



Warszawa, 17.04.2017 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Julii Pauliny Witkowskiej

pt.: „Badania oddziaływań proteasomu z allosterycznymi modulatorami jego aktywności oraz wyznaczenie miejsc ich wiązania z enzymem za pomocą rentgenografii strukturalnej”

Jednym z najważniejszych systemów degradacji białek pozwalających na utrzymanie właściwej homeostazy komórkowej jest system ubikwityno-proteasomowy (UPS), który degraduje większość (aż do 90%) białek komórkowych. Zaangażowany w ten system proteasom 20S pełni zarówno rolę ochronną (rozkładając źle sfałdowane lub uszkodzone białka), jak i regulatorową (poprzez rozkład białek regulatorowych) uczestnicząc w regulacji podstawowych procesów życiowych. Dlatego też możliwość wpływu na jego aktywność (hamowanie lub aktywację) stwarza perspektywy możliwości interwencji w stany patologiczne (choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne). Z tego powodu proteasom jest bardzo ciekawym obiektem zarówno badań, jak i projektowania potencjalnych leków. Jednak z uwagi na wyjątkową złożoność budowy proteasomu mechanizmy jego działania nie zostały dotąd w pełni wyjaśnione i są one intensywnie badane w wielu ośrodkach naukowych. Do tych badań włączyła się także grupa prof. UG dr hab. Elżbiety Jankowskiej z Katedry Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, która ma już na tym polu niemałe osiągnięcia, a kontynuacją wcześniejszych jej badań jest recenzowana praca doktorska.

Celem pracy doktorskiej mgr Julii Witkowskiej była próba określenia miejsc wiązania allosterycznych modulatorów proteasomu za pomocą krystalografii rentgenowskiej. Cel był niezwykle ambitny, bo niewiele jest wiadomo na temat miejsc allosterycznych proteasomu, ale też niezwykle atrakcyjny z powodu badania „ziemi nieznannej”.

Praca doktorska mgr Julii Witkowskiej ma układ klasyczny dla prac chemicznych, składa się z wprowadzenia (2 strony), wstępu literaturowego (40 stron), celu pracy (3 strony), opisu metodyki badań (37 stron), prezentacji i omówienia wyników (31 stron), oraz wykazu stosowanych skrótów i spisu literatury cytowanej (184 pozycje).

W części wstępnej swojej rozprawy doktorantka przedstawiła stan obecnej wiedzy dotyczący systemu ubikwityna-proteasom omawiając budowę i funkcje proteasomu, w tym mechanizm ubikwitynacji i sygnały degradacji białek, a następnie opisała budowę i regulację proteasomu 20S. Kolejny rozdział dotyczył omówienia proteasomu pod kątem celu terapeutycznego, zarówno pod kątem poszukiwań inhibitorów do zastosowań w terapii przeciwnowotworowej, jak również w chorobach neurodegeneracyjnych. Część literaturową kończył rozdział omawiający modele allosteryczności, leki allosteryczne i allosteryczną regulację proteasomu.

Przedstawione wprowadzenie literaturowe jest dobrze i treściwie napisane i świadczy o ogromnej wiedzy doktorantki w zakresie badań proteasomu.

Przedmiotem pracy doktorskiej mgr Julii Witkowskiej było znalezienie miejsc zdolnych do wiązania małowcząsteczkowych niekompetycyjnych inhibitorów i aktywatorów w obrębie cząsteczki proteasomu 20S, a metodą badawczą była rentgenografia rentgenostrukturalna kompleksów proteasomu z jego modulatorami. Doktorantka do badań wykorzystywała związki otrzymane przez siebie i w zespole Chemii Biomedycznej. Początkowo krystalizowała je w kompleksie z proteasomem drożdżowym, dla którego znane były warunki krystalizacji. Te badania, jak również zbieranie i procesowanie danych dyfrakcyjnych z synchrotronu prowadziła pod opieką dr hab. Grzegorza Dubina z Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jednocześnie na Uniwersytecie Gdańskim prowadziła próby krystalizacji proteasomu ludzkiego, ponieważ jego struktura krystalograficzna została opublikowana dopiero w 2015 r., już w trakcie wykonywania pracy doktorskiej przez mgr Witkowską.

W celu znalezienia modulatorów allosterycznych proteasomu doktorantka przeprowadziła poniższe syntezy:

1. analogów peptydu Tat2 (wirusa HIV-1) - miało to na celu wyznaczenie regionu farmakoforowego inhibitora Tat2 (poprzez syntezę analogów z „podwójnym” skanem alaninowym) oraz określenie zależności między konformacją peptydu, a zdolnością do inhibicji proteasomu 20S.

2. analogów peptydu PR-11, wywodzącego się z PR-39 – miało to celu określenie, które elementy sekwencji analogów PR wpływają na własności inhibicyjne, a które na własności aktywacyjne. W zaplanowanych peptydach modyfikowano zarówno N- jak i C-koniec, a także wycinano fragmenty ze środka sekwencji.

3. analogu C-końcowego fragmentu białka Blm 10. C-koniec zaprojektowanego peptydu odpowiadał sekwencji białka Blm 10 (co miało umożliwić wiązanie z proteasomem), a na N-końcu zaplanowano dwie reszty aromatyczne, aby umożliwić oddziaływanie peptydu z tworzącymi bramę N-końcami podjednostek α .

Szkoda, że doktorantka na etapie przedstawiania celu pracy nie podała przesłanek, którymi się sugerowała projektując poszczególne analogi peptydów wyjściowych. Np. jaka była geneza analogów Tat2 zawierających 2, 3 lub 4 reszty alaniny, jakie były przesłanki do wstawienia kwasu 2-etylenodiamino-5-nitrobenzoesowego lub synteza peptydów cyklicznych. Nie wiadomo też jak długi jest C-koniec peptydu skopiowany z białka Blm 10, a określenie, że na N-końcu zaplanowano 2 reszty aromatyczne nie odpowiada dokładnie sekwencji zaplanowanego peptydu, bo ten peptyd posiada na N-końcu resztę lizyny. Niefortunne jest też nazwanie tego peptydu analogiem białka Blm 10. Niektóre z brakujących na tym etapie czytania pracy informacji można znaleźć czytając omówienie otrzymanych wyników, ale lepiej byłoby podać uzasadnienie wprowadzanych zmian już w celu pracy.

Syntezę peptydów doktorantka prowadziła na różnych nośnikach stałych z użyciem chemii Fmoc zarówno w automatycznym syntezaorze, jak również manualnie w reaktorze mikrofalowym lub w naczynku do syntezy peptydów. Dwa analogi Tat2 były poddane cyklizacji na żywicy, reszty Asp i Lys były chronione ortogonalnymi osłonami: Asp(OAll) i Lys(Mtt). W tym miejscu nasuwa się pytanie dlaczego zastosowano właśnie te grupy ochronne? Peptydy po zdjęciu z żywicy były analizowane, oczyszczane na RP HPLC, a następnie ich budowa była potwierdzana metodami spektrometrii mas (ESI i/lub MALDI).

Badania wpływu otrzymanych peptydów na poszczególne aktywności ludzkiego i drożdżowego proteasomu 20S doktorantka przeprowadziła z wykorzystaniem substratów fluorogenicznych, odpowiednich dla danej aktywności peptydazowej. Przeprowadziła również badania FTIR peptydów ze skanu alaninowego Tat2, w celu sprawdzenia, czy aktywność tego peptydu zależy od jego struktury drugorzędowej.

Do swoich badań mgr Julia Witkowska pozyskiwała samodzielnie drożdżowy proteasom izolując go z hodowli kultur drożdżowych. Izolację i oczyszczania prowadziła wg. protokołów literaturowych i wskazówek dr Gaczyńskiej i dr. Osmulskiego z University of Texas, USA. Etapy oczyszczania proteasomu polegały na chromatografii jonowymiennej, chromatografii na złożu hydroksypatytowym i czasami również na filtracji żelowej. Ogrom pracy może obrazować wydajność izolacji i oczyszczania proteasomu drożdżowego: z 60 g suchej masy doktorantka uzyskiwała ok. 1 mg białka. Ludzki proteasom doktorantka pozyskiwała z erytrocytów wg. procedur literaturowych. Procedury oczyszczania były również wieloetapowe i pozwalały na otrzymanie ok. 1 mg białka ze 100 mL pełnej krwi.

Właściwe badania krystalizacji proteasomu doktorantka prowadziła metodą dyfuzji par w układzie kropli wiszącej. Optymalizację warunków krystalizacyjnych prowadziła na 24-dołkowych płytkach, a w celu otrzymania kryształów kompleksu białko-peptyd otrzymane kryształy białka nasączała roztworami wybranych związków. Rejestracja danych dyfrakcyjnych dla wszystkich kryształów zostały zarejestrowane z wykorzystaniem promieniowania synchrotonowego w ośrodkach naukowych w Berlinie, Grenoble i Hamburgu. Doktorantka zmierzyła 74 kryształy drożdżowego proteasomu, a uzyskane dane pozwoliły na rozwiązanie 12 struktur krystalicznych, z których jedna zawierała gęstość elektronową pochodzącą od modulatora. W przypadku proteasomu ludzkiego doktorantka zmierzyła 29 kryształów, ale żaden nie rozpraszał promieniowania synchrotonowego.

Doktorantka może mieć naprawdę dużą satysfakcję z przeprowadzonych badań i osiągniętych wyników. Otrzymana przez nią struktura krystaliczna kompleksu Blm-pep z drożdżowym proteasomem 20S jest pierwszą strukturą pokazującą miejsce wiązania niskocząsteczkowego aktywatora z tym enzymem. Przeprowadzone modelowanie molekularne wskazuje również, że Blm-pep mógłby się związać w tym samym miejscu proteasomu ludzkiego. Uzyskana struktura krystalograficzna tego kompleksu wnosi nowe informacje do obowiązującego modelu aktywacji proteasomu. Dyskusja tych wyników stanowi treść publikacji wysłanej obecnie do recenzji (która być może będzie już przyjęta do druku podczas obrony doktorantki).

Pozostałe wyniki poszukiwania allosterycznych modulatorów proteasomu pokazały, że jest to zadanie bardzo trudne, ponieważ badany związek może być w zależności od warunków eksperymentu inhibitorem lub aktywatorem. Spośród przebadanych związków najlepszym inhibitorem okazał się związek PR7 (IC_{50} względem aktywności ChTL wynosi 0,049 μ M), natomiast najlepszymi aktywatorami są peptydy Blm-pep i PR1.

Dodatkowo analiza SAR analogów skanu alaninowego Tat2 (niekompetycyjnego inhibitora aktywowanego ludzkiego proteasomu i dodatkowo stymulującego aktywność chymotrypsynopodobną (ChTL) latentnego enzymu) wykazały, że zdolność do hamowania peptydazy aktywowanego proteasomu 20S jest powiązana z obecnością ładunku dodatniego w inhibitorze, natomiast własności stymulujące są powiązane z konformacją uporządkowaną. Również analiza

aktywności analogów PR11 pozwoliła na obserwację, że poszczególne związki są dobrymi aktywatorami przy niższych stężeniach, a przy wyższych tracą tę właściwość, a nawet stają się inhibitorami. Doktorantka podaje kilka możliwych interpretacji tych wyników, ale zaobserwowane zjawisko wskazuje na dodatkowe trudności jakie pojawiają się przy poszukiwaniu modulatorów allosterycznych.

Pracę doktorską mgr Julii Witkowskiej przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Praca jest napisana bardzo dobrą polszczyzną, zwięźle i przejrzysto. I tylko z obowiązku recenzenta chciałabym wymienić kilka zauważonych błędów i zadać pytania:

1. Str. 53 „oba fragmenty połączyłam polarnym, labilnym łącznikiem”, takie stwierdzenie sugeruje raczej łącznik organiczny, a nie sekwencję peptydową

2. Str 59, doktorantka opisuje, że po zdjęciu próbki peptydu z żywicy potwierdziła usunięcie osłony OAll z reszty Asp, ale nie opisuje jak to wykonała?

3. Str. 78 izolacja ludzkiego proteasomu prowadzona była z erytrocytów. W pracy nie podano źródła pochodzenia krwi, z której izolowano erytrocyty.

4. I uwagi edytorskie: doktorantka niepotrzebnie stosuje „kropki” w podtytułach rozdziałów, również lepiej byłoby zastosować mniejszą czcionkę w podpisach pod rysunkami. Te obecne podpisy źle się czyta, a są często długie, pisane dużą czcionką i przy zastosowaniu małego odstępu między liniami.

Oczywiście wymienione powyżej drobne usterki nie mają wpływu na wartość naukową rozprawy i nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej opinii o tej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że zakres pracy doktorskiej mgr Julii Witkowskiej był niezwykle szeroki. Począwszy od izolacji i oczyszczania proteasomu drożdżowego i ludzkiego, po syntezy i oczyszczania peptydów do badań, ich badania strukturalne (FTIR, CD) i badania aktywności biologicznej, a skończywszy na krystalizacji kompleksów proteasom-peptyd i analizie otrzymanych danych. Wszystkie te tak bardzo różnorodne badania wymagały od doktorantki wszechstronnego przygotowania, zarówno teoretycznego, jak i eksperymentalnego i z wszystkich etapów pracy doktorantka wywiązała się znakomicie!

Również bardzo wysoko oceniam sposób prezentacji wyników i sposób prowadzenia dyskusji przy ich omawianiu. Wszystkie te umiejętności klasyfikują doktorantkę jako wszechstronnego badacza, świetnie przygotowanego do podejmowania różnorodnych wyzwań naukowych.

Chciałabym również podkreślić, że doktorantka jest współautorką 3 publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (i 1 publikacji spoza listy w Wiadomościach Chemicznych), a następna publikacja z jej pierwszym autorstwem jest już wysłana do recenzji. Doktorantka również wielokrotnie prezentowała swoje wyniki na zjazdach krajowych i zagranicznych (w tym są 2 wystąpienia ustne i 23 w formie plakatu). Doktorantka prowadziła badania w grantach NCN swojej promotor dr hab. Jankowskiej, jak również jest obecnie kierownikiem własnego grantu NCN Preludium. Mgr Witkowska odbyła również staż naukowy w ramach programu MOST w grupie badawczej dr hab. Grzegorza Dubina z Uniwersytetu Jagiellońskiego. To naprawdę imponujący dorobek i zasługujący na wyróżnienie!

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr Julii Witkowskiej zatytułowana „*Badania oddziaływań proteasomu z allosterycznymi modulatorami jego aktywności oraz wyznaczenie miejsc ich wiązania z enzymem za pomocą rentgenografii strukturalnej*” spełnia wszelkie wymagania stawiane ustawą o stopniach i tytule naukowym i zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Julii Witkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Bliszczyński