

## OPONENTSKÝ POSUDOK

**habilitačnej práce RNDr. Zuzany Gažovej, CSc.,  
samostatnej vedeckej pracovníčky IIa  
na Oddelení biofyziky Ústavu experimentálnej fyziky SAV v Košiciach  
v študijnom odbore 4.2.1 Biológia  
na tému „Amyloidná agregácia proteínov.“**

Habilitačná práca RNDr. Zuzany Gažovej, CSc. pod názvom „Amyloidná agregácia proteínov“ predstavuje súbor 14 vedeckých prác habilitantky publikovaných v zahraničných časopisoch registrovaných v Current Contents. Jednotiacim motívom všetkých prác je štúdium amyloidnej agregácie proteínov.

Téma práce je v súlade so súčasným trendom. Je venovaná problematike amyloidnej agregácii konformačne zmenených proteínov. Predpokladá sa, že tieto agregované štruktúry môžu byť príčinou viacerých závažných ochorení, akými sú Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba či diabetes mellitus. Napriek intenzívnemu výskumu v tejto oblasti doposiaľ neexistuje účinná terapia, ktorá by bola zameraná na podstatu týchto ochorení. Pochopenie mechanizmu konverzie proteínov na vysoko nerozpustné amyloidné agregáty a inhibícia patologickej agregácie rôznymi látkami by mohlo prispieť k vývoju nových a efektívnych terapeutík.

V habilitačnej práci je v literárnom prehľade prezentovaný súhrn súčasných poznatkov v oblasti štúdia amyloidnej agregácie proteínov (strany 13 – 24). V prvej podkapitole habilitantka prezentuje hlavne spojitosť amyloidných agregátov s patológiou amyloidných ochorení a ich úlohu pri niektorých fyziologických funkciách v rôznych organizmoch. Druhá podkapitola je venovaná charakteristickým štruktúrnym znakom a vlastnostiam amyloidných agregátov, ich cytotoxicite a tvorbe in vitro. Detailnejší popis možných terapeutických prístupov závažných amyloidných ochorení je uvedený v tretej podkapitole. Zameriava sa hlavne na charakterizáciu inhibítorov amyloidnej agregácie, a to malých molekúl a nanočastíc. Podkladom pre vypracovanie tejto kapitoly bolo viac ako 70 literárnych zdrojov (abecedne zoradených v kapitole literatúra na stranách 51 – 54).

V ďalšej časti (strany 24 – 47) predstavuje vlastné výsledky získané pomocou rozličných experimentálnych techník použitím viacerých proteínov. Je členená na štyri časti: 1. Študované proteíny, ktorá bližšie popisuje poly/peptidy s ktorými habilitantka pracovala, a to lyzozým, inzulín, Abeta peptid a tau proteín; 2. Štúdium mechanizmu amyloidnej agregácie, analýza morfológie amyloidných fibríl opublikované v prílohách 1-3; 3. Inhibítory amyloidnej agregácie, ktoré sú bližšie popísané v prílohách 4 - 10 (malé molekuly) a prílohách 11 - 13 (nanočastice); 4. Cytotoxicita amyloidných agregátov a látok s anti-amyloidným účinkom opierajúca sa o prílohy 2, 7 a 14. V závere sú zosumarizované získané poznatky (strany 48 - 50). Prílohy predstavujú 14 publikácií (strany 55 – 199), ktoré boli podrobené náročným recenzným konaniam redakciami príslušných vedeckých časopisov.

Vo svojej práci habilitantka zistila, že prítomnosť sodných solí Hofmeisterovej série významne determinuje stabilitu a sekundárnu štruktúru natívneho lyzozýmu, ktorá následne ovplyvňuje amyloidnú fibrilizáciu tohto proteínu. Poloha aniónu v Hofmeisterovej sérii nepriamo koreluje s rýchlosťou fibrilizácie a určuje morfológiu vytvorených amyloidných fibríl. Prítomnosť chaotropného ako aj kozmotropného aniónu vedie k tvorbe fibríl s výrazným podielom  $\beta$ -ohybov v sekundárnej štruktúre fibríl. Štruktúra amyloidných fibríl vytvorených v prítomnosti NaCl bola

popísaná prostredníctvom jednoduchého modelu špirály so sférickými štruktúrnymi jednotkami, pričom boli definované základné parametre helixu. Podobne, hodnota pH tiež ovplyvňuje kinetiku fibrilizácie lyzozýmu a štruktúru amyloidných fibríl.

Ďalšou významnou oblasťou štúdia bola identifikácia účinných inhibítorov amyloidnej agregácie poly/peptidov. Bol sledovaný inhibičný účinok viacerých malých molekúl, ako napr. akridínových derivátov, polyfenolov a tripeptidov. Na základe experimentálnych údajov bolo zistené, že významnú úlohu pri inhibičnej aktivite zohráva prítomnosť aromatického jadra, jeho planarita ako aj vlastnosti linkera a skupiny naviazanej na linker. V prípade tripeptidov najväčšiu anti-amyloidnú aktivitu mali tripeptidy obsahujúce tryptofán a prolín. Pomocou počítačového modelovania boli identifikované väzobné miesta inhibítorov v natívnom proteíne ako aj v amyloidných fibrilách a definované dominantné interakcie medzi inhibítorom a proteínom.

V ďalšej časti habilitantka charakterizuje účinok magnetických a zlatých nanočastíc na amyloidnú agregáciu lyzozýmu a inzulínu. Bolo ukázané, že veľkosť anti-amyloidnej aktivity nanočastíc je podmienený fyzikálno-chemickými vlastnosťami nanočastíc, hlavne ich veľkosťou a stabilitou. Významnú úlohu pri tom zohráva hlavne kovové jadro nanočastíc. Dôležité je zistenie, že fluorescencia tioflavínu T v mozgo-miešnom moku ľudí postihnutých Alzheimerovou chorobou silne koreluje s hladinami fosforylovaného tau proteínu. Táto skutočnosť poukazuje na možnosť využitia danej metodiky na skoré diagnostikovanie Alzheimerovej choroby.

Posledná časť je zameraná na štúdium účinku amyloidných agregátov na bunky. Rozdielna morfológia amyloidných agregátov podmieňuje ich odlišný cytotoxický účinok. V prípade dlhších a tenších fibríl pripravených v kyslom pH sa cytotoxický efekt kontinuálne zvyšuje so zvyšujúcou sa koncentráciou fibríl. Cytotoxický efekt kratších a širších fibríl pripravených v neutrálnom pH má skokový charakter. Rozličný efekt je spôsobený jednak odlišnými postrannými reťazcami na povrchu fibríl ako aj ich rozdielnou stabilitou. Okrem toho bolo ukázané, že magnetické nanočastice sú schopné redukovať množstvo amyloidných agregátov v bunkách, a tým znížiť ich nepriaznivý cytotoxický účinok na bunky.

Habilitačná práca je napísaná zrozumiteľne, logicky a je doplnená obrazovou dokumentáciou. Z teoretického prehľadu, ako aj z doložených vlastných prác vyplýva, že autorka má výborný prehľad v danej oblasti, dokáže sa na problém pozeráť z viacerých uhlov a vyvodíť z toho závery pre ďalšiu prácu. Riešenie uvedenej problematiky si vyžadovalo zvládnutie náročných fyzikálno-chemických a biologických metódik zameraných na prípravu, meranie a analýzu rôznych amyloidných agregátov, mikroskopické techniky ako atómová kontaktná mikroskopia či transmisná elektrónová mikroskopia. Štruktúrne zmeny proteínov boli sledované pomocou kruhového dichroizmu a infračervenej spektroskopie.

Dôležitým výsledkom tejto práce je nájdenie malých molekúl a nanočastíc, ktoré účinne redukujú amyloidné agregáty proteínov a majú veľký potenciál byť použité na liečbu a diagnostiku chorôb spojených s amyloidnou agregáciou proteínov. Nové, originálne poznatky prezentované v predloženej práci sú prínosom pre ďalší rozvoj základného výskumu a následne môžu byť využiteľné aj v praxi.

Predkladané výsledky boli realizované hlavne na Oddelení biofyziky Ústavu Experimentálnej fyziky SAV v Košiciach a tiež v Ústave Maxa Plancka pre štruktúrnú molekulárnu biológiu v Hamburgu, Nemecko. Celkový habilitačný spis, vrátane príloh, predstavuje vedecké dielo, ktoré už prešlo náročnou oponentúrou v redakčných radách významných vedeckých časopisov a nie je ho potrebné analyzovať osobitne z hľadiska

metodologických a vedeckých aspektov. Všetky predložené práce predstavujú významný prínos pre rozvoj vedných disciplín ako sú biológia, biofyzika a konformačná analýza proteínov.

RNDr. Zuzana Gažová, CSc. je vedecká pracovníčka s dobrými teoretickými a praktickými skúsenosťami v oblasti štúdia amyloidnej agregácie proteínov. Okrem publikácií zahrnutých v habilitačnej práci (CC-14 s celkovým impakt faktorom 51,12), je autorkou ďalších 74 vedeckých prác. Publikované práce zaznamenali doteraz 475 citácií väčšinou v databázach WoS a SCOPUS. Okrem toho prezentovala svoje výsledky prostredníctvom viacerých pozvaných prednášok na zahraničných konferenciách alebo významných vedeckých inštitúciách.

Habilitantka získala svoje pedagogické skúsenosti hlavne na Prírodovedeckej a Lekárskej fakulte UPJŠ v Košiciach pri výučbe študentov ako aj vo vyučovacom procese na Fakulte biotechnológie a potravinárstva v Nitre a Fakulte humanitných a prírodných vied v Prešove. Je autorkou učebných textov. Svoju odbornosť aktívne využíva aj pri výchove bakalárov, diplomantov a doktorandov.

## **Záver**

Záverom je možné konštatovať, že habilitačná práca RNDr. Zuzany Gažovej, CSc. „Amyloidná agregácia proteínov“ prináša nové pohľady na túto problematiku. Autorka na vysokej úrovni dokumentuje svoju vedecko-výskumnú erudíciu, schopnosť dobrej voľby aktuálnych problémov pre ich riešenie a rozvoj daného vedného odboru.

Predložená habilitačná práca v plnej miere splnila cieľ, vyplýva z nej vysoká profesionálnosť autorky, odrážajúca sa i vo výbere metód ako aj dosiahnutých výsledkoch.

Na základe preštudovania tejto práce a vyššie uvedených skutočností môžem túto prácu jednoznačne odporučiť Vedeckej rade Fakulty biotechnológie a potravinárstva k habilitačnému konaniu a po jej úspešnom obhájení navrhnúť menovanie RNDr. Zuzany Gažovej, CSc. v študijnom odbore 4.2.1 Biológia za docentku.

v Nitre 12.1.2016

prof. Ing. Ján Tomáš, CSc.

FBP SPU v Nitre