

dr hab. Anna Łęgowska, prof. UG

Gdańsk, 18 września 2015 r.

Wydział Chemii

Uniwersytetu Gdańskiego

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marty Sosnowskiej

zatytułowanej „Badania fibrylizacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A oraz jego krótkich N-terminalnych fragmentów.”

Pod nazwą amyloidoza kryje się grupa schorzeń charakteryzująca się pozakomórkowym gromadzeniem nierozpuszczalnych włókienek amyloidu w przestrzeniach pozanaczyniowych w różnych tkankach i narządach, co prowadzi do ich niewydolności. Amyloidozę tradycyjnie dzieli się na pierwotną i wtórną. Pierwotna (gromadzenie białka AL) jest związana z gammapatią monoklonalną, szpiczakiem mnogim i innymi nowotworami immunocytowymi. Amyloidoza wtórna (AA, amyloidoza reaktywna) występuje w większości przypadków w przebiegu przewlekłych chorób zapalnych. Amyloidoza może mieć charakter miejscowy, ograniczony do jednego narządu lub układowy związany z zajęciem wielu narządów. Podstawą klasyfikacji amyloidozy jest typ białka prekursorowego tworzącego strukturę włókienkową amyloidu. Znanych jest ponad 25 typów białka prekursorowego. Poszczególne typy amyloidu różnią się powinowactwem do narządów docelowych, wśród których najczęściej wymienia się nerki, wątrobę, układ sercowo-naczyniowy, przewód pokarmowy oraz obwodowy i autonomiczny układ nerwowy.

W krajach rozwijających się podłożem amyloidozy AA są przewlekłe infekcyjne stany zapalne, natomiast w społeczeństwach o wysokim statusie socjoekonomicznym – choroby reumatyczne. W Europie powikłania amyloidozy wtórnej dotyczą 0,005% populacji zarówno mężczyzn, jak i kobiet powyżej 50-go roku życia. W blisko połowie przypadków choroba pozostaje niezdiagnozowana.

Jak dotąd nie opracowano skutecznego sposobu leczenia amyloidozy. Do jego opracowania doprowadzić może poznanie przyczyn oraz mechanizmu prowadzącego do powstania toksycznych fibryli. Dlatego też badania nad tym procesem prowadzone są przez

wiele grup badawczych. Do tego nurtu badań można włączyć przedłożoną mi do recenzji pracę doktorską mgr Marty Sosnowskiej wykonaną pod kierunkiem prof. Franciszka Kasprzykowskiego.

Zadaniem jakie postawiono przed Doktorantką były badania dotyczące możliwości i warunków tworzenia fibryli amyloidowych przez peptydy wywodzące się z *N*-końcowego fragmentu ludzkiego i mysiego białka amyloidu A (SAA) i przez ich analogi oraz przez ludzkie osoczowe białko amyloidu A, a także badanie struktury tego białka.

Recenzowana rozprawa napisana została na 154 stronach, a jej układ jest typowy dla tego rodzaju prac. W rozprawie wyróżniono sześć części: przegląd literaturowy, rozdział poświęcony celowi pracy, w którym wyjaśniono wybór sekwencji otrzymanych peptydów oraz przeprowadzonych eksperymentów, część eksperymentalną zawierającą opis przeprowadzonych badań oraz trzy rozdziały, na które składają się: omówienie wyników, podsumowanie oraz literatura cytowana – 147 pozycji. Ponad połowę objętości pracy zajmuje opis eksperymentów wykonywanych przez Kandydatkę oraz dyskusja uzyskanych wyników, co uważam za właściwe.

Część pierwsza, zawierająca sześć rozdziałów, wprowadza w tematykę badań własnych mgr Sosnowskiej. Znajduje się w niej opis amyloidoz, charakterystyka tworzących się w czasie choroby amyloidów, omówienie mechanizmu powstawania fibryli, oraz rozdział poświęcony osoczowemu białku amyloidu A. W części tej opisane zostały także analityczne metody badań struktury fibryli amyloidowych. Ostatni rozdział tej części poświęcony został wymianie protonów białka na deuterony, połączonej ze spektrometrią mas (HDXMS), która pozwala na badanie struktury białek. Poziom merytoryczny tej części rozprawy jest właściwy dla tego rodzaju prac i dobrze przygotowuje do czytania rozdziałów, w których omówione zostały badania własne. Umieszczone w pracy rysunki i schematy ułatwiają lekturę tekstu. Nie mam też zastrzeżeń do strony językowej, aczkolwiek Kandydatka kilka razy niepoprawnie sformułowała zdania sprawiając, że stały się one mało zrozumiałe. Na przykład na końcu str. 27 i początku 28, napisała: „W celu zwiększenia rozpuszczalności peptyd KLVFF został rozbudowany na jego *N*- i *C*- końcu odpowiednio o reszty RG i GR (RGKLVFFGR-NH₂), w dalszym ciągu wykazuje całkowitą inhibicję tworzenia fibryli amyloidowych..”. Można się tylko domyślać, że pomimo dołączenia dodatkowych reszt aminokwasowych peptyd w dalszym ciągu hamował tworzenie fibryli amyloidowych. Na str.29 jest napisane „...gdy stosuje się peptydy jako lek, muszą być one chemicznie modyfikowane tak, aby zmniejszyć degradację proteolityczną..”. Powinno być napisane „aby zmniejszyć ich podatność na degradację proteolityczną”.

Celem pracy były szeroko zaplanowane badania zarówno warunków i mechanizmu powstawania fibryli jak i ich morfologii, ale żeby je wykonać, Doktorantka musiała zsyntetyzować i oczyścić szereg potrzebnych do zaplanowanych eksperymentów peptydów. Patrząc na ich sekwencje przypuszczam, że część z nich sprawiła Doktorantce sporo kłopotu zarówno w syntezie jak i przy oczyszczaniu, ale w rozdziale 7, dotyczącym ich syntezy i oczyszczania, nie ma na ten temat informacji. Uważam, że pokazanie chociaż kilku chromatogramów peptydów po syntezie, a potem po oczyszczeniu oraz podanie informacji o rodzaju zanieczyszczeń znacząco wzbogaciłoby ten rozdział. W omawianym rozdziale znalazłam też drobne błędy jak np. niewłaściwe numery tabel przedstawionych na stronach 75 i 77.

Następnym etapem pracy doktorantki było zbadanie tendencji otrzymanych peptydów, wywodzących się z *N*-terminalnego rejonu ludzkiego i mysiego białka SAA, do tworzenia fibryli oraz scharakteryzowanie morfologii powstałych agregatów. Otrzymane peptydy wykazywały tendencję do tworzenia fibryli, a najsilniejsze skłonności do tworzenia fibryli wykazał peptyd oznaczony jako SAA1-12. Badania pokazały, że proces ten w dużym stopniu zależy od temperatury i stężenia peptydu. I tu muszę zwrócić uwagę na fakt, że mimo iż rozdział 8.1., dotyczący tych badań zatytułowany jest „Fibrylizacja peptydów SAA1-12 i mSaa1-11 w zależności od stężenia peptydu i temperatury” nie opisano w nim badań dotyczących zależności procesu fibrylizacji od stężenia peptydów. Że takie badanie wykonano, dowiadujemy się dopiero czytając część pracy omawiającej uzyskane wyniki. Otrzymane w badaniach z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego mikrografy potwierdziły fibrylarną postać otrzymanych agregatów, i pokazały, że ich kształt zależy od sekwencji i długości łańcucha peptydowego. Omawiając ten fragment pracy, z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na fakt błędnego zacytowania publikacji Schwansa i współpracowników na str. 106. Błąd wkradł się w pisownię nazwiska pierwszego autora, podano również niewłaściwy rok ukazania się publikacji. Na str. 99 natomiast, doktorantka omawiając tendencje peptydów do tworzenia fibrylarnych agregatów, dwa razy odwołała się do rys. 29, a powinna do rys. 28.

Kolejne zadanie polegało na określeniu roli reszt aromatycznych w procesie agregacji peptydów. Badania analogów uzyskanych poprzez zastępowanie kolejnych reszt Phe peptydu SAA1-12 przez resztę Ala pokazały, że tylko wymiana reszty Phe w pozycji 11 nie powoduje zahamowania tendencji peptydów do fibrylacji. Wymiana reszty Phe z pozycji 3, 4 czy 6 lub wszystkich trzech, prowadzi do utraty właściwości amylogennych tych peptydów. Uzyskane

przez mgr Sosnowską wyniki wskazują na istotną rolę w procesie fibrylacji interakcji z udziałem pierścieni aromatycznych.

Kolejne badania, z wykorzystaniem krótkich peptydów (tabela 7), doprowadziły do znalezienia dwóch inhibitorów procesu agregacji *N*-terminalnych peptydów SAA i białka rSAA1.1

W następnym etapie badań, Doktorantka zastosowała sączenie molekularne do rozdzielania mieszanin, uzyskanych przez pobieranie po określonym czasie inkubacji, próbek z roztworu białka rSAA1.1. w buforze Tris-HCl. Uzyskane chromatogramy pozwoliły doktorantce na potwierdzenie faktu, że natywne białko rSAA1.1. jest heksamerem, oraz na zaproponowanie dwóch potencjalnych ścieżek jego agregacji.

Ostatni etap pracy Kandydatki polegał na badaniu procesu powstawania fibryli za pomocą spektrometrii mas połączonej z wymianą izotopową. Eksperymenty HDXMS wykonano dla czterech różnych roztworów: białka natywnego, białka natywnego i peptydu SAA1-5 będącego inhibitorem procesu agregacji, białka zagregowanego oraz białka, które agregowało w obecności inhibitora SAA1-5. Uzyskane wyniki pokazały, że tylko niewielka ilość protonów amidowych natywnej formy białka rSAA1.1 uległa wymianie na deuter, co wskazuje na zwartą budowę białka. Wyniki badań potwierdziły fakt, że to właśnie *N*-końcowy fragment białka (1-18) zaangażowany jest w proces fibrylizacji. Po przeczytaniu części pracy dotyczącej badań HDXMS, mam pewien niedosyt związany z mało dokładnym opisem wykonanych prac eksperymentalnych. Brakuje informacji dotyczących np. warunków w jakich przeprowadzono proces trawienia białka pepsyną. Nie ma też informacji czy Doktorantka samodzielnie immobilizowała pepsynę na złożu agarozowym, czy też złoże takie zostało zakupione. Z powinności recenzenta muszę też zwrócić uwagę na niefortunnie zredagowane pierwsze zdanie rozdziału 12.1.4. Kandydatka napisała; "...deuterowaną próbkę białka (45µl) wstrzykiwałam do pętli o pojemności 50 µl, gdzie była poddawana trawieniu enzymatycznemu w systemie on-line z zastosowaniem pepsyny unieruchomionej na złożu agarozowym.", co może sugerować, że trawienie miało miejsce w pętli, a nie w kolumnie. Nie podoba mi się także sformułowanie pierwszej części zacytowanego fragmentu, poprawnie byłoby "...próbkę roztworu deuterowanego białka (45µl) wstrzyknęłam do pętli..".

Podsumowując stwierdzam, że Kandydatka zrealizowała cele rozprawy. Zaprojektowane na bazie *N*-końca białka SAA peptydy okazały się być dobrymi modelami do badań procesu fibrylizacji. Wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przedstawionych w

rozprawie. Ich zakres jest szeroki: od niewątpliwie trudnych syntez peptydów, przez badania, z zastosowaniem różnorodnych technik badawczych procesu fibrylizacji i morfologii powstających fibryli, do eksperymentów z wykorzystaniem HDXMS. Na uznanie zasługuje także sposób prezentacji wyników i prowadzenia dyskusji przy ich omawianiu, a dostrzeżone przeze mnie usterki i nieścisłości nie obniżają wartości pracy. Wszystkie umiejętności jakimi wykazała się Doktorantka pozwalają stwierdzić, że jest ona dobrze przygotowana do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Nadmienić też należy, że praca naukowa mgr Marty Sosnowskiej współfinansowana była ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytetu IV, projekt pt. „Program wdrożenia nowoczesnych elementów kształcenia w Uniwersytecie Gdańskim”, Zadanie „Stypendia naukowe dla doktorantów szansą na rozwój gospodarki” oraz przez Narodowe Centrum Nauki w ramach Konkursu Preludium II.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie kryteria ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. IJ. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr782, poz. 7228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz.455) i zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marty Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.