

Prof. dr hab. Małgorzata Komorowska
Politechnika Wrocławska
Wydział PPT
Katedra Inżynierii Biomedycznej
Zespół Biospektroskopii

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Hernik-Magoń zatytułowanej:
„AMYLOIDOGENNE WŁAŚCIWOŚCI PEPTYDÓW (L-GLU)_N”.**
Praca wykonana pod kierunkiem dr hab., prof. UW. Wojciecha Dzwolaka

Na wstępie należy podkreślić, że zakres badań w prezentowanej rozprawie doktorskiej ma ogromne znaczenie. Tworzenie amyloidów jest do dzisiaj nie do końca zbadane, a konsekwencje tego zjawiska dla organizmów są dramatyczne. Wzrost średniej życia ludzkiego skutkuje między innymi wzrostem zachorowań na choroby neurodegeneracyjne, które potrafimy opóźnić ale nie eliminować. Przedstawiony w pracy cykl badań stanowi niewątpliwie postęp w rozumieniu procesów sterujących tworzeniem agregatów-amyloidów.

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Hernik-Magoń ma klasyczny układ. Składa się praktycznie z dwóch części. Pierwszą częścią jest wprowadzenie zawierające przegląd literatury dotyczący polipeptydów i ich przemian konformacyjnych. Dużo miejsca Autorka poświęciła zjawisku agregacji amyloidogennej oraz skutkom tego procesu zachodzącego w organizmach ludzkich. Ponieważ wybranym obiektem badań są homopolipeptydy stąd następny paragraf poświęcony jest głównie poli-L-glutaminie i poli-L-lizynie oraz ich przemianom strukturalnym. Ta część zawiera także podstawową wiedzę dotyczącą struktury polipeptydów: konformacji oraz parametrów fizykochemicznych warunkujących przejście jednej formy w drugą. Omówiony został także proces tworzenia amyloidów oraz struktury jakie tworzą te agregaty. Dużo miejsca Autorka poświęciła omówieniu amylogennych właściwości kwasu poliglutaminowego, głównego obiektu badań. Paragraf 1.3.4 zawiera istotne informacje dotyczące mechanizmu i kinetyki procesu agregacji amyloidowej. W tej części pracy - wstępie, autorka wykazała się dobrą znajomością literatury. Tekst jest krótkim i treściwym opisem wiedzy niezbędnej do wprowadzenia w tematykę rozprawy. Przy okazji omawiania zmian zachodzących w strukturze peptydów w zależności od pH zabrakło mi jedynej bardzo podstawowej informacji, która jest istotnym składnikiem tych badań, a mianowicie wartości pKa dla grup funkcyjnych monomeru kwasu glutaminowego. Takie równanie pozwala na precyzyjne uświadomienie sobie ładunku monomeru a co za tym idzie także polimeru.

Drugi rozdział zatytułowany „Metodologia” zawiera krótki opis znakomicie dobranych metod badawczych: spektroskopii FTIR, AFM, fluorescencji a w szczególności metody sond fluorescencyjnych oraz spektroskopii elektronowego dichroizmu kołowego. Tak jak poprzednio tekst jest napisany krótko, zawiera niezbędną ilość informacji, które będą wykorzystywane w dalszej części rozprawy.

W trzecim rozdziale został sformułowany cel pracy i rozdział najważniejszy: prezentacja zaprojektowanych badań, omówienie wyników i ich prezentacja. Bardzo obszerny spis literatury, głównie z ostatnich lat chociaż znajdują się cytowania artykułów sięgających lat 80 ubiegłego wieku, zamyka omawianą przeze mnie rozprawę doktorską. Jest to także znak, że Autorka dogłębnie przestudiowała literaturę dotyczącą zagadnień poruszanych w rozprawie.

Następnie został określony cel pracy oraz wymienione zostały zadania badawcze. Cel pracy został sformułowany precyzyjnie a dobrze zaplanowane zadania badawcze doprowadziły do rozwiązania założonej tezy. Sformułowanym przez Autorkę celem pracy było głębsze poznanie molekularnego i fizykochemicznego mechanizmu tworzenia amyloidów przez peptydy (L-Glu)_n, oznaczenie minimalnej długości łańcucha peptydowego jeszcze tworzącego agregaty oraz określenie czynników mających wpływ na polimorfizm powstających fibryli amyloidowych. Autorka także podjęła próby wyjaśnienia mechanizmu tworzenia tych struktur. Cykl badań został wykonany na polipeptydzie PLGA, który stanowił wzorzec dla dalszych eksperymentów. Materiałem badawczym były krótkie łańcuchy kwasu poliglutaminowego – (L-Glu)_n, gdzie n przybierało wartości: 3, 4, 5, 6, 10 - liczba reszt kwasu glutaminowego. Dla peptydu PLGA Doktorantka wykonała całą serię badań kinetycznych w roztworach wodnych, rejestrując widma FTIR w zależności od czasu biegu reakcji (245h) oraz dla kilku stężeń wyrażonych w procentach masowych (0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0). Produkt: tworzenie β_2 struktury monitorowany był poprzez wcześniej zdefiniowane pasma w widmie FTIR. Na podstawie zarejestrowanych kinetyk, do dalszych pomiarów dla krótkołańcuchowych polimerów kwasu L-glutaminowego przyjęto stężenie 1% masowy. Agregacja prowadzona była przez 72 godziny w t=60°C. Końcowy produkt analizowany był spektroskopią FTIR i AFM. W pełni zagregowane krótkołańcuchowe peptydy opadały w postaci osadu. Badania wykazały, że tylko polimer złożony z 3 reszt GA nie wykazał charakterystycznego widma dla β_2 struktury. Potwierdziły ten wniosek badania morfologiczne metodą AFM. Po wyznaczeniu krytycznej długości łańcucha polimeru L-Glu wykazującej zdolność do tworzenia agregatów, do dalszych eksperymentów Doktorantka wybrała PLGA-wzorzec i (L-Glu)₅. Eksperyment polegał na badaniu kinetyki tworzenia formy β_2 w procesie zasiewania homologicznego i heterologicznego. Zostały przebadane także właściwości agregacyjne zmodyfikowanych na C i N końcach peptydów oraz efekty uzyskane w procesie zasiewania.

Zastosowanie czterech technik pomiarowych pozwoliło na sformułowanie następujących wniosków:

1. Autorka badając agregację peptydów o różnej liczbie reszt kwasu glutaminowego wyznaczyła ich minimalną liczbę tj n=4 niezbędną do utworzenia β -karkowej agregacji. Struktura agregatów tworzonych przez krótkie oligomery charakteryzuje się znacznymi różnicami w widmie FTIR jak i morfologią tworzonych struktur
2. Niezależnie od długości łańcucha peptydy (L-Glu)_n wykazują zdolność agregacji w obecności dodawanych zarodków utworzonych z fibryli zarówno homologicznych jak i heterologicznych.
3. Koagregacja peptydów (L-Glu)₅ i PLLA prowadzi zawsze do przyspieszenia agregacji i bez względu na ilość obu składników w mieszaninie reakcyjnej, właściwości produktu są identyczne z tworzonymi agregatami przez PLLA. Widma różnicowe CD takiego układu reakcyjnego wykazały, że w pierwszym etapie koagregacji cząsteczka PLLA traci strukturę helikalną co ułatwia i przyspiesza agregację.
4. Modyfikacja C końca i N końca peptydów poprzez reakcję podstawienia zasadniczo zmienia właściwości agregacyjne peptydów. Modyfikacja N-końca nie prowadzi do tak drastycznych zmian. Szczególnie istotne są zmiany C-końca, które silnie spowalniają proces agregacji. Modyfikacja obydwu końców przywraca zdolności do agregacji amyloidowej a jednocześnie przesuwają granicę w kierunku mniejszej liczby reszt kwasu glutaminowego aby utworzyć stabilne agregaty.
5. Badanie zdolności zasiewania poszczególnych peptydów wykazały, że w przypadku różnej modyfikacji peptydów proces jest selektywny a jednocześnie tworzone produkty znacznie różnią się strukturą. Oznacza to, że w przeciwieństwie do efektów uzyskiwanych dla PLLA układy o zmodyfikowanej strukturze wykazują strukturalny polimorfizm.

Po lekturze przedstawionej pracy uważam, że zarówno zaplanowane eksperymenty, ich ilość oraz dobór metod pomiarowych jest imponująca. Uzyskane wyniki wnoszą znaczący wkład w zakres wiedzy o amyloidach. Świadczy o tym fakt, że wszystkie wyniki zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach.

W przeciwieństwie do lektury publikacji, których Autorka jest pierwszym autorem (3), studiowanie rozprawy doktorskiej już jest dość utrudnione. A oto przyczyny tych trudności. Opis wykonanych eksperymentów wykazuje sporo braków. Rozprawa doktorska powinna wykazać pełne zrozumienie doktoranta o ich przebiegu co z kolei powinno się łączyć ze szczególną troską o dokumentację dotyczącą zarówno przebiegu eksperymentów, jak i stosowanych materiałów. Oczekuje się też, że prezentacja wyników będzie czytelna i pełna. Poniżej przedstawiam problemy jakie napotkałam w trakcie lektury.

1. Otrzymywanie peptydów jest istotną informacją dla opisu przebiegu eksperymentu. Doceniam uczciwe przedstawienie faktu, że otrzymał je zespół współpracowników, doktorantka nie zawłaszcza cudzej pracy. Oprócz jednak komentarza warto byłoby krótko opisać metodę otrzymywania tych związków tak jak zostało to opisane w publikacji. Natomiast zupełnie nie mogę zrozumieć dlaczego opis stosowanych odczynników (paragrafy 4.1.1.1 i 4.1.1.2 str. 69) pojawia się w pracy trójrotnie (metoda kopiuj-wklej) jako informacja dotycząca materiałów stosowanych przy następnych eksperymentach. W bardzo interesujących badaniach kinetyki agregacji i tworzeniu amyloidów przez modyfikowane peptydy brakuje jakiegokolwiek opisu przeprowadzonej reakcji podstawienia C i N końca polimerów kwasu L-glutaminowego. Czy był jakiś sprawdzian na temat ilości podstawionych grup?
2. Zgodnie z cytowaną literaturą najlepsze warunki fizykochemiczne przy uzyskiwaniu agregatów β_2 -(L-Glu)_n są $pD=4,1$ oraz temperatura $60^{\circ}C$. W pomiarach kinetycznych temperaturę zredukowano do $40^{\circ}C$. Pomiarы stężeniowe także wykonano w tej samej temperaturze. Czy chodziło o obniżenie szybkości tworzenia agregatów?
3. W paragrafie 4.1.2.2. w opisie agregacji krótkołańcuchowych polimerów we wstępie Doktorantka użyła sformułowania, że w badanej reakcji agregacji w zależności od długości łańcucha można ocenić szybkość tego procesu. W podanych wynikach znalazły się tylko dane dotyczące końcowego efektu agregacji. Proces prowadzony był w $t=60^{\circ}C$ (duża litera T na ogół używana jest dla temperatur wyznaczonych w stopniach K) przez 72h, a mierzony efekt dotyczył charakterystyki widmowej produktu końcowego bez jakiegokolwiek wiedzy o szybkości tego procesu.
4. Pomiarы kinetyczne wykonuje się w przedziale czasowym z określoną częstotliwością. Szukałam w tekście jakiegokolwiek informacji na ten temat. Znalazłam tylko, że pomiarы kinetyczne wykonywane były przez 24h bez podania częstotliwości pomiarów.
5. Pomiarы widm oparte na 256 przemiataniach są prawdopodobnie słabo zaszumione. Zmniejszenie tej liczby do 16 w pomiarach kinetycznych może wymagać dodatkowej obróbki widm. Szczególnie może to być istotne przy prezentacji drugiej pochodnej widm (rys. 49) a także widma próbek zawierające osad agregatów. Opis obróbki widm jest dość lakoniczny.
6. Z ilu pomiarów były wyznaczone kinetyki? Jaka jest powtarzalność? Rysunek 45 pokazuje jednak dość duży rozrzut w otrzymanych krzywych kinetycznych. Prezentowanie wszystkich wyników na jednym wykresie (rys. 45) zmniejsza jego czytelność.
7. Prezentowane wyniki w postaci wykresów są niestety bardzo nieczytelne; np. wspomniany rys 45, rys. 52, rys. 53, 54, 55. Jeśli krzywe się nakładają, szczególnie przy prezentacji widm, można

przesunąć je na osi absorbancji. Na rysunku 36A, 52 i podobne warto pokazać w jakim kierunku rośnie czas zachodzącej reakcji.

8. Otrzymując wykresy absorbancji od czasu i stężenia można by się pokusić o ilościowy opis zjawiska. Najprostszą metodą byłoby np. określenie szybkości reakcji elongacji. To uprościłoby znacznie zrozumienie efektów i skrócenie słownego opisu.
9. Jaką intensywność pasma amidu I mierzono: integralną czy tylko wysokość odciętego pasma?
10. Pod wszystkimi wykresami kinetycznymi opisującymi zależność absorbancji od czasu biegu reakcji pojawia się informacja, że na osi podane są wartości absorbancji znormalizowanej. O normalizacji świadczą wartości na skali intensywności. Wartości te na wykresach kinetycznych zmieniają się pomiędzy 0 i 1 albo 100 (chyba są to %). Względem czego normalizowano absorbancję: intensywności określonego pasma czy po powierzchni całego widma, czy względem wartości uzyskanych dla wzorca PLLA? Z wykresu bardzo trudno się zorientować o co chodzi, w opisie procedury pomiarowej nie ma ani jednego słowa na ten temat. Mierząc tę samą próbkę przez 24h, czy konieczna jest jakaś normalizacja?
11. Próba wytłumaczenia wzrostu intensywności pasma 1585 cm^{-1} przypisanemu antysymetrycznym drganiom rozciągającym zjonizowanym grupom karboksylowym jest dla mnie bardzo niejasna. Tłumaczenie przedstawione w pracy jako efekt polaryzacyjny dodatnio naładowanej grupy $-\text{ND}_3^+$ na niezjonizowaną grupę karboksylową, jest bardzo trudny do zrozumienia. W przedstawionym rozumowaniu jest także pewna nieścisłość. Wartość $\text{pD}=4,1$ odpowiada wartości punktu izoelektrycznego dla peptydu. Grupy karboksylowe przy węglu α są w formie zjonizowanej już powyżej $\text{pD}=2,1$ natomiast reszty GA są jeszcze sprotonowane, jak słusznie zauważyła Autorka. Nie mogę zrozumieć jaki cel miało obniżanie pD . Obniżanie pD nie mogło powodować większych zmian intensywności tego pasma (najniższe mierzone przez doktorantkę wynosiło 2,6) natomiast wzrost pD powyżej 4.1 powodowałby masową jonizację grup bocznych. Dlatego też wydaje mi się, że druga wersja tłumaczenia wzrostu intensywności pasma 1585 cm^{-1} jest najbardziej prawdopodobna. Stąd też wzięła się moja wcześniejsza uwaga o rozpisaniu równowag kwasowo-zasadowych dla monomeru kwasu glutaminowego.
12. Metoda AFM jest niesłychanie ważna ponieważ obrazuje powstające produkty agregacji. Natomiast niejasna jest dla mnie metodyka pomiaru. Z rysunków wynika, że wybierane były dość arbitralnie podobne twory (fibryle) i 15 razy zostały zmierzone przekroje. Ilość zmierzonych obiektów wg prezentowanych ilustracji nie przekraczała 3 fibryli. Doktorantka wspomniała przy rysunku 38 o analizie statystycznej. Dalej jednak w opisie była średnia i odchylenie standardowe. Powstaje pytanie, czy przedstawione obrazy i wybór fibryli był jednorazowy a każdy z fibryli został zmierzony 15 razy, czy zanalizowane zostało 15 obrazów dając odpowiednią ilość danych do analizy statystycznej. Jeśli tak to, jaką analizę zastosowano? Ważne jest także pytanie o istotność podanych wyników.
13. Używanie wyrażenia „kowalencyjnie zmodyfikowanych łańcuchów bocznych”, konsekwentnie stosowanych w całej pracy jakoś nie współgra z miejscem wykonanej pracy (Wydziałem Chemii UW), kojarzy mi się raczej z historią chemii.
14. Nie czuję się specjalistą w sprawach językowych. Raziły mnie jednak sformułowania np. intensywność pasma amid I. W języku polskim nazwy własne powinny się odmieniać. Sporo było niezręcznych sformułowań np. „można zgadnąć” bo przecież w rozprawce naukowej nie powinno się zgadywać.

Niezależnie od krytycznych uwag, praca Pani mgr Agnieszki Hernik-Magoń stanowi wartościowy wkład w stan wiedzy o białkach a dorobek publikacyjny jest znaczący – cztery publikacje, w trzech Doktorantka jest pierwszym autorem. Wszystkie czasopisma gdzie zostały opublikowane prace są znakomite. Na podkreślenie zasługuje udział Doktorantki w dwóch projektach badawczych. Jej aktywność naukowa została nagrodzona stypendium KNOW oraz EMBO Travel Grant Award.

Podsumowując , stwierdzam na podstawie przeprowadzonej oceny, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Hernik-Magoń pt. „AMYLOIDOGENNE WŁAŚCIWOŚCI PEPTYDÓW (L-GLU)_n” stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w chemii peptydów oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań, a tym samym spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki. W związku z tym wnioskuję o jej dopuszczeniu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

