

dr hab. CEZARY CZAPLEWSKI, prof. UG

Gdańsk, 22.10.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Martyny Maszoty-Zieleniak  
pt.: „Struktura i dynamika peptydów i białek amyloidogennych  
na przykładzie serum amyloidu A i ludzkiej cystatyny C”

Praca doktorska mgr Martyny Maszoty-Zieleniak poświęcona jest badaniom strukturalnym serum amyloidu A i ludzkiej cystatyny C, a także określeniu oddziaływań pomiędzy tymi białkami. Tematyka pracy należy do szerokiego obszaru badań strukturalnych peptydów i białek z wykorzystaniem danych NMR prowadzonych w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego kierowanej przez dr hab. Sylwię Rodziewicz-Motowidło prof. UG, promotora recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej mają charakter badań podstawowych i wykorzystują zarówno metody teoretyczne jak i eksperymentalne. Wybrane białka, serum amyloidu A (SAA) i ludzka cystatyna C (hCC), są białkami amyloidowymi związanymi z występowaniem chorób cywilizacyjnych XXI wieku. Agregacja białka SAA w postaci nierozpuszczalnych złogów amyloidowych jest konsekwencją reumatoidalnego zapalenia stawów. Natomiast tworzenie się złogów amyloidowych białka hCC z mutacją L68Q prowadzi do powstania dziedzicznej amyloidowej angiopatii mózgowej.

Recenzowana rozprawa doktorska przedstawiona jest na 154 stronach. Układ rozprawy jest zgodny z układem prac doktorskich z dziedziny chemii. Zawiera ona siedem głównych rozdziałów poprzedzonych spisem stosowanych skrótów, a zakończonych podsumowaniem i cytowaną literaturą (202 pozycji). Rozdział ósmy stanowią załączniki ze szczegółowymi danymi NMR (lista wiązań wodorowych, lista przesunięć chemicznych, fragmenty widm NMR, statystyka sygnałów, itp.). Dodatkowo w rozdziale dziewiątym doktorantka zaprezentowała swój dorobek naukowy.

Rozdział zatytułowany *Wstęp teoretyczny* (41 stron) zgodnie z tytułem wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy doktorskiej: począwszy od znaczenia prowadzonych badań, poprzez omówienie struktury i aktywności biologicznej obu badanych białek, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów oligomeryzacji białek amyloidowych. Rozdział kończy krótkie omówienie metod badań konformacyjnych peptydów i białek oraz oddziaływań między nimi. Zarówno ogólna charakterystyka amyloidów jak i budowa oraz rola w organizmie obu badanych białek zostały omówione szczegółowo. Podrozdział omawiający metody badań konformacyjnych przedstawia tylko najważniejsze zagadnienia: modelowanie białek oparte na homologii i *de novo*, dynamikę molekularną z więzami wynikającymi z NMR, dokowanie molekularne. Skrótowe potraktowanie tych zagadnień nie jest wadą, ale autorka nie ustrzegła się pewnych błędów i nieścisłości. Mikroskopia atomowa powinna być określona pełną nazwą mikroskopia sił atomowych (str.10). Przy przedstawieniu modelu homologicznego białka SAA z roku 2004 i struktur krystalicznych tetrameru i heksameru SAA określonych w roku 2014 zabrakło ich porównania. W polu siłowym UNRES łańcuch aminokwasowy zastał zredukowany do dwóch centrów oddziaływań a nie "płaszczyzn interakcji", łańcuchy boczne są modelowane jako elipsoidy obrotowe a nie "różnokształtne centroidy" (str. 33). Wartość wicynalnej stałej sprzężenia nie informuje o liczbie wiązań oddzielających sprzęgające się jądra jak napisano na str.34 a co najwyżej o ich krotności. Niezrozumiałe jest zdanie na str. 40: "Dla każdej konformacji wybierane są reszty aminokwasowe, których każdy atom liganda oddalony jest o nie więcej niż 10 Å od atomów receptora i te wybrane reszty poddawane są ocenie średniego odchylenia kwadratowego (ang. root mean square deviation, RMSD) dwóch węgli alfa w strukturze kompleksu." O jakich dwóch węglach alfa jest mowa? Podsumowując, mimo tych drobnych uwag, oceniam, że część literaturowa rozprawy napisana jest w sposób zwięzły i precyzyjny, ilustrowana odpowiednio dobranymi schematami i rysunkami struktur białek.

Kolejny rozdział przedstawia *Cel pracy* (5 stron). Podstawowym celem pracy doktorskiej było zbadanie struktury i wzajemnych oddziaływań dwóch białek: serum amyloid A (SAA) oraz ludzkiej cystatyny C (hCC). Kolejne etapy badań to: ustalenie struktury przestrzennej monomeru białka SAA, struktur przestrzennych dimeru białka hCC i monomeru białka V57G hCC. Drugim celem było określenie charakteru oddziaływań białka SAA z białkiem hCC. Zbadano zarówno oddziaływanie obu białek jak i białka hCC z peptydem o sekwencji fragmentu białka SAA(86-104).

W rozdziale *Materiały i metody* (8 stron) przedstawiono zastosowane w badaniach prowadzonych przez doktorantkę metody eksperymentalne (eksperymenty NMR analizowane

w programach XEASY, SPARKY, CARA i MARS). Opisano także jak otrzymano materiał do badań NMR: ekspresję znakowanego białka hCC oraz syntezę peptydów SAA(86-104), co zostało wykonane nie przez doktorantkę a przez pracowników i doktorantów Katedry Chemii Biomedycznej. Omówiono w skrócie zastosowane metody teoretyczne: symulacje dynamiki molekularnej w gruboziarnistym polu siłowym UNRES oraz pełnoatomowym polu siłowym AMBER, zastosowanie programów CS23D, CYANA i DYANA do wygenerowania wstępnych struktur na podstawie danych NMR. Dla dokowania wykorzystano programy ClusPro oraz PatchDock.

Dyskusja wyników przedstawiona jest w rozdziale piątym *Wyniki i dyskusja wyników* na 54 stronach i podzielona jest na szereg podrozdziałów omawiających kolejno: strukturę przestrzenną białka SAA wyznaczoną na podstawie zwijania białka de novo w polu siłowym UNRES, wyznaczanie struktury przestrzennej ludzkiej cystatyny C i jej wariantu V57G na podstawie dwu- i trójwymiarowych widm magnetycznego rezonansu jądrowego, badania konformacyjne dla peptydu SAA (86-104) oraz jego czterech analogów, symulacje dokowania molekularnego kompleksów ludzkiej cystatyny C z białkiem SAA oraz z peptydem SAA(86-104).

Dla zwijania białka de novo w polu siłowym UNRES nie przedstawiono żadnej analizy trajektorii, jak wybrano strukturę wynikową do konwersji do modelu pełnoatomowego ? Dlaczego zastosowano symulację dynamiki molekularnej w stałej temperaturze, a nie symulację wymiany replik jaką stosuje się dla przewidywania struktur białek z wykorzystaniem pola siłowego UNRES w czasie eksperymentów CASP ?

Dla dimeru hCC doktorantka uzyskała jedynie przesunięcia chemiczne dla dobrze zdefiniowanych elementów struktury białka, nie udało się określić sygnałów NOE. Dlatego do określenia struktury białka wykorzystano program CS23D, który łączy modelowanie homologiczne z analizą przesunięć chemicznych z NMR. Wyniki modelowania CS23D są uzależnione od kompletności przypisań przesunięć chemicznych oraz podobieństwa białka do znanych struktur zdeponowanych w bazie PDB. Jaki był wpływ danych NMR w przypadku modelowania dimeru hCC względem samego modelowania homologicznego ? Zgodnie z rys. 35 różnice uzyskanej struktury hCC względem znanych struktur krystalicznych cystatyn są dominujące dla pętli AS dla której nie zmierzono przesunięć chemicznych - czy wynikają one jedynie z modelowania homologicznego?

Dla wariantu V57G ludzkiej cystatyny C zmierzono zarówno przesunięcia chemiczne jak i sygnały NOE co pozwoliło na określenie struktury w programie CS23D, który korzysta tylko z przesunięć chemicznych, jak i w tradycyjnym algorytmie CYANA. Zabrakło w tym

miejscu bardziej szczegółowego porównania tych struktur (w pracy jest przedstawiony tylko rys. 37 przedstawiający wyniki CS23D i dalsze rysunki ilustrujące model z CYANA). Szczegółowa analiza i porównanie do struktur krystalograficznych zostało przedstawione tylko dla modelu uzyskanego na podstawie sygnałów NOE.

Dla określenia konformacji peptydu SAA(86-104) zastosowano symulacje dynamiki molekularnej z uśrednionymi po pewnym oknie czasowym więzami wynikającymi z NMR (metoda TAV-MD). Mimo dużej swobody konformacyjnej stosunkowo krótkiego peptydu porównanie jego struktury z C-końcowym fragmentem białka SAA, zarówno z modelem wyznaczonym w polu siłowym UNRES, jak i z dwoma monomerami uzyskanymi metodą krystalograficzną, wskazało na duże podobieństwo strukturalne peptydu do C-końcowych fragmentów modeli krystalicznych, zwłaszcza do monomeru SAA wyodrębnionego ze struktury tetrameru.

Modele struktury kompleksów hCC z peptydem SAA(86-104) wygenerowano za pomocą dwóch ogólnodostępnych programów: ClusPro i PatchDock. Otrzymane modele kompleksów doktorantka analizowała pod kątem występowania określonych eksperymentalnie oddziaływań między resztami aminokwasowymi Lys90, Arg96 oraz Lys103 z białka SAA i resztami aminokwasowymi białka hCC: Ser98 i Tyr102. Dlaczego nie wykorzystano tych informacji jako więzów podczas dokowania? Pozwoliłoby to na wydajniejsze przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej podczas dokowania. Czy do dokowania całych białek hCC i SAA również wykorzystano oba programy ClusPro i PatchDock? Dynamikę molekularną dla kompleksów wykonano w obecności rozpuszczalnika implicite w uogólnionym modelu Borna w podejściu Hawkinsa, Cramera i Truhlara. Dla tego modelu rozpuszczalnika nie stosuje się procedury particle-mesh Ewald (PME) - jest ona wykorzystywana tylko dla obliczeń w warunkach periodycznych z modelami wody explicite.

Rozdział *Podsumowanie* zgodnie ze swoim tytułem stanowi zwięzłe podsumowanie przeprowadzonych badań. Do głównych osiągnięć doktorantki należy wyznaczenie struktury przestrzennej białka SAA na podstawie sekwencji aminokwasowej poprzez symulację w polu siłowym UNRES, uzyskana struktura jest w dużej mierze zgodna ze strukturami później określonymi na drodze eksperymentalnej dla tetra- i heksamery białka SAA. Doktorantka wyznaczyła także struktury przestrzenne dimeru białka hCC oraz wariantu V57G na podstawie danych NMR. Ustaliła również strukturę przestrzenną peptydu SAA(86-104) z wykorzystaniem danych NMR i wykorzystała ją w symulacji dokowania peptydu do białka hCC. W podsumowaniu nie poświęcono osobnego punktu na omówienie dokowania całego białka SAA do białka hCC, ale porównano te wyniki z dokowaniem fragmentu SAA(86-104).

Przegląd piśmiennictwa w rozdziale *Bibliografia* doprowadzony został do roku 2016, cytowane pozycje świadczą o dobrym rozeznaniu doktorantki w zakresie swojej problematyki badawczej.

Przedstawione powyżej uwagi mają głównie charakter dyskusyjny i nie obniżają wartości naukowej rozprawy. Przedstawione w rozprawie wyniki jednoznacznie pokazują, że mgr Martyna Maszota-Zieleniak zrealizowała wszystkie postawione sobie cele badawcze. Szczegółowa dyskusja osiągniętych wyników, precyzyjne wnioski znamionują osobę przygotowaną do prowadzenia tego typu badań naukowych. Recenzowana praca doktorska przygotowana została na wysokim poziomie merytorycznym, a zawarte w niej wyniki stanowią oryginalny i istotny wkład do nauki. Ponadto mgr Martyna Maszota-Zieleniak jest współautorką czterech artykułów z tzw. listy filadelfijskiej, trzech artykułów w materiałach pokonferencyjnych oraz 23 komunikatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach. Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia formalne wymagania stawiane przez Ustawę o stopniach i tytule naukowym jak i zwyczajowe warunki stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Martynty Maszoty-Zieleniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego

KIEROWNIK  
Pracowni Symulacji Polimerów  
*Cezary Czaplowski*  
dr hab. Cezary Czaplowski, prof. UG