

**Dr Paulina Małgorzata Czaplewska**

**Załącznik 2**

**Autoreferat wnioskodawcy przedstawiający omówienie  
osiągnięcia naukowego zgłaszanego jako przedmiot  
postępowania habilitacyjnego i naukowej życiorys  
wnioskodawcy w języku polskim**

**Dr Paulina Małgorzata Czaplewska**

**Autoreferat**

**Laboratorium Spektrometrii Mas  
Zespół Laboratoriów Specjalistycznych  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Gdańsk 2018

1. **Imię i nazwisko:** Paulina Małgorzata Czaplewska  
**Nazwisko rodowe:** Juszczyk
2. **Dane kontaktowe:** Zespół Laboratoriów Specjalistycznych  
Laboratorium Spektrometrii Mas  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny  
Ul. Antoniego Abrahama 58  
80-307 Gdańsk  
Polska
- Tel.:** 0048 58 5236437  
**Tel. komórkowy:** 0048 609339535  
**Fax:** 0048 58 5236426  
**E-mail:** [paulina.czaplewska@ug.edu.pl](mailto:paulina.czaplewska@ug.edu.pl)

3. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

**2005 r.** Doktor nauk chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk, Polska

**2001 r** magister chemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, Gdańsk, Polska

4. **Tytuł pracy doktorskiej, promotor, recenzenci:**

**Tytuł:** Synteza, badania konformacji i agregacji peptydów  $\beta$ -amyloidowych.

**Promotor:** prof. Zbigniew Grzonka Uniwersytet Gdański

**Recenzenci:** prof. Krzysztof Rekowski Uniwersytet Gdański

prof. Zbigniew Szewczuk Uniwersytet Wrocławski

**Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:**

*Wartość IF pobrana ze strony Web of Science (WoS), przy braku IF dla danego roku, podano wartość IF roku poprzedniego, Punkty Ministerialne zgodnie z Wykazem Czasopism Punktowanych MNiSW obowiązujących dla danego roku publikacji, liczba cytowań ( $L_c$ ) zgodnie z bazą danych Web of Science Core Collection).*

**P. Juszczyk**, AS. Kołodziejczyk, Z. Grzonka (2005) *Circular dichroism and aggregation studies of amyloid beta (11-28) fragment and its variants*. **Acta Biochimica Polonica**. (IF<sub>2004</sub> = **1.032**, IF<sub>3-letni</sub> = **0.754**, Punkty MNiSW **15**, Lc = **14**)

*Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 50%: jestem pierwszym autorem manuskryptu, przeprowadziłam wszystkie eksperymenty prezentowane w pracy, brałam udział w analizie danych, przygotowałam wszystkie tabele i rysunki oraz brałam udział w przygotowaniu tekstu manuskryptu.*

Sumaryczny IF publikacji, wchodzących w skład pracy doktorskiej = **1.032**

Sumaryczny IF<sub>5-letni</sub> publikacji, wchodzących w skład pracy doktorskiej = **0.754**

Sumaryczna wartość punktów MNiSW publikacji pracy doktorskiej = **15**

5. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

**2016 - obecnie** Nauczyciel akademicki (adiunkt), Laboratorium Spektrometrii Mas, Zespół Laboratoriów Specjalistycznych,

	Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny
<b>2013-2016</b>	Staż podoktorski (Post-doc), specjalista w zakresie spektrometrii mas w ramach projektu międzynarodowego FP 7 REGPOT "MOBI4Health-Centre of Molecular Biotechnology for healthy life and environment" Laboratorium Spektrometrii Mas, Zespół Laboratoriów Specjalistycznych, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny
<b>2007-2013</b>	Nauczyciel akademicki (adiunkt), Katedra Chemii Biomedycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
<b>2006-2007</b>	Staż podoktorski (Post-doc) w Laboratory of Analytical Chemistry and Biopolymer Structure Analysis, University of Konstanz - Department of Chemistry, Niemcy
<b>2005-2006</b>	Staż podoktorski (Post-doc) w Department of Molecular Medicine University of Texas Health Science Center at San Antonio USA

6. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

***Mapowanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z biologicznie aktywnymi ligandami***

Osiągnięcie naukowe (cykl monotematyczny) obejmuje cykl **dziesięciu** prac eksperymentalnych, zebranych pod wspólnym tytułem jak przedstawiono w Punkcie 6a. (\* - oznacza autora korespondencyjnego)

**Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

*Wartość IF pobrana ze strony Web of Science (WoS), przy braku IF dla danego roku, podano wartość IF roku poprzedniego, Punkty Ministerialne zgodnie z Wykazem Czasopism Punktowanych MNiSW obowiązujących dla danego roku publikacji, liczba cytowań (L<sub>c</sub>) zgodnie z bazą danych Web of Science Core Collection)*

1. M. Rafalik, M. Spodzieja, A.S. Kołodziejczyk, S. Rodziewicz-Motowidło, A. Szymańska, A. Grubb, P. **Czaplewska\*** (2018) The identification of discontinuous epitope in the human cystatin C – monoclonal antibody hCC3 complex. ***Journal of Proteomics***, (DOI: doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.020), praca w druku  
**IF<sub>2017</sub> 3.914, IF<sub>5-letni</sub> = 3.926, Punkty MNiSW = 35, L<sub>c</sub> = 0**  
***Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: jestem autorem korespondencyjnym manuskryptu, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich***



doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, przeprowadziłam rejestrację wszystkich widm MALDI TOF dla analizowanych próbek, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele oraz przygotowałam pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu badawczego.

2. M. Spodzieja, K. Kalejta, A.S. Kołodziejczyk, M. Maszota-Zieleniak, S. Rodziewicz-Motowidło, W. Żmudzińska, **P. Czaplewska\*** (2017) Characteristics of C-terminal,  $\beta$ -amyloid peptide binding fragment of neuroprotective protease inhibitor, cystatin C. *Journal of Molecular Recognition*, 30(2): 1-13 (DOI 10.1002/jmr.2581)  
IF<sub>2015</sub> = 2.091, IF<sub>5-letni</sub> = 2.051, Punkty MNiSW = 20, L<sub>c</sub> = 2  
**Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 35%: jestem autorem korespondencyjnym manuskryptu, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, przeprowadziłam rejestrację wszystkich widm masowych dla analizowanych próbek, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele oraz przygotowałam pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu badawczego.**
3. M. Prądzińska, I. Behrendt, J. Astorga-Wells, A. Manoilov, R. Zubarev, A.S. Kołodziejczyk, S. Rodziewicz-Motowidło, **P. Czaplewska\*** (2016) Application of amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for epitope mapping in human cystatin C. *Amino Acids*, 48(12): 2809-2820, (DOI: 10.1007/s00726-016-2316-y)  
IF<sub>2015</sub> 3.29, IF<sub>5-letni</sub> = 3.241, Punkty MNiSW 30, L<sub>c</sub> = 6  
**Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: jestem autorem korespondencyjnym manuskryptu, miałam wiodący udział w analizie wszystkich otrzymanych wyników, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele oraz przygotowałam pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu badawczego.**
4. M. Prądzińska, I. Behrendt, M. Spodzieja, A.S. Kołodziejczyk, S. Rodziewicz-Motowidło, A. Szymańska, S.L. Lundström, R.A. Zubarev, K. Macur, **P. Czaplewska\*** (2016) Isolation and characterization of autoantibodies against human cystatin C. *Amino Acids*, 48(11): 2501-2518, (DOI 10.1007/s00726-016-2271-7)  
IF<sub>2015</sub> 3.29, IF<sub>5-letni</sub> = 3.241, Punkty MNiSW 30, L<sub>c</sub> = 1  
**Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: jestem autorem korespondencyjnym manuskryptu, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, przeprowadziłam rejestrację wszystkich widm masowych dla analizowanych próbek, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele oraz przygotowałam pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu badawczego.**
5. I. Behrendt, M. Prądzińska, M. Spodzieja, A.S. Kołodziejczyk, S. Rodziewicz-Motowidło, A. Szymańska, **P. Czaplewska\*** (2016) Epitope location for two

monoclonal antibodies against human cystatin C, representing opposite aggregation inhibitory properties. *Amino Acids*, 48(7): 1717-1729, (DOI: 10.1007/s00726-016-2242-z)

IF<sub>2015</sub> 3.29, IF<sub>5-letni</sub> = 3.241, Punkty MNiSW<sub>2016</sub> 30, Lc = 2)

*Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: jestem autorem korespondencyjnym, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, przeprowadziłam rejestrację wszystkich widm masowych dla analizowanych próbek, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele oraz przygotowałam pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu badawczego.*

6. M. Maszota, N. Karska, M. Spodzieja, J. Ciarkowski, A.S. Kołodziejczyk, S. Rodziewicz-Motowidło, P. Czaplewska\* (2015) Structural studies of the C-terminal 19-peptide of serum amyloid A and its Pro → Ala variants interacting with human cystatin C. *Journal of Molecular Recognition*, 28(7), 413-426; (DOI: 10.1002/jmr.2457) (IF<sub>2014</sub> 2.091, IF<sub>5-letni</sub> = 2.051, Punkty MNiSW 20, Lc = 1)

*Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 30%: jestem autorem korespondencyjnym manuskryptu, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, napisałam manuskrypt oraz przygotowałam pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu badawczego.*

7. M. Spodzieja, M. Rafalik, A. Szymańska, A.S. Kołodziejczyk, P. Czaplewska\*. (2013) Interaction of serum amyloid A with human cystatin C – assessment of amino acid residues crucial for hCC-SAA formation (part II). *Journal of Molecular Recognition*, 26(9): 415-425, (DOI: 10.1002/jmr.2283)

IF<sub>2012</sub>=3.31, IF<sub>5-letni</sub> = 2.051 Punkty MNiSW 20, Lc = 8

*Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: jestem autorem korespondencyjnym manuskryptu, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, przeprowadziłam rejestrację wszystkich widm masowych dla analizowanych próbek, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele oraz przygotowałam pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu badawczego.*

8. M. Spodzieja, A. Szymańska, A. Kołodziejczyk, M. Prądzińska, M. Maszota, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, A. Grubb, P. Czaplewska\*. (2012) Interaction of serum amyloid A with human cystatin C—identification of binding sites. *Journal of Molecular Recognition*, 25(10):513-524, (DOI: 10.1002/jmr.2220)

IF<sub>2011</sub>=3.31 IF<sub>5-letni</sub> = 2.051, Punkty MNiSW 20, Lc = 9

*Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: jestem autorem korespondencyjnym manuskryptu, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, przeprowadziłam rejestrację wszystkich widm masowych dla analizowanych próbek, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele oraz przygotowałam*

pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu badawczego.

9. A. Śladewska, A. Szymańska, M. Kordalska, A. Lewandowska, A.S. Kołodziejczyk, A. Grubb, G. Paraschiv, M. Przybylski, **P. Czaplewska\*** (2011) Identification of the epitope for anti-cystatin C antibodies (Cyst-13). *Journal of Molecular Recognition*, 24(4):687-99, (DOI: 10.1002/jmr.1100)

IF<sub>2011</sub>=2.286, IF<sub>5-letni</sub> = 2.051, Punkty MNiSW 20, Lc = 13

**Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%:** jestem korespondencyjnym autorem manuskryptu, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, wykonałam wszystkie pomiary widm masowych, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele oraz przygotowałam pracę do druku. Ponadto zapewniłam finansowanie badań z własnego projektu.

10. **P. Juszczak**, G. Paraschiv, A. Szymańska, A.S. Kołodziejczyk, S. Rodziewicz-Motowidło, Z. Grzonka, **M. Przybylski\***. (2009) Binding epitopes and interaction structure of the neuroprotective protease inhibitor cystatin C with beta-amyloid revealed by proteolytic excision mass spectrometry and molecular docking simulation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(8): 2420-2428, (DOI 10.1021/jm801115e)

IF<sub>2008</sub> = 4.898, IF<sub>5-letni</sub> = 5.896, Punkty MNiSW 45, Lc = 28

**Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%:** jestem pierwszym autorem manuskryptu, miałam wiodący udział w planowaniu wszystkich doświadczeń i analizie wszystkich otrzymanych wyników, wykonałam następujące eksperymenty laboratoryjne: oznaczanie miejsc wiązania cystatyny C i peptydu beta amyloidowego z wykorzystaniem wycinania i ekstrakcji epitopu w oparciu o analizę widm masowych, testy powinowactwa z wykorzystaniem kolumn i techniki ELISA, zsyntetyzowałam część peptydów prezentowanych w pracy, napisałam manuskrypt, przygotowałam i opracowałam ryciny i tabele.

Sumaryczny IF publikacji, wchodzących w skład cyklu monotematycznego = **31.770**

Sumaryczny IF<sub>5-letni</sub> publikacji, wchodzących w skład cyklu monotematycznego = **29.800**

Sumaryczna wartość punktów MNiSW publikacji cyklu monotematycznego = **270**

**b) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i otrzymanych wyników wraz z omówieniem ich potencjalnego wykorzystania:**

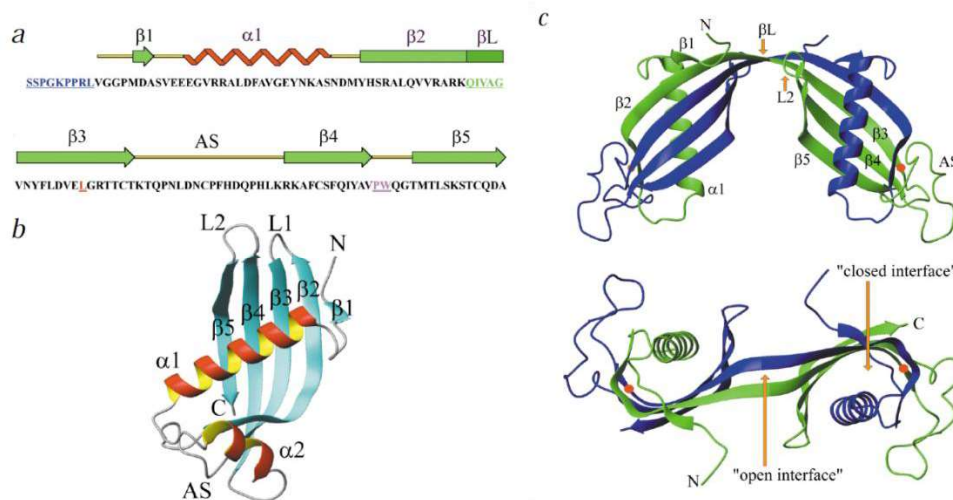
**1. Wstęp**

Oddziaływania białko-białko, jak i peptyd-białko są w organizmach żywych podstawą większości procesów fizjologicznych. Leżą one również u podstaw wielu procesów patologicznych, które, jak np. choroby neurodegeneracyjne, stanowią narastający problem w wysokorozwiniętych i starzejących się społeczeństwach. Badania naukowe

skupiające się na zgłębieniu molekularnych mechanizmów tworzenia kompleksów białkowych oraz poznanie czynników wpływających na ich stabilność pozwalają na coraz lepsze rozumienie dynamiki tych układów. Otwiera to drogę do wykorzystania ligandów czy fragmentów peptydowych do kontroli zarówno procesów fizjologicznych, jak i patologicznych, zachodzących w naszym organizmie. **Celem prowadzonych przeze mnie badań była identyfikacja fragmentów ludzkiej cystatyny C, które istotne są dla oddziaływania z peptydami i białkami.**

Ludzka cystatyna C (hCC, Rysunek 1 A) jest niewielkim białkiem (120 Aa), które wzbudza stałe zainteresowanie naukowców. Przede wszystkim ze względu na główną rolę jaką pełni, czyli regulowanie aktywności proteaz cysteinowych<sup>1</sup>. Jako powszechnie występujący w ludzkim organizmie inhibitor, hCC może wpływać zarówno na procesy wewnątrzkomórkowe, takie jak apoptoza czy prezentacja antygeny, jak i zewnątrzkomórkowe, do których zaliczyć można m.in. miażdżycę tętnic, przerzuty nowotworów oraz inwazje patogenów<sup>2</sup>. Coraz częściej wzmiankowane jest zaangażowanie cystatyny w procesy niezależne od jej właściwości inhibicyjnych. W tym przypadku głównie wymienia się **rolę modulatorową cystatyny C** związaną ściśle z oddziaływaniem z innymi białkami: np. modulowanie aktywności receptora transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- $\beta$ )<sup>3</sup>; blokowanie ścieżek sygnałowych w komórkach zdrowych i nowotworowych<sup>4</sup>; wpływ na nadprodukcję białek np. promotora kwaśnego białka włóknikowego GFAP w hodowlach komórek nerwowych<sup>5</sup>; **udział w procesie amyloidogenezy** (hCC, a w szczególności jej naturalnie występujący wariant L68Q, jako główny czynnik patologiczny w dziedzicznej amyloidowej angiopatii mózgowej HCCAA)<sup>6</sup> czy **funkcję neuroochronną** związaną z hamowaniem agregacji amyloidu beta (A $\beta$ )<sup>7</sup>; ochroną komórek nerwowych przed toksycznością amyloidów oraz zwiększeniem przeżywalności komórek nerwowych w hodowlach w obecności oligomerycznych czy fibrylarnych form A $\beta$ <sup>8</sup>.

Dzięki obecności wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej hCC ma możliwość oddziaływania z wieloma białkami, przez co może wpływać na różne ścieżki sygnałowe, a poprzez oddziaływanie z elementami komórek - na ich funkcje biologiczne. Cystatyna C stanowi też doskonały punkt wyjścia do projektowania nowych związków, które swoją aktywność zawdzięczają miejscom wiążącym hCC z innymi białkami. W ten sposób udało się do tej pory, w oparciu o strukturę miejsca aktywnego w stosunku do proteaz cysteinowych oraz N-koniec hCC, zaproponować zarówno nowe inhibitory, jak i peptydomimetyki o silnym działaniu antybakteryjnym i antywirusowym<sup>10,11</sup>, które wkrótce zostaną wprowadzone na rynek.



**Rysunek 1** Pierwszo-, drugo-, i trzeciorzędowa struktura ludzkiej cystatyny C. **a)** sekwencja aminokwasowa z zaznaczonymi elementami struktury drugorzędowej, na niebiesko oznaczono fragment niewidoczny w strukturze krystalicznej, na czerwono strukturę  $\alpha$ -helisy, na zielono struktury  $\beta$ -katek; **b)** kurza cystatyna C (PDB 1CEW), L1 pętla 1, L2 pętla 2; AS fragment nazywany Appendix Structure; **c)** dimer cystatyny C przedstawiony w dwóch orientacjach<sup>9</sup>.

### **Ludzka cystatyna C i peptyd beta amyloidowy (A $\beta$ )**

W odróżnieniu od endemicznego charakteru amyloidozy związanej z agregacją cystatyny C, choroba Alzheimera (AD), związana z agregacją peptydu  $\beta$  amyloidowego (A $\beta$ ), jest coraz częściej uznawana za chorobę cywilizacyjną. Z roku na rok przybywa osób starszych cierpiących z powodu postępujących problemów z pamięcią powiązanych ze sporadyczną lub dziedziczną formą tej choroby, co zdecydowanie zmienia jakość życia tak chorych jak i ich otoczenia.

Głównym składnikiem powstających w procesie neurodegeneracyjnym złogów amyloidowych jest peptyd A $\beta$  zbudowany z 39 do 42 reszt aminokwasowych, które powstają na skutek niewłaściwej obróbki enzymatycznej białka prekursorowego  $\beta$  amyloidu (APP) w czasie jego szlaku komórkowego<sup>12</sup>. W wyniku działania  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretyz z APP uwalniane są podatne na agregację peptydy, z których forma 42-aminokwasowa agreguje najszybciej. Mimo iż wiele grup badawczych zajmuje się badaniem mechanizmu agregacji A $\beta$ , wciąż nie ma konsensusu co do mechanizmu tworzenia płytek amyloidowych czy stopnia toksyczności form oligomerycznych peptydu<sup>13,14,15</sup>. Wiadomo natomiast, że oprócz głównego składnika złogów, czyli peptydu A $\beta$ , w tworzonych agregatach można zidentyfikować wiele innych białek. Ich obecność może być zarówno przypadkową kodepozycją, jak i być spowodowana specyficznymi oddziaływaniami peptydu A $\beta$  lub jego form oligomerycznych z innymi białkami. Oddziaływania takie mogą prowadzić do obniżenia stężenia peptydu A $\beta$  w celu ochrony organizmu przed patologicznym procesem<sup>16</sup>. Wśród białek zidentyfikowanych w złogach można wyróżnić: apolipoproteinę E, klasterynę, transtyretynę, gelsolinę

i ludzką cystatynę C<sup>17,18</sup>. Szczególnie interesujące jest występowanie hCC, ze względu na jej wpływ na modulację aktywności neuropeptydów i proliferację neurytów<sup>19,20</sup>. Występowanie cystatyny w złogach potwierdzono w naczyniach krwionośnych i tkance mózgowej osób cierpiących na AD. Rola biologiczna i mechanizm oddziaływania między cystatyną i peptydem A $\beta$  pozostają nadal nieznane. ***W celu określenia roli jaką hCC może pełnić w procesie agregacji peptydu beta amyloidowego i hamowaniu jego agregacji w swojej pracy naukowej zajęłam się określeniem miejsc odpowiedzialnych za tworzenie kompleksu białko-peptyd i określeniem wpływu zidentyfikowanych sekwencji na ich agregację.***

#### **Ludzka cystatyna i białko amyloidowe A (SAA)**

Wykazano, iż cystatyna C może tworzyć kompleks z białkami ostrej fazy i surowiczym białkiem amyloidu A (SAA)<sup>21</sup>. Naturalnie występujące białko SAA jest odpowiedzialne za odkładanie się nierozpuszczalnych fibryli amyloidowych (AA), charakterystycznych dla reumatoidalnego zapalenia stawów (RA). Ten chroniczny stan zapalny prowadzi do niszczenia kości kończącego się poważnymi zaburzeniami organu ruchu. W efekcie tworzenia kompleksu SAA-hCC zmianie ulega funkcja SAA, nie obserwuje się natomiast wpływu na fizjologiczną funkcję hCC<sup>21</sup>. Oddziaływanie między wymienionymi białkami powoduje utratę zdolności SAA do indukowania produkcji cytokin pro-zapalnych<sup>21</sup>. Ponieważ tworzenie tego kompleksu białkowego nie wpływa na funkcję inhibicyjną cystatyny C, można przypuszczać, że miejsce wiązania się amyloidu A jest różne od miejsca wiążącego proteazy cysteinowe. Zewnątrzkomórkowe odkładanie się amyloidu A powoduje ciężkie komplikacje w przebiegu RA, a poznanie miejsc wiążących kompleksu SAA-hCC może pomóc w rozwiązaniu problemów pacjentów z chorobą reumatoidalną. Nie zbadano do tej pory wpływu wiązania się SAA do hCC na proces dimeryzacji i oligomeryzacji cystatyny. ***W swojej pracy zajęłam się oznaczeniem miejsc wiązania się obu białek, a także sprawdzeniem czy fragment amyloidu A zawierający sekwencję wiążącą może wpływać na proces dimeryzacji i oligomeryzacji ludzkiej cystatyny C.***

#### **Ludzka cystatyna C i przeciwciała**

Obecnie, ze względu na wzrastającą mobilność ludzi i zacieranie się granic państwowych, nie można bagatelizować endemicznych chorób neurodegeneracyjnych. Przykładem takiego schorzenia jest dziedziczna amyloidowa angiopatia mózgowa typu Islandzkiego, której przyczyną jest występowanie punktowej mutacji L68Q w ludzkiej cystatynie C<sup>22</sup>. Początkowo mutacja ta była charakterystyczna dla populacji Islandii, obecnie występuje w krajach skandynawskich, ale nie można wykluczyć częstszego występowania na całym świecie<sup>6</sup>. Amyloidoza ta zasługuje na szczególną uwagę ze względu na fakt, iż dotyka młodych ludzi między 20 a 30 rokiem życia<sup>23,24</sup>. Obecnie nie istnieje żadna terapia, nie ma możliwości hamowania czy zapobiegania agregacji patologicznej formy cystatyny. Można jedynie łagodzić objawy schorzenia. Dla młodych ludzi dotkniętych tą mutacją, każda możliwość opracowania skutecznego inhibitora

agregacji hCC, lub też możliwość zastosowania spersonalizowanej immunoterapii, jest na wagę złota.

Prof. Anders Grubb wraz ze swoją grupą badawczą z Uniwersytetu w Lund wykazał, że nawet niewielka ilość przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej cystatynie C jest w stanie znacząco wpływać na proces dimeryzacji, a w domyśle agregacji, tego białka<sup>25</sup>. W doświadczeniach stosowali monoklonalne przeciwciała otrzymane w ich laboratorium (IgG2b(κ)). Inkubując roztwór cystatyny C w obecności czynników sprzyjających agregacji (chlorowodorek guanidyny, temp. 37°C) badacze uzyskali dimer natywnej formy białka oraz dimer wariantu L68Q, który agreguje również samoistnie. Dodatek przeciwciał w stosunku 1:10 i 1:5 (przeciwciało : hCC) spowodował zahamowanie patologicznego procesu<sup>25</sup>. Pokazało to jednoznacznie, że przeciwciała mogą być skuteczną formą walki z agregacją ludzkiej cystatyny C. Początkowo komercyjnie dostępne były jedynie monoklonalne przeciwciała otrzymane poprzez immunizację zwierząt całą cząsteczką hCC, nazwane Cyst13. Aktualnie na rynku dostępny jest cały zestaw przeciwciał otrzymanych dla cystatyny. Wszystkie one zostały przetestowane przez grupę prof. Grubba, a ich potencjał antyagregacyjny jest różny w zależności od testowanego klonu<sup>26</sup>. Porównane one zostały z przeciwciałami produkowanymi w zespole prof. Grubba, a oznaczonymi obecnie jako HCC3. Nie jest jednak znany dokładny mechanizm hamowania patologicznego procesu ani sekwencje epitopów i paratopów zaangażowanych w tworzenie immunokompleksów. ***W swojej pracy postanowiłam zająć się identyfikacją epitopów dla wytypowanych monoklonalnych przeciwciał i określenie sekwencji hCC kluczowych dla hamowania procesu agregacji. W przyszłości mogą one zostać wykorzystane jako cele dla projektowania inhibitorów dimeryzacji i agregacji cystatyny.***

Coraz częściej w poszukiwaniu terapii przeciwko chorobom neurodegeneracyjnym naukowcy zwracają swoją uwagę w kierunku autoprzeciwciał produkowanych przez ludzki organizm. Naturalne autoprzeciwciała to specjalny typ immunoglobulin produkowany przez organizm niezależnie od obecności antygeny czy stymulacji zewnętrznej<sup>27</sup>. Ich rola fizjologiczna nie została jeszcze dokładnie określona. Mogą one być zarówno czynnikiem patologicznym dla organizmu, powodując występowanie chorób autoimmunologicznych; jednak mogą również pełnić funkcje ochronne, co jest obecnie głównym obiektem zainteresowania naukowców z wielu grup badawczych. W literaturze nie ma informacji na temat autoprzeciwciał produkowanych w odpowiedzi na powszechną obecność w organizmie ludzkiej cystatyny C. ***Ostatnim celem prezentowanego cyklu prac było wykrycie i charakterystyka molekularna kompleksu/ów ludzkiej cystatyny C (hCC) z naturalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko temu białku (autoprzeciwciała, NAbs), występującymi w puli immunoglobulin produkowanych przez ludzki organizm.***

Cystatyna C jest obecna we wszystkich płynach fizjologicznych<sup>28</sup> i, oprócz ewidentnej funkcji inhibicyjnej w stosunku do proteaz cysteinowych, może oddziaływać z różnymi komponentami płynów fizjologicznych. Może to mieć wpływ na wiele procesów

zachodzących w ludzkim organizmie. Szczególnie interesujące jest oddziaływanie z białkami odpowiedzialnymi za procesy związane z agregacją białek ludzkich, jak i samej cystatyny. Identyfikacja fragmentów hCC odpowiedzialnych za tworzenie kompleksów może więc w przyszłości posłużyć jako szablon do projektowania skutecznych terapeutyków. Z drugiej strony należy określić mapę oddziaływań cystatyny w jej sekwencji, aby przy projektowaniu inhibitorów jej agregacji zachować funkcję inhibitora proteaz.

## 2. Cel osiągnięcia naukowego (cyklu monotematycznego)

Głównym celem przedstawionej jako osiągnięcie pracy była identyfikacja fragmentów sekwencji ludzkiej cystatyny C odpowiedzialnych za oddziaływanie z biologicznie aktywnymi ligandami takimi jak peptydy i białka. Podstawą osiągnięcia jest dziesięć prac doświadczalnych składających się na cykl pod wspólnym tytułem: „**Mapowanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z biologicznie aktywnymi białkami i peptydami**”.

Prace badawcze wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były finansowane ze środków przyznanych mi przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (1264/B/H03/2009/37) oraz Narodowego Centrum Nauki Sonata Bis 1 (2012/05/E/ST5/03796). Prace badawcze prowadzone były w latach 2006 – 2017 w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, Laboratorium Spektrometrii Mas Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku oraz Department of Medical Biochemistry and Biophysics Karolinska Institutet, Szwecja oraz University of Konstanz, Niemcy.

## 3. Szczegółowy opis prac wchodzących w skład cyklu monotematycznego (osiągnięcia naukowego)

### Ludzka cystatyna C i peptyd beta amyloidowy (A $\beta$ )

- P. Juszczak i inni . (2009) *Binding epitopes and interaction structure of the neuroprotective protease inhibitor cystatin C with beta-amyloid revealed by proteolytic excision mass spectrometry and molecular docking simulation. **Journal of Medicinal Chemistry** (DOI 10.1021/jm801115e)*
- M. Spodzieja i inni (2016) *Characteristics of C-terminal,  $\beta$ -amyloid peptide binding fragment of neuroprotective protease inhibitor, cystatin C. **Journal of Molecular Recognition** (DOI 10.1002/jmr.2581)*

### Cel naukowy:

Pojawiające się wzmianki literaturowe o obecności hCC w złogach amyloidowych oraz o hamowaniu agregacji A $\beta$  przez cystatynę C wskazywały, że zasadne jest zidentyfikowanie fragmentów obu molekuł zaangażowanych w oddziaływanie i dalsza charakterystyka tego oddziaływania. Szczegółowe cele obejmowały określenie stechiometrii kompleksu, identyfikację miejsc wiążących w sekwencji peptydu i białka oraz określenie wzajemnego wpływu na agregację.



### **Syntetyczne omówienie wyników:**

Do identyfikacji miejsc wiążących zastosowałam technikę wycinania i ekstrakcji epitopu połączoną z analizą widm masowych otrzymanych frakcji<sup>29</sup>. Metoda ta opiera się na chromatografii powinowactwa, gdzie jeden z partnerów białkowych/peptydowych kompleksu przyłączony jest do matrycy stałej. Utworzony kompleks poddaje się trawieniu enzymatycznemu (za pomocą takich enzymów jak np. trypsyna, AspN, GluC, chymotrypsyna, LysC, pronaza) i, po odpłukaniu uwolnionych fragmentów proteolitycznych, które, nie biorąc udziału w tworzeniu kompleksu, były dostępne dla wybranego enzymu, przeprowadza się dysocjację kompleksu. Uzyskane frakcje poddaje się analizie za pomocą spektrometrii mas, która pozwala na szybką identyfikację fragmentów istotnych dla oddziaływania. Jest to technika tzw. wycinania epitopu. W przypadku ekstrakcji epitopu, pierwszym etapem jest trawienie białka/peptydu w roztworze za pomocą racjonalnie dobranego enzymu / enzymów, po którym następuje tworzenie kompleksu między białkiem osadzonym na złożu a mieszaniną po proteolizie. Dalsze etapy (usuwanie niezwiązanych fragmentów i dysocjacja kompleksu) są identyczne jak w przypadku wycinania epitopu. Co istotne, w tym przypadku istnieje możliwość przecięcia sekwencji wiążącej, co w rezultacie może dać fałszywie negatywny wynik. Zbiorcza analiza obu podejść daje jednak dobre rezultaty i pozwala szybko, precyzyjnie określić miejsca oddziaływania.

Zastosowanie omówionego powyżej podejścia umożliwiło scharakteryzowanie oddziaływania w kompleksie hCC-A $\beta$ . W przypadku peptydu  $\beta$ -amyloidowego miejsce oddziaływania z cystatyną znajduje się w centralnej części peptydu i obejmuje reszty 17-28. Jest to fragment istotny dla struktury i agregacji A $\beta$ , zawierający charakterystyczny hydrofobowy rdzeń <sup>17</sup>LVFFA<sup>22</sup> oraz reszty odpowiedzialne za tworzenie  $\beta$  zgięcia (25-35) powstającego przy tworzeniu fibryli amyloidowych. W przypadku ludzkiej cystatyny C, domena wiążąca A $\beta$  zlokalizowana jest w C-końcowej części białka i obejmuje reszty 101-117 z drugiej pętli (L2) i piątej nici  $\beta$  ( $\beta$ 5)  $\beta$ -kartki, które są eksponowane do środowiska i dostępne dla ligandu.

Oddziaływanie zidentyfikowanych fragmentów w roztworze zostało potwierdzone poprzez zarejestrowanie wysokorozdzielczego widma masowego (nanoESI FTICR). Oba peptydy wiążą się w stosunku 1:1. Badania agregacyjne peptydu beta amyloidowego A $\beta$ 40 dodatkiem C-końcowego fragmentu cystatyny hCC(93-120) i najkrótszej zidentyfikowanej sekwencji wiążącej się do peptydu, hCC(101-117) potwierdziły potencjał antyagregacyjny ludzkiej cystatyny C.

Badania strukturalne z zastosowaniem nuklearnego rezonansu magnetycznego (NMR), dichroizmu kołowego (CD) oraz technik teoretycznych takich jak modelowanie molekularne (MD) kompleksu pozwoliły na zaproponowanie możliwych struktur przestrzennych tworzących się kompleksów.

### **Możliwości wykorzystania wyników:**

Charakterystyka molekularna kompleksu hCC-A $\beta$  pozwoliła na określenie miejsc oddziaływania w kompleksie peptyd-białko. Potwierdzenie potencjału

antyagregacyjnego dla zidentyfikowanego C-końcowego fragmentu ludzkiej cystatyny C pozwala na rozpoczęcie prac nad projektowaniem inhibitorów procesu agregacji (peptydów i peptydomimetyków) w oparciu o sekwencję i strukturę wyznaczonego peptydu. Może mieć to istotne znaczenie w poszukiwaniu skutecznych terapeutyków w leczeniu choroby Alzheimera lub stanów patologicznych wywołanych odkładaniem się złogów amyloidowych.

### **Ludzka cystatyna i białko amyloidowe A (SAA)**

- M. Spodzieja i inni . (2012) *Interaction of serum amyloid A with human cystatin C—identification of binding sites. **Journal of Molecular Recognition** (DOI: 10.1002/jmr.2220)*
- M. Spodzieja i inni . (2013) *Interaction of serum amyloid A with human cystatin C – assessment of amino acid residues crucial for hCC-SAA formation (part II). **Journal of Molecular Recognition** (DOI: 10.1002/jmr.2283)*
- M. Maszota i inni . (2015) *Structural studies of the C-terminal 19-peptide of serum amyloid A and its Pro -> Ala variants interacting with human cystatin C. **Journal of Molecular Recognition** (DOI: 10.1002/jmr.2457)*

### **Cel naukowy:**

Głównym celem drugiej części cyklu była charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z surowiczym białkiem amyloidu A (SAA). Szczegółowe cele obejmowały określenie stechiometrii kompleksu, identyfikację miejsc odpowiedzialnych za tworzenie kompleksu, określenie reszt aminokwasowych kluczowych dla oddziaływania obu białek, badania strukturalne fragmentów białek istotnych dla procesu tworzenia kompleksu oraz określenie wpływu zidentyfikowanych fragmentów na procesy agregacji zarówno hCC jak i SAA.

### **Syntetyczne omówienie wyników:**

Zastosowanie jako podstawowej techniki chromatografii powinowactwa połączonej z trawieniem enzymatycznym kompleksu hCC-SAA i analiza frakcji z wykorzystaniem spektrometrii mas pozwoliło na określenie fragmentów obu białek odpowiedzialnych za ich wzajemne oddziaływanie. W tym przypadku białka zamiennie były wiązane do złoża agarozowego (Sepharose), a trawieniu podlegał drugi partner kompleksu. W przypadku trawienia ludzkiej cystatyny C (w roztworze i w kompleksie z SAA) otrzymane wyniki wskazały na C-końcowy fragment hCC jako odpowiedzialny za oddziaływanie z surowiczym białkiem amyloidu A. Na podstawie przeprowadzonych badań ustaliłam reszty aminokwasowe krytyczne dla oddziaływania fragmentu hCC(96-102) z SAA. Są nimi seryna w pozycji 98 i tyrozyna w pozycji 102. Oba te aminokwasy posiadają grupę hydroksylową w łańcuchu bocznym, mogą więc pełnić funkcję zarówno donora, jak i akceptora wiązania wodorowego podczas formowania kompleksu białkowego.

W przypadku białka SAA, w tworzenie kompleksu z ludzką cystatyną zaangażowany jest również C-końcowy fragment białka, a mianowicie reszty od 86 do 104. Tu również ustaliłam, że resztami aminokwasowymi krytycznymi dla oddziaływania SAA(86-104)-hCC są: arginina w pozycji 96, lizyna w pozycji 90 i lizyna w pozycji 103. Wszystkie one mają charakter zasadowy i w warunkach prowadzenia eksperymentu niosą ładunek dodatni na łańcuchu bocznym. Zastąpienie jednej z tych reszt resztą alaniny powodowało zanik zdolności fragmentu SAA(86-104) do formowania kompleksu z ludzką cystatyną C. W celu potwierdzenia oddziaływania fragmentów obu białek zarejestrowałam widma ESI-FTICR MS oraz MS/MS dla zmieszanych ze sobą syntetycznych fragmentów SAA(86-104) i hCC(93-102). Potwierdziły one tworzenie kompleksu peptydowego w roztworze i wykazały, że peptydy oddziałują ze sobą w stosunku stechiometrycznym 1:1.

Przy wykorzystaniu takich technik jak elektroforeza i sączenie molekularne podjęłam próbę określenia wzajemnego wpływu obu białek na procesy ich agregacji. Na podstawie otrzymanych wyników ustaliłam, że SAA w buforze fosforanowym, w temperaturze 37 °C, wykazuje tendencję do agregacji i asocjacji. Surowicze białko amyloidu A, podobnie jak jego fragment SAA(86-104), odpowiedzialny za oddziaływanie z hCC, nie hamuje procesu dimeryzacji/oligomeryzacji ludzkiej cystatyny C. Wpływu hCC na właściwości agregacyjne SAA nie udało mi się jednoznacznie określić.

Badania strukturalne fragmentu hCC(96-102), który w natywnym białku znajduje się w czwartej  $\beta$ -nici wykazały, że charakteryzuje się on strukturą nieuporządkowaną z niewielkim udziałem struktur  $\beta$  kartki. Peptyd ten należy do trudno rozpuszczalnych w roztworach wodnych, rozpuszczalności nie poprawia dodatek trifluoroetanolu (TFE). Ze względu na obecność reszty cysteiny w pozycji 97 tworzy kowalencyjne dimery. Fragment SAA(86-104) posiada w swojej sekwencji trzy reszty proliny (pozycje 92, 95 i 101), które wpływają na jego strukturę. W roztworach wodnych dominuje struktura nieuporządkowana, a strukturę  $\alpha$ -helikalną można wymusić jedynie przez zamianę jednej z trzech reszt proliny na resztę alaniny. Krytyczna w tym przypadku jest pozycja 97. Peptyd ten nie wykazuje tendencji do asocjacji czy agregacji. Bardzo ciekawą obserwacją okazał się fakt, że związek ten ulega spontanicznej, zależnej od pH roztworu, autohydrolizie. W środowisku o pH 7,4 lub lekko kwaśnym (pH 6) dochodzi do hydrolizy reszt aminokwasowych zarówno od N- jak i C-końca, a proces ten nie jest obserwowany w przypadku roztworów zasadowych. Szczególnie podatne na ten proces jest wiązanie pomiędzy resztą Asp91 a Pro92. Znaczenie biologiczne tego procesu i ewentualna rola ludzkiej cystatyny C w procesie hydrolizy C-końcowego fragmentu SAA nie została jeszcze wyjaśniona.

#### **Możliwości wykorzystania wyników:**

Z naszych prac wynika, iż miejsce wiązania amyloidu A, podobnie jak dla peptydu amyloidowego A $\beta$ , jest zlokalizowane w części C-końcowej cystatyny C. Pozwala to

przypuszczać, że C-końcowy fragment cystatyny C odgrywa ważną rolę w jej oddziaływaniach z peptydami i białkami ustrojowymi. Porównanie sekwencji miejsc wiążących w cystatynie C dla większej liczby badanych białek da nam możliwość dalszego sprecyzowania hipotezy o szczególnej roli tego fragmentu białka.

### **Ludzka cystatyna C i przeciwciała**

- A. Śladowska i inni . (2011) *Identification of the epitope for anti-cystatin C antibodies (Cyst-13)*. **Journal of Molecular Recognition (DOI: 10.1002/jmr.1100)**
- I. Behrendt i inni. (2016). *Epitope location for two monoclonal antibodies against human cystatin C, representing opposite aggregation inhibitory properties*. **Amino Acids (DOI: 10.1007/s00726-016-2242-z)**
- M. Prądzińska i inni . (2016). *Application of amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for epitope mapping in human cystatin C*. **Amino Acids (DOI: 10.1007/s00726-016-2316-y),**
- M. Rafalik i inni . (2018) *The identification of discontinuous epitope in the human cystatin c – monoclonal antibody hCC3 complex*. **Journal of Proteomics, (DOI: doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.020)**

### **Cel naukowy:**

Celem prac zebranych w przedstawionych powyżej publikacjach była molekularna charakterystyka kompleksów ludzkiej cystatyny C z monoklonalnymi przeciwciałami. Trzy z nich to komercyjnie dostępne (producent firma HyTest) przeciwciała oznaczone jako Cyst10, Cyst13 i Cyst28. Czwarte badane przeciwciało HCC3, zostało mi udostępnione przez prof. Andersa Grubba, University of Lund, Szwecja<sup>30</sup> w ramach współpracy naukowej. Wszystkie z przeciwciał zostały przebadane wcześniej pod kątem hamowania procesu dimeryzacji ludzkiej cystatyny C. Klon 10 najslabiej wpływa na dimeryzację hCC (5%), natomiast dla pozostałych trzech przeciwciał potencjał w hamowaniu tego procesu jest zróżnicowany i wynosi od 22% (Cyst13), przez 60% (HCC3) do 75% (Cyst28)<sup>26</sup>.

### **Syntetyczne omówienie wyników:**

Identyfikację epitopu przeprowadziłam z zastosowaniem techniki wycinania i ekstrakcji epitopu sprzężonej ze spektrometrią mas. Pozwoliła ona na jednoznaczne określenie epitopu dla klonu Cyst13 jako liniowego i zlokalizowanego w C-końcowej części białka (reszty hCC(107-114)). W przypadku pozostałych przeciwciał technika ta wskazała na nieciągły charakter epitopów i pozwoliła na wytypowanie ich kilku potencjalnych lokalizacji. Dlatego też, jako metoda weryfikująca uzyskane wyniki, zastosowana została dodatkowo technika wymiany proton/deuter połączona ze spektrometrią mas (HDX).

Eksperymenty HDX prowadzone były w dwóch niezależnych laboratoriach. Klony Cyst10 i Cyst28 badane były w Instytucie Karolinska, Szwecja a przeciwciało HCC3 w Instytucie Biochemii i Biofizyki PANw Warszawie. W obu przypadkach udało się

potwierdzić część ze zidentyfikowanych fragmentów epitopowych, ale też pojawiły się rozbieżności, które prezentuje Tabela 1.

**Tabela 1.** Porównanie epitopów ludzkiej cystatyny C wyznaczonych dla monoklonalnych przeciwciał technikami wycinania i ekstrakcji oraz techniką HDX.

mAb	WiE-MS	HDX-MS	Fragment struktury hCC
HCC3	--	17-28	$\alpha$ -helisa
	54-64	52-62	L1
	93-103	100-105	$\beta$ 4
Cyst10	-	53-61	L1
	60-70	-	$\beta$ 3
	96-102	-	$\beta$ 4
	101-111	101-112	$\beta$ 4-L2- $\beta$ 5
Cyst28	-	41-48	$\beta$ 2
	53-62	53-61	L1
	-	65-73	$\beta$ 3
	85-91/92-99	81-99	$\beta$ 4
	101-111	-	$\beta$ 4-L2- $\beta$ 5

WiE-MS – wycinanie i ekstrakcja epitopu sprzężone ze spektrometrią mas

HDX-MS – wymiana proton/deuter sprzężona ze spektrometrią mas

W przypadku przeciwciał Cyst10 i Cyst28 przeprowadzona została charakterystyka samych przeciwciał poprzez rejestrację widm masowych w formie *intact* ukazujących różnice w masie obu klonów oraz dokładna analiza reszt cukrowych przyłączonych do przeciwciał. Określony został podtyp IgG: Cyst28 należą do podklasy IgG1, a Cyst10 do IgG3. Zastosowanie termoforezy mikroskalowej pozwoliło na wyznaczenie i porównanie stałych dysocjacji dla obu klonów. Dla kompleksu hCC-Cyst28 stała dysocjacji wynosi  $20,2 \pm 1,85$  nM, a dla hCC-Cyst10 -  $141 \pm 13,2$  nM.

#### Możliwości wykorzystania wyników:

Zidentyfikowane sekwencje epitopów wskazują lokalizację elementów strukturalnych ludzkiej cystatyny C, które mogą stać się celami dla projektowania inhibitorów procesu dimeryzacji i agregacji hCC.

- M. Prądzińska i inni . (2016). *Isolation and characterization of autoantibodies against human cystatin C*. **Amino Acids** (DOI 10.1007/s00726-016-2271-7)

#### Cel naukowy pracy:

Głównym celem ostatniej pracy z prezentowanego cyklu było wykrycie i charakterystyka kompleksu/ów ludzkiej cystatyny C (hCC) z naturalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko temu białku (autoprzeciwciała, NAb), występującymi w puli immunoglobulin produkowanych przez ludzki organizm. Prace prowadzone przez prof. Grubba z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał

przeciwko ludzkiej cystatynie C dały bardzo obiecujące wyniki co do możliwości hamowania *in vitro* procesu dimeryzacji hCC. Przed przystąpieniem do projektowania immunoterapii istotne jest sprawdzenie czy ludzki organizm jest w stanie produkować autoprzeciwciała przeciwko hCC, określić - jeśli to możliwe - epitop i paratop dla autoprzeciwciał i hCC, a co istotne, sprawdzić potencjał NABs do hamowania dimeryzacji i agregacji cystatyny C. Dodatkowo, uzyskane wyniki badań mogą w przyszłości przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat oddziaływań (auto)przeciwciał z ludzką cystatyną C.

### **Syntetyczne omówienie wyników:**

Do sprawdzenia obecności, a następnie izolacji autoprzeciwciał przeciwko ludzkiej cystatynie C z frakcji immunoglobulin IgG, wykorzystana została chromatografia powinowactwa. Przygotowana kolumna z osadzoną na złożu sefarozowym hCC pozwoliła na izolację NABs anty-hCC, które stanowiły 0,2-0,3% badanej frakcji przeciwciał. Czystość izolatu została sprawdzona chromatograficznie (HPLC i SEC) oraz z wykorzystaniem jedno i dwuwymiarowej elektroforezy żelowej. Dzięki temu stwierdziłam, że otrzymana próbka zawiera tylko przeciwciała, które mają charakter poliklonalny i składają się z kilku podklas IgG: 78% stanowią przeciwciała IgG1, 15% - IgG2, 6% - IgG3 a 1% - IgG4. Zastosowanie spektrometrii mas pozwoliło na identyfikację reszt cukrowych przyłączonych do autoprzeciwciał z podklas IgG1 i IgG2. Były to głównie dwu-sialylowe, dwu-antenowe kompleksy N-glikanów z jedną resztą galaktozy przyłączoną do obu końców FA2G1; dwu-sialylowe, dwu-antenowe kompleksy N-glikanów FA2, dwu-sialylowe, dwu-antenowe kompleksy N-glikanów z dwoma resztami galaktozy przyłączony do obu końców FA2G2.

Przed przystąpieniem do eksperymentalnej identyfikacji epitopów, przeprowadzona została analiza bioinformatyczna sekwencji ludzkiej cystatyny C pod kątem fragmentów prezentujących charakter antygenowy. Wykorzystane zostały ogólnodostępne serwisy, w tym strony IEDB (<http://www.iedb.org/>) z dostępnymi tam algorytmami: *EliiPro*, *Bepipred* i algorytmem *Kolaskara i Tongaonkara*. Uzyskane wyniki wskazały, że cała sekwencja hCC zawiera fragmenty o różnej długości, które mogą stanowić potencjalne epitopy, zarówno liniowe jak i nieciągłe.

Do eksperymentalnej identyfikacji epitopów dla wyizolowanych autoprzeciwciał wykorzystaliśmy, tak jak w przypadku przeciwciał monoklonalnych, technikę wycinania i ekstrakcji epitopu sprzężoną ze spektrometrią mas, technikę badania oddziaływań opartą na wymianie proton/deuter sprzężoną ze spektrometrią mas oraz techniki dodatkowe takie jak chromatografia powinowactwa i płytkowe testy immunoenzymatyczne. W przypadku wycinania i ekstrakcji epitopu, autoprzeciwciała zostały osadzone na stałej matrycy, a trawieniu poddawana była cystatyna C. Immunokompleks tworzony był z całą molekułą, a następnie poddawany trawieniu (trypsyna, AspN, pronaza; wycinanie epitopu) lub też prowadzone było trawienie białka w roztworze, a kompleks tworzony był między autoprzeciwciałami a fragmentami proteolitycznymi hCC. Przeprowadzone eksperymenty wskazały na 3 fragmenty hCC,

które stanowią epitopy dla anty-hCC NAb. Dwa z nich zlokalizowane są w pętłach L1 (fragment 53-62) i L2 (fragment 101-115), a jeden znajduje się w nici  $\beta$ 3 (fragment 92-99). Analiza HDX, gdzie immunokompleks tworzony jest w roztworze, wskazała na reszty 41-48 oraz 65-73. Poprawnie zostały przewidziane jako epitopy: fragment znajdujący się w środkowej części cystatyny C (53-62) oraz fragmenty z C-końcowej części (92-99, 96-102 i 101-115). Nie potwierdziło się natomiast oddziaływanie z autoprzeciwciałami fragmentu z N-końca hCC oraz fragmentu zlokalizowanego w  $\alpha$ -helisie, wykazujących nieco słabsze powinowactwo do immobilizowanych przeciwciał w testach wycinania/ekstrakcji epitopu.

Próba określenia wpływu wyizolowanych autoprzeciwciał na dimeryzację hCC nie dała jednoznacznego wyniku i wymaga przeprowadzenia kolejnych eksperymentów. Anty-hCC NAb powodowały dimeryzację hCC od razu po zmieszaniu, ale po 3 dniach inkubacji ilość dimeru w kontroli i próbce była taka sama.

#### **Możliwości wykorzystania wyników:**

**Jest to pierwsza i jedyna do tej pory praca poświęcona autoprzeciwciałom przeciwko ludzkiej cystatinie C.** Poznanie sekwencji oraz struktury drugorzędowej epitopu i paratopu będzie w przyszłości bazą do dalszej pracy nad zaprojektowaniem efektywnych inhibitorów procesu agregacji ludzkiej cystatyny C. Bazując na dotychczasowych badaniach zaproponowano, że naturalnie występujące przeciwciała, poprzez oddziaływanie z istotnym fizjologicznie, a jednocześnie neurotoksycznym białkiem, eliminują je z krążenia ustrojowego zanim zaczną ono ujawniać swoją drugą – toksyczną naturę. Jednakże sposób, w jaki przeciwciała hamują tworzenie samych agregatów, nie jest znany. NAb mogą również zostać wykorzystane w diagnostyce wczesnych stadiów choroby. Tego rodzaju diagnostyka może być zastosowana w przypadku chorób autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty czy cukrzyca typu pierwszego<sup>31</sup>. Schorzenia te charakteryzują się długą fazą przedkliniczną, podczas której rozwijająca się choroba może być zdiagnozowana na podstawie poziomu odpowiednich autoprzeciwciał. Podobne podejście może być wykorzystane w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, których postęp zależy od czasu trwania choroby. Zaobserwowano różnice w poziomie autoprzeciwciał u osobników zdrowych i chorych<sup>32,33</sup>. Obiecujące wyniki terapii z zastosowaniem autoprzeciwciał i ich potencjał diagnostyczny<sup>34,35,36</sup>, w połączeniu z nie do końca wyjaśnionym mechanizmem działania, skłaniają do rozszerzenia zbioru białek amyloidogennych oraz wywoływanych przez nie chorób neurodegeneracyjnych zbadanych w tym kontekście. Dlatego też chcemy wyizolować kompleksy NAb-hCC, poddać je charakterystyce molekularnej i zbadać ich wpływ na proces autoasocjacji cystatyny C. Dzięki temu możliwe będzie nie tylko poznanie mechanizmu ich działania, ale też jego odniesienie do innych chorób neurodegeneracyjnych. Opracowanie nowych metod terapeutycznych i testów

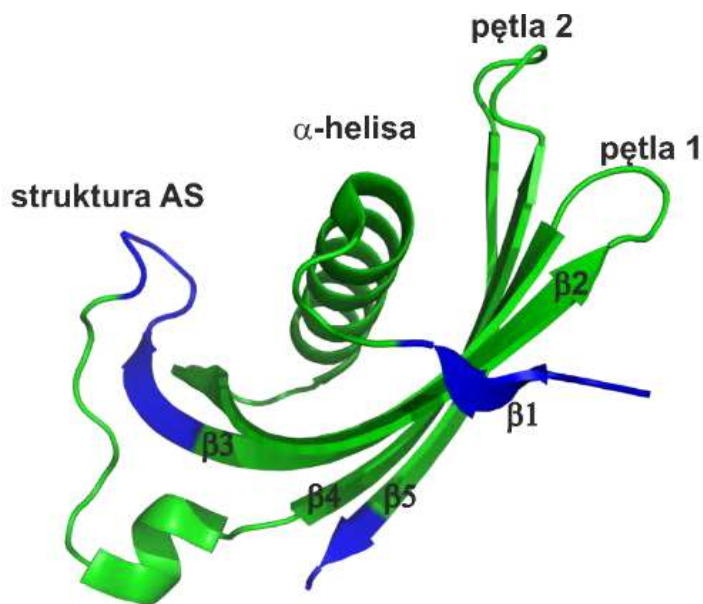
diagnostycznych dla HCCAA, opartych na obecnych w serum autooprzeciwciałach przeciwko hCC, to kolejny plus realizacji naszego projektu.

#### Podsumowanie zaprezentowanego cyklu publikacji:

Analizując otrzymane wyniki identyfikacji miejsc wiążących dla kompleksu cystatyny C z:

- Peptydem A $\beta$ 40,
- Osoczym białkiem amyloidu A,
- Przeciwciałami monoklonalnymi: Cyst10, Cyst28, Cyst13 oraz HCC3,
- Autooprzeciwciałami wyizolowanymi z frakcji IgG,

można stwierdzić, że właściwie cała sekwencja hCC może być zaangażowana w oddziaływanie z ligandami (Tabela 2). Z tego oddziaływania wyłączone są krótkie fragmenty z N- i C-końca (reszty 1-16 oraz 118-120), a także fragment 70-80, co obrazuje Rysunek 2. N-końcowy fragment odznacza się sporą ruchomością oraz brakiem określonej struktury, może ulegać odcinaniu *in vivo* od natywnego białka (pierwsze 10-11 reszt) w wyniku działania elastazy neutrofilowej<sup>37,38</sup>. Fragment 70-80 może być wykluczony ze względu na usztywnienie wprowadzane przez mostek disulfidowy utworzony przez reszty cysteiny 73 i 83.



**Rysunek 2** Struktura ludzkiej cystatyny C (PDB 3GAX) z zaznaczonymi kolorem niebieskim fragmentami niezaangażowanymi w oddziaływanie z ligandami, kolor zielony oznacza fragmenty cystatyny zdolne do oddziaływania z do tej pory przebadanymi białkami i peptydami.



**Tabela 2.** Fragmenty ludzkiej cystatyny C zidentyfikowane w toku pracy jako odpowiedzialne za tworzenie kompleksów z przebadanymi białkami i peptydami.

Fragment cystatyny C	Ligand	Metoda eksperymentalna
1-16	-	-
17-28	HCC3	HDX-MS
41-48	Cyst28	HD- MS
52-64	HCC3, Cyst28	WiE-MS, HDX-MS
60-70	Cyst10	WiE-MS
70-80	-	-
81-99	Cyst28	WiE-MS, HDX-MS
93-103	HCC3	WiE-MS, HDX-MS
96-102	SAA	WiE-MS
101-111	Cyst10 Cyst28	WiE-MS, HDX-MS WiE-MS
101-117	A $\beta$	WiE-MS
107-114	Cyst13	WiE-MS
117-120	-	-

WiE-MS – wycinanie i ekstrakcja epitopu sprzężone ze spektrometrią mas  
HDX-MS – wymiana proton/deuter sprzężona ze spektrometrią mas

#### 4. Najważniejsze dokonania osiągnięcia naukowego (cyklu monotematycznego)

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanego cyklu monotematycznego zaliczam:

- **Wprowadzenie nowej tematyki badawczej i nowego warsztatu naukowego do Katedry Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii UG**

Prace prowadzone dotychczas w Katedrze Chemii Biomedycznej dotyczące ludzkiej cystatyny C były związane z badaniami strukturalnymi i opracowywaniem mechanizmu dimeryzacji i agregacji hCC oraz poszukiwaniem inhibitorów tego procesu. Do czasu złożenia przeze mnie projektu grantowego do Ministerstwa Nauki i szkolnictwa Wyższego dotyczącego poszukiwania biologicznie aktywnych ligandów ludzkiej cystatyny C, nie zajmowano się badaniem kompleksów białkowych.

Technika wycinania i ekstrakcji epitopu oraz spektrometria mas, która była podstawą pracy podczas mojego stażu podoktorskiego na Uniwersytecie w Konstancji została przeze mnie wprowadzona na stałe do warsztatu pracy Katedry.

- **Charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z peptydem  $\beta$  amyloidowym oraz osoczymym białkiem amyloidu A**

Jest to pierwsza charakterystyka oddziaływań ludzkiej cystatyny C z peptydem oraz białkiem amyloidogennym. Potwierdza ona, iż hCC, oprócz pełnienia niezwykle istotnej funkcji inhibitora proteaz, może również uczestniczyć

w procesach związanych z agregacją innych molekuł co, jak w przypadku oddziaływań z A $\beta$ , może mieć charakter neuroochronny.

- ***Identyfikacja epitopów dla przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko ludzkiej cystatynie C***

W ramach badań nad immunokompleksami ludzkiej cystatyny C przeprowadzono identyfikację epitopów dla trzech komercyjnych monoklonalnych przeciwciał Cyst10, Cyst13 i Cyst28 oraz mAb HCC3 uzyskanych do badań dzięki współpracy z Uniwersytetem w Lund.

- ***Wyizolowanie z frakcji IgG, charakterystyka oraz identyfikacja epitopów autoprzeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej cystatynie C***

Realizowane prace pozwoliły po raz pierwszy wyizolować i scharakteryzować autoprzeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej cystatynie C. W literaturze nie było wcześniej wzmianki o zdolności ludzkiego układu immunologicznego do produkcji immunoglobulin przeciwko temu białku. Badania prowadziłam w ramach otrzymanego grantu NCN Sonata Bis.

## **5. Nowe plany badawcze bezpośrednio powiązane z tematyką zaprezentowanego osiągnięcia naukowego**

W dalszej pracy badawczej zamierzam zajmować się badaniem kompleksów ludzkiej cystatyny C z głównymi składnikami płynów biologicznych. W tym celu zamierzam wykorzystać doświadczenie jakie zdobyłam w zakresie spektrometrii mas oraz wiedzę uzyskaną z dotychczasowych prac.

W toku prac związanych z identyfikacją epitopów zauważono, że jeden z fragmentów cystatyny prezentuje bardzo interesujące właściwości, a mianowicie wysokie powinowactwo i jednocześnie niską selektywność w stosunku do wielu ligandów o charakterze polipeptydowym. Aktualnie kontynuuję prace zmierzające do określenia jego potencjału w tworzeniu kompleksów z białkami oraz ustalenia potencjału aplikacyjnego dla tego peptydu.

W 2014 roku zostałam kierownikiem Laboratorium Spektrometrii Mas utworzonym w ramach Zespołu Laboratoriów Specjalistycznych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Pozwoliło mi to na rozwijanie swoich zainteresowań związanych ze spektrometrią mas, doskonalenie warsztatu pracy oraz rozwijanie własnej tematyki badawczej w oparciu o tę technikę. Znaczna część mojej pracy naukowej będzie również związana z uczestnictwem w projektach prowadzonych na MWB oraz współpracy z naukowcami z kraju i zagranicy prowadzącymi badania wymagające zastosowania analiz proteomicznych. Równie istotnym zadaniem w mojej dalszej karierze naukowej będzie również rozbudowa Laboratorium Spektrometrii Mas, zdobywanie funduszy na nowe instrumenty oraz utrzymanie dotychczasowej aparatury.

## 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

(Szczegółowy wykaz wszystkich publikacji (IF, Punkty MNiSW, cytowania), znajduje się w Załączniku 4 razem z opisem moich innych osiągnięć)

Swoją naukową drogę rozpoczęłam w 1996 roku, kiedy to zostałam studentką I roku chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Na trzecim roku studiów, po ukończeniu kursu chemii organicznej, zgłosiłam się do kierownika Katedry Chemii Organicznej, prof. Zbigniewa Grzonki, który przyjął mnie do grupy badawczej. Pracę magisterską wykonywałam pod kierunkiem dr hab. Aleksandry S. Kołodziejczyk, która zaraziła mnie miłością do nauki, a w szczególności chemii organicznej. Pierwsze prace wykonywane w ramach pracowni specjalizacyjnej dotyczyły otrzymywania pochodnych aminokwasowych wykorzystywanych w syntezie peptydów i peptydomimetyków. W tym czasie zapoznałam się z technikami chromatografii cieczowej, której uczyłam się od prof. Franciszka Kasprzykowskiego. Tematem mojej pracy magisterskiej była „*Synteza chiralnych 1,2-diamin o szkielecie aminokwasowym z wykorzystaniem reakcji Mitsunobu*”. Polega ona na reakcji między grupą hydroksylową substratu z odpowiednim czynnikiem nukleofilowym w obecności trifenylofosfiny oraz estru etylowego (DEAD) lub izopropylowego (DIAD) kwasu azodikarboksylowego. Moim zadaniem jako magistrantki było otrzymanie substratów, chiralnych chronionych diamin, które zostały z sukcesem wykorzystane do przeprowadzenia końcowej reakcji, a wyniki prac zostały przedstawione w postaci publikacji<sup>39</sup>:

- **P. Juszczyk, L. Łankiewicz, AS. Kołodziejczyk.** *Synthesis of orthogonally protected vicinal diamines with amino acid-based skeleton.* ***Lett Pept Sci.*** 2002;9(4-5):187-192. doi:10.1007/BF02538381

Dodatkowo zajęłam się sprawdzeniem możliwości zastosowania odczynnika Vitride do otrzymywania aminoalkoholi z aminokwasów, a wyniki opisane zostały w publikacji<sup>40</sup>:

- **P. Juszczyk, R. Kasprzykowska, AS. Kołodziejczyk.** *Simple and efficient synthesis of chiral amino alcohols with an amino acid-based skeleton.* ***Lett Pept Sci.*** 2003;10(2):79-82. doi:10.1023/B:LIPS.0000032366.28662.1d

W 2001 roku zostałam słuchaczką studium doktoranckiego przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem mojej pracy doktorskiej był prof. Zbigniew Grzonka, a bezpośrednią opiekę naukową sprawowała dr hab. Aleksandra S. Kołodziejczyk. Przez cztery lata zajmowałam się badaniem agregacji peptydu beta-amyloidowego, który jest odpowiedzialny za tworzenie złogów amyloidowych u osób dotkniętych chorobą Alzheimer'a. Szczególne zainteresowanie stanowiły warianty dziedziczne tej choroby, które związane są z występowaniem punktowych mutacji w sekwencji genu kodującego A $\beta$ . Mutacje te wpływają na proces agregacji, głównie przez przyspieszenie tworzenia fibryli amyloidowych. W toku mojej pracy udało mi się określić dla modelowego peptydu A $\beta$ (11-28) potencjalny mechanizm agregacji, w którym kluczowe jest tworzenie się przejściowego stanu helikalnego. Przeprowadziłam badania strukturalne i badania agregacji peptydu modelowego oraz

jego wariantów, a wyniki prac opublikowane zostały w postaci dwóch publikacji, jednej w trakcie doktoratu druga została opublikowana po ukończeniu studium<sup>41</sup>:

- **P. Juszczyk**, AS> Kołodziejczyk, Z. Grzonka. *FTIR spectroscopic studies on aggregation process of the  $\beta$ -amyloid 11-28 fragment and its variants. *J Pept Sci.* 2009;15(1):23-29. doi:10.1002/psc.1085*

Oprócz realizacji głównego tematu, brałam również udział w badaniach w ramach współpracy naukowej z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami badawczymi, które realizowane były przez prof. Grzonkę od wielu lat. Obejmowały one współpracę z prof. Henrykiem Kozłowskim z Uniwersytetu Wrocławskiego, prof. Romanem Kaliszanem i prof. Tomaszem Bączkiem z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz prof. Falkiem Fahrenholzem z Uniwersytetu w Moguncji. Moja rola skupiała się głównie na syntezie i oczyszczaniu peptydów, które służyły do dalszych badań naukowych. Brałam również udział w przygotowaniu manuskryptów, które były wynikiem badań prowadzonych z wyżej wymienionymi ośrodkami naukowymi.

W 2005 roku odbyłam swój pierwszy staż podoktorski u dr Marii Gaczyńskiej z University of Texas Health Science Center w San Antonio w Texasie. Grupa dr Gaczyńskiej od wielu lat zajmuje się badaniem proteasomu. W ciągu 12 miesięcy stażu zajmowałam się projektowaniem, syntezą, oczyszczaniem i badaniami strukturalnymi inhibitorów proteasomu opartych na strukturze peptydu PR11. W 2006 roku odbyłam kolejny staż podoktorski u prof. Michaela Przybylskiego, który prowadził laboratorium analityczne w Uniwersytecie w Konstancji w Niemczech. Jest on światowej klasy specjalistą w dziedzinie spektrometrii mas, a jego zainteresowania naukowe skupiają się również wokół choroby Alzheimera. Była to dla mnie doskonała szansa na zdobycie doświadczenia w zastosowaniu spektrometrii mas w badaniach proteomicznych oraz ewentualną kontynuację tematyki realizowanej podczas pracy doktorskiej. Przez pierwsze trzy miesiące pracowałam z dr Gabrielą Parashiv, która zajmowała się identyfikacją epitopów i paratopów dla immunokompleksów peptydu A $\beta$  z nanoprzeciwciałami otrzymanymi w organizmie lamy, a skierowanym przeciwko peptydowi A $\beta$ 40. Pozwoliło mi to na uzyskanie biegłości w stosowaniu techniki wycinania i ekstrakcji epitopu oraz opanowanie obsługi spektrometrów masowych.

Po znalezieniu w literaturze pierwszych informacji na temat wpływu ludzkiej cystatyny C na agregację peptydu A $\beta$ , postanowiłam wykorzystać nowo zdobyte doświadczenie do pracy nad identyfikacją miejsc wiążących w kompleksie A $\beta$ -hCC. Prace prowadziłam we współpracy z prof. Grzonką i dr Anetą Szymańską z Katedry Chemii Medycznej UG oraz prof. Przybylskim i dr Parashiv. Efektem kilku miesięcy wyłożonej pracy były wyniki, które zostały zaakceptowane do publikacji w *Journal of Medicinal Chemistry*. Dodatkowo, uzyskane wyniki zostały włączone do zgłoszenia patentowego: Zgłoszenie patentowe nr 08002878.0-2405: „*Neuroprotective peptides and paratopes recognizing a sequence-specific  $\beta$ -amyloid epitope for diagnosis and therapy of neurodegenerative diseases*” (patent europejski).

Po zakończeniu stażu w Konstancji, w 2007 roku wróciłam do Gdańska i uzyskałam zatrudnienie na Wydziale Chemii UG na stanowisku adiunkta. Dalszą pracę naukową kontynuowałam w grupie prof. Zbigniewa Grzonki. Zajął się poszukiwaniem biologicznie aktywnych ligandów dla ludzkiej cystatyny C. W roku 2009 uzyskałam pierwszy grant MNiSW na realizację badań własnych. Pozwoliło mi to na prowadzenie badań nad kompleksami ludzkiej cystatyny C z białkiem osoczkowym amyloidu A oraz pierwszym dostępnym komercyjnie przeciwciałem skierowanym przeciwko hCC, tj. klonem Cyst13. W realizacji badań wspierały mnie wówczas doktorantki mgr Anna Śładewska (promotor dr hab. Sylwia Rodziewicz-Motowidło prof. UG) i mgr Marta Spodzieja (promotor prof. Zbigniew Grzonka), które pod moją opieką naukową realizowały swoje prace doktorskie. Są to pierwsze doktorantki, które pod moją opieką zdobywały doświadczenie naukowe, a aktualnie obie kontynuują swoje indywidualne prace naukowe: dr Anna Śładewska na Uniwersytecie w Konstancji, a dr Marta Spodzieja na Wydziale Chemii UG. Wyniki naszych wspólnych badań zostały opublikowane w postaci czterech prac eksperymentalnych wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

W toku moich prac pojawiło się więcej komercyjnie dostępnych przeciwciał przeciwko hCC, a współpracujący z prof. Grzonką prof. Anders Grubb z Uniwersytetu w Lund, opublikował pracę porównującą potencjał inhibicyjny dla serii przeciwciał monoklonalnych anty-hCC<sup>26</sup>. Postanowiłam kontynuować ten kierunek badań i zidentyfikować fragmenty cystatyny C, które poprzez tworzenie immunokompleksów są blokowane i nie mogą zainicjować bądź wspomagać procesu dimeryzacji. W pracach tych uczestniczyły trzy doktorantki z Katedry Chemii Medycznej Wydziału Chemii UG : mgr Martyna Prądzińska, mgr Izabela Behrendt i mgr Monika Rafalik. Po zmianie przepisów zostałam oficjalnie promotorem pomocniczym wszystkich trzech doktorantek.

W 2012 roku uzyskałam finansowanie badań w ramach grantu NCN Sonata Bis na prace związane z izolacją i charakterystyką autoprzeciwciał przeciwko ludzkiej cystatinie C, który realizowałam wraz z mgr Martyną Prądzińską. Udało nam się po raz pierwszy wyizolować i scharakteryzować autoprzeciwciała przeciwko hCC. Dzięki zastosowaniu techniki wycinania i ekstrakcji epitopu sprzężonej ze spektrometrią mas udało się nam wyznaczyć epitopy hCC dla wyizolowanych poliklonalnych autoprzeciwciał.

W 2013 roku rozpoczęłam trzeci staż podoktorski na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W tym czasie prof. Krzysztof Bielawski poszukiwał specjalisty w dziedzinie spektrometrii mas w ramach realizowanego projektu Mobi4Health (7PR). W wyniku rekrutacji uzyskałam zatrudnienie jako Post-doc oraz kierownik nowego Laboratorium Spektrometrii Mas. W ramach projektu zakupione zostały trzy spektrometry masowe, a moim zadaniem była organizacja nowego laboratorium od podstaw. Dało mi to możliwość realizacji moich zainteresowań związanych bezpośrednio z techniką MS oraz

wykazanie się na nowym stanowisku jako kierownik laboratorium. Uczestnictwo w programie Mobi4Health dało mi możliwość odbycia szkoleń w siedzibie firmy Sciex (Darmstadt, Niemcy) w zakresie obsługi i prowadzenia badań proteomicznych na spektrometrach QTrap6500, TripleTof5600+ oraz Maldi TOF/TOF 5800. Brałam udział w organizacji czterech szkoleń MS prowadzonych przez firmę Sciex na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-GUMed. Wspólnie z dr Katarzyną Macur w 2016 roku przygotowaliśmy i poprowadziłyśmy warsztaty z podstawowych technik proteomicznych dla naukowców z Trójmiasta.

W roku 2016, po zakończeniu realizacji projektu Mobi4Health uzyskałam dalsze zatrudnienie na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie pracuję do dnia dzisiejszego. Wraz z dr Katarzyną Macur prowadzę, w ramach Zespołu Laboratoriów Specjalistycznych, Laboratorium Spektrometrii Mas, w którym, oprócz realizacji własnych projektów, prowadzimy badania wspierające naukowców z Uniwersytetu Gdańskiego oraz pozostałych gdańskich uczelni. Laboratorium uzyskuje również zlecenia analiz z uczelni z całego kraju, co pozwala mi na stały rozwój naukowy. Nawiązujemy również nowe współprace ze specjalistami z zakresu spektrometrii mas. Jednym z najnowszych naszych współpracowników jest prof. Ciborowski z Uniwersytetu w Nebrasce, z którym w maju 2018 roku przeprowadziliśmy kolejne warsztaty poświęcone podstawowym technikom proteomicznym, które przewidują zarówno część wykładową jak i zajęcia praktyczne.

Podczas swojej pracy naukowej prowadziłam również zajęcia dydaktyczne. Od czasów studium doktoranckiego prowadziłam zajęcia laboratoryjne z chemii organicznej i analizy organicznej. Po uzyskaniu zatrudnienia na Wydziale Chemii UG kontynuowałam prowadzenie zajęć laboratoryjnych z chemii organicznej, analizy związków biologicznie czynnych oraz realizowałam zajęcia w ramach pracowni specjalizacyjnej i magisterskiej. W dalszym etapie mojego rozwoju naukowego opracowałam wykład monograficzny dla studentów II stopnia zatytułowany „Wybrane zagadnienia z chemii peptydów cz. I”. Brałam również udział w opracowaniu zajęć laboratoryjnych z Laboratorium Zaawansowanej Chemii dla studentów studiów II stopnia (kierunek chemia). Wspólnie z dr hab. Anetą Szymańską realizowałam zajęcia dydaktyczne w formie ćwiczeń laboratoryjnych z Chemii Organicznej: "Podstawowe techniki laboratoryjne" *Projekt „Kształcenie kadr dla innowacyjnej gospodarki opartej na wiedzy w zakresie agrochemii, chemii i ochrony środowiska (Inno'AgroChemOś)”. Opracowałam autorskie zajęcia dydaktyczne zatytułowane „Dlaczego biegna reakcje chemiczne”.*

Obecnie zamierzam zająć się przygotowaniem zajęć praktycznych skupiających się na spektrometrii mas oraz podstawowych technikach proteomicznych, które są obecnie podstawą w moich pracach badawczych.

Za swój duży sukces uważam również pogodzenie pracy naukowej z macierzyństwem. W 2010 roku zostałam po raz pierwszy mamą córki Marii, a w 2012 roku syna Adama.

Nie jest łatwe godzenie dwóch tak różnych światów, ale dzięki wsparciu rodziny udało mi się nie rezygnować z części naukowej mojego życia.

## 7. Cytowana literatura

1. Turk B, Turk V, Turk D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem.* 1997;378(3-4):141-150. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165064>.
2. Xu Y, Ding Y, Li X, Wu X. Cystatin C is a disease-associated protein subject to multiple regulation. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(5):442-451. doi:10.1038/icb.2014.121
3. Sokol JP, Neil JR, Schiemann BJ, Schiemann WP. The use of cystatin C to inhibit epithelial-mesenchymal transition and morphological transformation stimulated by transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res.* 2005;7(5):R844-53. doi:10.1186/bcr1312
4. Tian M, Schiemann WP. Preclinical efficacy of cystatin C to target the oncogenic activity of transforming growth factor Beta in breast cancer. *Transl Oncol.* 2009;2(3):174-183. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19701502>. Accessed March 12, 2018.
5. Kumada T, Hasegawa A, Iwasaki Y, Baba H, Ikenaka K. Isolation of cystatin C via functional cloning of astrocyte differentiation factors. *Dev Neurosci.* 2004;26(1):68-76. doi:10.1159/000080714
6. Olafsson I, Grubb A. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Amyloid.* 2000;7(1):70-79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842708>.
7. Perlenfein TJ, Mehlhoff JD, Murphy RM. Insights into the mechanism of cystatin C oligomer and amyloid formation and its interaction with  $\beta$ -amyloid. *J Biol Chem.* 2017;292(27):11485-11498. doi:10.1074/jbc.M117.786558
8. Tizon B, Ribe EM, Mi W, Troy CM, Levy E. Cystatin C protects neuronal cells from amyloid-beta-induced toxicity. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(3):885-894. doi:10.3233/JAD-2010-1291
9. Janowski R, Kozak M, Jankowska E, et al. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat Struct Biol.* 2001;8(4):316-320. doi:10.1038/86188
10. Brage M, Lie A, Ransjö M, et al. Osteoclastogenesis is decreased by cysteine proteinase inhibitors. *Bone.* 2004;34(3):412-424. doi:10.1016/j.bone.2003.11.018
11. Pikuła M, Smużyńska M, Krzystyniak A, et al. Cystatin C peptidomimetic derivative with antimicrobial properties as a potential compound against wound infections. *Bioorg Med Chem.* 2017;25(4):1431-1439. doi:10.1016/j.bmc.2017.01.004
12. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease.

*Mol Brain*. 2011;4(1):3. doi:10.1186/1756-6606-4-3

13. Sakono M, Zako T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A $\beta$  oligomers. *FEBS J*. 2010;277(6):1348-1358. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x
14. Keshet B, Yang IH, Good TA. Can size alone explain some of the differences in toxicity between  $\beta$ -amyloid oligomers and fibrils? *Biotechnol Bioeng*. 2010;106(2):n/a-n/a. doi:10.1002/bit.22691
15. Stroud JC, Liu C, Teng PK, Eisenberg D. Toxic fibrillar oligomers of amyloid- have cross- structure. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(20):7717-7722. doi:10.1073/pnas.1203193109
16. Armstrong RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2009;47(4):289-299. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20054780>.
17. Levy E, Sastre M, Kumar A, et al. Codeposition of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer disease patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(1):94-104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11202179>.
18. Calero M, Pawlik M, Soto C, et al. Distinct properties of wild-type and the amyloidogenic human cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *J Neurochem*. 2001;77(2):628-637. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11299325>.
19. Sastre M, Calero M, Pawlik M, et al. Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid  $\beta$  inhibits in vitro amyloid fibril formation. *Neurobiol Aging*. 2004;25(8):1033-1043. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2003.11.006
20. Carrette O, Demalte I, Scherl A, et al. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics*. 2003;3(8):1486-1494. doi:10.1002/pmic.200300470
21. Bokarewa M, Abrahamson M, Levshin N, et al. Cystatin C binds serum amyloid A, downregulating its cytokine-generating properties. *J Rheumatol*. 2007;34(6):1293-1301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17552057>. Accessed March 12, 2018.
22. Levy E, Lopez-Otin C, Ghiso J, Geltner D, Frangione B. Stroke in Icelandic patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases. *J Exp Med*. 1989;169(5):1771-1778. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2541223>.
23. Grubb A, Jansson O, Gudmundsson G, Arnason A, Löfberg H, Malm J. Abnormal Metabolism of  $\gamma$ -Trace Alkaline Microprotein. *N Engl J Med*. 1984;311(24):1547-1549. doi:10.1056/NEJM198412133112406
24. Palsdottir A, Abrahamson M, Thorsteinsson L, et al. Mutation in cystatin C gene causes hereditary brain haemorrhage. *Lancet (London, England)*. 1988;2(8611):603-604. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2900981>.
25. Nilsson M, Wang X, Rodziewicz-Motowidlo S, et al. Prevention of Domain



- Swapping Inhibits Dimerization and Amyloid Fibril Formation of Cystatin C. *J Biol Chem.* 2004;279(23):24236-24245. doi:10.1074/jbc.M402621200
26. Östner G, Lindström V, Postnikov AB, Solovyeva TI, Emilsson ÖI, Grubb A. High throughput testing of drug library substances and monoclonal antibodies for capacity to reduce formation of cystatin C dimers to identify candidates for treatment of hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011;71(8):676-682. doi:10.3109/00365513.2011.621026
  27. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(9):491-498. doi:10.1038/ncprheum0895
  28. Ni J, Fernandez MA, Danielsson L, et al. Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem.* 1998;273(38):24797-24804. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733783>.
  29. Dhungana S, Williams JG, Fessler MB, Tomer KB. Epitope Mapping by Proteolysis of Antigen–Antibody Complexes. In: Humana Press; 2009:87-101. doi:10.1007/978-1-59745-450-6\_7
  30. Olafsson I, Löfberg H, Abrahamson M, Grubb A. Production, characterization and use of monoclonal antibodies against the major extracellular human cysteine proteinase inhibitors cystatin C and kininogen. *Scand J Clin Lab Invest.* 1988;48(6):573-582. doi:10.3109/00365518809085775
  31. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity.* 2008;41(1):11-18. doi:10.1080/08916930701619169
  32. Marcello A, Wirths O, Schneider-Axmann T, Degerman-Gunnarsson M, Lannfelt L, Bayer TA. Reduced levels of IgM autoantibodies against N-truncated pyroglutamate A $\beta$  in plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2011;32(8):1379-1387. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.08.011
  33. DeMarshall C, Sarkar A, Nagele EP, et al. Utility of Autoantibodies as Biomarkers for Diagnosis and Staging of Neurodegenerative Diseases. In: *International Review of Neurobiology.* Vol 122. ; 2015:1-51. doi:10.1016/bs.irn.2015.05.005
  34. Lacombe J, Mangé A, Solassol J. Use of Autoantibodies to Detect the Onset of Breast Cancer. *J Immunol Res.* 2014;2014:1-8. doi:10.1155/2014/574981
  35. Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Clinical significance of autoantibodies in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 2013;46:17-24. doi:10.1016/j.jaut.2013.08.001
  36. Rubini Gimenez M, Pagano S, Virzi J, et al. Diagnostic and prognostic value of autoantibodies anti-apolipoprotein A-1 and anti-phosphorylcholine in acute non-ST elevation myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(4):369-379. doi:10.1111/eci.12411
  37. Gerhartz B, Abrahamson M. Physico-chemical properties of the N-terminally truncated L68Q cystatin C found in amyloid deposits of brain haemorrhage patients. *Biol Chem.* 2002;383(2):301-305. doi:10.1515/BC.2002.032

38. Abrahamson M, Mason RW, Hansson H, Buttle DJ, Grubb A, Ohlsson K. Human cystatin C Role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase. *Biochem J.* 1991;273:621-626.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/0316/8334af36fb12bac56e8dd5a5b9b3283a0811.pdf>.
39. Juszczak P, Łankiewicz L, Kołodziejczyk AS. Synthesis of orthogonally protected vicinal diamines with amino acid-based skeleton. *Lett Pept Sci.* 2002;9(4-5):187-192. doi:10.1007/BF02538381
40. Juszczak P, Kasprzykowska R, Kołodziejczyk AS. Simple and efficient synthesis of chiral amino alcohols with an amino acid-based skeleton. *Lett Pept Sci.* 2003;10(2):79-82. doi:10.1023/B:LIPS.0000032366.28662.1d
41. Juszczak P, Kołodziejczyk AS, Grzonka Z. FTIR spectroscopic studies on aggregation process of the  $\beta$ -amyloid 11-28 fragment and its variants. *J Pept Sci.* 2009;15(1):23-29. doi:10.1002/psc.1085

02.08.2018

Paulina Czapka