



Instytut Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk

Dr hab. Alicja Węgrzyn, prof. PAN
Pracownia Biologii Molekularnej
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
ul. Kładki 24
80-822 Gdańsk
Tel. (58) 523 6036, Tel. komórkowy: 505 062 309, e-mail: alicja.wegrzyn@biol.ug.edu.pl

Gdańsk, 1 lutego 2019 r.

Recenzja

**rozprawy doktorskiej Pana magistra Przemysława Jurczaka
pt. „Badania wpływu oddziaływań białko-ligand oraz białko-błona komórkowa
na proces oligomeryzacji białek amyloidogennych na przykładzie ludzkiej
cystatyny C”**

Tworzenie amyloidów, czyli nieprawidłowo sfałdowanych białek lub peptydów tworzących w związku z tym nierozpuszczalne złoże, jest związane z patogenezą wielu chorób, w tym schorzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona. Procesy chemiczne związane z tworzeniem się amyloidów, jak i czynniki modulujące te procesy, w dalszym ciągu są poznane jedynie częściowo. Zatem dokładniejsze ich zrozumienie jest istotne nie tylko z czysto poznawczego punktu widzenia, ale może odegrać dużą rolę w zrozumieniu patomechanizmów różnych chorób, znacznie ułatwiając w ten sposób prace nad potencjalnymi lekami. W tym świetle, podjęte przez Pana magistra Przemysława Jurczaka badania, które zmierzały do poznania wpływu oddziaływań modelowego białka mogącego tworzyć amyloidy, cystatyny C, z różnymi ligandami oraz modelami błon komórkowych na jego oligomeryzację (który to proces jest etapem w tworzeniu amyloidu) należy uznać za istotne naukowo.

Opisane w rozprawie doktorskiej badania Pan mgr Przemysław Jurczak rozpoczął od uzyskania nadprodukcji kilku wariantów ludzkiej cystatyny C (białka dzikiego typu oraz zmodyfikowanych wariantów: V57G, V57P i L68V) oraz ich oczyszczenia w ilościach pozwalających na przeprowadzenia badań chemicznych i biochemicznych. Na podkreślenie zasługuje optymalizacja metody oczyszczania białek znakowanych ^{15}N , ^{13}C i ^2H .

Uzyskanie oczyszczonych form cystatyny C pozwoliło następnie na zbadanie wpływu oddziaływań tego białka z różnymi ligandami i innymi białkami na jego oligomeryzację. W szczególności, badane były oddziaływania z mimetykami błon komórkowych, przeciwciałami HCC3, papainą, albuminą z krwi bydlęcej (BSA), β amyloidem, karboplatyną, norpinefryną i chlorowodorkiem dobutaminy. W badaniach tych Doktorant wykorzystał zaawansowane metody doświadczalne z zakresu chemii, biochemii, biofizyki i chemii fizycznej, takie jak dichroizm kołowy, sączenie molekularne, izotermalne miareczkowanie kalorymetryczne, magnetyczny rezonans jądrowy, modelowanie molekularne, chromatografia powinowactwa, elektroforeza w warunkach natywnych i denaturujących. W mojej ocenie badania te zostały przeprowadzone poprawnie, z zastosowaniem odpowiednich kontroli. Na wyróżnienie zasługuje sprawne posługiwanie się przez Doktoranta wieloma zaawansowanymi metodami analitycznymi.

Przeprowadzone analizy pozwoliły stwierdzić, że ze wszystkich badanych interakcji, jedynie oddziaływania cystatyny C z jednym mimetykiem błony komórkowej (DPC:SDS 5:1) jednoznacznie wskazały na stabilizację formy monomerycznej badanego białka oraz rozbijanie jego dimerów do monomerów. Niemniej jednak, wyniki pozostałych badań doprowadziły do innych ciekawych wniosków, a mianowicie określenie epitopu w oddziaływaniach cystatyny C z monoklonalnymi przeciwciałami HCC3, potwierdzenie roli pierwszych 11 aminokwasów cystatyny C w oddziaływaniach z papainą, zmapowanie fragmentów łańcucha cystatyny C odpowiedzialnych za oddziaływania z albuminą z krwi bydlęcej (BSA) i β amyloidem. Uważam, że są to ważne odkrycia, pozwalające stwierdzić, że Pan mgr Przemysław Jurczak samodzielnie rozwiązał problem naukowy, co jest podstawowym wymaganie stawianym kandydatom do stopnia doktora. Niewątpliwie Doktorant spełnił ten warunek, wykazując przy tym umiejętności zaplanowania doświadczeń, samodzielnego ich wykonania oraz interpretacji ich wyników i wyciągania wniosków.

Oceniając sposób przedstawienia wykonanych badań, należy stwierdzić, że rozprawa doktorska Pana magistra Przemysława Jurczaka została złożona w formie manuskryptu książki, napisanego w języku angielskim. Liczy ona 191 stron i jest podzielona na typowe rozdziały spotykane w tego typu opracowaniach w zakresie nauk ścisłych i przyrodniczych.

Streszczenie, napisane zgodnie z obowiązującymi przepisami w języku polskim i angielskim, przedstawia cel badań, uzyskane wyniki i najważniejsze wnioski. Niemniej jednak uważam, że nieco więcej miejsca powinno być poświęcone opisowi otrzymanych rezultatów, nawet kosztem skrócenia części wstępnej. Streszczenie ma bowiem kluczowe znaczenie w zachęceniu czytelnika do zapoznania się z całością dzieła naukowego, zaś wskazanie istotności i nowości uzyskanych wyników jest na to najlepszym sposobem.

W części wstępnej pracy, Doktorant przedstawił problem jakim jest tworzenie się amyloidów w różnego rodzaju chorobach. Patrząc z punktu widzenia biologa odczuwam pewien niedosyt spowodowany stosunkowo mało dokładnym opisem poszczególnych zaburzeń funkcjonalnych w tych chorobach, ale zdaję sobie sprawę, że oceniana rozprawa doktorska mieści się w dziedzinie nauk chemicznych, a w tym świetle opisy te mogą być wystarczające. Niemniej jednak, prosiłabym aby podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej Pan mgr Przemysław Jurczak przedstawił złożoność procesu patogenezy choroby Alzheimerera (jako przykładowej choroby), który polega nie tylko na gromadzeniu się amyloidu. W dalszej części opisane są błony biologiczne i stosowane w badaniach ich modele, jak również surfaktanty, oddziaływania błon z białkami oraz metody stosowane w ich badaniach. Znalazłam tutaj kilka nieścisłości, jak na przykład na str. 22 czytamy: „Membrane proteins are estimated to account for 20-30% of genes...” („Szacuje się, że białka błonowe stanowią 20-30% genów...”). Białka nie mogą stanowić określonego procentu genów, gdyż geny to fragmenty DNA a nie polipeptydy – oczywiście chodzi tu o geny kodujące te białka. Ta nieścisłość nomenklaturowa nie wpływa jednak na zrozumienie tekstu. Ostatnią częścią wstępu jest opis obiektu badań Doktoranta, czyli ludzkiej cystatyny C. W tej części pracy muszę zwrócić uwagę na kolejną nieścisłość – tytuł rozdziału 2.6. ewidentnie sugeruje jakoby ludzka cystatyna C była proteinazą, podczas gdy białko to jest inhibitorem proteaz cysteinowych.

Rozdział opisujący przeprowadzone badania, ich wyniki oraz dyskusję jest według mnie bardzo dobrze przygotowany. Doktorant zamieścił obszerną i czytelną

dokumentację wyników. Nie ma do tego rozdziału krytycznych uwag merytorycznych, natomiast muszę zwrócić uwagę na błędy nomenklaturowe. Na przykład na str. 54 dwukrotnie znajduje się określenie „temperature promoter” („promotor temperaturowy), podczas gdy w rzeczywistości chodzi o układ, w którym gen ulegający ekspresji znajdował się pod kontrolą promotora regulowanego przez represor wrażliwy na temperaturę. Ponadto powinno się pisać o ekspresji genu, a nie białka (str. 54).

Bardzo dobrze napisany jest rozdział przedstawiający wnioski płynące z opisanych badań. Wskazane są w sposób bardzo wyważony główne konkluzje, jakie Doktorant proponuje na podstawie uzyskanych rezultatów.

Opis metod jest zasadniczo prawidłowy, a przedstawione szczegóły eksperymentalne pozwalają na ewentualne powtórzenie doświadczeń. Ponownie mam jedynie kilka uwag związanych z używaną nomenklaturą. Tytuł rozdziału 6.2.1. powinien brzmieć „Gene expression” zamiast „Protein expression”. Na str. 116 czytamy: „hCC coding gene coupled with signaling peptide” („gen kodujący hCC sprzężony z peptydem sygnałowym”) – gen (DNA) nie może być sprzężony z peptydem, przynajmniej jeśli ma funkcjonować prawidłowo w komórce. Skąd pochodzi nazwa pożywki LB przedstawiona jako „Miller Lysogeny borth” (str. 127)? Pożywka ta określana jest w literaturze jako „pożywka Lurii-Bertoniego” („Luria-Bertoni medium”, chociaż sam Giuseppe Bertoni wielokrotnie wskazywał, że wraz z Salvadorem Lurią nazwali tę pożywkę „LB” od „lysogeny broth” („pożywka dla lizogenów”).

Spis literatury przygotowany jest prawidłowo, przy zachowaniu obowiązujących w tym względzie standardów. Rozprawę kończy materiał uzupełniający w postaci surowych danych uzyskanych w wyniku pomiarów.

Praca napisana jest ogólnie poprawnym językiem naukowym, chociaż Doktorantowi nie udało się uniknąć błędów gramatycznych i stylistycznych. Ich przykłady to: na str. 23 - pierwsze zdanie rozdziału 2.3.1. jest niezrozumiałe, str. 50 – w ostatnim zdaniu jest błąd gramatyczny („Can the protein.... may prevent...”), str. 57 – zdanie kończy się następująco: „POPC and DMPS, and.” Niemniej jednak, całość pracy pod względem reakcyjnym prezentuje się poprawnie. Na pochwałę zasługują czytelne ilustracje – zarówno schematy zamieszczone w części wstępnej jak też ryciny przedstawiające wyniki eksperymentów.

W podsumowaniu oceny rozprawy doktorskiej Pana magistra Przemysława Jurczaka uważam, że Doktorant samodzielnie rozwiązał problem naukowy, wykazał się umiejętnością planowania badań, wykonania części doświadczalnej, a także interpretacji wyników eksperymentów i wyciągania uprawnionych wniosków. Część wstępna pracy oraz dyskusja wyników wskazują na odpowiednią wiedzę teoretyczną Doktoranta w zakresie tematyki prowadzonych badań. W związku z powyższym, stwierdzam iż oceniana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie Pana magistra Przemysława Jurczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

 PRACOWNIA
Biologii Molekularnej IBB PAN

Prof. PAN, dr hab. Alicja Węgrzyn