

dr hab., prof. UG
Sylwia Rodziewicz-Motowidło

Gdańsk, 7.03.2014 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Emilii Agnieszki Lubeckiej zatytułowanej
„1D-4D NMR w analizie struktury i konformacji biomolekuł: od analogów wazopresyny do drugiej
cysteinowej pół-domeny katalitycznej enzymu E1 aktywującego ubikwitynę”
wykonanej w Zakładzie Modelowania Molekularnego Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod
kierownictwem prof. dr hab. inż. Jerzego Ciarkowskiego.

Sposób działania peptydów i białek oraz ich właściwości biologiczne ściśle zależą od ich struktury przestrzennej (3D). Znajomość struktury 3D tych biocząsteczek umożliwia poznanie kluczowych mechanizmów reakcji biochemicznych (np. widzenie czy skurcze mięśni), określenie miejsc aktywnych i miejsc wiążących w białkach, poznanie przyczyn powstawania wielu chorób (np. anemia sierpowata, mukowiscydoza czy choroba Alzheimera) oraz projektowanie skutecznych leków. Znajomość struktury 3D peptydów i białek pozwala na zrozumienie wielu procesów komórkowych, od transportu po regulację cyklu komórkowego. Obecnie, poznanie struktury przestrzennej peptydu lub białka na poziomie atomowym jest możliwe dzięki wykorzystaniu technik eksperymentalnych takich jak krystalografia rentgenowska oraz magnetyczny rezonans jądrowy (NMR). Pierwsze struktury białek o wysokiej rozdzielczości uzyskano metodą krystalografii rentgenowskiej w latach 60-tych i były to struktury mioglobiny i hemoglobiny. Od tamtej pory rozwiązano eksperymentalnie wiele struktur białek, najczęściej metodą krystalografii. Technika NMR jest o wiele bardziej użyteczna do określania struktury przestrzennej peptydów (a właściwie do określania ich równowagi konformacyjnej w roztworze) i białek w środowisku zbliżonym do warunków natywnych w komórce. Inne techniki eksperymentalne takie jak dichroizm kołowy (CD), spektroskopia w podczerwieni (FTIR), spektrometria mas (MS), fluorescencja czy kalorymetria są bardzo użyteczne w badaniach nad strukturą drugorzędową czy nad wpływem czynników wewnętrznych (np. mutacje) i zewnętrznych (tj. temperatura, pH, ciśnienie, siła jonowa, obecność metali, rodzaj rozpuszczalnika itd.) na strukturę przestrzenną. Z pomocą przychodzą również techniki teoretyczne, dzięki którym możliwe jest poznanie niskorozdzielczych struktur natywnych białek. Zaletą tych technik jest możliwość badań *in silico* bez konieczności wykonywania często niemożliwych lub bardzo kosztownych badań eksperymentalnych. Metody chemii obliczeniowej ułatwiają lub umożliwiają wyznaczenie struktur przestrzennych biomolekuł na podstawie danych NMR.

Wykorzystanie techniki NMR oraz metod chemii obliczeniowej do wyznaczania struktur przestrzennych peptydów i białek (lub ich kompleksów) stanowią podstawowe narzędzie badawcze w stosunku do różnych biocząsteczek najważniejszych ośrodków na całym świecie. Jednym z zespołów wykorzystujących te techniki jest grupa Pana Prof. dr hab. inż. Jerzego Ciarkowskiego z Wydziału Chemii

Uniwersytetu Gdańskiego, która od wielu lat prowadzi badania strukturalne hormonów neuroprzysadkowych oraz ich analogów w kontekście ich aktywności biologicznej. Wnikliwa analiza wielu analogów tychże hormonów pozwala w konsekwencji na wnikliwe poznanie zależności struktura - aktywność biologiczna potencjalnych leków, co z kolei umożliwia projektowanie nowych, coraz to skuteczniejszych farmaceutyków. Takie podejście do zaplanowanych badań przyjęła także Doktorantka stawiając sobie za cel charakterystykę strukturalną dziesięciu analogów hormonów neuroprzysadkowych tj. wazopresyny (AVP/VP) i oksytocyny (OT), z wykorzystaniem techniki NMR oraz technik obliczeniowych. Obiektem zainteresowania Doktorantki stały się hormony neuroprzysadkowe z powodu ich dużego znaczenia farmakologicznego, gdyż zaburzenia ich działania pociągają za sobą różne stany patologiczne. Niedobór AVP powoduje moczówkę prostą, którą leczy się podając pacjentom wazopresynę, a właściwie jej superagonistę dDAVP. Trwają obecnie prace nad opracowaniem nowych związków chemicznych o własnościach fagonistycznych, i wygodniejszych farmakologicznie, np. podawanych doustnie lub w postaci aerozolu. Prace nad poszukiwaniem nowych, bardziej skutecznych leków, mogą przyspieszyć badania konformacyjne naturalnych peptydów i ich analogów. Można w ten sposób ograniczyć ilość poszukiwanych modyfikacji strukturalnych.

Sposób działania peptydów i białek oraz ich właściwości biologiczne ściśle zależą od ich struktury przestrzennej. Dodatkowym celem badawczym realizowanym przez Doktorantkę było określenie struktury przestrzennej białka E1, enzymu systemu ubikwityna-proteasom. System ten jest jednym z głównych szlaków selektywnie degradujących białka komórkowe i regulujących większość procesów kluczowych dla zachowania homeostazy komórki. Degradacji proteosomalnej ulegają między innymi białka odpowiadające za transdukcję sygnału oraz regulację metabolizmu, cyklu komórkowego i apoptozy. Proteasom jest główną częścią systemu określanego jako system ubikwityna-proteasom (UPS). Białka przeznaczone do degradacji proteosomalnej są najpierw rozpoznawane i oznaczone przez przyłączenie ubikwityny (Ub). Proces ubikwitynacji jest kilkuetapowy i obejmuje na początku aktywację Ub przez enzym E1. Właśnie strukturę tego enzymu, a właściwie jego fragmentu, zawierającego katalityczną cysteinę (SCCH) wyznaczała Doktorantka, używając do tego celu techniki NMR.

Rozprawa mgr Emilii Agnieszki Lubeckiej to obszerny materiał teoretyczny i doświadczalny zawarty na 173 stronach podzielonych na 6 typowych dla rozpraw doktorskich rozdziałów tj.: wstęp teoretyczny, cele pracy, metodyka badań, wyniki badań, dyskusja wyników oraz podsumowanie, po którym znajduje się wykaz skrótów i symboli oraz bibliografia. Wstęp zajął autorce jedynie 33 strony, co z jednej strony zakłóca nieco proporcje całej rozprawy z drugiej jednak w sposób bardzo przystępny i skrótowy opisuje podstawy spektroskopii NMR i jej zastosowanie do analizy peptydów i białek w roztworze. Kandydatka drobniawo wyjaśnia procedurę analizowania widm peptydów i białek oraz opisuje jakie informacje strukturalne można uzyskać z poszczególnych technik NMR oraz jakie należy stosować procedury podczas wyznaczania struktury peptydów z wykorzystaniem więzów NMR. Niestety, Doktorantka, chcąc zapewne uniknąć dodatkowych opisów w tekście, skomasowała te informacje na schemacie (Rysunek 1) oraz w Tabeli 2, co sprawiło że ta bardzo istotna część pracy stała się mało czytelna. W rozdziale tym Doktorantka syntetycznie ujęła również najważniejsze informacje na temat hormonów neuroprzysadkowych, gdzie w sposób bardzo skrupulatny opisała wpływ określonych modyfikacji chemicznych na strukturę oraz ich aktywność biologiczną. We wstępie rozprawy doktorskiej znajduje się również podrozdział poświęcony roli enzymu E1 w systemie UPS. Opis ten jest również bardzo skrótowy i przedstawia najważniejsze informacje dotyczące enzymu E1. Niestety czytelnik, bez dodatkowego wyjaśnienia, zaczyna się zastanawiać nad celowością opisu w rozprawie roli białka E1.



Hormony neuroprzysadkowe wiążą się z zewnątrzkomórkową częścią receptorów błonowych, podczas gdy białko E1 uczestniczy w szlaku proteosomalnej degradacji białek. Brak dodatkowych wyjaśnień nadaje tej części rozprawy nieco niespójny i dychotomiczny koncepcyjnie charakter a czytelnik zostaje wtłoczony w dwa niezależne wątki z życia komórki, jeden – hormonalno-peptydowy i drugi – degradacyjno-białkowy. Ze szczególnym zainteresowaniem przeczytałam podrozdział z części wstępu rozprawy doktorskiej zatytułowany „Kierunki rozwoju spektroskopii NMR”. Chcąc zaspokoić swą nieco zastaną w tym zakresie wiedzę dowiedziałam się jakie są główne ograniczenia w kierunkach rozwoju spektroskopii NMR. Bardzo spodobało mi się umieszczenie takiego rozdziału w rozprawie. Doktorantka pokazała w nim perspektywy zastosowania spektroskopii NMR do badań strukturalnych biomolekuł, po ówczesnym uporaniu się z problemami natury ekonomicznej i technicznej (tj. wysokie koszty pomiarów widm NMR i ograniczenia programistyczne).

W rozdziale opisującym cele pracy, Doktorantka nadal utrzymywała czytelnika w koncepcji dwóch niezależnych wątków swojej rozprawy, jeden – hormonalno-peptydowy i drugi – degradacyjno-białkowy. Jasno przedstawiła dwa, niezależne cele swojej pracy doktorskiej dotyczące analizy strukturalnej krótkich peptydów – analogów hormonów neuroprzysadkowych oraz analizy strukturalnej białka – półdomeny katalitycznej enzymu z E1 aktywującego mysią ubiquitynę (SCCH). Oba cele badawcze Doktorantka słusznie powiązała techniką NMR, czyli umiejętnością doboru i posługiwania się zaawansowanymi technikami spektroskopii NMR w analizie strukturalnej peptydów i białek.

W rozdziale poświęconym metodyce badań Kandydatka w sposób zwięzły scharakteryzowała wykorzystywane techniki NMR i opisała stosowane procedury w rozwiązywaniu wielowymiarowych widm NMR i ustalaniu więzów NMR. Skrupulatnie opisała również stosowane procedury obliczeniowe. Wiele fragmentów tej części rozprawy powinno moim zdaniem znaleźć się w części teoretycznej rozprawy doktorskiej, jak przykładowo podrozdział „Przesunięcie chemiczne”, „Izomeryzacja *cis-trans*”, „Analiza sekwencyjna” czy „Przypisanie alifatycznych łańcuchów bocznych”. Jednak zdaję sobie sprawę, iż przeniesienie tych podrozdziałów do części teoretycznej pracy wiązałoby się ze znacznie szerszym ich opisem niż w metodyce badań. Spowodowałoby to być może niepotrzebne zwiększenie objętości części teoretycznej rozprawy doktorskiej a także powielanie w znacznej mierze informacji z książek. Dlatego, rozwiązanie na które zdobyła się Doktorantka jest w pełni uzasadnione oraz wygodne, gdyż bezpośrednio wiąże teorię z praktyką. Dopiero w tymże rozdziale Doktorantka ujawnia pochodzenie koncepcyjne wątku degradacyjno-białkowego swojej rozprawy. W tym rozdziale napisała, iż badania nad strukturą białka SCCH były i są realizowane przez Dr Igora Zhukova, u którego przebywała na stażu naukowym w Slovenian NMR Centre w Lublanie. Prace nad strukturą białka SCCH Doktorantka kontynuowała po powrocie do Gdańska, stąd można się było domyśleć, dlaczego w rozprawie doktorskiej pojawił się drugi, niezależny temat badawczy związany z białkiem SCCH. W tej części rozprawy doktorskiej Doktorantka opisała również i uzasadniła prace jakie przeprowadziła nad rozszerzeniem funkcjonalności programu SPARKY (program do analizy wielowymiarowych widm NMR). Doktorantka, w ramach swojej pracy inżynierskiej na Politechnice Gdańskiej utworzyła program o nazwie ScA4D do przypisywania sygnałów alifatycznych łańcuchów bocznych. Program ten przetestowała na widmach 2D, 3D oraz 4D NMR białka SCCH a wyniki wykorzystała podczas oznaczenie struktury przestrzennej białka SCCH. Podsumowując rozdział poświęcony metodyce badań można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorantka zdobyła doskonały warsztat badawczy w zakresie jedno i

wielowymiarowych technik NMR, technik obliczeniowych, doskonale orientuje się również w zakresie specjalistycznego oprogramowania do analizy widm NMR, ustalania struktury drugorzędowej na podstawie przesunięć chemicznych, do obliczania i analizy struktur peptydów czy do parametryzacji niestandardowych reszt aminokwasowych (SPARKY, TALOS+, CS23D, NMRPipe, CARA, MARS, AMBER i inne), dacyjno-białkowy. Ze szczególnym zainteresowaniem przeczytałam podrozdział z części wstępu

rozprawy doktorskiej zatytułowany „Kierunki rozwoju spektroskopii NMR”. Chcąc zaspokoić swa nieco zastaną w tym zakresie wiedzę, dowiedziałam się jakie są główne ograniczenia w kierunku rozwoju spektroskopii NMR. Bardzo spodobało mi się omieszczenie takiego rozdziału w rozprawie. Doktorantka pokazała w tym perspektywę zastosowania spektroskopii NMR do badań strukturalnych białek, po dwuczęści w odniesieniu do problemów natury ekonomicznej i technicznej (tj. wysokie koszty pomiarów widm NMR i ograniczenia programistyczne).

W Dyskusji wyników Autorka w sposób syntetyczny wymienia najważniejsze spostrzeżenia wynikające z przeprowadzonych badań osobno dla wątku hormonalno-peptydowego i osobno dla wątku degradacyjno-białkowego. Wyniki badań konformacyjnych zarówno dla analogów hormonów neuroprzysadkowych jak i dla białka SCCH zostały przed Doktorantką opisane bardzo syntetycznie, i skrupulatnie. Właściwie zostały przedstawione wyniki z pomiarów NMR, prawidłowo przeanalizowane struktury oraz wyniki z badań dynamiki molekularnej. Praca zawiera również wiele rysunków i schematów ułatwiających analizę uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Większość z osiągnięć Kandydatki oceniam bardzo wysoko, a zwłaszcza:

- Kompletne ustalenie struktury dziesięciu analogów hormonów neuroprzysadkowych w roztworze z podaniem pełnej ich charakterystyki strukturalnej oraz zdefiniowaniem oddziaływań stabilizujących ich struktury w odniesieniu do ich aktywności biologicznej oraz w odniesieniu do struktur innych analogów hormonów neuroprzysadkowych,
- Ustalenie i analiza struktury trzeciorzędowej białka SCCH na podstawie danych NMR. Uzyskana struktura NMR białka SCCH praktycznie pokrywa się ze strukturą krystalograficzną tego białka, co wskazuje na uzyskanie bardzo dobrego warsztatu w zakresie ustalania struktur białek na podstawie danych NMR,
- Dokonanie pełnej charakterystyki spektralnej i strukturalnej analizowanych analogów i białka SCCH (jedno i wielowymiarowe widma NMR, przesunięcia chemiczne, wartości kątów torsyjnych, odległości międzyprotonowe, wiązania wodorowe, parametry dynamiczne),
- Zastosowanie stworzonej przez siebie aplikacji ScA4D, służącej przypisywaniu sygnałów alifatycznych łańcuchów bocznych aminokwasów w białku.

W Podsumowaniu Doktorantka przedstawiła swój dorobek naukowy, który obejmuje trzy publikacje z listy filadelfijskiej (opublikowanych w *Biophysical Chemistry*, *Chemical Biology & Drug Design*, *Journal of Peptide Science*), jedną pracę w materiałach zjazdowych oraz pięć posterów z konferencji naukowych. Rozprawę kończy Wykaz skrótów i symboli oraz Bibliografia obejmująca 284 pozycje literaturowe.

Rozprawa napisana jest poprawnie i zrozumiale. Niektóre moje wątpliwości, kwestie dyskusyjne oraz uchybienia wymieniam poniżej:

- Na Rysunku nr. 1 należałoby zaznaczyć, iż informacje o geometrii wiązania peptydowego również stanowią informację do ustalenia zbioru „wiązków NMR”,
- Na stronie 10 istnieje zapis, iż próbki znakowane izotopowo zwiększają koszty oraz wydłużają procedurę syntezy. W jaki sposób zastosowanie znakowanych izotopowo komponentów wydłuża procedurę syntezy?



UNIWERSYTET GDAŃSKI



- Co Doktorantka rozumie pod pojęciem β -mostka w strukturze białka SCCH?
- Dlaczego badania strukturalne analogów hormonów neuroprzysadkowych nie zostały przeprowadzone w identycznych warunkach (różne rozpuszczalniki, różne micelle)?
- W jaki sposób należałoby uzasadnić wybór rozpuszczalnika TFE w badaniach konformacyjnych analogów hormonów neuroprzysadkowych?
- Badania nad białkiem SCCH nie zostały ukończone o czym wspomina sama Doktorantka. Struktura białka została ustalona w zasadzie wyłącznie na podstawie przesunięć chemicznych w białku. Jednak uzyskana struktura powinna być według Recenzenta lepiej przedyskutowana w aspekcie jej wpływu na proces aktywacji ubikwityny przez enzym E1,
- W pracy znalazłam kilka błędnych określeń, oraz (prawdopodobnie) przejęczyzeń: Co oznacza zdanie na str. 29 „...może dostarczyć pewnych przesłanek co do wędrówki hormonów neuroprzysadkowych...”? Niefortunne jest tytułowanie rozdziałów i podrozdziałów skrótami np.: SCCH lub TAV-MD itp.; str. 40 jest „obecności micel” a powinno być raczej „obecności miceli”; str. 47. dlaczego reszty aminokwasowe charakteryzują się różnymi układami spinowymi łańcuchów bocznych?; na stronie str. 56 niefortunne jest sformułowanie: „Innym rodzajem zgięcia które nierzadko występuje w peptydach i białkach jest γ -zgięcie jest jednak ono znacznie mniej popularne niż β -zgięcie”, czy γ -zgięcie może być popularne? ogów hormonów neuroprzysadkowych,
- Przytoczone uwagi krytyczne oraz kwestie dyskusyjne nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a postawione przez autorkę tezy znalazły potwierdzenie. Rozprawa mgr Emilii Agnieszki Lubeckiej zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny uzyskany dla otrzymanych peptydów i białka SCCH, a Kandydatka wykazała się ponadto znajomością wielu technik NMR i biegłością w technikach obliczeniowych.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Emilii Agnieszki Lubeckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Emilia Rodziewicz-Motowidło