



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

Warszawa, 20.05.2022

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Żygowskiej

Pani mgr Justyna Żygowska przedstawiła do oceny rozprawę doktorską pod tytułem „*Badanie wpływu jonów Cu^{2+} na strukturę, właściwości i oligomeryzację cystatyny c*”, wykonaną w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem dr hab. Anety Szymańskiej, prof. UG jako promotora i dr Marty Orlikowskiej jako promotora pomocniczego. Rozprawa liczy 173 strony w tradycyjnym układzie, którego częściami są kolejno Wprowadzenie, Cel pracy, Metody badań, Procedury, Prezentacja i omówienie wyników, Podsumowanie, i na końcu Bibliografia. Dołączono również streszczenie w języku angielskim. Ten schemat rozprawy umożliwił Doktorantce klarowne przedstawienie istoty swoich badań. Rozprawa jest bogato zilustrowana, zawierają 82 rysunki do czego należy doliczyć również serię obrazów z mikroskopu elektronowego ujętych przez Autorkę w formie tabel.

W pierwszej części liczącego niecałe 40 stron Wprowadzenia Doktorantka przedstawiła w zwięzły i klarowny sposób istotę chorób neurodegeneracyjnych i bieżące poglądy na temat roli procesów agregacji białek w ich rozwoju, następnie omawiając metody eksperymentalne badania tych procesów. W kolejnej części Wprowadzenia opisała rolę jonów metali w chorobach neurodegeneracyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem jonów miedziowych. W ostatniej części Wprowadzenia znajduje się opis cystatyny c, tytułowego białka rozprawy, z uwzględnieniem jej właściwości biologicznych, fizykochemicznych i wiązania jonów metali.

Ta część rozprawy stanowi świetne wprowadzenie do części eksperymentalnej rozprawy. złożone zagadnienia zostały tam opisane w sposób prosty, ale nie uproszczony, do czego przyczyniły się znakomite ilustracje, sporządzone przez Doktorantkę. Świadczy on o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w badaniach, stanowiących kontekst merytoryczny rozprawy. Natomiast obowiązkiem recenzenta jest wskazanie pewnych nieścisłości, które znalazły się w tej części rozprawy. Nie dotyczą one jednak głównego nurtu rozprawy doktorskiej i nie obniżają one znacząco jej wartości. Mianowicie na str. 12-13 wśród amyloidoz nie wymieniono formy nabytej, takiej jak w AD.



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

Nieprecyzyjne jest stwierdzenie, podane na str. 25, jakoby w warunkach fizjologicznych jon Cu^{2+} był stabilny, a Cu^+ niestabilny. To zależy od kontekstu chemicznego. Takie stwierdzenie jest prawdziwe dla rozcieńczonych roztworów wodnych, zwłaszcza w obecności tlenu, ale np. w warunkach wewnątrzkomórkowych. przy niskim poziomie tlenu i dużym stężeniu grup tiolowych jest na odwrót. Dalej na tej samej stronie – pompa ATP7B transportuje jon Cu^+ , a nie jon Cu^{2+} . W opisie reakcji redoks na str. 26 lepiej używać zbiorczego określenia „reakcje Fentona i Habera-Weissa”. Opinia o nadmiarze miedzi w mózgu Alzheimerowskim, zamieszczona na str. 27-28 na podstawie starszej literatury przedmiotu, nie jest tak dobrze ugruntowana, jak sugeruje Autorka. Nie została ona potwierdzona w późniejszych badaniach. Obecnie rozważa się raczej zaburzenia dystrybucji jonów metali pomiędzy strukturami mózgu, a nie ich akumulację. Za nieprawidłowe należy uznać poglądy na temat roli „wolnych” jonów miedziowych w regulacji fizjologicznej receptora NMDA. Takie jony raczej nie występują w mózgu, natomiast przedmiotem badań jest ich konkretna forma chemiczna. Struktura kompleksu Cu(II) z peptydem $\text{A}\beta_{1-x}$ jest nieprawidłowa (Ryc. 11, str. 30). Prawidłowe struktury, tworzone w pH obojętnym, można znaleźć w pracach P. Fallera i wsp. Ponadto przedstawiony na str. 33-34 pogląd o roli jonów Cu(II) w agregacji α -synukleiny *in vivo* został już całkowicie zarzucony, ze względu na prawie całkowitą acetylację N-końca tego białka w mózgu. Stąd struktura podana na Ryc. 13 dla wariantu nieacetylowanego dotyczy tylko sytuacji *in vitro*. Błędy te są jednak o tyle mało istotne, że Autorka nie korzysta z tych danych w analizie i dyskusji otrzymanych przez siebie wyników.

Na str. 47-49 Doktorantka przedstawiła rozbudowany cel pracy. Wymienia w nim zarówno cel ogólny badań, zawarty w tytule rozprawy, jak i szczegółowy plan eksperymentów, prowadzących do osiągnięcia tego celu. Tak dokładne rozpisanie badań w sekcji, zwyczajowo poświęcanej jedynie ogólnemu przedstawieniu hipotezy badawczej, jest niekonieczne, ale z pewnością nie może być poczytane za błąd.

Kolejne dwie części rozprawy, zatytułowane „Metody badań” i „Procedury” traktują łącznie. Jest to znaczna część pracy, obejmująca 38 stron. Często podstawy teoretyczne metodologii badań



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

zamieszcza się w części wstępnej, ale ujęcie zastosowane przez Autorkę jest również prawidłowe, umożliwiając czytelnikowi płynne przejście od ogólnych założeń poszczególnych technik eksperymentalnych do szczegółowego opisu wykonania eksperymentów.

Do weryfikacji hipotezy badawczej Autorka zastosowała techniki biologii molekularnej w celu otrzymania cystatyny c typu dzikiego, mutantów punktowych His86A, His90A oraz mutantu podwójnego His86A_90A. Wszystkie białka zostały otrzymane za pomocą standardowego podejścia w *E. coli*. Autorka szczegółowo opisuje wykorzystane przez siebie techniki zastosowane do optymalizacji nadprodukcji białek. Te eksperymenty, jak i charakteryzacja analityczna otrzymanych białek nie budzą wątpliwości (str. 88-99). Natomiast badania temperatury topnienia badanych białek, ich tendencji do dimeryzacji oraz zdolności do hamowania aktywności papainy, zamieszczone na str. 99-106, wykazują brak istotnego wpływu wprowadzonych mutacji na te właściwości. Wyniki eksperymentów meltingu, zamieszczone na rys. 49 i 50, są dość jednoznaczne, ale muszą skrytykować sposób wygładzania krzywych, który wygenerował fałszywe maksima przy niższych temperaturach, zamieniając szum na nierzeczywiste oscylacje.

Badania efektu jonów metali na właściwości cystatyny c i jej mutantów Doktorantka rozpoczęła od testów dimeryzacji/oligomeryzacji w obecności równomolowych stężeń jonów miedziowych i cynkowych w pH obojętnym. Przy monitorowaniu reakcji za pomocą chromatografii eksperyment z jonem cynkowym nie wykazał oddziaływania dla żadnego z czterech badanych białek, co poskutkowało zarzuceniem dalszych badań z tym jonem. Natomiast dla jonów Cu(II) zaobserwowano silne wzmożenie agregacji białka, zwłaszcza dla WT i mutantu H90A, co wskazuje na kluczową rolę oddziaływania z jonem miedziowym reszty His86. Przy monitorowaniu procesu agregacji za pomocą dichroizmu kołowego nie zaobserwowano zmian struktury drugorzędowej badanych białek. Nie jestem przekonany sugestią Autorki, że o oddziaływaniu świadczą również zmiany w widmach CD w zakresie bliskiego nadfioletu, przedstawione na rys. 60 (str. 113), gdyż nie uwzględniła ona możliwości, że za zmiany w widmie odpowiadają pasma przeniesienia ładunku, związane z tworzeniem wiązań Cu(II) z atomami azotu białka, występujące w tym zakresie widma. Przekonujące i zgodne z obserwacjami chromatograficznymi są natomiast wyniki zależności



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

temperaturowej sygnałów CD, zamieszczone na rys. 61 i 62, choć i w tym przypadku krzywe są nadmiernie wygładzone. Większe zastrzeżenia mam do zastosowania metody EPR do zbadania sposobu wiązania Cu(II) do badanych białek (rys. 63, str. 116). Po pierwsze tak się niestety składa, że dla peptydów histydynowych zazwyczaj między pH 6 i 7 zachodzą znaczne zmiany sposobu koordynacji. Jest więc całkiem możliwe, że w niższym pH jon Cu(II) oddziałuje preferencyjnie z His90, co zdaje się sugerować EPR, a w pH bliskim 7 – jak w eksperymentach agregacyjnych – miejsce wiązania przesuwa się do His86. Można też dopuścić hipotezę, że His86 jest kluczowym miejscem wiązania jonu miedziowego w monomerycznym białku, a His90 w białku zagregowanym. Zresztą wnioskowanie o konkretnym sposobie wiązania jonu Cu(II) na podstawie danych EPR przedstawionych tak, jak na str. 116 jest praktycznie niemożliwe, gdyż nie podano parametrów poszczególnych widm. Za ich pomocą można by oszacować liczbę atomów azotu związanych do jonu miedziowego w poszczególnych kompleksach, co ułatwiłoby określenie ich struktur.

Ciekawy jest natomiast wynik eksperymentu NMR, sugerujący dużą dynamikę miejsca wiązania miedzi w stosunku do części ustrukturyzowanej białka, lub też oddziaływania międzycząsteczkowe. Zgaduję, że łuk na rys. 64, przechodzący przez reszty Ser38 i Val50 oznacza dystans 15 Å od centrum paramagnetycznego, określający część struktury białka niedostępną do analizy.

Sekcja 5 (str. 118-139) poświęcona jest tworzeniem fibryl przez badane białka. Zdecydowana większość eksperymentów wykonana jest w pH 4.0. W tym miejscu muszę poprzeć stanowisko Doktorantki, zamieszczone na str. 137, że w przy tej wartości pH reszty His są sprotonowane i przez to nieefektywne w wiązaniu jonu Cu(II). Jedyne grupy, mogące w pełni oddziaływać z jonami Cu²⁺ to reszty karboksylowe. Zatem interpretacja tych wyników wymagałaby zmapowania reszt Asp i Glu oraz C-końca i przyjrzenia się, w jaki sposób wiązanie jonu Cu²⁺ do tych reszt mogłoby wpłynąć na agregację. Pomocny byłby tu eksperyment z innym kationem o podobnym promieniu jonowym, np. Mg²⁺ lub Mn²⁺. Eksperyment wykonany w wyższym pH (str. 137-139) wykazuje zresztą zupełnie inne zachowanie układu i jednocześnie zdolność jonu miedziowego do fibrylizacji cystatyny c.

Ostatnią część wyników, zawartą w sekcji 6, stanowi opis badań rentgenograficznych. Po



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

wykonaniu licznych eksperymentów Doktorantce udało się otrzymać dziewięć różnych kryształów białka WT i jego mutantów, z i bez jonu Cu(II). Spośród nich wyznaczono nowe struktury mutantu H90A w formie monomerycznej i dimerycznej (z dobrą jakością) i mutantu podwójnego. Za pomocą map gęstości elektronowej udało się też wykazać tworzenie wiązania jonu Cu(II) do His90 w białku dzikim. Należy jednak zauważyć, że namaczanie kryształu białka roztworem jonów miedziowych niekoniecznie może odtworzyć sposób wiązania Cu(II) w roztworze, gdyż w kryształach bardzo utrudniona jest zmiana konformacji łańcucha białkowego, zapewne towarzysząca tworzeniu kompleksu w roztworze. W końcowej części sekcji 6 Autorka kompetentnie dyskutuje uwarunkowania eksperymentów krystalograficznych i rentgenograficznych i obiektywne trudności, napotkane w toku badań.

Rozprawa kończy się trzystronicowym podsumowaniem, w którym mgr Justyna Żygowska omawia uzyskane przez siebie wyniki, wśród nich potwierdzenie wpływu jonów miedziowych na agregację cystatyny c oraz dodatkowo odkrycie roli pętli zawierającej reszty histydyny na proces dimeryzacji białka. Doktorantka zrealizowała dużą część zamierzonych badań i uzyskała wartościowe wyniki badawcze. Opisane badania są warte kontynuacji, a skrytykowane powyżej zagadnienia eksperymentalne i interpretacyjne nie mają kluczowego znaczenia dla istotnych wyników rozprawy.

Stwierdzam zatem, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska p. mgr Justyny Żygowskiej spełnia wymogi, stawiane przed rozprawami doktorskimi przez art. 186 i 187 ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.