

Prof. dr hab.

Sylwia Rodziewicz-Motowidło

Wydział Chemii

Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 15.11.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Adrian Żyły

pt.: „Badania strukturalne agregacji wybranych peptydów beta-amyloidowych w obecności ludzkiej albuminy i ludzkiej cystatyny C”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Kozaka oraz

promotora pomocniczego dr Łukasza Popendy

W dniu 15 listopada 2022 roku, dokładnie w dzień złożenia niniejszej recenzji pracy doktorskiej, liczba ludności na Ziemi przekroczyła 8 miliardów. W kolejnych latach ludzi nadal będzie przybywać, choć tempo wzrostu nie będzie już tak duże jak w latach 1960-1990. Obniżające się tempo wzrostu populacji ludzkiej, szczególnie w krajach rozwiniętych, jest związane z jednej strony z malejącą liczbą urodzeń (np. w skali roku w Europie ujemny przyrost, w Ameryce Północnej wynosi 0,7% a w Afryce ok. 2,4%) a z drugiej strony z wydłużającą się średnią życia człowieka (np. w Europie - 42,8 lata, w Ameryce Północnej - 40 lat i w Afryce - 24,3 lata). Niestety, wraz z wydłużaniem się długości życia ludzkiego, dochodzi do zwiększenia liczby chorych na choroby starcze takie jak choroba Alzheimera. Choroba ta postępuje powoli i związana jest ze zwyrodnieniem układu nerwowego. W jej przebiegu dochodzi do utraty neuronów w obszarach mózgu odpowiedzialnych za funkcje poznawcze. Pojawienie się takich chorób zwykle skazuje chorego na całodzienną opiekę, duże koszty państwa związane z leczeniem i hospitalizacją oraz wykluczeniem z życia społecznego nie tylko chorych ale także ich rodzin. Obecnie stosowane leki mogą wpływać jedynie na poprawę funkcji poznawczych i behawioralnych chorego, pod warunkiem że stosuje się je na wczesnym etapie choroby. Osoby chore posiadają zaburzenia nastroju oraz zachowania. Powodują narastający wzrost niesprawności i niechęć ze strony opiekunów. Współcześnie stosowane leczenie pozwala jedynie na zahamowanie progresji choroby a nie na jej wyleczenie. Nie ma obecnie, dopuszczonego do powszechnego stosowania, leku na chorobę Alzheimera, który działałby na przyczynę powstawania tej choroby. Trudno jest ją rozpoznać na wczesnych etapach, dlatego w momencie włączenia leczenia objawowego często jest już za późno. Choroba trwa przez 8 do 20 lat, powoli pozbawiając chorego zdolności do samodzielnego myślenia i życia. Choroba Alzheimera prowadzi ostatecznie do śmierci pacjenta w wyniku obecności tzw. blaszek amyloidowych oraz zwyrodnień neurofibrilarnych. Na świecie co 3 sekundy jedna osoba zapada na chorobę Alzheimera. Szacuje się że na świecie, w roku 2050, chorych na Alzheimera będzie 103 miliony ludzi. Powyższe dane wskazują na konieczność opracowania nowych terapii działających na wczesnych etapach choroby. Co prawda pojawiły się już pierwsze cząsteczki które są (w wybranych krajach) zarejestrowane do leczenia przyczynowego (np. przeciwciała monoklonalne), to jest to dopiero początek. W celu opracowania terapii czy nowych leków ważne jest dokładne poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za powstawanie tej choroby. W nurt tych badań wpisuje się praca doktorska mgr Adrian Żyły, w

której autorka postanowiła zrozumieć jakie są podstawy formowania się toksycznych oligomerów lub fibryli amyloidowych A β w chorobie Alzheimera, w obecności innych białek występujących u ludzi tj. ludzkiej cystatyny C (HCC) oraz ludzkiej albuminy (HSA). Co ciekawe białko HCC a raczej jego naturalnie występujący mutant L68Q, odpowiedzialne jest za powstawanie choroby neurodegeneracyjnej ale o nieco innym przebiegu.

Rozprawa doktorska mgr Adriany Żyły została wykonana pod opieką prof. dr hab. Macieja Kozaka z Wydziału Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza oraz dr Łukasza Popeny z Centrum Nanobiomedycznego Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, jako promotora pomocniczego. Praca powstała we współpracy naukowej z licznymi grupami naukowymi z kraju (Gdańsk, Warszawa) jak i z zagranicy (Rosja, Francja). We wszystkie prace badawcze, realizowane we współpracy Doktorantka była bezpośrednio zaangażowana. Badania były wykonane w ramach projektu NCN OPUS, natomiast wyjazd zagraniczny mgr. Żyły finansowany był z programu NCBR POWER (Polska) i programu ILL (Francja).

Całość rozprawy obejmuje 193 strony maszynopisu. Praca podzielona jest na 5 głównych rozdziałów (tj. część teoretyczna poprzedzona celem pracy, opis materiałów i metod, wyniki badań, dyskusje oraz spis literaturowy i załączniki). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów, choć w mojej opinii nie należy wyjaśniać skrótów używanych zgodnie z zapisami konwencji IUPAC. Spis piśmiennictwa obejmuje 197 pozycji i obejmuje w większości publikacje z ostatnich dziesięciu lat. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu nauk przyrodniczych i ścisłych. W pracy znalazłam kilka błędów edycyjnych (np. brak kropek, różne wcięcia czy zmiana rodzaju lub wielkości czcionki np. Unres zamiast UNRES itd.) oraz językowych (np. „desegregacji” a powinno być dezagregacji, „awzllow” (str. 33), jest fibrillation zamiast fibrilization (str. 33), a2M zamiast α 2M (str. 33), N-terminal fragment zamiast C-terminal fragment (str. 34), 6 mg/mL zamiast 6 mg/L (str. 34) itd.). Zaznaczyć należy, że praca doktorska napisana jest zrozumiałym językiem angielskim. W pracy Doktorantka umieściła kilkanaście tabel, kolorowych i wysokiej jakości rysunków, struktur i schematów, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Szczególną uwagę zwracają podziękowania, skierowane do promotora, współpracowników, rodziców i przyjaciół. Ich treść wskazuje, że Doktorantka potrafi współpracować ze specjalistami z zakresu różnych dziedzin naukowych (chemia - synteza chemiczna, modelowanie molekularne; biologia molekularna – praca z białkami; biofizyka - badania spektroskopowe i mikroskopowe).

Na początku lektury dysertacji Kandydatka przedstawiła główny cel swojej pracy doktorskiej, którym była **charakterystyka oddziaływania oraz zrozumienie mechanizmów kompleksowania peptydów A β w obecności ludzkiej cystatyny C oraz ludzkiej albuminy**. Do osiągnięcia zamierzonego celu Doktorantka postanowiła wykorzystać szereg zaawansowanych technik fizykochemicznych. Cel pracy postanowiła osiągnąć badając dwa różne fragmenty peptydu A β tj. 1-16 i 3-28 oraz natywny peptyd A β tj. 1-42. Nie znalazłam jednak w pracy szczegółowego uzasadnienia dla wyboru tych fragmentów peptydu A β . Dlaczego do badań wybrany został peptyd 1-16 który nie tworzy fibryli. Zabrakło również w tym miejscu wyjaśnienia dlaczego do badań Kandydatka wybrała białko V57G HCC a nie białko natywne.

Kolejna część pracy doktorskiej, zatytułowana „Wprowadzenie”, to zapoznanie czytelnika z zagadnieniami związanymi z chorobami neurodegeneracyjnymi ze szczególnym uwzględnieniem choroby Alzheimera. Mgr Żyła opisała w sposób bardzo zwięzły wpływ tej choroby na życie człowieka oraz wyjaśniła molekularne mechanizmy prowadzące do jej powstania. Najważniejszy z punktu widzenia tematyki recenzowanej pracy doktorskiej jest rozdział dedykowany oddziaływaniom peptydów A β z innymi białkami. Bardzo podoba mi się podział tych oddziaływań, zaprezentowany na Rys. 12, ze względu na białka które promują lub hamują fibrylizację peptydu A β . W

kolejnych dwóch podrozdziałach szczegółowo scharakteryzowała dwa białka, tj. ludzką cystatynę C (HCC) oraz ludzką albuminę (HSA) z uwagi na fakt, iż białka te oddziałują z peptydami A β , obniżając ich tendencję do agregacji lub opóźniając proces fibrylizacji.

Kolejne podrozdziały pracy doktorskiej dotyczą omówienia podstaw teoretycznych stosowanych przed Doktorantką technik fizykochemicznych. Zastosowała ona, w mojej opinii, nowoczesne i odpowiednie metody badawcze, do których należały: (i) spektrometria mas (MS), (ii) małokątowe rozpraszanie promieni rentgenowskich (SAXS) i neutronów (SANS), (iii) mikroskopia sił atomowych (AFM), (iv) elektronowa mikroskopia transmisyjna (TEM), (v) obliczenia dynamiki molekularnej (MD) i dokowanie molekularne, (vi) ultrawiórowanie analityczne (UA) oraz (vii) spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Opis poszczególnych metod jest bardzo przystępny i zrozumiały nawet dla niespecjalistów. Ze szczególnym zainteresowaniem przeczytałam opis metod SAXS i SANS oraz sposoby analizy danych eksperymentalnych.

Następny rozdział dysertacji, zatytułowany „Materiały i metody” zawiera informację o zastosowanych materiałach oraz protokołach wykonanych podczas syntezy i oczyszczania peptydów A β oraz podczas nadprodukcji białek. Doktorantka opisała szczegółowo wszystkie parametry techniczne dla zastosowanych technik tj. SAXS, SANS, modelowanie struktur na podstawie danych SAXS i SANS, AFM i TEM, spektroskopia NMR. Wymieniła także zastosowane przez siebie oprogramowanie i bazy danych z których korzystała. Liczba zastosowanych programów przez Kandydatkę jest bardzo duża i nie zawsze znajdowała się informacja dlaczego i do czego zostały zastosowane. Kiedy np. stosowano dokowanie z wykorzystaniem programu PatchDock, FoXSDocs a kiedy Cabs Dock? Czy wszystkie obliczenia MD były wykonywane z wykorzystaniem modelu gruboziarnistego w polu siłowym UNRES? W mojej opinii brakuje w pracy pełnych informacji na temat szczegółowych parametrów obliczeniowych, choć rozumiem, że ich wypisanie wiązałoby się ze znacznie rozbudowanym opisem tej części pracy.

Kolejny rozdział pracy zawiera opis uzyskanych wyników. Mgr Żyła podzieliła ten rozdział ze względu na stosowane techniki badawcze a nie badane obiekty badawcze. Oczywiście można by tego podziału dokonać odwrotnie ale jest to odwieczny i często nierozstrzygalny dylemat piszącego doktoranta i opiekującego się nim promotora. W pierwszym podrozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki z badań MS podczas których badała wpływ heksafluoroizopropanolu (HFIP) na stopień dezagregacji oligomerów A β do niższych form czy monomerów. Zarejestrowała widma MS kompleksów peptydów A β z białkiem HSA, potwierdzając że biomolekuły te oddziałują ze sobą. Tego eksperymentu nie wykonała jednak dla kompleksu A β -HCC, dlaczego? Wyniki pomiarów MS umieściła w Tabeli 3, podając masy cząsteczkowe badanych peptydów i białek. Czy na pewno są to masy cząsteczkowe? Nie rozumiem również dlaczego w Tabeli tej podane zostały teoretycznie obliczone wartości dla peptydów 1-16 i 3-28 skoro widma MS dla tych peptydów zostały wcześniej wykonane (Rys. 43). W kolejnym podrozdziale mgr Żyła scharakteryzowała pod względem morfologicznym fibryle peptydu A β 1-42 oraz mieszaniny tych fibryli z białkiem HSA, z tym że próbki pochodziły z wcześniej wykonanego eksperymentu SANS. Wniosek jaki płynie z tego eksperymentu jest taki że białko HSA prowadzi do skrócenia długości fibryli peptydu A β 1-42, choć trudno to ocenić na podstawie dwóch zdjęć TEM (Rys. 46). Być może należałoby dokonać pomiaru długości i szerokości fibryli z kilkudziesięciu zdjęć TEM i pokazać statystyczny rozkład. Należy jednak podkreślić, że uzyskany wynik jest bardzo ważny w świetle badania mechanizmów odpowiedzialnych za proces fibrylizacji peptydu A β . Czy podobne eksperymenty wykonane zostały dla peptydu A β 3-28? W następnym podrozdziale Doktorantka opisała wyniki z wykorzystaniem techniki ultrawiórowania analitycznego, które wykonała dla pojedynczych białek oraz dla kompleksu HCC-HSA o różnych stosunkach molowych. Wyniki tych badań pokazują, że białko HCC, choć raczej chodzi o wariant V57G HCC, występuje w formie monomeru podczas gdy HSA tworzy mieszaninę monomeru i dimeru. Niestety, Doktorantka nie zaobserwowała piku sedymentacyjnego charakterystycznego dla kompleksu HCC-HSA a jedynie dla

pojedynczych białek. Zauważyła również, że we wszystkich próbkach zaobserwowała zanieczyszczenia. Skąd mogą pochodzić te zanieczyszczenia? Z uwagi na to iż nie zaobserwowany został kompleks HCC-HSA to w jaki sposób można by zmodyfikować procedurę, żeby uzyskać dane na temat tworzenia się kompleksu białko-białko z wykorzystaniem ultrawierowania analitycznego? Kolejna obszerna część pracy dotyczy, w mojej opinii, najbardziej wartościowych wyników recenzowanej rozprawy doktorskiej, mianowicie eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki SAXS i SANS dla kompleksów HCC-A β oraz HSA-A β . Dodatkowo wykonane zostały eksperymenty SAXS dla pojedynczych białek HSA i HCC oraz dla kompleksu HCC-HSA i SANS dla procesu dezagregacji fibryli A β 3-28 i 1-42. Obie techniki dostarczają informacji o dużych grupach, takich jak struktura cząstek oraz zespołach cząstek/makrocząstek w skali do setek nanometrów. Sygnał wiązki padającej pod wysokim kątem opisuje strukturę krystaliczną na poziomie atomowym. Dlatego, techniki te doskonale nadają się do badania tak dużych układów jak fibryle peptydowe oraz ich kompleksy z białkami. Niewątpliwie analiza uzyskanych wyników SAXS i SANS oraz uzyskanie informacji o kształcie badanej cząsteczki nie jest proste. Dodatkowo, Kandydatka musiała nabyć umiejętności związanych z dokowaniem molekularnym i wyborem najbardziej optymalnego i uzasadnionego modelu kompleksów A β -białko. Z eksperymentu SANS dla kompleksu HSA-A β (1-16, 3-28 i 1-42) nie udało się uzyskać wysokiej rozdzielczości parametrów z uwagi na problemy z wytrącaniem się próbek. Jednak były one wystarczające do zaproponowania kształtu tych kompleksów i które zostały szczegółowo opisane w rozdziale poświęconemu dyskusji wyników. W przypadku badań SANS dla kompleksu HCC-A β (3-28 i 1-42, dlaczego nie był badany fragment 1-16 skoro był badany w kompleksie z HSA?) mgr Żyła uzyskała bardzo ciekawe wyniki, gdyż udowodniła, że białko HCC (a właściwie wariant V57G) „rozpuszcza” włókna A β 3-28. W przypadku fibryli utworzonych przez peptyd A β 1-42 były one odporne na działanie HCC. Wynik eksperymentu SANS został potwierdzony przez Kandydatkę w badaniach AFM, gdzie wyraźnie widać zmianę morfologii fibryli A β 3-28 pod wpływem obecności białka HCC. Tutaj pojawia się jedynie pytanie dotyczące peptydu A β 3-28. Czy peptyd ten występuje w ludzkich złogach amyloidowych i czy najważniejsze osiągnięcie tej pracy doktorskiej można przenieść na procesy *in vivo* występujące u ludzi? Jak można wyjaśnić, że peptyd A β 1-42 nie ulega dezagregacji w warunkach *in vitro*, choć w badaniach *in vivo* (dane literaturowe) podobny efekt był obserwowany. Ostatnią techniką którą zastosowała Doktorantka do analizy kompleksu HCC-HSA była spektroskopia NMR. Wyniki tych badań pokazały, że pomimo braku zmian w przesunięciach chemicznych to szybkość relaksacji R2 dla białka HSA uległa zmianie. Wskazuje to na słabe i prawdopodobnie niespecyficzne oddziaływanie obu białek. Doktorantka napisała, że możliwe jest, że białka te mogą oddziaływać w sposób niebezpośredni, napędzając oddziaływania hydrofobowe poprzez motyw β -kartki. Proszę o wyjaśnienie co dokładnie miała na myśli pisząc o takim rodzaju oddziaływań?

Ostatni rozdział dysertacji doktorskiej, zatytułowany „Dyskusje” zawiera dokładną charakterystykę strukturalną modeli kompleksów HCC-A β oraz HSA-A β , uzyskanych na podstawie danych eksperymentalnych. Charakterystyka ta jest umieszczona w świetle znanych danych literaturowych. Uważam, że dyskusja przeprowadzona przez Doktorantkę jest dojrzała i pokazuje doskonałą znajomość podjętej tematyki badawczej. Doktorantka udowadnia w nim, że białka HCC i HSA pełnią w organizmie człowieka rolę neuroprotekcyjną z uwagi na wiązanie i/lub dezagregację oligomerów A β .

Uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest interesująca i niezwykle potrzebna w świetle poznania molekularnych przyczyn powstawania fibryli A β oraz sposobu ich dezagregacji z udziałem innych białek ludzkich. Cel pracy został w pełni osiągnięty przez Doktorantkę. Rozprawa mgr Adrian Żyły zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W

tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Adrian Żyły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne. Ponadto, mając na względzie wkład odkryć Doktorantki w prace nad wyjaśnieniem wpływu białek HCC i HSA na powstawanie toksycznych oligomerów i fibryli A β oraz udowodnienie, że ludzkie białko HCC jest odpowiedzialne za "rozpuszczanie: fibryli amyloidowych A β 3-28 zwracam się do Wysockiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.



Sylwia Rodziewicz-Motelnik