



UNIwersytet
WARszawski

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Wojciech Dzwolak
wdzwolak@chem.uw.edu.pl

Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 17 maja 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Sandry Skibiszewskiej „*Poszukiwanie skutecznego inhibitora agregacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A (hSAA1.1) oraz próby poznania mechanizmu tej agregacji*” powstałej pod kierunkiem dr. hab. Elżbiety Jankowskiej, prof. UG na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Procesy niepoprawnego zwijania się i agregacji białek manifestujące się powstawaniem specyficznych nanowłókien o wysokiej zawartości β -kartki, tzw. fibryli amyloidowych, powiązane są z etiologią szeregu chorób degeneracyjnych: m.in. chorobami Alzheimerera, Parkinsona, czy też cukrzycą typu II. Specyficznym przypadkiem takiej choroby jest amyloidoza AA, w której prekursorem fibryli jest osoczowe białko amyloidu A (SAA). Jego obecność w organizmie w bardzo wysokim, sprzyjającym patogennej agregacji stężeniu, może być pochodną stanów zapalnych o innej etiologii (np. stowarzyszonych z przebiegiem gruźlicy). Opracowanie nowych strategii terapeutycznych zapobiegających powstawaniu tego amyloidu w następstwie chronicznych stanów zapalnych jest ambitnym celem działań wielu grup badawczych na całym świecie. W ten nurt badań wpisuje się przedkładana rozprawa doktorska mgr. Sandry Skibiszewskiej „*Poszukiwanie skutecznego inhibitora agregacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A (hSAA1.1) oraz próby poznania mechanizmu tej agregacji*”.

Liczącą sobie 131 stron pracę rozpoczyna bardzo dobrze napisane wprowadzenie w kontekst biomedyczny i biofizyczny prowadzonych przez Autorkę badań. Obszerna prezentacja

powiązań amyloidogenezy *in vivo* z etiologią różnych chorób jest satysfakcjonująca i, co zrozumiałe, ściśle związana z tematem pracy, choć wartościowym mogłoby się okazać umieszczenie również wzmianki o niepatogennych, funkcjonalnych biologicznie strukturach amyloidowych, jak chociażby białka Pmel17. Formalna struktura pracy jest poprawna, a jej czytanie sprawia przyjemność - głównie za sprawą krytycznej i inteligentnie prowadzonej dyskusji przedstawianych na bieżąco rezultatów. Dość zwięzły opis podstaw metodologicznych wybranych technik stosowanych przez Autorkę poprzedza prezentację wyników własnych. W tym miejscu muszę podkreślić imponującą paletę wykorzystanych w pracy metod eksperymentalnych. Są wśród nich: m.in. spektrometria mas, elektroforeza, dichroizm kołowy, fluorescencja zarówno zewnętrznych znaczników (ThT, ANS), jak i reszt tryptofanowych, magnetyczny rezonans jądrowy, mikroskopie: TEM i AFM. Gama tych technik jest doskonale dobrana do rodzaju problemu, a jej bogactwo wiele mówi o pieczołowitości, z jaką mgr Skibiszewska zaprojektowała i przeprowadziła swoje badania. O nakładzie pracy Autorki (i jej kompetencjach, jako specjalisty w dziedzinie chemii peptydów) niech świadczy fakt, iż wiele z badanych związków było przez Nią samą zsyntetyzowanych. W szczególności dotyczy to trudnej syntezy białka MetSAA1.1 w wyniku natywnej ligacji dwóch polipeptydowych fragmentów. Doskonałe opanowanie warsztatu zarówno syntezy polipeptydowych modeli (i inhibitorów ich amyloidogennej agregacji), jak i ich biofizykochemicznych badań pozwoliło na wysnucie ciekawych wniosków dotyczących mechanizmów agregacji SAA oraz wskazania molekuly – inhibitora jego agregacji. Rezultaty pracy „*Poszukiwanie skutecznego inhibitora agregacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A (hSAA1.1) oraz próby poznania mechanizmu tej agregacji*” opublikowane już częściowo w bardzo dobrych czasopismach - m.in. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, oraz *Amino Acids* są istotne nie tylko dla zrozumienia mechanizmów agregacji białka SAA, ale również dla opracowania skutecznych leków zapobiegających temu procesowi *in vivo*.

W tym miejscu chciałbym przejść do bardziej szczegółowych, merytorycznych uwag:

1. Zastanawia mnie różnica stosunku eliptyczności przy 208 / 222 nm widoczna w widmach CD białek hSAA1.1 i MetSAA1.1 zmierzonych w temp. 4 °C (Ryc. 5, str. 23) w stosunku do widm otrzymanych w temp. 37 °C (najświeższe widma pokazane po 6 h inkubacji – Ryc. 6). Czy może mieć ona związek ze zjawiskiem denaturacji niskotemperaturowej?
2. Stronę 49 rozprawy wieńczy zdanie: „*Wyniki z natywnej elektroforezy pokazują jak wiele form oligomerycznych jest zaangażowanych w proces agregacji tych białek*”. Zastanawiam się czy należy przyjmować (bez dodatkowych badań / zastrzeżeń), że wszystkie te oligomery są „*on-pathway*” badanego procesu agregacji białka. Proszę o komentarz.
3. Zastanawia mnie wynik zaprezentowany na dolnym panelu Ryc. 39 (str. 61) – czy należy rozumieć, że związki takie, jak saa3,4Bip, saa4Bpa czy AβBpa stymulują agregację SAA1-27 na przestrzeni 24 h? Czy kontrolna agregacja samego peptydu po 24 h jest całkowita? A jeżeli tak, to jak dodatek tych substancji może doprowadzić do 2-3 krotnego przyrostu sygnału ThT przy założeniu, że skaluje się on wprost proporcjonalnie do ilości agregatów?
4. To pytanie prowadzi mnie ku drażliwej kwestii domniemanej proporcjonalności sygnału (intensywność emisji) ThT do ilości powstającego amyloidu. Nawet w przypadku pojedynczego wariantu strukturalnego agregatu amyloidowego pojedynczego białka prawdopodobne jest istnienie więcej niż jednego typu miejsca wiązania ThT na jego powierzchni (innego w sensie energii i geometrii wiązania, to ostatnie ma zwłaszcza prawo wpłynąć na wydajność kwantową fluorescencji ThT). To, z kolei, przełoży się na nieliniową zależność sygnału emisji ThT w szerokim zakresie stosunków molowych ThT: liczba miejsc wiązania. W przypadku badanym w tej pracy zastanawiają mnie dwie możliwości: [i] współzawodnictwa „inhibitorów” z ThT w wiązaniu powierzchni bocznych amyloidu (trzymam się tu dla uproszczenia rozsądnego modelu „Krebsa” i podobnych, w których ThT jest traktowana jak dokujący na powierzchni amyloidu rotor molekularny), [ii] bezpośredniego wiązania inhibitora z ThT prowadzącego

do powstania luminescencyjnego, bądź nieluminescencyjnego kompleksu z pominięciem białka. Taki przypadek nie byłby niezwykły – istnieją liczne nieamyloidowe ligandy ThT, np. natywna acetylocholinoesteraza z *Torpedo californica*, czy kwas poliglutaminowy w pH neutralnym i inne. Chciałbym prosić Autorkę o ustosunkowanie się do tych ewentualności.

5. Jeżeli dobrze zrozumiałem strategię projektowania inhibitorów agregacji białek opartych o modyfikowany motyw amyloidogenny (np. KLVFF) to zasadza się ona na interakcjach takiego motywu z oligomerycznym kwazi- β -karkowym stanem pośrednim, bądź już β -karkowym agregatem i blokowanie jego dalszego wzrostu. Dzięki temu mała liczba cząsteczek inhibitora może zablokować agregację wielu cząsteczek białka poprzez dezaktywację aktywnych powierzchni agregatu. Wynik przedstawiony w rozprawie sugeruje, że molekula saa3Dip przeciwdziała agregacji MetSAA1.1. poprzez stabilizację natywnej struktury białka (z konieczności już w stechiometrii co najmniej 1:1). Czy Autorka uważa ten wynik za zaskakujący w kontekście oczekiwanego mechanizmu działania takich inhibitorów?
6. Zastanawiam się nad interpretacją sygnałów CD kompleksu MetSAA1.1 z saa3Dip (Ryc. 54B, str. 76). Czy widmo to nie jest również efektem nałożenia się sygnału CD aromatycznego i chiralnego inhibitora (dodatkowo komplikowanego indukowanym CD w wyniku dokowania na powierzchni białka)?
7. Czy w przypadku widm drugiej pochodnej (np. Ryc. 55, str. 77) osi rzędnych nie powinniśmy raczej przypisać wymiaru $d^2A/d\bar{\nu}^2$ [cm^2], a, tamże, słowo „trajektoria” (tor ruchu) zastąpić słowem „krzywa” (lub „wykres”)?
8. Strona 56. Zastanawiam się jak dodatek zewnętrznego wygaszacza fluorescencji Trp (np. jonów jodkowych) wpłynąłby na widma emisyjne prezentowane na Ryc. 36? Jednym słowem: czy reszty Trp w agregatach są odizolowane od otaczającego roztworu?
9. Bardzo stanowczy tytuł podrozdziału (II.4) „Sposoby walki z amyloidami” nie budzi zastrzeżeń w przypadku immanentnie patogennych amyloidów i jest zapewne uprawniony w przypadku SAA. Jednak kwestia sensu takiej „walki” jest

mniej jednoznaczna w przypadku amyloidów A β czy α -synukleiny, które mogą stanowić relatywnie bezpieczny produkt końcowy agregacji w porównaniu do bardziej neurotoksycznych wczesnych oligomerów.

Kwestie poruszone w tych komentarzach i pytaniach nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny pracy „*Poszukiwanie skutecznego inhibitora agregacji ludzkiego osoczowego białka amyloidu A (hSAA1.1) oraz próby poznania mechanizmu tej agregacji*” wnoszącej rzetelny i cenny wkład w badania niezwykle złożonych procesów patogennej agregacji białek. Jestem przekonany, że rezultaty badawcze mgr. Sandry Skibiszewskiej przedstawione w Jej pracy zbliżają nas do uzyskania nowych, skutecznych leków.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana praca całkowicie spełnia warunki i wymogi stawiane pracom doktorskim, zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Stwierdzam, iż dorobek naukowy Doktorantki i Jej postawa akademicka w pełni uzasadniają nadanie Jej stopnia naukowego doktora i wnoszę o dopuszczenie mgr. Sandry Skibiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/ Wojciech Dzwolak