



UNIWERSYTET GDAŃSKI



Dr hab. Elżbieta Jankowska

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63 tel. (+48 58) 5235044, e-mail: elzbieta.jankowska@ug.edu.pl

Gdańsk, 19.08.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Amyloidogenne właściwości peptydów (L-Glu)_n”

mgr Agnieszki Hernik-Magoń

Praca doktorska mgr Agnieszki Hernik-Magoń dotyczy niezwykle ważkiego problemu agregacji białek i peptydów. Zagadnienie to jest coraz intensywniej badane, gdyż agregacja i tworzące się w jej konsekwencji złogi amyloidowe powiązane są z etiologią tzw. chorób konformacyjnych, które stanowią rosnący problem w starzejących się społeczeństwach obecnego świata. Im więcej informacji uda się uzyskać na temat mechanizmów rządzących przemianami strukturalnymi prowadzącymi w końcowym efekcie do powstawania agregatów, tym większe będą szanse na odkrycie skutecznych metod zapobiegania agregacji i opracowanie terapii możliwych do zastosowania w stanach patologicznych z nią powiązanych. Badania wykonane przez mgr Agnieszkę Hernik-Magoń pod kierunkiem dr hab. Wojciecha Dzwolaka, prof. UW, wpisują się ten ważki nurt badawczy.

Jako obiekt badań wybrane zostały przez Doktorantkę peptydy zbudowane wyłącznie z kwasu L-glutaminowego. Tego typu połączenia i ich tendencje do agregacji były już badane, a wyniki tych badań Doktorantka rzetelnie zreferowała we wstępie literaturowym. Jako cel swojej pracy postanowiła obrać pogłębienie wiedzy na temat szczególnego typu agregatów – agregatów β_2 tworzących się dzięki specyficznemu układowi wiązań wodorowych. Realizując ten cel przeprowadziła badania tendencji agregacyjnych układów poliglutamylowych zbudowanych z 3, 4, 5, 6 i 10 reszt aminokwasowych. Peptydy te zostały przebadane zarówno w wersji z niemodyfikowanymi N- i C-końcowymi grupami funkcyjnymi, jak też w postaci amidowanej i/lub acetylowanej. Do badań został włączony także komercyjnie dostępny wielkocząsteczkowy kwas poli-L-glutaminowy, PLGA. W badaniach przemian strukturalnych tych peptydów wykorzystana została przez Doktorantkę spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera. Do badania tendencji agregacyjnych oraz określenia morfologii powstających agregatów posłużyły natomiast odpowiednio testy tioflawinowe oraz mikroskopia sił atomowych.

Podjęte przez Doktorantkę badania zostały precyzyjnie zaprojektowane i rzetelnie wykonane. Zrealizowanie postawionych celów badawczych pozwoliło określić minimalną liczbę reszt kwasu glutaminowego niezbędnych do uzyskania przemiany konformacyjnej do struktury β_2 oraz udowodnić, iż pre-formowane fibryle poliglutamylowe wykazują zdolność do indukowania agregacji zarówno w układzie homo- jak i heterologicznym, przy czym nie narzucają swojej morfologii agregatom potomnym. Wykazano także, iż efekt przyspieszania procesu w warunkach koagregacji peptydów poli-L-Glu o różnej długości nie zależy od ich stosunku stechiometrycznego. Interesujące wyniki przyniosły także badania peptydów, w których jedna lub obie terminalne grupy funkcyjne utraciły zdolność jonizacji ze względu na modyfikację poprzez acetylowanie (*N*-końcowa grupa aminowa), bądź przekształcenie w formę amidową (*C*-końcowa grupa karboksylowa). Szczególne w tym ostatnim przypadku silnie zaznaczył się efekt spowolnienia agregacji, czego nie obserwowano gdy jednocześnie obie grupy funkcyjne przekształcone zostały w formy niejonizowalne. Wszystkie te wyniki pozwalają na lepsze zrozumienie przemian konformacyjnych jakim na ścieżce agregacji ulegają peptydy poliglutamylowe oraz rozpoznanie roli dodatkowych czynników, takich jak np. zasiewanie zarodkami fibrylizacyjnymi, na przebieg procesu agregacji. Co warto podkreślić, przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej wyniki zostały już opublikowane, w czasopiśmie o obiegu międzynarodowym. W trzech z łącznej liczby czterech prac Doktorantka jest pierwszą autorką. Łączny współczynnik wpływu tych publikacji wynosi 17,6, co pokazuje wysoką klasę czasopism, w których artykuły te zostały opublikowane.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Hernik-Magoń ma układ klasyczny dla prac chemicznych. Składa się ze zwięzłego ale treściwego wprowadzenia literaturowego (58 stron), obejmującego zarówno opis aktualnego stanu wiedzy na temat przemian konformacyjnych białek i homopolipeptydów, jak też podstawy teoretyczne zastosowanych w pracy narzędzi badawczych – spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), dichroizmu kołowego (CD), fluorescencji oraz mikroskopii sił atomowych (AFM). Treść tych rozdziałów została starannie przemyślana i klarownie przedstawiona, przez co bardzo dobrze przygotowuje do lektury dalszej części rozprawy. Przed opisaniem wyników badań własnych Doktorantka jasno zdefiniowała i uzasadniła cele swojej pracy. W części eksperymentalnej (obejmującej łącznie 51 stron) wyodrębnione zostały trzy rozdziały kolejno opisujące zrealizowane zadania badawcze, każdorazowo z podziałem na przedstawienie użytych materiałów i metod oraz opis i przedyskutowanie uzyskanych wyników. Tekst rozprawy zamyka podsumowanie, zbierające najważniejsze efekty pracy badawczej. Bibliografia pracy jest bardzo bogata i obejmuje odwołania zarówno do literatury dawniejszej, jak i najnowszej, co pokazuje, iż Doktorantka gruntownie zaznajomiła się z tematem i osiągnięciami światowej nauki w jego zakresie.

Tekst rozprawy napisany został bardzo jasno i klarownie. Nie budzi zastrzeżeń także sposób prezentacji wyników – zarówno dobór wykresów, tabel, czy rysunków, jak i ich czytelność. Na uznanie zasługuje sposób prowadzenia dyskusji wyników. Zwraca uwagę precyzja sformułowań, a także odpowiednia doza ostrożności w interpretowaniu wyników, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Korekta językowa wykonana została niezwykle starannie, w tekście rozprawy nie ma więc zbyt wielu usterek edycyjnych czy niezręcznych bądź nieprawidłowych sformułowań. Z obowiązku recenzenta wspomnę tu jednak kilka dostrzeżonych:

- na rys. 15 pokazano zależność struktury od pH, wskazując, iż struktura zwinięta pojawia się w $\text{pH} < 4$ a rozciągnięta przy $\text{pH} > 6$, w podpisie do rysunku znalazła się jednak informacja, iż ta druga pojawia się w $\text{pH} > 9$
- dwa sformułowania na stronie 34 poprzez drobną nieścisłość gramatyczną prowadzą do, zdaje się, odmiennej niż zamierzona wymowy tekstu: ‘badanie temperaturowej denaturacji α -helisy i następnie tworzenie formy RC za pomocą dichroizmu kołowego...’ sugeruje iż CD odgrywa jakąś rolę w tworzeniu struktury RC; natomiast fragment ‘... część łańcuchów bocznych ulega neutralizacji, co pozwala częściowo pokonać silne oddziaływania kulombowskie niezbędne do zwinięcia homopolipeptydu’ wskazuje, iż to same oddziaływania a nie ich pokonanie pozwala na fałdowanie łańcucha polipeptydowego
- na str. 41 pojawiło się zaskakujące sformułowanie ‘pozbawia grupę karbonylową [...] właściwości protonodonorowych’
- słowo ‘sonikowanych’, aczkolwiek zrozumiałe w żargonie laboratoryjnym, w tekście naukowym przygotowanym w języku polskim powinno być zastąpione, z konieczności pewnie opisowym sformułowaniem
- na str. 87, przy uzasadnianiu użytej jednostki eliptyczności, we fragmencie ‘ze względu na różne masy wykorzystywanych do badań peptydów’ zabrakło słowa ‘cząsteczkowe’
- na str. 99 użyto sformułowania ‘synteza w ciele stałym’ zamiast ‘na nośniku stałym’

Lektura rozprawy nasunęła mi ponadto kilka pytań:

- Czy strukturę β_2 stwierdzono na ścieżce powstawania jakichkolwiek patologicznych agregatów amyloidowych?
- Czy ‘akceptor bifurkujący’ jest zaakceptowanym w polskiej nomenklaturze określeniem czy tylko najwygodniejszym do zastosowania anglicyzmem?
- Na jakiej podstawie przyjęto, iż PLGA składa się z 200 reszt aminokwasowych, skoro dostawca określa produkt jako sól sodową kwasu poli-L-glutaminowego o masie cząsteczkowej 15-50 kDa?
- W jaki sposób weryfikowano poprawność odjęcia pasm związanych z drganiami wiązań w obecnym w badanym układzie kwasie trifluorooctowym?
- Na str. 73 stwierdzono, iż peptyd $(\text{L-Glu})_3$ nie wykazał żadnych cech spektralnych charakterystycznych dla struktury β_2 , podczas gdy na widmie FTIR tego peptydu pojawiło się jednak pasmo 1597 cm^{-1} (rys. 37A), w przypadku innych związków traktowane jako charakterystyczne dla tej struktury. Na jakiej podstawie dokonano więc kategorię odrzucenia struktury β_2 w przypadku tripeptydu?

- Na str. 81 podkreślono, iż nie obserwuje się propagacji polimorfizmu w wyniku dodawania do agregującego PLGA zarodków fibrylizacyjnych utworzonych przez peptyd (L-Glu)₅. Czy wobec niemal identycznej charakterystyki spektralnej przebiegu agregacji obu peptydów można spodziewać się, iż za pomocą FTIR zaobserwowane zostaną jakieś spektakularne różnice?
- Czy ze względu na duże podobieństwo widm FTIR zarejestrowanych w trakcie przebiegu procesów agregacji (L-Glu)₅ i PLGA do badania efektów koagregacji nie należałoby wybrać raczej tetrapeptydu, którego charakterystyka spektralna jest nieco bardziej odmienna?
- Na stronach 103-105 napisano, iż peptyd (L-Glu)₅-NH₂ po 21 dniach tworzy formy fibrylarne. Nie ulega wątpliwości, że takie formy uwidoczniły się na obrazach spod mikroskopu sił atomowych (rys. 56), jednak rys. 53 przedstawiający widmo FTIR takiej próbki zdaje się na to nie wskazywać. Z czego może wynikać ten brak spójności w wynikach uzyskanych obiema technikami?

Dostrzeżone mankamenty, jak też uwagi zaprezentowane w recenzji, w żaden sposób nie umniejszają jednak wartości rozprawy, w której mgr inż. Agnieszka Hernik-Magoń zaprezentowała bardzo interesujące i rzetelnie opracowane wyniki. Warto tu ponadto nadmienić, iż wyniki te Doktorantka zaprezentowała nie tylko w rozprawie i wspomnianych wyżej publikacjach, ale także na konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych, będąc w sumie współautorką 8 tego typu doniesień. Na dodatkowe podkreślenie i uznanie zasługuje także to, iż Doktorantka zyskała już pewne doświadczenie w zdobywaniu funduszy na cele badawcze i rozwojowe, realizowała bowiem dwa krótkoterminowe granty, jak również uzyskała stypendium KNOW dla najlepszych doktorantów oraz EMBO Travel Grant, dzięki któremu mogła odbyć szkolenie z badania biomolekuł metodami strukturalnymi i biofizycznymi.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz. 1228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz. 455)). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Agnieszki Hernik-Magoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ejmbowska