

dr hab., prof. UG
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 8.04.2016 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Kamila Roźniakowskiego
pt. „*Modyfikacje amyloidogennych białek i peptydów N-metylowanymi aminokwasami*” wykonanej w Instytucie
Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej

(Promotor: dr hab. inż. Beata Kolesińska)

Tematyka dysertacji opiera się na zjawisku niewłaściwego zwijania się białek w wyniku mutacji w sekwencji aminokwasowej lub na skutek zmian środowiska. Białko wówczas przechodzi ze swojej rozpuszczalnej formy natywnej w nierozpuszczalną, tworząc fibryle gromadzące się w rozmaitych organach np. w mózgu, sercu, nerkach, trzustce czy w wątrobie. Poznanie mechanizmów rządzących procesami powstawania fibryli amyloidowych to obecnie wielkie wyzwanie dla naukowców, gdyż wydłużający się czas życia ludzi coraz częściej wiąże się z formowaniem się w ich organizmach nieprawidłowych złogów białkowych (tzw. amyloidów). Obecność amyloidów (lub ich rozpuszczalnych form oligomerycznych) prowadzi najczęściej do zaniku fizjologicznej aktywności białek lub peptydów, a także do szeregu innych niekorzystnych dla organizmu człowieka procesów. Agregacja rozpuszczalnych w warunkach fizjologicznych białek i peptydów w postaci złogów amyloidowych jest związana z wieloma poważnymi chorobami. Ze względu na swoją patogenezę są one nazywane chorobami konformacyjnymi. Przyczyną tych chorób jest zmiana konformacyjna określonego białka lub peptydu, prowadząca do jego agregacji i powstania amyloidu. Najbardziej znanym przykładem choroby amyloidowej jest choroba Alzheimerera, choroba Huntingtona, Parkinsona, Creutzfelda-Jacoba i cukrzyca typu II. To właśnie cukrzyca typu II, zwana chorobą cywilizacyjną XXI wieku, skłoniła Doktoranta do poznania przyczyn jej powstawania i opracowania możliwych dróg spowalniających jej rozwój. Tematyka dysertacji należy do największych wyzwań współczesnej chemii medycznej. Badania prowadzone w tej dziedzinie stanowią przedmiot zainteresowania bardzo wielu grup badawczych. Do tego nurtu badań można też zaliczyć przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską mgr inż. Kamila Roźniakowskiego, wykonaną pod kierunkiem dr hab. inż. Beaty Kolesińskiej w Instytucie Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. Podjęta przez Doktoranta tematyka pracy doktorskiej jest w moim przekonaniu bardzo aktualna a przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania pozwoliły na (i) uzyskanie informacji na temat samoorganizacji peptydów w fibrylach amyloidowych, na (ii) identyfikację wymagań strukturalnych nowoprojektowanych inhibitorów peptydowych procesu fibrylizacji amyliny oraz na (iii) określenie cytotoksyczności zsyntetyzowanych peptydów na hodowle komórek trzustki.

Całość rozprawy obejmuje 247 strony maszynopisu i podzielona jest na 7 głównych rozdziałów (tj. wprowadzenie, cel i założenia pracy, część literaturowa, badania własne, część eksperymentalna, streszczenie, literatura). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów. Na końcu znajduje się spis piśmiennictwa, który

obejmuje 271 pozycji. W pracy umieszczono 45. tabel i 92. rysunki, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników.

W krótkim wprowadzeniu do dysertacji, Doktorant zwraca uwagę na problem cukrzycy we współczesnym społeczeństwie. Na świecie co 10 sekund diagnozuje się cukrzycę a co 6 sekund ktoś umiera z powodu jej powikłań. Obecnie, na cukrzycę choruje 382 miliony ludzi a w 2035 roku liczba ta zwiększy się do 592 milionów. Statystyki są przerażające, co sprawia, że podjęty przez Doktoranta temat dysertacji przemawia do wyobraźni czytelnika i dowodzi słuszności wyboru tematu pracy.

W pierwszej części pracy mgr inż. Roźniakowski zaprezentował cele i założenia jakie postawił w swoim doktoracie. Należały do nich:

- (i) Identyfikacja sekwencji aminokwasowych w amylinie, odpowiedzialnych za proces fibrylizacji tego peptydu
- (ii) Poszukiwanie nowych inhibitorów agregacji amyliny
- (iii) Zbadanie procesu samoagregacji przez krótkie peptydy zawierające aminokwasy aromatyczne
- (iv) Optymalizacja procesu syntezy chemicznej peptydów o właściwościach fibrylogennych

W mojej opinii znacznie lepiej byłoby przedstawienie celu pracy po części literaturowej, gdyż ułatwiłoby to czytelnikowi zrozumienie problemów jakich podjął się Doktorant w swojej pracy.

W drugiej części pracy, Doktorant opisał stan obecnej wiedzy dotyczący amyloidów. Podał dokładną definicję amyloidu oraz wymogi strukturalne którymi musi się on charakteryzować. Szczegółowo opisał metody fizyko-chemiczne badania struktury oraz metody mikroskopowe wizualizacji włókien amyloidowych. Na szczególną pochwałę zasługuje podrozdział poświęcony opisowi oddziaływań barwników z fibrylą amyloidową. Niezwykle cenne w mojej opinii jest również zestawienie metod badawczych stosowanych w badaniu struktur amyloidowych. Następnie, pod kątem amyloidogenności i roli jaką pełni w powstawaniu cukrzycy, Pan Roźniakowski omówił peptyd - amylinę. Przedstawił jego budowę i funkcję oraz rolę w fizjologii komórki i w stanach patologicznych. Wszystkie podrozdziały są bardzo dobrze udokumentowane stosownymi rysunkami co powoduje, że część literaturową dysertacji czyta się łatwo i z dużym zainteresowaniem. Przedstawione wprowadzenie literaturowe zapoznaje czytelnika bardzo dobrze w tematykę realizowanych przez Doktoranta badań własnych.

W kolejnym rozdziale pracy, zatytułowanym „Badania własne”. W tej części pracy można wyłuskać dwa główne wątki. Pierwszy z nich dotyczy optymalizacji metod syntezy tzw. „trudnych peptydów” o właściwościach amyloidogennych. Doktorant podjął się doboru i sprawdzenia czynnika kondensującego (sulfonian N-triazynyloamoniowy) w syntezie peptydów. Wydajności otrzymanych peptydów mieściły się w przedziale 73-95%, zaś ich czystości w przedziale 90-95%, co stanowi bardzo dobry wynik. W swojej pracy udowodnił, że czynnik ten świetnie nadaje się do syntez peptydów łatwo agregujących. W ramach wątku dotyczącego optymalizacji metody syntezy, Doktorant testował również różne żywice stosowane podczas syntezy peptydów. Chcąc zsyntetyzować amylinę przeprowadził kilka prób na kilku różnych żywicach. Ostatecznie, amylinę udało mu się zsyntetyzować na żywicy PAL-PEG z wykorzystaniem pseudoprolinowych bloków budulcowych w obecności promieniowania mikrofalowego. Wydajność tak otrzymanego peptydu wynosiła 96,8%.

Drugi wątek rozdziału zatytułowanego „badania własne” dotyczył projektowania peptydów o właściwościach agregacyjnych oraz ich badań fizyko-chemicznych w aspekcie tworzenia fibryli. Badaniom tym poddał trzy grupy peptydów. Pierwsza grupa to krótkie di- lub tripeptydy zawierające reszty aromatyczne, druga grupa to peptydy będące fragmentami amyliny oraz trzecia grupa to potencjalne inhibitory formowania fibryli do których należały N-

metylowane peptydy. Z badań przeprowadzonych dla pierwszej grupy peptydów wynika, iż szesnaście z przetestowanych peptydów tworzy struktury samoorganizujące się w warunkach fizjologicznych (37°C, pH 7.2). Ten etap pracy wskazał, że tendencja do tworzenia fibryli zależy od składu aminokwasowego i wskazał, że ważnymi elementami tych oddziaływań są oddziaływania pomiędzy grupami aromatycznymi (π - π), stabilizując w ten sposób β -karkę. Badania przeprowadzone na drugiej grupie peptydów pokazały, iż fragmenty (18-22) oraz (33-37) amyliny stanowią nowe, niezidentyfikowane dotychczas tzw. rdzenie amyloidowe, czyli fragmenty o silnych właściwościach fibrylogennych. W trzeciej grupie peptydów znalazły się te najbardziej interesujące w mojej opinii peptydy. Należały do nich N-metylowane peptydy, które bez modyfikacji na azocie amidowym formowały fibryle, natomiast po wprowadzeniu modyfikacji (pojedynczych lub podwójnych) traciły te właściwości. Doktorantowi udało się znaleźć 10 peptydów o niskiej tendencji do samoagregacji oraz 8 peptydów blokujących agregację innego, silnie agregującego peptydu. Te krótkie peptydy poprzez uniemożliwienie tworzenia wiązania wodorowego (zamiana wodoru na grupę metylową na azocie amidowym) utrudniają łączenie się kolejnych cząsteczek peptydu we włókno fibrylarne stabilizowane przez wiązania wodorowe. W badaniach agregacyjnych Doktorant wykorzystał badania spektrofluorymetryczne w obecności barwnika – tioflawiny T (test tioflawinowy) lub badania spektrofotometryczne z wykorzystaniem barwnika – czerwieni Kongo. Ponadto, do scharakteryzowania morfologii fibrylarnych agregatów Doktorant używał mikroskopu z przystawką do światła spolaryzowanego. Dla wybranych peptydów Doktorant przeprowadził również badania cytotoksyczności na liniach komórkowych trzustki szczurzej, pokazując, iż hamowanie agregacji zmniejsza również właściwości toksyczne dla komórek trzustki. Peptydy takie mogą więc stanowić potencjalny lek w walce z cukrzycą.

W czwartej części Doktorant opisał szczegółowo warunki syntezy wszystkich otrzymanych do badań aminokwasów i peptydów. Doktorant podał w pracy warunki syntezy, oczyszczania i charakterystykę otrzymanych peptydów (czas retencji, wydajność, MS, NMR). W większości, były to standardowe i powszechnie używane metody w zakresie pełnej charakterystyki peptydów. Elementy opisu syntezy poszczególnych związków znalazły się również w rozdziale zatytułowanym „badania własne”, co stanowiło pewną trudność podczas czytania dysertacji.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki zostały w sposób bardzo zwięzły i przejrzysty zapisane w kolejnym rozdziale, zatytułowanym „Streszczenie”. Na podstawie opisanych eksperymentów i wyników można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorant zdobył warsztat badawczy w zakresie projektowania i syntezy peptydów, badania procesów agregacyjnych peptydów oraz badania cytotoksyczności peptydów na wybranych liniach komórkowych.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie. Poniżej, z obowiązku recenzenta, wymieniłam najważniejsze pytania oraz drobne uwagi dotyczące dysertacji:

- (1) Str. 9 – W spisie skrótów niektóre z nich nie posiadają polskiego tłumaczenia
- (2) Str. 13 – Czy według Doktoranta istnieje „postulat Levinthala” czy tzw. „paradoks Levinthala”?
- (3) Str. 14, Rys. 2 - Gdzie na Rys. 2 powinien znajdować się podpis oddziaływań międzycząsteczkowych?
- (4) Str. 88 – W zdaniu nad tabelą brakuje nazwy metody którą potwierdzona była budowa peptydów.
- (5) Str. 96 – Czy dla krótkich tripeptydów, zawierających resztę Cys wykluczony został proces formowania międzycząsteczkowego wiązania disulfidowego przez badane peptydy?
- (6) Str. 96 – Jak Doktorant może wytłumaczyć formowanie się sferycznych struktur przez jeden z badanych peptydów?
- (7) Str. 112 – Czy mogłabym zobaczyć przykładowe widma NMR dla uzyskanych N-metyloaminokwasów przed i po rozdziale na chiralnym złożu?
- (8) Str. 116 – Jak powinien wyglądać prawidłowy zapis fragmentu tekstu: „fragment 20-29 IAPP, o strukturze H-SNNFGAILSS-OH”

- (9) Str. 142 – Jaka idea przyświecała Doktorantowi podczas podziału sekwencji amyliny na takie a nie inne fragmenty? Dlaczego peptydy zostały zaprojektowane jako nienachodzące na siebie fragmenty pięcioaminokwasowe? Czy Doktorant sprawdzał tzw. energię Rosetta dla amyliny w celu wyznaczenia fragmentu peptydu posiadającego najsilniejsze właściwości fibrylogenne?
- (10) Str. 151 – Dlaczego została wybrana taka a nie inna sekwencja modelowa (związek 179)?
- (11) Str. 154 i 191 – Jakie przesłanki posłużyły Doktorantowi do zaprojektowania modyfikacji peptydu resztą N-metyloaminokwasu w takich a nie innych pozycjach?
- (12) Czy w badaniach mikroskopowych wykorzystywano inną metodę obrazowania fibryli peptydowych, np. technikę TEM? W pracy, na zdjęciach spod mikroskopu bardzo często brakuje skali. Co jest tego powodem?
- (13) W części pracy dotyczącej opisu syntez brakuje często informacji o stosowanych gradientach przy oznaczaniu końcowej czystości peptydów.
- (14) Dlaczego w swoich badaniach Doktorant nie przetestował powszechnie stosowanych żywic TentaGel lub RRAM?
- (15) Dlaczego podczas badań stosowane były różne długości fali początkowej dla widm ThT i różne czasy analizy?
- (16) Czy Doktorant sprawdzał jak duże, rozpuszczalne oligomery tworzą agregujące peptydy? Na przykład z wykorzystaniem techniki SEC?
- (17) W pracy zauważyć można wiele literówek, co pewnie było spowodowane pośpiechem na ostatnim etapie dokonywania korekty pracy. Wiele rysunków nie posiada odniesień literaturowych. Na rysunkach często pojawia się anglojęzyczny opis. Brak jest często na rysunkach i w tabelach opisu stosowanych skrótów. Brak jest czasami konsekwencji w oznaczeniach np. Fmoc-Ala oraz Fmoc-alanina.

Przytoczone uwagi krytyczne oraz kwestie dyskusyjne nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze pracowitości Doktoranta, wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa mgr inż. Kamila Roźniakowskiego zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny, uzyskany dla kilkudziesięciu związków. Kandydat wykazał się ponadto znajomością w zakresie optymalizacji metod syntezy peptydów. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań opublikowane zostały w latach 2010-2015 w czasopiśmie indeksowanym w JCR. Na opublikowany dorobek mgr inż. Kamila Roźniakowskiego łącznie składają się 3 artykuły opublikowane w czasopiśmie indeksowanym w JCR oraz 1 artykuł w czasopiśmie o zasięgu krajowym (w dwóch pracach Doktorant jest pierwszym autorem).

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym z późn. zm. W tym odniesieniu wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Kamila Roźniakowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

