

Dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Wrocław, 20.02.2019 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Przemysława Jurczaka zatytułowanej „Studies of the influence of protein-ligand and protein cel membrane interactions on the amyloidogenic protein oligomerisation process: the case of human cystatin C”, tytuł w języku polskim “Badania wpływu oddziaływań białko-ligand oraz białko-błona komórkowa na process oligomeryzacji białek amyloidogennych na przykładzie ludzkiej cystatyny C”

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło i doskonale wpisuje się w podejmowane z dużym sukcesem trendy badawcze w Katedrze Chemii Medycznej, a podjęte zadanie badawcze w niniejszej dysertacji stanowi kontynuację badań dotyczących cystatyny C.

Pomimo zaangażowania dużych nakładów środków finansowych oraz prowadzonych na szeroką skalę badań procesów amyloidogenezy istnieje ciągle całe mnóstwo znaków zapytania dotyczących tworzenia się amyloidów, ich funkcji oraz oddziaływania z układami biologicznymi. Są to bardzo ważne procesy, które odgrywają duże znaczenie w chorobach neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona. Z tego względu reakcje tworzenia „konstruktów” białkowych w postaci organizujących się struktur od dimerów do amyloidów są bardzo ważnym aspektem poznawczym. Cystatyna C, inhibitor proteinaz cysteinowych w organizmie ludzkim pełni rolę od ochronnej np. tworzy kompleksy z amyloidem β do patogennej, jest przyczyną wrodzonej, rodzinnej angiopatii amyloidowej. Z tego względu poznanie oddziaływań cystatyny C z błoną komórkową oraz innymi białkami jest niezmiernie ważnym problemem badawczym.

Niniejsza rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim i czyta się ją bardzo dobrze zarówno pod względem językowym jak i merytorycznym. Układ pracy jest przemyślany składa się z 9 rozdziałów w tym głównych: wstępu, podstaw teoretycznych, celu pracy, rezultatów i dyskusji, wniosków, zastosowanej metodyki i metod oraz referencji.

Pracę rozpoczyna wstęp literaturowy, który jest proporcjonalny w stosunku do pozostałych rozdziałów w pracy. We wstępie zostały opisane choroby związane z procesami tworzenia amyloidów. Rozpoczyna się on krótkim opisem chorób neurodegeneracyjnych w tym choroby Alzheimera i Parkinsona oraz innych niezwiązanych z układem nerwowym w których tworzenie się amyloidów odgrywa znaczącą rolę. Zawiera również opis prawdopodobnego mechanizmu powstawania amyloidowych fibryli. Następny podrozdział jest poświęcony błonie komórkowej oraz jej komponentom. Ten fragment pracy jest napisany jako wprowadzenie do opisu mimetyków błon komórkowych, czyli układów micelarnych, liposomowych oraz nanodysków. Następnie zostały opisane parametry tworzenia się różnych agregatów tworzących się z amfifilowych związków. Dalsza część wstępu jest bardzo ciekawa, ponieważ zawiera streszczenie opisujące oddziaływania białek

z membranami w tym, opisy funkcji białek membranowych oraz opis oddziaływań białek powierzchniowych, zakotwiczonych i transbłonowych z błoną komórkową. W następnej kolejności zostały przedstawione metody za pomocą których prowadzi się badania oddziaływań pomiędzy makromolekułami tj. jądrowy rezonans magnetyczny (NMR), chromatografia wykluczenia (SEC), izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC) oraz dynamika molekularna (MD) jako metoda wspierająca badania eksperymentalne. Całość wstępu zamyka opis oddziaływania hCC z innymi białkami.

W następnym rozdziale został opisany cel pracy, który jest ściśle powiązany z właściwościami agregacji cystatyny C. Uszczegóławiając plan pracy można powiedzieć, że Doktorant wyznaczył sobie za cel określenie wpływu wyselekcjonowanych ligandów na właściwości dimeryzacji i oligomeryzacji hCC, w celu oszacowania ich potencjału inhibicyjnego lub wspomagającego powyższe procesy, wraz z opisem ich wpływu na zmiany strukturalne białka z określeniem miejsc oddziaływań. W realizacji niniejszych zadań badawczych zostały zaplanowane następujące działania takie jak ekspresja białka cystatyny C i jego pochodnych V57G, L68V oraz V57P, zoptymalizowanie ekspresji znakowanych izotopowo białek hCC oraz V57G (w celu przeprowadzenia badań NMR), określenie wpływu wyselekcjonowanych ligandów na procesy oligomeryzacji monomerów (WT, V57G, L68V) oraz dimerów (V57P, dimer WT), określenie wpływu ligandów na zmiany drugorzędowej struktury hCC wraz z określeniem termodynamicznych parametrów oddziaływania białko-ligand oraz miejsc oddziaływań.

Rozdział rezultaty i dyskusja rozpoczyna opis ekspresji białek w tym optymalizacji ekspresji białek z izotopowo wzbogaconymi atomami ^{15}N , ^{13}C oraz ^2H . Następnie został opisany materiał badawczy dotyczący określenia oddziaływań odpowiedzialnych za dimeryzację hCC. Początkowo zostały przeprowadzone badania WT hCC z mieszanym układem micelarnym DPC:SDS (stosunek molowy 5:1), które zostały wykonane w różnych temperaturach za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego. Z badań tych wynika, że wraz ze wzrostem stężeń surfaktantów indukowana jest drugorzędowa struktura białka w formie α helisy. Przeprowadzono również badania z surfaktantami DPC oraz SDS, przy czym stwierdzono, że stężenie 0.4 mM SDS powoduje degradację białka. I tu poproszę Doktoranta o wytłumaczenie, dlaczego zwiększenie stężenia do 0.8 mM nie powoduje efektu degradacji hCC. Następnie przeprowadzono badania oddziaływań hCC z miemytkami membran w postaci układów liposomowych, które nie zakończyły się sukcesem. W dalszych badaniach wykorzystano chromatografię wykluczenia, za pomocą której zostały przeprowadzone pomiary oddziaływań dla hCC WT oraz trzech jej wariantów z układami micelarnymi i liposomowymi. Wszystkie wyniki zostały zebrane w tabeli 2. Następnie zostały przeprowadzane badania za pomocą miareczkowania kalorymetrycznego, opisujące oddziaływania białka hCC WT oraz V57P z micelarnymi układami mieszanymi DPC:SDS (5:1) oraz z poszczególnymi surfaktantami osobno. W wyniku tych badań zostało ustalone, że główny udział w wiązaniu białka do mieszanego układu micelnego wykazuje SDS. Oddziaływań pomiędzy hCC i układami liposomalnymi nie udało się jednak zaobserwować. W tej części pracy zabrakło mi jednoznacznej konkluzji czy oddziaływanie pomiędzy układem mieszanym a białkami zachodzi, czy nie, z tego względu moja druga prośba o wytłumaczenie zaobserwowanych efektów.

W dalszym ciągu do badań zostały wykorzystane zaawansowane metody 2D oraz 3D NMR za pomocą których przypisano sygnały z łańcucha głównego aminokwasów, a następnie zostały wykonane badania V57G w układzie micelarnym. Analiza zmiany przesunięć chemicznych pozwoliła na określenie miejsc oddziaływań białka z układem micelarnym DPC:SDS. Niestety

przeprowadzone badania z mimetykami membran w postaci liposomów wykazały jedynie słabe oddziaływania N końca białka V57G (fragment 5-19).

Znaczna część pracy została poświęcona badaniom wykonanym z wykorzystaniem metod dynamiki molekularnej układów białko – mimetyk błony komórkowej, za pomocą których określono miejsca oddziaływań białek z zastosowanymi mimetykami. Niniejsze badania stanowią spory wkład wiedzy dotyczący oddziaływań białka hCC i jego trzech analogów, a do najciekawszych wyników moim zdaniem należy określenie słabych oddziaływań pomiędzy białkami a liposomami oraz monomeryzacji białka V57P pod wpływem oddziaływania z micelami. Niewątpliwie kontynuacją tych badań mogłyby być pomiary NMR z wykorzystaniem miareczkowania białka surfaktantami, a niewątpliwie wykonanie widm typu DOSY pomogłoby w określeniu form, w których białka występują bezpośrednio w roztworze.

Ostatni IV rozdział zawiera część pracy, w której zostały opisane oddziaływania pomiędzy hCC i jej analogami oraz cząsteczkami o potencjale inhibicyjnym procesu dimeryzacji, w tym przeciwciałem HCC3, papainą, białkiem BSA, amyloidem β , oraz małowcząsteczkowymi związkami organicznymi. Początkowo zostały wykonane badania w układzie hCC-HCC3 za pomocą chromatografii powinowactwa, które wykazały oddziaływanie pomiędzy obiema makromolekułami. W dalszej części prac zostały przebadane oddziaływania krótszych fragmentów białka hCC (14 peptydów składających się z od 12 do 15 reszt aminokwasowych) z przeciwciałem HCC3 za pomocą tej samej metody. Badania te wykazały oddziaływanie trzech z nich to jest peptydów 6, 8, 12 jednak w podsumowaniu tej części badań Doktorant nie był do końca o tym przekonany. Następny zestaw badanych białek hCC V57G oraz papaina wykazy tworzenie się kompleksu jedynie za pomocą natywnej elektroforezy agarozowej, czego pośrednim dowodem na jego istnienie może być cięcie enzymatyczne hCC V57G pomiędzy 11Gly – 12Gly oraz powstawanie białka o krótszej sekwencji.

W dalszym ciągu prac zostały przebadane układy hCC - BSA oraz hCC - amyloid β za pomocą metody NMR. Z badań NMR wynika, że hCC oddziałuje z obydwoma molekułami, głównie poprzez zaangażowanie N-końca białka hCC. W tym miejscu mam pytanie do Pana mgra Przemysława Jurczaka, czy były podjęte próby badania oddziaływań białka hCC V57P z przeciwciałem HCC3 z wykorzystaniem techniki NMR? Drugie pytanie łączy się z pierwszym, a dotyczy sprawdzenia oddziaływań karboplatyny, norepinefryny i chlorowodoru dobutaminy z dimerem hCC V57P.

Następne rozdziały to część eksperymentalna, w której opisane są procedury zarówno izolacji i oczyszczania białek jak i opis wykonanych pomiarów.

Podsumowując niniejszą dysertację doktorską myślę, że Doktorant uzyskał materiał na co najmniej półtora pracy doktorskiej, wykazał się dużą znajomością szeroko pojętych metod badawczych oraz doskonałym opanowaniem warsztatu badawczego. Praca jest napisana w sposób zrozumiały, a opisane po sobie rozdziały posiadają ciąg przyczynowo skutkowy podparty wysokiej jakości ilustracjami. W tym miejscu muszę dodać, że przedstawiona do recenzji praca jest opracowana niezwykle starannie zarówno pod względem edytorskim jak i językowym (praca napisana w języku angielskim). Chciałbym również zaznaczyć, że wszelakie uwagi, sugestie oraz pytania, które pozwoliłem sobie w tej recenzji wypisać wynikają jedynie z obowiązku recenzenta i mają charakter „dociekliwych sugestii”.

Pan mgr Przemysław Jurczak w swoim dorobku naukowym posiada dwie prace w czasopismach zagranicznych (Beilstein Journal of Nanotechnology, FEBS Letters) oraz jedną

w czasopiśmie polskim (Task Quarterly). Do dorobku naukowego Doktoranta należy również zaliczyć udział w 18 konferencjach oraz w 5 projektach badawczych.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Przemysława Jurczaka spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz biorąc pod uwagę opisane powyżej dokonania Pana mgr Przemysława Jurczaka wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized, somewhat abstract representation of a name.