

Dr hab. Piotr Młynarz prof. PWR
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Wrocław, 05.03.2014 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Emilii A. Lubeckiej zatytułowanej „1D-4D NMR w analizie struktury i konformacji biomolekuł: od analogów wazopresyny do drugiej cysteinowej pół-domeny katalitycznej enzymu E1 aktywującego ubikwitynę”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Emilii Lubeckiej została wykonana w Zakładzie Modelowania Molekularnego Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Jerzego Ciarkowskiego, który z sukcesem eksploruje tematykę chemii peptydów i białek.

Jak wskazuje sam tytuł, rozprawa ma układ dwuwątkowy, a jej motywem przewodnim jest zastosowanie spektroskopii NMR wraz z metodami modelowania molekularnego. Dysertacja doktorska wykazuje klasyczny układ podziału treści, składa się z 173 stron maszynopisu, który zawiera VI rozdziałów, 104 rysunki oraz 284 przypisy literaturowe.

Praca porusza szeroko pojmowane korelacje pomiędzy strukturą biomolekuł a ich aktywnością biologiczną i stanowi wartościowy wkład naukowy do chemii peptydów, a w szczególności do projektowania nowych terapeutyków.

Pracę rozpoczyna przegląd literaturowy na temat wykorzystania spektroskopii NMR w analizie peptydów i białek wraz z rysem historycznym oraz podsumowaniem kierunków rozwoju spektroskopii NMR. W pierwszym rozdziale są opisane parametry widma i rodzaje eksperymentów spektroskopii NMR, w tym eksperymentów korelacyjnych od 2D do 4D niezbędnych w nowoczesnej analizie strukturalnej peptydów i białek wraz z opisem procedur analizowania widm. Ten rozdział stanowi cenne kompendium wiedzy i ukazuje, że mgr Emilia Lubecka z dużą swobodą omawia poszczególne rodzaje eksperymentów oraz możliwości ich wykorzystania. Następnie Doktorantka wprowadza czytelnika we właściwości wazopresyny i oksytocyny oraz ich syntetycznych analogów podsumowując tabelarycznie zależności pomiędzy aktywnością i strukturą przestrzenną hormonów neuroprzysadkowych i ich analogów. W dalszej części pracy został skrótowo opisany wpływ glikozylacji oraz możliwe zastosowanie układów micelarnych w badaniach peptydowych. Następnie Autorka opisuje krótko genezę drugiego wątku dysertacji, którym są badania strukturalne drugiej cysteinowej pół-domeny katalitycznej - białka SCCH.

W drugim rozdziale zatytułowanym „Cele pracy” zostały sprecyzowane tezy dysertacji. Pierwszym celem powziętym przez Doktorantkę była analiza strukturalna krótkich analogów peptydów neuroprzysadkowych za pomocą spektroskopii NMR. Peptydy zostały podzielone na grupy w zależności od modyfikacji w sekwencji łańcucha peptydowego: grupa A –



Wpłynęło dn. 10.03.2014

L.dz. 8010-WCH/1P-400/2014

zawierające: kwas 1-merkaptocykloheksylooctowy oraz 1-naftyloalaninę (1-Nal) (dwa związki); grupa B - zawierające α -2-indanyloglicynę (Igl) (cztery związki), z tego dwa zawierają kwas 3-merkaptopropionowy (Mpa); grupa C - zawierające kwas L- α -indolino-2-karboksylowy (L-Ica) i Mpa (dwa związki) oraz grupa D - zawierające dwa glikozylowane peptydy. W sumie Doktorantka zaplanowała przebadanie w tej części pracy dziesięciu związków.

Drugim celem badań sformułowanym bardzo potocznie, tu cytuje: „*celem drugiej części pracy było przeanalizowanie widm NMR 276-aminokwasowego białka*”, była analiza za pomocą spektroskopii NMR białka zawierającego 276 reszt aminokwasowych - SCCH. Obu celom przyświecał pośredni cel rozprawy doktorskiej, czyli wykazanie umiejętności odpowiedniego doboru i posługiwania się zaawansowanymi technikami spektroskopii NMR w rozwiązywaniu problemów strukturalnych obu przedmiotów rozprawy.

Kontynuując Autorka dysertacji wprowadza czytelnika w metodykę podjętych badań nad analogami hormonów neuroprzysadkowych. Jest to ciekawa część pracy, która potwierdza dobrą znajomość warsztatu wykorzystywanego w rozwiązywaniu podjętej przez mgr Lubecką tematyki. W tym fragmencie zostały opisane warunki eksperymentów, struktury badanych związków, metody analizy danych NMR oraz metody obliczeniowe i algorytmy badawcze wykorzystywane przy opracowaniu struktur cyklicznych peptydów. Jednakże, po przeczytaniu fragmentu tekstu dotyczącego warunków przeprowadzenia eksperymentów, rodzi się pytanie, dlaczego Doktorantka użyła podczas badań tak wielu rodzajów rozpuszczalników. Czy wszystkie wybory były podyktowane rozpuszczalnością peptydów?

Myszę, że wartym zaznaczenia jest fakt, że chociaż parametry niestandardowych reszt takich jak: Cpa, Mpa oraz L-Nal, D-Nal zostały wcześniej opracowane to L-Igl i D-Igl, L-Ica, glikoO β Ser oraz glikoN ϵ Lys zostały sparametryzowane oryginalnie przez Doktorantkę do obliczeń struktur peptydów metodami dynamiki molekularnej.

W dalszej części rozdziału zostały opisane warunki eksperymentów badania białka SCCH. Przy tak dużym wyzwaniu jakim jest przypisanie sygnałów dla 267 reszt aminokwasowych białka zostały zastosowane dobrze znane w środowisku badań strukturalnych białek programy NMRPipe, CARA oraz MARS. W analizie tej makromolekuły Autorka dysertacji wykorzystwała zarówno techniki 2D, 3D oraz 4D NMR stosując program SPARKY z własnym rozszerzeniem do opracowywania widm 4D. Przypisane przesunięcia chemiczne jąder ^1H oraz ^{13}C zostały wykorzystane do analizy struktury drugorzędowej białka. W tym celu zostały zastosowane programy TALOS+ oraz CS23D, które bazują na metodzie indeksu przesunięć chemicznych. Dodatkowo wykorzystując jedynie sekwencję aminokwasową została przewidziana struktura drugorzędowa za pomocą programu PSIPRED.

Rozdział IV stanowią wyniki własnych badań Doktorantki, który tak jak dotychczas opisane rozdziały jest podzielony na dwa wątki badawcze. Na początku zostały opisane peptydy I i II z grupy A. Badania NMR były wykonane w DMSO- d_6 . W wyniku przeprowadzonych badań zostały przypisane przesunięcia chemiczne ^1H oraz ^{13}C NMR wszystkim aminokwasom dla obu związków. Oba z nich występują w formie dwóch konformerów, z których przeważającą formą jest forma „*trans*”. Zjawisko to jest dobrze zobrazowane na rysunkach nr 43 i 44. Bardzo dobrym pomysłem, który został zastosowany przez mgr Emilię Lubecką jest porównanie przesunięć chemicznych pochodzących od protonów amidowych natywnej wazopresyny ze związkami zawierającymi syntetyczny aminokwas o konfiguracji L i D, z

którego można zaobserwować selektywne zmiany, które dotyczą czwartej reszty Gln dla peptydu posiadającego w sekwencji resztę D-1-Nal. Wykres ten dobrze oddaje zmiany strukturalne pomiędzy porównywanymi peptydami oraz wazopresyną. I chociaż kolejne rozdziały napisane są według tego samego schematu, to zabrakło mi w nich porównań przesunięć chemicznych względem natywnych peptydów. Domyślam się, że przyczyną braku takich wykresów w dalszej części pracy była różnica wynikająca z wykonania badań w różnych warunkach eksperymentalnych. Doktorantka zidentyfikowała również sygnały typu ROE i NOE pomiędzy protonami w resztach aminokwasowych, określiła stałe wicynale pomiędzy protonami H_N i H_α oraz współczynniki temperaturowe. Ten ostatni parametr wskazuje na możliwe oddziaływania wodorowe NH-O=C. Przypisane sygnały oddziaływania pomiędzy protonami przez przestrzeń posłużyły do optymalizacji struktury za pomocą dynamiki molekularnej. W wyniku obliczeń zostały otrzymane rodziny konformacyjne dla związku I - 5 natomiast dla związku II - 6, z których następnie Doktorantka wybrała struktury dominujące i przedstawiła je za pomocą projekcji stereo.

Kolejna grupa czterech peptydów zawierała syntetyczne reszty aminokwasowe L-Igl (zw. III); D- Igl (zw. IV) oraz dwa analogi tych peptydów zawierające w pierwszej pozycji Mpa (reszta kwasu merkaptopropionowego) związku: V i VI. Badania zostały wykonane i opisane w tym samym schemacie jak dwa poprzednie związki. Eksperymenty zostały wykonane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7,4 zawierającym 10%D₂O-90%H₂O oraz SDS-d₂₅. Doktorantka na widmach związków IV i VI zaobserwowała dwa konformery w stosunku 5,6:1, jednakże wytłumaczenie ich pochodzenia nie było możliwe. W dalszym ciągu Autorka pracy pisze, że przyczyną mogą być oddziaływania z micelą. Moim zdaniem, aby wykluczyć lub potwierdzić tego typu oddziaływania oraz ich wpływ na obserwowane podwójnych sygnałów, Doktorantka powinna wykonać badania w tych samych warunkach, ale bez dodatku detergentu. Dodatkowo Doktorantka twierdzi, że ze względu na „złą jakość widma gHSQC” nie przypisała sygnałów pochodzących od atomów węgla ¹³C, nie tłumacząc, co było przyczyną takiego stanu rzeczy. Czy to był zbyt krótki czas akwizycji, czy też inne względy (np. poszerzenie lub nakładanie się sygnałów)? Układ micelarny został zastosowany jako układ modelowy błony komórkowej. Jednakże, ze względu na jego dynamikę model ten jest bardzo „zgrubny” i w takim przypadku, chociażby dla porównania wyników spodziewałbym się badań bez obecności detergentu. Takie dane mogłyby stanowić dodatkową ceną informację oraz pozwolić na pełną analizę przedmiotu badań. Struktury związków obliczone dynamiką molekularna na podstawie danych NMR zostały przedstawione na rysunkach 62 i 63 w formie projekcji stereo.

Następna grupa badanych związków składa się z dwóch analogów wazopresyny, które mają w pierwszej pozycji wprowadzoną syntetyczną resztę aminokwasową L-Ica. Dodatkowo w jednym z nich reszta L-Arg⁸ została zastąpiona aminokwasem o przeciwnej konfiguracji D-Arg. Badania odbywały się w układzie DMSO-d₆ : bufor fosforanowy (10% D₂O-90%H₂O) o pH 7,4 (1:1) z dodatkiem DPC-d₃₈. Fragment wyników dotyczący związku VII jest opisany nieprecyzyjnie. Doktorantka odczytała z widma istnienie czterech konformerów, jak słusznie twierdzi przyczyną takiego stanu rzeczy może być izomeria *cis-trans* wiązania Cys⁶-Pro⁷ i/lub Mpa¹-L-Ica² i/lub oddziaływanie z micelą. Względem wiązania peptydowego Mpa¹-L-Ica² główny konformer pozostaje w przewadze 5:1. Tu powstaje pytanie co oznacza 1 czy to są wszystkie pozostałe konformery, które mają konformacje *cis*? Ze względu na wiele pobocznych konformerów, również w tym przypadku twierdzą, że powinny zostać wykonane badania bez

udziału detergentu w celu ustalenia pochodzenia poszczególnych struktur. Podobnie jak dla poprzednich związków nie zostały przypisane sygnały ^{13}C NMR, tym bardziej jest to dla mnie niejasne, że dla analogu **VIII** w tych samych warunkach sygnały ^{13}C zostały przypisane. W przeciwieństwie do analogu **VII** zawierającego resztę L-Arg związek **VIII** wykazał obecność jednego konformeru z wiązaniem *cis* peptydowym pomiędzy resztami Mpa^1 -L-Ica² wraz

z pozostałymi wiązaniami *trans*. Doktorantka wykorzystała sygnały korelacyjne NOE znalezione dla obu peptydów do obliczeń struktur dynamiką molekularną peptydów, w wyniku czego zostały wyodrębnione po trzy rodziny konformacyjne. Rzeczywiście, zmiana konfiguracji L na D reszty Arg niesie za sobą znaczące zmiany strukturalne nie tylko na widmach NMR, ale również w strukturach otrzymanych za pomocą obliczeń teoretycznych. Badania w układzie micelarnym wykazały również rozbieżności w oddziaływaniach z detergentem.

Ostatnia grupa związków stanowi według mnie najciekawszą strukturalnie grupę peptydów. Pierwszym z nich jest analog wazopresyny, zawierający w pozycji ósmej resztę Arg wymienioną na glikoNεLys (zw. **IX**), natomiast w drugim analogu oksytocyny reszta Gln została zastąpiona glikoOβSer (zw. **X**). Jednak zaskakującym dla mnie był wybór jeszcze jednego rozpuszczalnika, którym był 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). Mogę się tylko domyślać, że wybór ten był podyktowany rozpuszczalnością peptydów, chociaż w przedstawionej dysertacji nie znalazłem takiej informacji. Oba peptydy na widmach ^1H NMR wykazały oprócz głównego układu spinowego również poboczne układy spinowe, które mogą świadczyć o istnieniu w równowadze kilku konformerów. Schemat badawczy we wszystkich przypadkach jest ten sam. Z tego względu, że Autorka pracy nie potrafiła wytłumaczyć przyczyny powstawania konformerów sugerowałbym wykonanie badań analogów peptydowych bez reszt cukrowych lub wykonanie pomiarów NMR w innych rozpuszczalnikach (o ile było to możliwe ze względu na rozpuszczalność związków). Doktorantka wykonała również obliczenia struktur za pomocą modelowania molekularnego, które doprowadziły do wyznaczenia dominujących rodzin konformacyjnych: dla peptydu **IX** - trzech, natomiast dla peptydu **X** - jednej.

We fragmencie pracy, który dotyczył badań nad białkiem SCCH Doktorantka wykazała biegłość w wykorzystywanych przez nią technikach NMR, za pomocą których został zanalizowany drugi przedmiot badań. Używając technik 3D oraz 4D spektroskopii NMR wraz z odpowiednimi programami komputerowymi mgr Emilia Lubecka przeprowadziła zarówno analizę struktury pierwszorzędowej jak i drugorzędowej białka, pomimo braku opisanego za pomocą metody NMR wszystkich reszt aminokwasowych. Szczególnie ważnym jest fakt wykazania przez Doktorantkę, że otrzymana poprzez nią struktura zawiera w ponad 50 % strukturę helikalną i pod tym względem jest zgodna z danymi krystalograficznymi. I to osiągnięcie w moim odczuciu świadczy o jej wysokich kompetencjach w posługiwaniu się zarówno technikami NMR jak i metodami rozwiązywania struktur.

Wyjaśnienia wymaga jedynie pewna nieścisłość. Mianowicie w celu pracy Doktorantka wyznaczyła sobie za zadanie „*stworzenie aplikacji rozszerzającej działanie popularnego programu do graficznej analizy widm NMR – program SPARKY- o metodę przypisywania sygnałów alifatycznych łańcuchów bocznych wykorzystywanych przez mnie widmach 4D.: HCCH-TOCSY oraz CN-NOESY*” po czym pisze w rozdziale „Wyniki badań”, że „*oba wykonane przez mnie rozszerzenia funkcjonalności programu SPARKY były przedmiotem mojej pracy inżynierskiej....*”. Być może w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej mgr Emilia

Lubecka dokonała modyfikacji wcześniej napisanych rozszerzeń programowych. Fakt ten wymaga jednak wyjaśnienia.

Rozdział V „Dyskusja wyników” rozpoczyna dyskusja wyników otrzymanych w trakcie badań nad cyklicznymi peptydami. Pomimo tego, że ten fragment pracy jest napisany bardzo syntetycznie to dyskusja jest przeprowadzona dobrze. Autorka dysertacji omawia korelację pomiędzy poszczególnymi zmianami w peptydach a ich aktywnością biologiczną. W ostatnim fragmencie tego rozdziału Doktorantka omawia wyniki dotyczące struktury białka SCCH i tu zostałem zaskoczony dwoma stwierdzeniami, które cytuję: „.....*Dopiero wtedy byłoby możliwe przypisanie i scałkowanie sygnałów korelacyjnych na widmach NOESY, wyznaczenie odległości międzyprotonowych (zgodnie ze schematem zamieszczonym we Wstępie, Rys3, s. 11), a następnie wyznaczenie wiarygodnej i pełnej struktury przestrzennej*”, a następnie pisze „*Struktura samego białka SCCH nie była głównym celem realizowanego projektu, tylko celem pośrednim do uzyskania struktury kompleksu SCCH-ubikwityna.....*”. Pierwszy cytat może świadczyć o dużej samokrytyce Doktorantki, natomiast drugie z przytoczonych zdań łącznie z całym akapitem moim zdaniem powinno się znaleźć w celu pracy. Ogólnie w tym rozdziale stanowczo odczułem brak schematów i rysunków, które w znacznym stopniu mogłyby zwizualizować otrzymane wyniki i ułatwić przez to ich interpretację. Ostatni rozdział pracy stanowi podsumowanie osiągnięć Doktorantki.

Jak już wcześniej napisałem układ pracy jest przejrzysty i widać, że jest przemyślany, chociaż wymagałyby w niektórych miejscach rysunków i dodatkowych komentarzy, które zapobiegłyby ciągłemu wertowaniu pracy w poszukiwaniu różnego rodzaju informacji. Wszystkie cele pracy zostały osiągnięte. Za szczególnie cenne uważam dokonania Doktorantki w opisanie struktur peptydów cyklicznych oraz ciekawym rozważaniom na temat struktura-aktywność biologiczna.

Podsumowując praca jest napisana przejrzysto poza pewnymi fragmentami, które przytoczyłem powyżej oraz takimi, których nie wypisałem i które nie wpływają na jej wartość naukową.

Warto zaznaczyć, że do tej pory wyniki badań Doktorantki ukazały się w postaci trzech publikacji i kilku komunikatów konferencyjnych.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Emilii Lubeckiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 05.03.2014 roku

