



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny | Wydziałowy Zakład Biochemii

Prof. dr hab. inż. Andrzej Ozyhar
andrzej.ozyhar@pwr.wroc.pl

Wrocław, 6 kwietnia, 2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty FIGIEL

Analiza struktury i stabilności wariantów białka TRAIL o podwyższonej aktywności cytotoksycznej

Rozprawa została wykonana w Zakładzie Biochemii Fizycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marty Dziedzickiej-Wasylewskiej i dr Andrzeja Góreckiego (promotor pomocniczy)

Przedstawiona do recenzji i przygotowana w języku polskim rozprawa mgr Małgorzaty FIGIEL liczy 132 strony. Układ pracy jest typowy i składa się ona z następujących części: *Streszczenie, Wykaz częściowej stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski końcowe, Bibliografia.*

Ligand indukujący apoptozę pokrewny do TNF (TRAIL), to sklonowana w 1996 roku cytokina, która specyficznie indukuje apoptozę komórek nowotworowych na drodze niezależnej od p53. Z tego powodu, od wielu lat, TRAIL jest przedmiotem badań, jako potencjalny lek przeciwnowotworowy. Jednak, niektóre z linii komórek nowotworowych wykazują oporność na indukcję apoptozy przez TRAIL. Aby zwiększyć cytotoksyczność TRAIL i poszerzyć spektrum jego działania, jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego, zaproponowano szereg modyfikacji jego struktury. Bardzo ciekawa strategia modyfikacji została powstała w dziale badawczo-rozwojowy firmy Adamed. Kluczowym elementem strategii jest chimeryczne białko składające się z fragmentu TRAIL, aktywatora apoptozy na drodze niezależnej od p53, oraz domeny BH3 białka Bid, której obecność powinna zapewnić aktywację mitochondrialnej ścieżki apoptotycznej. TRAIL ma ponadto pełnić rolę nośnika, lokalizującego fragment Bid w sąsiedztwie guza. Oba białka zostały połączone łącznikiem zawierającym sekwencje rozpoznawane przez proteiny MMP-9 i urokinazy (uPa), które uwalniałyby aktywne peptydy w sąsiedztwie komórek nowotworowych. W ten sposób

przełamana zostałaby oporność niektórych komórek nowotworowych względem cytokiny TRAIL.

Celem rozprawy było opisanie struktury chimerycznego konstruktów, oraz określenie wpływu na nią składników roztworu – a co za tym idzie określenie optymalnego składu roztworu, warunkującego zachowanie natywnej struktury. Przedmiotem badań były cztery rekombinowane białka uzyskane w prokariotycznym systemie ekspresyjnym przez pracowników działu badawczo-rozwojowego firmy Adamed. Dwa z nich, pełniące rolę referencyjną, odpowiadały zewnątrzkomórkowej, C-końcowej domenie ludzkiej cytokiny TRAIL, począwszy od reszty 95 lub reszty 114 (TRAIL95 i TRAIL114). Dwa pozostałe, AD-O57.4 i AD-O57.5, to białka chimeryczne zawierające na końcu N domenę BH3 i na końcu C fragment TRAIL114. W AD-O57.4 oba fragmenty połączono polipeptydem zawierającym sekwencję trawioną przez urokinazę (uPa) i metaloproteinazę MMP-9 oraz sekwencję oktaarginylową mającą ułatwić transport do wnętrza komórki. Sekwencja łącznikowa białka AD-O57.5 została zaopatrzona w trzy dodatkowe reszty cysteinylowe, mające stabilizować trimeryczną formę białka oraz dodatkowy łącznik glicylo-serylowy.

Zmierzając do realizacji celu rozprawy doktorantka przeprowadziła szereg systematycznych analiz struktury wymienionych białek. Posługując się bardzo szeroką paletą metod biofizycznych i biochemicznych przeprowadziła krytyczne porównanie bardzo wielu danych pomiarowych uzyskanych dla białek chimerycznych z danymi referencyjnymi, tj. uzyskanymi dla TRAIL95 i TRAIL114, o strukturach odpowiadających wyznaczonym wcześniej strukturom krystalicznym. W konsekwencji zdefiniowane zostały optymalne warunki, w których chimeryczne białka są najbardziej stabilne a obserwowane różnice pomiędzy ich strukturą a strukturami odniesienia zostały przedyskutowane w kontekście wyników badań ich aktywności *in vitro* przeprowadzonych w laboratorium Adamed.

Uważam, że na przedłożoną do oceny rozprawę składają się badania stanowiące podstawę do rozwiązania problemu badawczego, jednocześnie jej lektura wskazuje, iż Pani Małgorzata Figiel posiada ogólną wiedzę w zakresie biochemii. Nie mam zatem wątpliwości, że rozprawa wypełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie o Stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami). Z recenzenckiego obowiązku pragnę jednak przedstawić kilka uwag, komentarzy, czasem refleksji, które przyporządkowałem wybranym rozdziałom rozprawy.

Streszczenie

Streszczenie skonstruowane jest zgodnie z obowiązującymi formalnymi zasadami. Po przedstawieniu stanu wiedzy i problemu badawczego doktorantka omawia wyniki prowadzonych badań oraz płynące z nich wnioski. Pewne zastrzeżenia budzi niedostateczna szczegółowość *Streszczenia*. Przykład: doktorantka pisze *Zaproponowano dwa nowe warianty białka TRAIL cechujące się wyższą cytotoksycznością in vitro*. W następnym zdaniu czytamy *Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy jest struktura i stabilność tych dwóch nowych*

wariantów białka TRAIL uzyskanych w prokariotycznym systemie ekspresyjnym. Szkoda, że w *Streszczeniu*, które powinno stanowić autonomiczną całość, zawierającą dostatecznie szczegółowe informacje, w zakresie pozwalającym na zrozumienie co było przedmiotem badań, brak jest informacji: (1) czym różnią się warianty od oryginału, tj. cytokiny TRIAL (2) kto zaproponował i uzyskał warianty.

Wprowadzenie

Wprowadzenie to w zamyśle doktorantki fragment pracy mający na celu przedstawienie danych literaturowych, uzasadniających celowość podjętych badań, oraz dokonanie przeglądu metod wykorzystywanych w celu uzyskania molekularnej charakterystyki i porównania, struktur analizowanych białek i odniesienia ich do znanych struktur krystalicznych białka TRAIL. Oba te zamierzenie zostały spełnione. Jednak, dość zaskakująca wydała mi się struktura *Wprowadzenia*, w którym problematyka TRAIL omawiana jest na 9 stronach a metody na 14. Wolałbym, aby więcej uwagi doktorantka poświęciła obiektowi badań, a w szczególności opisowi jego funkcji jako czynnika przeciwnowotworowego, także w formie rekombinowanych pochodnych.

Cel pracy

Cel pracy jest przedstawiony w klarowny sposób i, co bardzo ważne, jasno wynika on z danych literaturowych przedstawionych we *Wprowadzeniu*. W sumie motywacja do podjęcia badań składających się na rozprawę oraz ich cel są bardzo dobrze zdefiniowane.

Wyniki

Z dużym zainteresowaniem, chociaż niekiedy małym z uwagi na niedostatki przedstawione poniżej, przeczytałem ten fragment rozprawy. Znalazłem w nim opis systematycznych badań, które zmierzały do uzyskania charakterystyki molekularnej chimerycznych pochodnych TRAIL, tj. AD-O57.4 i AD-O57.5, porównania jej z danymi uzyskanymi przez doktorantkę dla fragmentów TRAIL114 i TRAIL95 oraz z danymi literaturowymi dla struktur krystalicznych TRAIL. Badania prowadzone były także w celu zdefiniowania czynników mogących wpływać na strukturę, a co za tym idzie stabilność, badanych białek, takich jak: pH, siła jonowa, obecność osmolitów, obecność EDTA. Zwraca uwagę kompleksowość prowadzonych badań - użycie szerokiej palety technik (metod) rutynowo stosowanych do analizy struktury pierwszo-, drugo-, trzecio- i czwartorzędowej białek. Umożliwiło to na zgromadzenie bardzo dużej ilości danych, których analiza pozwoliła na doktorantce sformułowanie ogólnych wniosków, zaprezentowanych na stronie 119 rozprawy. Niektóre z nich, w pełni są uprawnione, w świetle zaprezentowanych wyników. I tak w pełni zgadzam się z wnioskami dotyczącymi: (1) zgodności struktur AD-O57.4, TRAIL114 i TRAIL95 ze strukturami opisanymi wcześniej na podstawie badań krystalograficznych, (2) warunków optymalnych dla stabilności badanych białek, (3) wyższej podatności AD-O57.5 na proteolizę (4) oraz wpływu EDTA na strukturę oraz stabilność, określaną przez temperaturę topnienia. Natomiast wniosek dotyczący struktury czwartorzędowej AD-O57.5 wydaje się być wnioskiem powstałym bez przedstawienia wiarygodnych dowodów eksperymentalnych. Doktorantka

formuluje go w sposób następujący: *Białko występuje w postaci dimerycznej, utrzymywanej przez wiązania disiarczkowe pomiędzy podjednostkami. Takie kowalencyjne związane dimery mogą asocjować z trzecią podjednostką, tworząc trimer. Struktura monomeru jest zasadniczo zgodna z oczekiwaną.* Twierdzenie odnośnie postaci dimerycznej doktorantka wywodzi z eksperymentu filtracji żelowej, który został użyty dla wyznaczenia masy cząsteczkowej badanych białek. Na stronie 60 czytamy: *Wyznaczone masy były zbliżone do całkowitych wielokrotności mas teoretycznych. Formę trimeryczną zaobserwowano dla wszystkich białek z wyjątkiem AD-O57.5 – dla niego obserwowana masa odpowiadała formie dimerycznej.* Trudno ocenić na ile znaczące są obserwowane różnice wartości mas cząsteczkowych, gdyż w Tabeli 4.8 brak jest informacji o wielkości błędów pomiaru – zakładam, że dane nie pochodzą z eksperymentu wykonanego jeden raz (!). Ponadto, z uwagi na dokładność pomiaru oraz na fakt, iż białka w tej metodzie są rozdzielane ze względu na różnice w promieniu hydrodynamicznym a nie w masie cząsteczkowej, sączenie molekularne nie jest metodą, która powinna być używana do ustalania masy cząsteczkowej, szczególnie dla białek, o nietrywialnej strukturze, jaką wydaje się mieć AD-O57.5. Niewykluczone, że właściwsze dla rozwiązywania tego rodzaju problemów metody, jak na przykład ultrawirowanie analityczne czy MALS (ang. *multiangle light scattering*), wykazałyby, że AD-O57.5 istnieje w formie trimery – co sugerują testy cytotoxycywności wykonane przez Adamed. Twierdzenie o *utrzymywaniu struktury dimerycznej przez wiązania disiarczkowe pomiędzy podjednostkami* zostało sformułowane na podstawie rozdziału SDS-PAGE w warunkach denaturujących w obecności różnych stężeń reduktora. Jak pisze doktorantka na stronie 61 *Dla białka AD-O57.5 w nieobecności DTT można było zaobserwować prążki odpowiadające białkom o masach nieznacznie wyższych niż 40kDa (zgodnej z masą dimeru) oraz około 100 kDa (mogący pochodzić od agregatu białkowego). W obecności 5mM DTT, niewielka część białka ADO57.5 wstępowała także w formie dimerycznej. W obecności 50 mM DTT widoczna była tylko forma monomeryczna tego białka.* I w tym przypadku doktorantka wyciąga daleko idące wnioski, interpretując fakty w sposób nieco uproszczony. Po pierwsze - jak należy tłumaczyć obecność dwóch prążków w nieobecności DTT, w dla białka które tworzy homodimery? Po drugie – sączenie molekularne było wykonywane w buforze B zawierającym 5 mM DTT; warto zauważyć, że odczynnik ten był obecny we wszystkich innych buforach używanych w rozprawie. Tymczasem, jak twierdzi doktorantka, takie 5 mM stężenie DTT powinno skutkować redukcją mostków. Oczywiście warunki redukcji mostków w próbkach przygotowywanych do SDS-PAGE (obecność denaturanta) różnią się od tych w jakich prowadzono sączenie molekularne. Jednak jeśli przyjąć taki punkt widzenia, to obserwacje poczynione w trakcie analiz SDS-PAGE nie powinny być stosowane do interpretacji danych powstałych w trakcie eksperymentu sączenia molekularnego. Mogą one być co najwyżej inspiracją do eksperymentu, którego celem byłoby wyznaczenie ilości grup tiolowych/mostków disiarczkowych w AD-O57.5 w warunkach, w jakich szacowana była masa cząsteczkowa.

Dyskusja

Dyskusja stanowi znaczącą część rozprawy Pani Małgozaty FIGIEL. Zwraca uwagę dążność autorki do systematycznego przedyskutowania, na te dostępne dane literaturowe, różnych aspektów otrzymanych wyników. Doceniam zdolność do ich pogłębionej, mającej na względzie szereg aspektów poczynionych przez doktorantkę, oraz innych badaczy, obserwacji. I tak na przykład na stronie 103 dyskutowany jest problem współwystępowania AD-O57.5 w formie dimerycznej, na co zdaniem doktorantki wskazują wyniki sączenia molekularnego, oraz trimerycznej na co wskazują wyniki testu cytotoxyczności a także analizy spektroskopowe przedstawione w rozprawie.

Inne bardziej szczegółowe uwagi dotyczące pracy:

- str. 6, w *Wykazie częściej stosowanych skrótów* podany jest skrót NATA – skrót ten nie odnosi się do N-aminotryptofanamidu (jak zdefiniowane jest to na str. 6 i ponownie na str. 23), ale do N-acetylotryptofanamidu, co doktorantka prawidłowo podaje na stronie 52.
- str. 8, podpis pod Rysunkiem 1.1, *Poszczególne podjednostki trimery oznaczono różnymi kolorami*; chyba chodzi tu o kolory?
- str. 22, podpis pod Rysunkiem 1.6, *Widma absorpcji i emisji aminokwasów aromatycznych*; raczej powinno być *Widma absorpcyjne i emisyjne aminokwasów aromatycznych*.
- str. 37, (rozdz. 3.2.2), *masy poszczególnych białek wyznaczano*; w rozprawie doktorantka wielokrotnie używa pojęcia *masa białka*, mając na myśli jego masę cząsteczkową.
- str. 38, *Pomiary widm dichroizmu kołowego*; w podrozdziale przedstawiono szczegóły dotyczące rejestracji widm CD – brak jednak informacji o stężeniu białek; informacji tej nie znalazłem w innych miejscach rozprawy (np. w podpisach pod rysunkami przedstawiającymi widma w bliskim i dalekim nadfiolecie) chociaż wartości stężeń musiały być znane, gdyż widma CD są przedstawiane jako zależność eliptyczności molowej resztowej od długości fali; ciekaw jestem jak określane stężenie białek w warunkach, w których białka precypitowały, lub „znikały” po naniesieniu na kolumnę do sączenia molekularnego (a więc najprawdopodobniej precypitowały).
- str. 39; *Bufor reformulacyjny stanowił referencję*; czy raczej nie powinno się używać terminu *odnośnik*?
- str. 53; *Dla wygaszania fluorescencji NATA wszystkimi trzema wygaszaczami oraz dla wygaszania fluorescencji białka akrylamidem....* tekst sugeruje, że w trakcie badań użyte były cztery wygaszacze, tymczasem na stronie 52 czytamy: *Zastosowano trzy wygaszacze: hydrofilowy, ale elektrycznie obojętny akrylamid; anion jodkowy; kation cezu.*
- str. 53; *W kilku przypadkach uzyskano dobre dopasowanie: dla wygaszania w warunkach denaturujących wygaszaczami jonowymi oraz dla wygaszania cezem we wszystkich analizowanych warunkach; cezem???*
- str. 59, 60, 61; W Rozdziale 4.1.3, omawiane są analizy sączenia molekularnego, których celem było określenie struktury czwartorzędowej. Prezentacja wyników – jak wydaje się bardzo ważnych dla opisu struktury

czwartorzędowej analizowanych białek a szczególnie, dla wysunięcia wniosku, iż AD-O57.5 jest dimerem – pozostawia wiele do życzenia;

- (1) *Rozdziaty chromatograficzne prowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w punkcie 3.10 w buforze B, w którym znajdowały się białka w preparatach dostarczonych do badań; jest to standardowy bufor formulacyjny stosowany w dziale badawczo-rozwojowym firmy Adamed; zgodnie z opisami buforu B (str. 34) i buforu, w którym znajdowały się białka dostarczane do badań (str. 33) składy buforów różnią się - bufor B zawierał 10 μM ZnCl_2 a bufor formulacyjny 0,1 mM ZnCl_2 (t.j. 100 μM), bufor B zawierał 5 mM DTT a bufor formulacyjny 5 mM glutation; pozostałe składniki buforów były takie same, jednak z całą pewnością bufor B nie był standardowym buforem formulacyjnym stosowanym w dziale badawczo-rozwojowym firmy Adamed, przynajmniej tak sugeruje podany skład obu buforów.*
 - (2) W Rozdziale 4.1.3 doktorantka przedstawia Tabelę 4. 7, w której zamieszczone są dane uzyskane w wyniku sączenia molekularnego białek wzorcowych, użytych do kalibracji kolumny; prosta sporządzona na ich podstawie przedstawiona została na Rysunku 4.10; ku mojemu zaskoczeniu ani w Tabeli 4.7 ani też na Rysunku 4.10 nie zostały zamieszczone dane pomiarowe otrzymane dla badanych białek !? Co więcej w pracy nie pokazano chromatogramów dla nich otrzymanych! Można jedynie przeczytać, że: *Na podstawie chromatogramów uzyskanych dla badanych białek w buforze B, posługując się uzyskaną kalibracją, wyliczono masy cząsteczkowe białek (tabela 4.8). Dla każdego białka zaobserwowano pojedynczy pik, z czego wynika że w roztworze dominowała jedna forma białka.*
- str. 62; *Analizując przyrost produktu w czasie, wyznaczono wartości początkowej szybkości trawienia, V_0 (tabela 4.9); w Tabeli zamieszczono nie tylko wartości V_0 , ale też wartości parametrów dopasowania – nie znalazłem jednak w pracy informacji do jakiego równania.*
 - str. 83; *W pH 4,0 obserwowane piki odpowiadały białkom o bardzo dużej masie cząsteczkowej (...). Dla białka AD-O57.5 i dla AD-O57.4 w nieobecności osmolitów nie zaobserwowano żadnego pików po nałożeniu próbki na kolumnę. Doktorantka, i tym razem, nie przedstawia stosownych chromatogramów i poprzestaje na przedstawieniu wartości mas cząsteczkowych w formie tabelarycznej. Być może, z tego powodu nie zauważyła, że w stosownej tabeli (Tabela 4.19) dla białka AD-O57.4 podana jest wartość pozornej masy cząsteczkowej wyznaczonej w nieobecności osmolitu (a więc pik jednak obserwowano ?!), natomiast brak jest danych dla obu wymienionych białek analizowanych w obecności osmolitów.*
 - str. 85; Rysunek 4.21; błędny opis widm CD - widma AD-O57.5 i AD-O57.4 zostały opisane jako widma uzyskane dla AD-O57.4.
 - str. 86; brak informacji w tytule Tabeli 4.20 o tym, że widma zostały zarejestrowane w obecności EDTA; w innych Tabelach podawane są warunki w jakich rejestrowano widma.

- str. 104; *Przeprowadzono bardziej dogłębną analizę zmian struktury białek w skrajnych wartościach pH: 4,0 i 10,5. W pH 4,0 zaobserwowano globalną zmianę struktury w kierunku stopionej globuli: zwiększenie promienia hydrodynamicznego* Ten wniosek jest bardzo dyskusyjny – zwiększenie promienia hydrodynamicznego, bez wykazania, że jest ono spowodowane zmianą właściwości hydrodynamicznych cząsteczek białka wynikającą ze zmiany struktury cząsteczek a nie ich agregacji, nie jest dowodem na zmianę struktury w kierunku stopionej globuli. W pracy brak jest dowodów eksperymentalnych pozwalających rozstrzygnąć jaka jest przyczyna obserwowanego zwiększenia promienia hydrodynamicznego.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną, zakres i jakość przeprowadzonych badań, rozprawę Pani Małgorzaty FIGIEL oceniam pozytywnie. Uważam, że jako całość badania te pozwoliły na skuteczne i oryginalne rozwiązanie problemu badawczego sformułowanego w celu rozprawy. W związku z powyższym, pomimo krytycznych uwag, jakie przedstawiłem powyżej, stwierdzam, że rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Zatem wnoszę do Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

