

Prof. dr hab. Józef Garbarczyk
Akademia Nauk Stosowanych im H. Cegielskiego
W Gnieźnie
Uczelnia Państwowa

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Adriany Żyły
Z Wydziału Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
pt **Structural studies of the aggregation of selected beta-amyloid peptides in
the presence of human albumin and human cystatin C**

Ogólna problematyka rozprawy doktorskiej pani magister Adriany Żyły, została sformułowana w tytule pracy. Autorka, poprzez analizę strukturalną wybranych binarnych układów białkowych, poszukuje odpowiedzi na pytanie, czy i jak ludzka cystatyna C i albumina surowicy oddziałują z fibrylami amyloidowymi.

Tematyka rozprawy jest w nurcie badań prowadzonych od szeregu lat w Zakładzie Fizyki Biomedycznej na Wydziale Fizyki pod kierunkiem profesora Macieja Kozaka.

Nie ma potrzeby specjalnego uzasadniania, że zagadnienia rozszyfrowywania złożonych problemów biologicznych zwłaszcza nakierowane na rozwikłanie na poziomie molekularnym etiologii chorób związanych z budową białek są niezwykle ważne, ale i bardzo trudne. Bowiern wymagają od badacza wiedzy zarówno z zakresu biologii białek będących przyczyną chorób a także metod instrumentalnych i obliczeniowych pozwalających analizować takie złożone układy.

Rozprawa jest napisana języku angielskim z krótkim streszczeniem w języku polskim, przedstawiona została w postaci obszernego opracowania liczącego 193 strony, z podziałem na 10 części.

Główną intencją autorki było poszerzenie wiedzy na temat agregacji amyloidów beta (A β) i tym samym wskazanie mechanizmów molekularnych, które mogłyby zapobiegać działaniom patologicznym tych białek.

Szczegółowy cel pracy został określony w pierwszym rozdziale. Doktorantka, po krótkim uzasadnieniu, podaje cztery zasadnicze cele, a mianowicie:

- określenie strukturalnych parametrów kompleksów utworzonych przez białka amyloidu beta ($A\beta$) z białkiem ludzkiej cystatyny C (HCC) lub białkiem ludzkiej albuminy surowicy (HSA),

- określenie parametrów strukturalnych układów HSA i HCC

- określenie mechanizmu oddziaływań między HCC, lub HSA z wybranymi białkami $A\beta$ oraz określenie strefy w budowie białek, które są zaangażowane w takie oddziaływania.

Dla realizacji tych zamiarów doktorantka wyznaczyła zadania obejmujące syntezę i oczyszczanie białek $A\beta$ oraz badania strukturalne i symulacje komputerowe kompleksów różnych wariantów białek, $A\beta$, HCC, oraz HSA.

W rozdziale drugim rozprawy zawarte są informacje o konsekwencjach neurodegeneracyjnych zakłóceń w organizmie człowieka. Doktorantka, w oparciu o 197 cytowanych prac, przedstawiła aktualny stan wiedzy na tematy związane z rozprawą.

Rozdział ten podzielony został na siedem podrozdziałów, gdzie trzy pierwsze poświęcone są skutkom i przyczynom powstawania choroby Alzheimera (ch. A) a także historii poszukiwań sposobów leczenia tej choroby. W kolejnych czterech podrozdziałach zawarte są informacje o białkach amyloidu beta jako głównej przyczyny tej choroby. Autorka w bardzo przystępny sposób podaje mechanizmy tworzenia $A\beta$ oraz oddziaływań z innymi polipeptydami. Znajdujemy też informacje o roli cystatyny i albuminy w interakcji z białkami amyloidowymi. Należy podkreślić, że tekst ilustrowany jest rysunkami i wykresami, co ułatwia czytelnikowi rozumienie złożonych zagadnień.

Rozdział trzeci zawiera skrótowe informacje o wybranych metodach stosowanych w badaniach strukturalnych makrocząsteczek.

W sposób encyklopedyczny autorka opisuje metody stosowane w prezentowanej rozprawie, a mianowicie:

- małokątowe rozpraszanie rentgenowskie i neutronowe (SAXS i SANS) z uwzględnieniem równania Guinier pozwalającego określać tzw. promień żyracji a także metody obliczeniowe stosowane w pomiarach dyfrakcji małokątowej rentgenowskiej (SAXS); metodę wymiany izotopowej w przygotowaniu preparatu do metodą dyfrakcji neutronów pod małymi kątami (SANS);

- metody obliczeniowe, czyli symulacje dynamiki molekularnej, symulację tworzenia układów binarnych (makromolekular docking) oraz metodę tzw. modelowania gruboziarnistego;
- mikroskopię sil atomowych (AFM) i elektronową transmisyjną (TEM);
- metody rozdzielcze poprzez ultrawiórowanie;
- spektroskopię mas (MS);
- spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

W opisach podane są istotne cechy danej metody bez rozwijania szczegółów.

W rozdziale czwartym zatytułowanym *Material and methods* doktorantka opisuje sposoby przygotowania preparatów trzech amyloidów: 1-6, 2-28 i 1-42 oraz ludzkiej cystatyny C (HCC) i ludzkiej albuminy surowicy. Amyloid A β 1–16 był komercyjny, natomiast dwa pozostałe zostały syntetyzowane we współpracy z panią prof. Anetą Szymańską z Uniwersytetu Gdańskiego. Cystatynę i jej deuterowanie przygotowano według opisu literaturowego.

Opisane metody przygotowania materiałów do badań A β , HCC jak i ludzkiej albuminy HSA nie budzą zastrzeżeń.

Doktorantka analizowała strukturę następujących układów: kompleks HSA-HCC V57G oraz kompleksy cystatyny (HCC) i albuminy (HSA) z włóknkami A β (1-42, 1-26 i 3-28). Badania przeprowadzono z wykorzystaniem poprzednio wyszczególnionych metod.

Należy szczególnie pokreślić, że wybrane metody były komplementarne, mogące współdziałać w otrzymaniu informacji na temat struktury a także dynamiki analizowanych białek.

Eksperymenty realizowane były w kilku ośrodkach badawczych: w Uniwersytecie Gdańskim, w Dubnej (Rosja), w Grenoble (Francja), na Wydziale Fizyki i Centrum NanoBioMedycznym UAM oraz w Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego w Krakowie.

Przeprowadzone eksperymenty jak i metody obliczeniowe zostały starannie opisane wraz z krótkim uzasadnieniem. Stosowano szereg programów komputerowych zarówno wspomagających interpretację wyników pomiarowych jak i symulujących aranżację przestrzenną badanych układów. Do analizy danych uzyskanych metodą

dyfrakcji małąkąowej autorka wykorzystywała Primus (ATSAS) Igor, SASView, dla modelowania niskiej rozdzielczości DAMMIN, DAMMINF, MONSA, GASBOR, ATSAS. Do analizy rozbieżności, za pomocą funkcji χ^2 , między wynikami eksperymentalnymi i zaproponowanym modelem CRYSON, ATAS i FoXS. Do modelowania układów binarnych PatchDoc i dla wizualizacji PyMOL oraz SUPCOMB pozwalający na superpozycję dwu przestrzennych struktur, wyznaczonych eksperymentalnie i obliczone w oparciu o krzywe dyfrakcyjne. Programy PEPSI-SANS i PEPSI-SAXS (PEPSI *Polynomial Expansions of Protein Structures and Interactions*) pozwalają wyliczyć teoretyczne krzywe rozpraszania w oparciu o model atomowy. Dla konstruowania modeli referencyjnych doktorantka korzystała z bazy PDB, czyli bazy danych strukturalnych dla białek i kwasów nukleinowych.

Uzyskane rezultaty zaprezentowane zostały na 46 stronach w rozdziale 5. Wyniki zostały starannie opisane, zilustrowane i odpowiednio zinterpretowane. Badania eksperymentalne, a także obliczenia symulacyjne są przedstawiane w postaci wykresów, tabel i rysunków. Dotyczy to każdego badanego układu, a więc białek HSA i HCC oraz kombinacji tych protein z trzema amyloidami beta.

Rezultaty pomiarów eksperymentalnych są analizowane zgodnie z współczesnymi standardami.

Przykładem może być analiza krzywych dyfrakcyjnych SAS, gdzie promień żyracji (R_g) określony z funkcji Guinier jest porównywany z obliczeniami funkcji rozkładu radialnego ($P(r)$).

Różnorodność eksperymentów przeprowadzona dla kilku kombinacji HSA i HCC z A β wraz z obliczeniami wykazały, że dezintegracji ulega jedynie amyloid A β 3-28. To zjawisko wystąpiło jako skutek oddziaływania z ludzką cystatyną C (HCC). Ta obserwacja zasługuje na szczególną uwagę ma bowiem fundamentalne znaczenie dla prac nad zahamowaniem ch.A.

Należy również dodać, że korzystając z odpowiednich programów komputerowych autorka podaje prawdopodobny mechanizm tworzenia układów binarnych złożonych z amyloidu i białka HCC lub HSA.

Dyskusja wraz z podsumowaniem zawarta jest w rozdziale 6. W rozdziale tym autorka omawia uzyskane wyniki w konfrontacji z doniesieniami literaturowymi. Podaje, że już w roku 2001 była informacja o roli HCC w zapobieganiu neurodegeneracji powodowanej przez oligomery A β . Brakowało jednak głębszego objaśnienia tego zjawiska.

Wyniki prezentowane w tej pracy pozwoliły wskazać mechanizm dekompozycji amyloidu beta 3-28. Jest to więc bardzo ważne uzupełnienie tamtej obserwacji

Autorka wykazała również, że HCC nie powoduje rozkładu A β 1-42, jednakże badania dyfrakcji neutronowej i obrazy AFM pokazały, że HCC osadza się na powierzchni tego amyloidu i tym samym hamuje jego wzrost.

W dalszej części *Dyskusji* doktorantka omawia znaczenie badań nad kompleksami HSA i A β oraz kompleksami HCC i HSA.

Podrozdział oznaczony jako 6.4 zawiera podsumowanie wraz wnioskami. Wnioski w liczbie 8 w pełni korespondują z prezentowanymi wynikami.

Na zakończenie rozdziału 6 jest podrozdział 6.5 zatytułowany *Study perspectives* gdzie doktorantka wskazuje na dalsze możliwe badania w tej tematyce.

Poniżej kilka uwag i pytań szczegółowych:

1. Redakcja pracy wymaga korekty językowej i graficznej; jest kilka powtórzeń. W kilku przypadkach rysunki są mało czytelne
2. Wyniki obliczeń prezentowane są w postaci rysunków, w przypadku układów binarnych; były one sporządzane po osiągnięciu minimów energii oddziaływań, brak wzmianki na ten temat
3. W przeprowadzonych eksperymentach brak jest pewnych szczegółów np. jakiego rodzaju promieniowanie (lampa) stosowano w pomiarach SAXS ?

PODSUMOWANIE

Lektura rozprawy pozwala na stwierdzenie, że prezentowane rezultaty zawierają wiele nowych informacji, poszerzających a także pogłębiających wiedzę w zakresie biologii białek amyloidowych, zwłaszcza oddziaływań z cystatyną i albuminą, które są w organizmie człowieka. Wyniki te mają też aspekt praktyczny, pokazują bowiem drogę do opracowania leku przeciw chorobie Alzheimerera.

Wykonane eksperymenty, a także obliczenia wraz z omówieniem rezultatów, pozwalają wyrazić opinię, że mgr Adriana Żyła potrafi kompetentnie posługiwać się wieloma metodami badawczymi, a uzyskane wyniki właściwie i krytycznie interpretować.

WNIOSEK KOŃCOWY

Biorąc pod uwagę całość rozprawy, z przekonaniem wyrażam opinię, że przedstawione wyniki mają dużą wartość poznawczą ale też praktyczną, wskazującą na możliwość opracowania leku. Praca zawiera wiele nowych oryginalnych obserwacji pozwalających lepiej zrozumieć zmiany występujące w procesach chorobowych człowieka

Bez wątpliwości stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia warunki przewidziane stosowną ustawą dla prac doktorskich i dlatego wnoszę do Wydziału Fizyki UAM o dopuszczenie magister Adriany Żyły do kolejnych etapów postępowania kwalifikacyjnego oraz do publicznej dyskusji na temat rozprawy.

Jednocześnie wnioskuję, aby tę pracę uznać za wyróżniającą

Poznań, 15.11.2012

Gamborczył