



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego**

**Prof. dr hab. Justyna Brasuń**

### **OCENA ROZPRAWY DOKTORSIEJ**

mgr Sandry Skibiszewskiej

pt.: " Poszukiwanie skutecznego inhibitora agregacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A (hSAA1.1) oraz próby poznania mechanizmu tej agregacji.

Promotor pracy - dr hab. Elżbieta Jankowska, prof. UG

Amyloidoza to schorzenie którego cechą charakterystyczną jest tworzenie się nierozpuszczalnych agregatów białkowych. Agregaty te mogą powstawać zarówno wewnątrz komórek jak i w przestrzeni poza komórkowej. Jedną ze znanych chorób zaliczanych do amyloidoz jest choroba Alzheimera, w przebiegu której obserwowane jest powstawanie złogów białkowych wewnątrz neuronów (splątki neurofibrylarne) oraz w przestrzeni pozakomórkowej w postaci płytek beta-amyloidowych. W wyniku tego procesu dochodzi do degradacji układu nerwowego. Innym typem amyloidoz jest ogólnoustrojowa amyloidoza, która jest powikłaniem niektórych ciężkich chorób przewlekłych jak: gruźlica, reumatoidalne zapalenie stawów czy nowotwór płuc. W przebiegu tej choroby dochodzi do zewnątrzkomórkowego odkładania się białka amyloidu A (SAA), które jest przedmiotem badań przedstawionych w rozprawie.

Przedstawiona mi do oceny praca ma klasyczny układ i składa się z pięciu głównych rozdziałów: I. Założenia i cele pracy, II. Wstęp literaturowy, III. Badania Własne. Prezentacja i omówienie wyników, IV. Podsumowanie, V. Metodyka badań. Swoją dysertację, Autorka oparła na przeanalizowaniu i zacytowaniu aż 195 pozycji literaturowych. Wyniki badań zostały przedstawione także w postaci starannie i czytelnie przygotowanych 78 rycin i 7 tabel.

Głównym celem pracy było poznanie mechanizmu tworzenia złogów  $\beta$ -amyloidowych oraz poszukiwanie skutecznych związków, które byłyby zdolne do skutecznego hamowania tego procesu. W związku z tym badania zostały przeprowadzone w trzech etapach. W pierwszym z nich zostały wykonane badania mające na celu scharakteryzowanie zachowania się białka w warunkach sprzyjających

agregacji. W tym etapie Doktorantka wykonała badania dla dwóch izoform SAA1.1: hSAA1.1 oraz MetSAA1.1. Drugim etapem było poszukiwanie małowcząsteczkowych związków zdolnych do hamowania procesu agregacji. W tym etapie Doktorantka zsyntezowała i przebadła 24 związki. Ostatnim etapem prowadzonych badań było zsyntezowanie białka za pomocą natywnej chemicznej ligacji oraz określenie, czy otrzymane białko jest zdolne do tworzenia natywnej struktury oraz tworzenia form oligomerycznych.

Następnie, w drugim rozdziale, na podstawie przeanalizowania 195 pozycji literaturowych, Doktorantka opisała amyloidozę i jej typy, scharakteryzowała osoczowe białko amyloidu A (SAA) oraz prawdopodobne mechanizmy agregacji i sposoby walki z nią. Ponadto została tu przedstawiona możliwość zastosowania fluorescencji do badania procesu agregacji. Rozdział ten jest bardzo dobrym zapoznaniem czytelnika z zagadnieniami związanymi z procesem tworzenia i agregacji nierozpuszczalnych złogów i stanowi doskonałe wprowadzenie do kolejnego rozdziału, w którym Doktorantka prezentuje i omawia wyniki badań. Jednak w rozdziale tym pojawiło się kilka nieścisłości.

W podrozdziale 1.2. opisane zostały rodzaje amyloidoz i pokrótce scharakteryzowane wybrane z nich. Na stronie 14, w ostatnim akapicie, opisywana jest choroba Alzheimera, najczęściej występująca choroba z grupy amyloidoz. Doktorantka pisze tu „*Rozwój AD związany jest głównie z peptydem  $A\beta_{40}$  (~90%) oraz  $A\beta_{42}$  (~5%), które są inicjatorami procesów prowadzących do choroby. Peptydy te spontanicznie agregują tworząc rozpuszczalne oligomery oraz fibryle, ...*” Wydaje się iż, jeżeli peptydy agregują to tworzą one nierozpuszczalne oligomery.

W rozdziale 2.2.3. Doktorantka opisuje strukturę przestrzenną białka SAA. Na stronie 25 jest napisane: „*... W tym klastrze zarówno C-końcowa grupa karboksylowa, jak i grupa hydroksylowa Tyr35 tworzą rozwidlone mostki solne z dwoma resztami argininy, Arg39 i Arg96. ...*” Możliwość tworzenia mostka solnego w wyniku elektrostatycznego oddziaływania par jonowych między ujemnie naładowaną grupą karboksylową a dodatnio naładowaną grupą guanidynową łańcucha bocznego reszty Arg jest oczywista. Wątpliwość moją budzi możliwość tworzenia mostka solnego z zaangażowaniem łańcucha bocznego reszty Tyr, która w fizjologicznym zakresie pH nie występuje w formie zdeprotonowanej. W tym przypadku spodziewałabym się raczej tworzenia np. wiązania wodorowego.(?)

Następnie, na 51 stronach Doktorantka przedstawia i omawia badania własne. Swoje badania rozpoczęła od zbadania struktury izoform białek SAA: hSAA1.1 i MetSAA1.1. w warunkach sprzyjających agregacji. Białko MetSAA1.1. zostało poddane badaniom jako pierwsze. Wybór ten został podyktowany doniesieniami literaturowymi, jednak uzyskane rezultaty były zaskakująco odmienne. W związku z tym, Doktorantka postanowiła przeprowadzić dokładniejsze badania dla ww. białka i jego analogu pozbawionego N-terminalnej reszty metioniny z zastosowaniem dodatkowych metod badawczych. Takie podejście do problemu świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki. W następnych podrozdziałach doktorantka opisuje wyniki uzyskane z zastosowaniem licznych metod eksperymentalnych mające na celu zbadanie stanu oligomerycznego izoform SAA1.1, struktury drugo- trzecio- i czwartorzędowej białka, procesu agregacji oraz morfologii powstających oligomerów. W kolejnym etapie Doktorantka przeprowadziła syntezę fragmentu 1-27 białka SAA oraz serii potencjalnych inhibitorów fibrylizacji w oparciu o krótkie fragmenty biomolekuł amyloidogennych o potwierdzonym działaniu inhibującym. Spośród 24 związków najskuteczniej działało 5 z nich: saa3Phg, saa4Bip, saa3Bip, saa4Nal oraz saa3Dip. W dalszych etapach badań cztery z nich zostały wykluczone. W widmie CD związek z naftyloalaniną (saa4Nal) dawał silny sygnał przysłaniający inne sygnały, co uniemożliwiało obserwację zmian w strukturze drugorzędowej. W mojej opinii zastosowanie w tym przypadku roztworu zawierającego ten związek jako tło, umożliwiłoby zaobserwowanie zmian strukturalnych białka. Peptydy saa3Bip i saa4Bip, zawierające w swojej strukturze 4-feniloalaninę wykazywały silną emisję w zakresie fluorescencji tryptofanu, przez co nie można było obserwować zmian w otoczeniu tego aminokwasu. W takiej sytuacji, w przyszłości można spróbować zastosować metodę magnetycznego dichroizmu kołowego (MCD). Czwartym wykluczonym peptydem był peptyd z fenyloglicyną (saa3Phg), ze względu na to, że mimo skuteczności w stosunku do modelowego peptydu, to w przypadku białka przyspieszał proces fibrylizacji. W związku z powyższym, dalsze badania Doktorantka przeprowadziła dla związku saa3Dip, zawierającego w swojej strukturze  $\beta,\beta$ -difeniloalaninę.

Po wyborze skutecznego inhibitora, jakim okazał się saa3Dip, Doktorantka przeprowadziła szereg badań, które pozwoliły na określenie jego wpływu na proces tworzenia fibryli przez peptyd SAA1-27 oraz określenie miejsca oddziaływania. W następnym etapie zbadano oddziaływanie saa3Dip z białkiem MetSAA1.1 oraz jego wpływem na strukturę drugo-, trzecio- i czwartorzędową. Zostały także określone

miejsca oddziaływania inhibitora z MetSAA1.1. Przeprowadzone badania wykazały, iż wybrany związek, saa3Dip, hamuje agregację nie tylko modelowego peptydu SAA1-27 ale także całego białka. Ponadto peptyd ten wpływa na drugo- i trzeciorzędową strukturę białka oraz wpływa na wielkość i morfologię powstających agregatów. Ostatnim etapem badań było przedstawienie możliwości zastosowania natywnej chemicznej ligacji w celu otrzymania MetSAA1.1. Doktorantka wykazała iż zastosowania tej metody nie tylko do otrzymywania większych ilości białka ale także wprowadzania modyfikacji do jego struktury.

Rozprawę zamyka starannie przygotowany rozdział w który Doktorantka opisuje metody i procedury badawcze, które zastosowała w swojej pracy eksperymentalnej. W swoich badaniach Doktorantka zastosowała liczne metody m.in. dichroizm kołowy, fluorescencję, natywna spektrometrie mas, magnetyczny rezonans jądrowy, chromatografię, spektroskopię FTIR-ATR oraz procedury eksperymentalne jak np. test tioflawinowy, sączenie molekularne, sieciowanie chemiczne czy trawienie enzymatyczne. Pozwoliło to na zrealizowanie założonych celów.

Zanim przejdę do podsumowania, pragnę zwrócić uwagę na dorobek mgr Sandry Skibiszewskiej. Jest ona autorką/współautorkę trzech oryginalnych prac naukowych. Swoje wyniki przedstawiła w postaci 5 prezentacji ustnych i 17 prezentacji plakatowych na międzynarodowych oraz krajowych konferencjach naukowych. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż była kierownikiem w czterech projektach badawczych w tym projekcie „Diamantowy grant” a za swoje osiągnięcia otrzymała trzy nagrody.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Sandry Skibiszewskiej spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2003 r., poz.595 z późniejszymi zmianami, tekst jednolity Dz.U. z 2017 r., poz. 1789).

W związku z powyższym przedkładam wniosek o dopuszczenie do przeprowadzenia dalszej procedury dającej podstawę nadania stopnia doktora Pani mgr Sandrze Skibiszewskiej.

Justyna Brasuń  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD  
CHEMII NIEORGANICZNEJ  
kierownik  
  
prof. dr hab. Justyna Brasuń