

Warszawa, dnia 6.10 2015 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik  
Wydział Chemii  
Uniwersytetu Warszawskiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Sosnowskiej pt.: „*Badania fibrylizacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A oraz jego krótkich N-terminalnych fragmentów*”**

Poznanie przyczyn występowania chorób neurodegeneracyjnych i opracowanie możliwych dróg interwencji spowalniających ich rozwój należy do największych wyzwań współczesnej chemii medycznej. Dlatego też badania prowadzone w tej dziedzinie stanowią przedmiot zainteresowania bardzo wielu grup badawczych. Jest to również od wielu lat tematyka badawcza Zakładu Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemi Uniwersytetu Gdańskiego. Do tego nurtu badań można też zaliczyć przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską mgr Marty Sosnowskiej, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Franciszka Kasprzykowskiego. W moim przekonaniu, tematykę badawczą mgr Sosnowskiej uznać należy za bardzo aktualną i ważną zarówno z poznawczego jak i utylitarne punktu widzenia.

Mgr Marta Sosnowska za cel swoich badań wyznaczyła wyjaśnienie przyczyn oraz mechanizmu agregacji osoczowego białka amyloidu A. Cel ten jest niezwykle ważny z punktu widzenia medycznego ponieważ poznanie mechanizmów prowadzących do powstawania toksycznych fibryli jest niezwykle istotne dla diagnostyki chorób neurodegeneracyjnych i może w przyszłości stanowić punkt wyjścia do poszukiwania skutecznego leku. Głównym celem doktorantki były badania fibrylizacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A (rSAA1.1) i jego *N*-terminalnych fragmentów oraz określenie czynników mających wpływ na agregację, mechanizm oraz kinetykę tworzenia fibryli.

Poszczególne etapy jej pracy to:

1. Projektowanie i synteza peptydów stanowiących fragment *N*-końca osoczowego białka amyloidu A (zarówno ludzkiego, jak i mysiego)
2. Badanie tendencji do agregacji otrzymanych peptydów
3. Badanie roli reszt aminokwasów aromatycznych w procesie tworzenia fibryli
4. Poszukiwanie związków wywodzących się z amyloidogennego rejonu białka SAA i peptydu A $\beta$  zdolnych do hamowania procesu fibrylizacji białka SAA
5. Określenie mechanizmu tworzenia oligomerów i fibryli amyloidowych przez osoczowe białko amyloidu A.

Praca doktorska mgr Marty Sosnowskiej ma układ klasyczny dla prac chemicznych, składa się ze wstępu literaturowego (52 strony), celu pracy (4 strony), opisu przeprowadzonych eksperymentów (23 strony), prezentacji i omówienia wyników (50 stron) i podsumowania (2 strony). Praca zawiera również spis tabel, rysunków oraz wykaz stosowanych skrótów i spis literatury cytowanej.

W części literaturowej swojej rozprawy doktorantka przedstawiła stan obecnej wiedzy dotyczący amyloidozy, mechanizmu tworzenia i inhibicji fibryli amyloidowych. W szczególności pod kątem

amyloidogenności i wartości diagnostycznej omówiła osoczowe białko amyloidu A (SAA) przedstawiając jego budowę i funkcję oraz rolę w fizjologii komórki i stanach patologicznych. Ponieważ duża część pracy doktorskiej mgr Sosnowskiej dotyczyła badań strukturalnych to odrębne rozdziały części literaturowej doktorantka poświęciła na omówienie zagadnień związanych z analitycznymi metodami badań struktury fibryli amyloidowych (FTIR, stosowane barwniki) i badaniom białek poprzez wymianę proton-deuteron połączonej ze spektrometrią mas. Wszystkie rozdziały są bardzo dobrze udokumentowane stosownymi rysunkami co powoduje, że czyta się go łatwo i z dużym zainteresowaniem. Przedstawione wprowadzenie literaturowe bardzo dobrze przygotowuje do rozdziału, w którym doktorantka omawia wyniki szeroko zaplanowanych badań własnych.

Pierwszym etapem pracy doktorskiej mgr Marty Sosnowskiej była synteza 24 peptydów o różnej długości zawierających od 5 do 15 reszt aminokwasowych. Sekwencje te pochodziły z postulowanego amyloidogennego rdzenia ludzkiego i mysiego białka SAA. Wszystkie zaplanowane peptydy (w formie amidów) zostały otrzymane na nośniku stałym (TentaGel R RAM) bądź przy użyciu syntezy, bądź z wykorzystaniem reaktora mikrofalowego według strategii Fmoc. Doktorantka podała w pracy dokładnie warunki oczyszczania (zastosowany gradient, rodzaj kolumny) i charakterystykę otrzymanych peptydów (czas retencji, MS). Na szczególną pochwałę zasługuje podanie otrzymanych ilości produktów - surowych i po oczyszczeniu, choć szkoda, że doktorantka nie dodała kolumny z wydajnością oczyszczania, co doskonale zilustrowałoby problemy związane z oczyszczaniem poszczególnych peptydów.

Następnym etapem pracy doktorskiej mgr Sosnowskiej były badania tendencji do agregacji otrzymanych peptydów polegające na wykorzystaniu badań spektrofluorymetrycznych w obecności barwnika – tioflawiny T (test tioflawinowy). Ponadto, do scharakteryzowania morfologii fibrylarnych agregatów doktorantka używała transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Ten etap pracy wskazał, że tendencja do tworzenia fibryli zależy od długości oraz składu aminokwasowego i wskazał, że ważnymi elementami tych oddziaływań są oddziaływania pomiędzy resztą kwasu asparaginowego z grupą aromatyczną (w mysim SAA), lub grupą guanidynową i grupą karboksylową w łańcuchu bocznym kwasu asparaginowego lub grupą aromatyczną (w ludzkim SAA), stabilizując w ten sposób  $\beta$ -karkę.

Ponieważ z doniesień literaturowych wynika, że oddziaływania aromatyczne odgrywają ważną rolę w mechanizmie tworzenia fibryli różnych peptydów i białek, a jeden z otrzymanych przez doktorantkę peptydów (SAA1-12) zawierał aż 4 reszty fenyloalaniny, dlatego też w celu określenia roli reszt aromatycznych w mechanizmie tworzenia fibryli amyloidowych doktorantka zaprojektowała analogi fragmentu tego peptydu, w których poszczególne reszty aminokwasów aromatycznych (pojedyncze, lub kilka na raz) zamieniła na resztę alaniny. Analogi te były zbadane testem tioflawinowym i TEM. Wyniki testu tioflawinowego wskazały, że jedynie podstawienie reszty fenyloalaniny w pozycji 11 nie powoduje całkowitego zahamowania tendencji do fibrylizacji. Otrzymane wyniki pokazały, że oddziaływania aromatyczne ( $\pi$ - $\pi$ ) odgrywają istotną rolę również w procesie fibrylizacji białka SAA. W celu określenia roli reszty fenyloalaniny do tworzenia przez analogi peptydu SAA1-12 kompleksu z białkiem SAA doktorantka przeprowadziła również badania metodą chromatografii powinowactwa, które potwierdziły, że fenyloalanina w pozycji 11 jest istotna dla oddziaływań międzycząsteczkowych z białkiem SAA.

Wydzielonym fragmentem badań doktorantki było zaprojektowanie krótkich peptydów homologicznych do natywnej, N-terminalnej sekwencji SAA, potencjalnie zdolnych do zmniejszania tendencji do agregacji.

Tendencje do formowania fibryli zostały zbadane testem tioflawinowym i badaniami turbidancji. Peptydy wykazujące brak skłonności do tworzenia włókien zostały przetestowane jako potencjalne inhibitory fibrylizacji N-terminalnych peptydów SAA (ludzkiego i mysiego). Spośród badanych związków dobrymi inhibitorami okazały się 2 peptydy SAA1-5 i A $\beta$ 17-20. Przypuszczalnie te krótkie peptydy poprzez oddziaływania z rejonem amyloidegenym białka SAA utrudniają łączenie się kolejnych cząsteczek białka we włókno fibrylarne. Ponieważ oba te peptydy zawierają sekwencję dwóch reszt fenyloalaniny, więc wydaje się, że to właśnie oddziaływania  $\pi$ – $\pi$  odgrywają istotną rolę w powstaniu efektu inhibicji.

Doktorantka wykonała również badania procesu agregacji ludzkiego białka SAA. Badania te potwierdziły zdolności inhibicyjne peptydu SAA1-5. Peptyd A $\beta$ 17-20 nie został przebadany z powodu niskiej rozpuszczalności w buforze TRIS, w którym wykonywane były wszystkie badania agregacji białka SAA.

Bardzo ciekawe wyniki doktorantka otrzymała w wyniku wykonanego sączenia molekularnego białka SAA. Wyniki te jednoznacznie potwierdziły istnienie natywnie heksamerycznej formy białka i wskazały na potencjalnie 2 ścieżki jego agregacji: 1). Do tworzenia fibryli amyloidowych dochodzi przez asocjację wyższych form oligomerycznych, oraz 2). Agregację poprzedza dysocjacja heksameru do monomeru i te cząsteczki ulegają następnie agregacji.

Ostatni etap pracy stanowiły badania mechanizmu tworzenia fibryli amyloidowych z zastosowaniem techniki wymiany izotopowej proton  $\rightarrow$  deuteron połączonej ze spektrometrią mas (HDXMS). Badania te miały na celu zbadanie różnic w strukturze formy monomerycznej białka SAA i powstałych oligomerów/fibryli i wskazanie kluczowych regionów biorących udział w procesie oligomeryzacji. Dodatkowo chcąc określić wpływ inhibitora (peptydu SAA1-5) na proces formowania wyższych form oligomerycznych białka SAA doktorantka zbadła różnicę w inkorporacji deuteronów w kompleksie białko-peptyd, w formie natywnej i zagregowanej. Wyniki tych badań wskazały, że istnieje niewielka tendencja wymiany protonów amidowych na deuteron, co świadczy o dużym stopniu uporządkowania struktury białka. Badania HDXMS wskazały również na istotne zaangażowanie N-terminalnego fragmentu białka (1-18) w proces fibrylizacji i potwierdziły oddziaływania peptydu SAA1-5 (inhibitora) z tym rejonem wskazując, że jest to rejon kluczowy w tworzeniu oddziaływań skutkujących procesem agregacji.

Pracę doktorską mgr Marty Sosnowskiej przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Praca jest napisana dobrą polszczyzną, przejrzyste, jest również dobrze ilustrowana zdjęciami i tabelami. I tylko z obowiązku recenzenta chciałabym wymienić kilka zauważonych błędów i zadać pytania:

1. Wydaje mi się, że trochę niezręcznie zostały przypisane skróty badanych peptydów. Na stronie 130 doktorantka podaje pełną sekwencję rekombinowanego ludzkiego białka SAA, które używała w swoich badaniach. Jednak w nazewnictwie swoich peptydów, które były N-końcowymi fragmentami białka SAA doktorantka jako podstawę przyjęła sekwencję białka naturalnego (bez metioniny na N-końcu). Stąd pojawiły się skróty SAA1-11, SAA1-12. Jednak jest dla mnie niezrozumiałe oznaczenie peptydu skróconego o N-końcową argininę skrótem SAA(-1)-12, co raczej powinno być oznaczone jako SAA2-12. Jednakże doktorantka zastosowała skrót SAA2-12 do analogu zawierającego dodatkową metioninę (czyli odpowiadającemu N-końcowemu fragmentowi rSAA). Trochę to było dla mnie mylące.

2. Zauważyłam też kilka nieścisłości w opisie syntez, np. w tabeli na str. 73 podany czas deprotekcji wynosi 2x5min, a w opisie powyżej tabeli podane są 2 minuty, czas tworzenia wiązania peptydowego w

tabeli jest 2x5 min 15 sek, a w opisie podano tylko 5min 15 sek. Ciekawa jestem również czy te 15 sekund miało rzeczywiście znaczenie?

3. W pracy zauważyć można wiele literówek, zdarzających się nawet w tytułach (np str. 81 „moikroskop”, str. 110 „amyloidgennego”, str. 20 ugrupowanie „aidowe”), co pewnie było spowodowane pośpiechem na ostatnim etapie dokonywania korekty pracy. Błędem jest również stawianie kropek po tytułach (pracy, rozdziałach lub podrozdziałach).

Oczywiście wymienione powyżej drobne usterki nie mają wpływu na wartość naukową rozprawy i nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej opinii o tej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że zakres pracy doktorskiej mgr Marty Sosnowskiej był niezwykle szeroki. Obejmował on zarówno syntezę peptydów, ich izolację i różnorodne badania z zakresu tworzenia i analizy fibryli. Stosowanie tak wielu technik wymagało od doktorantki wszechstronnego przygotowania, zarówno teoretycznego, jak i eksperymentalnego. Na szczególną pochwałę zasługują przeprowadzone przez doktorantkę badania mechanizmu tworzenia fibryli amyloidowych z zastosowaniem techniki wymiany izotopowej proton → deuteron połączonej ze spektrometrią mas (HDXMS). Badania te wymagały wykonywania trawienia enzymatycznego, przeprowadzenia analizy masowej fragmentów, korzystania z bazy MASCOT i zastosowania aparatu statystycznego. Opanowanie wszystkich tych umiejętności świadczy o dużych zdolnościach i wiedzy mgr Marty Sosnowskiej. Według mnie do największych osiągnięć jej pracy doktorskiej należy zaliczyć wykazanie własności inhibicyjnych analogu SAA1-5, który może stać się związkiem wiodącym w dalszych poszukiwaniach inhibitorów procesu fibrylizacji białka SAA.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr Marty Sosnowskiej zatytułowana **„Badania fibrylizacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A oraz jego krótkich N-terminalnych fragmentów”** spełnia wszelkie wymagania stawiane ustawą o stopniach i tytule naukowym i zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marty Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*D. Piścilo*