



Wrocław, 25 stycznia 2016 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Figiel zatytułowanej:

„Analiza struktury i stabilności wariantów białka TRAIL
o podwyższonej aktywności cytotoksycznej”

Opracowywanie nowych białek terapeutycznych jest fascynującym obszarem badawczym współczesnej biotechnologii. Poznanie ogromnej liczby sekwencji białek, określenie dla wielu z nich struktur przestrzennych, zoptymalizowanie warunków ich produkcji oraz kompletowanie coraz pełniejszej wiedzy na temat ścieżek sygnalizacyjnych są zasadniczymi przyczynami eksplozji badań nad wprowadzaniem nowych leków białkowych. Oprócz oczywistych badań biologicznych, przedklinicznych i klinicznych, istnieje również potrzeba charakterystyki fizykochemicznej takich biocząsteczek.

Praca doktorska mgr Małgorzaty Figiel poświęcona jest analizie kilku wariantów kandydata na białko terapeutyczne poprzez zastosowanie metod spektroskopowych, które posłużyły do poznania różnic w konformacji i stabilności badanych białek, w zależności od szeregu czynników, jak pH, siła jonowa, obecność chelatora czy osmolitu. Doktorat zostały zrealizowany w świetnym laboratorium Pani Profesor Marty Dziedzickiej-Wasylewskiej, które specjalizuje się w badaniu białek metodami chemii biofizycznej. Na wyniki uzyskane w doktoracie istotny wpływ miała współpraca z firmą Adamed, która dostarczyła próbki białek. Sam temat pracy i zakres przeprowadzonych badań jest rzadkim przykładem tak szeroko przeprowadzonej charakterystyki białka, które jest kandydatem na bioterapeutyk.

Przedmiotem przeprowadzonych badań są cztery warianty białka TRAIL [informacja podana na str. 17, że były to dwa warianty jest nieprawidłowa. Podobnie nieprawdziwe jest stwierdzenie, że są one opisane w rozdziale 1.1.5]. Cztery warianty białka TRAIL przedstawione są dopiero na początku rozdziału *Wyniki*. Samo białko TRAIL zostało przedstawione na początku *Wstępu* jako cytokina występująca w szeregu komórek krwi, która selektywnie i na drodze niezależnej od p53, indukuje apoptozę komórek nowotworowych oraz posiada aktywności antywirusowe i przeciwwzapalne w procesach autoimmunologicznych. Wszystkie niezbędne dane o tym białku, w tym struktura, oddziaływanie z receptorami, ścieżki przekazywania sygnału przedstawione są kompetentnie. Doktorantka omawia też dotychczas badane warianty białka TRAIL pod kątem

zastosowań terapeutycznych. Dużą część *Wstępu* stanowi wnikliwy opis technik badawczych stosowanych w doktoracie wraz z ich podstawami teoretycznymi. Są to zasadniczo dichroizm kołowy oraz spektroskopia fluorescencyjna, ta ostatnia stosowana jest także w zaawansowanych metodach pomiaru czasów życia i wygaszania fluorescencji. Szczegółowe opisy technik pomiarowych przedstawione są wyczerpująco w rozdziale *Metody*.

Przeprowadzone badania są bardzo obszerne i dotyczą czterech wariantów białka TRAIL: dwa to białka TRAIL114 i TRAIL95 (formy rozpoczynające się odpowiednio od reszty 114 lub 95); pozostałe dwa to białka fuzyjne (AD-057.4 i AD-057.5) zawierające na końcu N domenę BH3 białka Bid. W obu wariantach fuzyjnych po sekwencji BH3 następuje sekwencja oktaargininowa i miejsca cięcia dla urokinazy i metaloproteazy 9. W białku AD-057.5 dodatkowo występuje sekwencja CAAACAACGSG mająca stabilizować formę trimeryczną białka. Z bardzo licznych wyników uzyskanych w doktoracie odnoszę się do tych, które uważam za najciekawsze lub wymagające komentarza.

Wszystkie cztery warianty białka TRAIL badano metodami widm CD w dalekim i bliskim ultrafiolecie, dochodząc do wniosku, że metoda ta daje, podobne do obserwowanych w strukturach krystalicznych, wkłady struktur drugorzędowych. Podobnie zgodne ze strukturą krystaliczną są pomiary widm fluorescencyjnych, świadczące o obecności w rdzeniu cząsteczki przynajmniej jednej lub dwóch reszt Trp.

Profile elucji sączenia molekularnego wskazują, że trzy warianty występują w formie trimery, zaś białko AD-057.5 tworzy dimer stabilizowany mostkami disiarczkowymi. Doktorantka postuluje, że ta forma może jednak współistnieć z trimerym, na co wskazuje stwierdzona aktywność biologiczna tego wariantu oraz charakterystyczne widmo fluorescencyjne i wrażliwość na obecność EDTA. Ważną właściwością wariantu AD-057.5 jest pokazana przez doktorantkę zdolność do wielokrotnie szybszej proteolizy przez MMP-9 niż w przypadku wariantu AD-057.4, co może wynikać z większej dostępności sekwencji dla cięcia proteolitycznego, spowodowanej obecnością dodatkowej sekwencji. Jest to jeden z najciekawszych wyników doktoratu, gdyż wariant ten wykazuje wyższą cytotoxycyzość.

Istotną częścią doktoratu są badania dotyczące optymalnej formulacji. Doktorantka już we *Wstępie* wykazała się dogłębną wiedzą na temat działania osmolitów na białka, cytując liczne trudne prace

zespołu Timasheffa, co w obecnych czasach jest rzadkością wśród doktorantów. Stosując pomiary widm fluorescencyjnych i czasów życia oraz widm CD w bliskim i dalekim UV, a także denaturacji chemicznej i termicznej, autorka ustaliła, że białka są najbardziej stabilne w pH od 7 do 8, zaś w niskim pH przechodzą w stan stopionej globuły. Obecność 10% glicerolu i 80 mM sacharozy stabilizuje warianty w skrajnych wartościach pH. Stabilizujący efekt uzyskiwano również w wysokich stężeniach soli, np. w 1 M siarczanie amonu.

Inna seria badań doktorantki dotyczyła wpływu chelatora na strukturę czterech badanych wariantów. W strukturze krystalicznej białka TRAIL obecny jest jon cynku zlokalizowany pomiędzy podjednostkami i koordynowany przez trzy reszty cysteinowe, po jednej z każdej podjednostki. Eksperymenty sączenia molekularnego, pomiary fluorescencji i CD wskazują na zmiany strukturalne oraz obniżenie stabilności spowodowane obecnością EDTA. Zachowanie wariantów w obecności chelatora zależy od obecności osmolitów. Niestety, dla trzech wariantów (TRAIL95, AD-057.4 i AD-057.5) badania były utrudnione ze względu na tendencję do tworzenia agregatów.

Doktorantka określiła także stabilność czterech wariantów stosując denaturację chemiczną monitorowaną zmianami fluorescencji. Są to unikatowe pomiary, gdyż dotąd białka z rodziny TNF nie były badane pod kątem wyznaczania stabilności termodynamicznej. Wartości ΔG_{den} są niskie przy stosunkowo wysokich temperaturach denaturacji w granicach 70° C. Co ciekawe, wyniki pomiarów denaturacji termicznej (wyrażone jako T_{den}) są słabo skorelowane z wartościami ΔG_{den} uzyskanymi z pomiarów denaturacji chemicznej.

Praca jest starannie napisana i estetycznie zilustrowana. Liczba błędów interpunkcyjnych czy tzw. literówek jest mała. Rozdział *Dyskusja* napisany jest wnikliwie i nie stanowi powielenia treści zawartych we wcześniejszych rozdziałach.

Moje uwagi:

1. Doktorantka widzi możliwość występowania stanu pośredniego dla procesu denaturacji białka AD-057.5 (Rysunek 4.27 F). Wykresy krzywych denaturacji chemicznej dla wariantu TRAIL114 (Rysunek 4.25 C do F) również wyraźnie wskazują na przejście dwufazowe. Proszę o komentarz.

2. Podenaturacyjne zmiany fluorescencji mają w niektórych przypadkach (np. rys. 4.13) charakter nieliniowy. Jak w związku z tym doktorantka wyznaczała temperaturę denaturacji?
3. Doktorantka sugeruje w *Wynikach*, że odmienne widmo CD w bliskim UV zaobserwowane dla wariantu AD-057.5 może wynikać z utworzenia dodatkowych mostków disiarczkowych. Taką ewentualność można było potwierdzić mierząc stężenie grup -SH odczynnikiem Ellmana. Czy taki eksperyment został wykonany?
4. Czy procesy denaturacji chemicznej i termicznej miały charakter odwracalny i czy badano ich przebieg w zależności od czasu preinkubacji białka w obecności denaturanta lub szybkości zmian temperatury?

Mniej istotne uwagi do doktoratu:

1. Stosowane wielokrotnie stwierdzenie „wyznaczenie entalpii swobodnych natywnych konformacji białek” jest niepoprawne. W doktoracie mierzone są *różnice* entalpii swobodnych stanu natywnego i zdenaturowanego.
2. Co oznacza szybkość skanowania 1% (tabela 3.7)?
3. W *Dyskusji* w szeregu przypadkach brak odniesienia do tabel lub rysunków z rozdziału *Wyniki*.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Figiel z tytułowanej: „Analiza struktury i stabilności wariantów białka TRAIL o podwyższonej aktywności cytotoksycznej” jest wysoce pozytywna a rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego mgr Małgorzaty Figiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jacek Otlewski