśnionych.

W ostatnich latach nowym podejściem badawczym, wywodzącym się z pogranicza chemii, biologii strukturalnej i biologii syntetycznej, pozwalającym szczegółowo określić przyczyny zmian strukturalnych w białkach amyloidogennych jest synteza i badania izolowanych motywów strukturalnych. Z prawdziwą przyjemnością chciałbym odnotować, upowszechnienie tej metodyki również w środowisku polskich chemików, bioinformatyków i biologów strukturalnych.

Rozprawa doktorska mgr Emilii Łowskiej zatytułowana “Badania motywu zamka sterycznego (“steric zipper”) w sekwencji ludzkiej cystatyny C”, którą mam przyjemność recenzować doskonale wpisuje się w nurt badań podstawowych nakierowanych na wyjaśnienie przyczyn powstawania chorób konformacyjnych, a w szczególności neurodegeneracyjnych na poziomie molekularnym.



DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 16.10.2014
L.dz. 8010-NCH/IP-1399/2014

Dysertacja przygotowana została w Zakładzie Chemii Medycznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr hab. Anety Szymańskiej - uznanej specjalistki z zakresu biochemii i biologii strukturalnej, posiadającej ogromne doświadczenie w zakresie charakterystyki szerokiej gamy mutantów HCC.

Maszynopis pracy doktorskiej o objętości 171 stron zredagowany został w języku polskim. Układ manuskryptu jest klasyczny z podziałem na część teoretyczną, eksperymentalną i omówienie wyników. W szczegółach, autorka podzieliła go na 8 rozdziałów, poprzedzonych wykazem skrótów oraz zilustrowała 115 rysunkami i 17 tabelami.

W pierwszym rozdziale liczącym 35 stron, podzielonym na dwie zasadnicze części autorka przedstawiła informacje literaturowe na temat procesu agregacji białek oraz dane na temat ludzkiej cystatyny C. W szczególności autorka skupiła się na zjawisku trójwymiarowego przerzutu domen towarzyszącego procesom agregacji białek oraz motywowi zamka sterycznego. Ten drugi aspekt omówiony został zarówno od strony identyfikacji (predykcji) jak i zilustrowany licznymi przykładami białek z motywem zamka sterycznego. W części dotyczącej HCC autorka, poza ogólnymi informacjami na temat struktury i funkcji ludzkiej cystatyny C, skupia się na znaczeniu reszty Val57 obecnej w sekwencji HCC.

W rozdziale drugim autorka zdefiniowała cel pracy, jakim było zweryfikowanie czy w ludzkiej cystatinie C, białku o właściwościach amyloidogennych, można zidentyfikować sekwencje aminokwasowe promujące agregację i fibrylizację tego białka.

W rozdziale trzecim, liczącym 19 stron, zaprezentowane zostały przez doktorantkę wykorzystywane w pracy metody badawcze. W pierwszej części rozdziału omówiono metody syntezy i oczyszczania peptydów. W dalszej części autorka przedstawiła metodykę analizy fizykochemicznej badanych peptydów (spektroskopia dichroizmu kołowego, transmisyjna mikroskopia elektronowa czy krystalizacja białek).

Uzyskane przez mgr Iłowską wyniki badań zostały przedstawione w rozdziale czwartym obejmującym 37 stron. W rozdziale tym wyniki zaprezentowano w logicznej i chronologicznej kolejności począwszy od analiz bioinformatycznych, których wyniki wykorzystane zostały do zaprojektowania sekwencji 14 badanych peptydów. Następnie szczegółowo omówiona została synteza i procedury oczyszczania peptydów. Naturalną konsekwencją analiz bioinformatycznych były zakrojone na szeroką skalę badania agregacyjne (chromatograficzne, spektroskopowe i mikroskopowe). Całości dopełnia bardzo szczegółowy opis krystalizacji peptydów zilustrowany licznymi zdjęciami kryształów.

Kolejny i zarazem najobszerniejszy (70 stron) jest rozdział piąty zawierający szczegółowe omówienie uzyskanych wyników. W bardzo logiczny sposób podzielony został na trzy części. Pierwsza poświęcona jest omówieniu wyników badań spektroskopowych i strukturalnych serii peptydów zaprojektowanych na bazie fragmentu sekwencji HCC. Druga część dyskusji dotyczy badań właściwości agregacyjnych peptydów z przegrupowaniami w sekwencji oraz peptydowego mutantu V57N. Ostatnia część zawiera pogłębioną dyskusję wyników badań krystalograficznych peptydów.

Podsumowanie pracy zawarte zostało w rozdziale szóstym, a w rozdziale siódmym przedstawione zostały cytowane w rozprawie odnośniki literaturowe. Zawarta w pracy

literatura obejmuje 135 pozycji. Do manuskryptu dołączony został 3-stronicowy załącznik zawierający dokumentację wykonywanych analiz chromatograficznych.

Ocena strony merytorycznej pracy

Ten fragment recenzji pracy mgr Łowskiej, chciałbym poświęcić ocenie realizacji postawionego na wstępie celu badań. W tym miejscu warto podkreślić, że moim zdaniem doktorantka podjęła niezwykle interesującą i aktualną ale również wymagającą metodycznie tematykę badawczą. Zaprezentowany wcześniej główny cel pracy mgr Łowska podzieliła na szereg etapowych celów badawczych, które pozwalam sobie poniżej streścić:

1. *Synteza i oczyszczanie dziewięciu heksapeptydów opartych sekwencji ludzkiej cystatyny C (region 52-65).*
2. *Przeprowadzenie testów agregacyjnych tych peptydów z pomocą chromatografii wykluczenia sterycznego, technik spektroskopowych i TEM.*
3. *Badania strukturalne agregacji peptydów po inkubacji w czasie 0-21 dni.*
4. *Uzyskanie kryształów heksapeptydów do badań strukturalnych.*
5. *Badania krystalograficzne zmierzające do uzyskania struktury przestrzennej badanych peptydów.*
6. *Badania wpływu kolejności sekwencji aminokwasowej na zdolności agregacyjne dla peptydu cechującego się najsilniejszymi właściwościami agregacyjnymi.*
7. *Przeprowadzenie analiz strukturalnych i agregacyjnych dla analogów peptydów.*
8. *Analiza właściwości agregacyjnych zmutowanego (V57N) fragmentu HCC 55-60.*

Autorka zrealizowała przedstawione powyżej szczegółowe cele badawcze. Pomimo, że nie udało się rozwiązać struktury któregośkolwiek z badanych przez nią peptydów warto docenić fakt, że opracowała warunki krystalizacji dla pięciu heksapeptydów. Z przedstawionego opisu w części eksperymentalnej wynika, że wszystkie doświadczenia były szczegółowo zaplanowane, zarówno w oparciu o dane literaturowe, jak i własne analizy bioinformatyczne ukierunkowane na określenie tendencji agregacyjnych poszczególnych fragmentów HCC. W dalszej części dobór kombinacji metod chromatograficznych (SEC), spektroskopowych (CD i spektrofluorescencja) oraz strukturalnych (transmisyjna mikroskopia elektronowa i techniki krystalografii białek) stanowi pełny zestaw metod pozwalających zweryfikować tendencje do tworzenia konkretnej aranżacji strukturalnej (zatków sterycznych). Uzyskane wyniki są powtarzalne i wysokiej jakości. Warsztat badawczy, który mgr Łowska stosowała w analizie wyników uważam za właściwy, a wyciągnięte wnioski za trafne i wyczerpujące.

Podczas lektury manuskryptu nasunęły mi się uwagi krytyczne, które z obowiązku recenzenta muszę zaprezentować.

Nie mogę zgodzić się z kontrowersyjnym sformułowaniem użytym przez autorkę na stronie 58, że „białka to peptydy zbudowane z kilkudziesięciu aminokwasów”. Typowa definicja strukturalna białek nie definiuje ściśle minimalnej ani maksymalnej liczby

aminokwasów. Jednakże powszechnie przyjęto, że białkami nazywa się polipeptydy liczące nawet kilka tysięcy aminokwasów. Jeżeli do tego weźmiemy pod uwagę zdolność łańcucha polipeptydowego do formowania struktury drugo i trzeciorzędowej to należy pamiętać, że największe pojedyncze domeny białkowe formowane są nawet z kilkuset aminokwasów. Wobec tego zacytowane sformułowanie autorki jest co najmniej niezręczne.

Z kolei podrozdział dotyczący rozwiązania struktury uważam, za zupełnie niepotrzebny, a nawet nieco wprowadzający w błąd czytelnika. Ze względu na niską kompletność danych dyfrakcyjnych oczywistym jest, że struktury się nie da rozwiązać. Informacje zawarte w tej sekcji należałoby raczej włączyć do poprzedniego rozdziału.

W opisach syntez autorka podaje wydajności syntezy poszczególnych peptydów, niestety nie uwzględniła szczegółowej procedury ich wyznaczenia. Niekiedy wartości te można powiązać z masą surowego i oczyszczonego peptydu, natomiast w innych przypadkach wydajności te odbiegają od bezpośredniego stosunku mas.

Nie zgadzam się z przedstawioną przez autorkę motywacją wyboru buforu HEPES jako alternatywy do buforu PBS (strona 106) z uwagi na jego powszechność w testach krystalizacyjnych. W testach przesiewowych warunków krystalizacji stosowany jest szereg innych buforów i celowanie w jeden konkretny bufor nie ma większego znaczenia.

Moim zdaniem na zdjęciach TEM, zamieszczonych na stronach 113-121 oraz 139-143, ilustrujących powstające agregaty powinna zostać zamieszczona wyraźna skala (lub adekwatny przelicznik powiększenia w opisie tabel), która ułatwiłaby porównywanie uzyskanych obrazów. W tej sytuacji mowa o mniejszych lub większych agregatach może mieć charakter spekulacji, tym bardziej, że niekiedy widoczne słupki skali (ale bez jednostek) mają zróżnicowaną długość. Przesłane dodatkowo dane na płycie CD nieco ułatwiają interpretację, jednakże autorka przygotowując dane do publikacji zdecydowanie powinna opatrzyć je czytelną i porównywalną pomiędzy poszczególnymi zdjęciami skalą.

Zabrakło mi także w tekście szczegółowych informacji czy uzyskana kompletność danych wynosząca zaledwie 50% dla peptydu pep9 wynikała z szybkiego zaniku zdolności dyfrakcyjnej kryształu czy z wyboru podczas zbierania danych zbyt małego zakresu sieci odwrotnej adekwatnego raczej dla grupy o wyższej symetrii niż C2.

W podsumowaniu tej części recenzji warto podkreślić aktualność tematu badawczego, który podjęła mgr Iłowska, przemyślany schemat wykonanych eksperymentów oraz właściwy dobór metod badawczych jakie zostały wykorzystane przez doktorantkę.

Za najważniejsze wyniki, które zostały uzyskane przez mgr Emilię Iłowską uważam:

- Zaprojektowanie serii peptydów w oparciu o analizy bioinformatyczne potencjalnych motywów zamka sterycznego w sekwencji HCC i określenie właściwości agregacyjnych.
- Wykonanie testów inkubacyjnych agregacji peptydów oraz analiza mikrostruktury powstających agregatów z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej.
- Opracowanie powtarzalnych warunków krystalizacji peptydów oraz wykonanie wstępnych badań krystalograficznych.

Ocena strony redakcyjnej pracy.

Strona redakcyjna pracy nie budzi moich zastrzeżeń. Rozprawa została zredagowana bardzo starannie zarówno od strony graficznej jak i językowej. W treści manuskryptu sporadycznie pojawiają się błędy edytorskie tzw. literówki. Mocną stroną pracy są starannie przygotowane ilustracje, które poza kilkoma wcześniej wspomnianymi mikrofotografiami TEM są czytelne i informatywne.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska zredagowana przez mgr Emilię Łowską, wskazuje na dobre przygotowanie autorki do samodzielnej pracy badawczej. Tematyka badawcza, którą poruszyła w pracy jest wymagająca, jednakże autorka zrealizowała założone na wstępie cele badawcze. Uzyskane wyniki badań zostały przez mgr Łowską przedstawione w sposób jasny i przejrzysty, a ich omówienie jest wyczerpujące. Wyniki zostały też porównane z danymi literaturowymi i krytycznie przedyskutowane. Strona edytorska i graficzna pracy jest staranna, a błędy edytorskie nieliczne.

Przedstawione wcześniej nieliczne uwagi krytyczne, nie wpływają na moją wysoką ocenę poziomu naukowego dysertacji. Pomimo, że autorce zabrakło przysłowiowej „odrobiny szczęścia” aby uzyskać kryształki pozwalające na wykonanie pełnych pomiarów dyfrakcyjnych pracę uważam za bardzo wartościową. Autorka, niezrażona wynikami badań dyfrakcyjnych, przeprowadziła szeroki zakres badań biochemicznych. Warto docenić ich nowatorski charakter, szczególnie w zakresie badań strukturalnych z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Natomiast przeprowadzone eksperymenty krystalizacyjne stanowią doskonały punkt wyjścia do przyszłych badań strukturalnych. Dlatego pracę doktorską mgr Emilii Łowskiej uważam za wyróżniającą.

W formalnym podsumowaniu recenzji, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Emilii Łowskiej w pełni spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365). Niniejszym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Emilii Łowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz rozważenie możliwości uznania przedłożonej rozprawy za wyróżniającą.

