

2019 -02- 12 MB.ulk.

Warszawa, dn. 12.02.2019

Prof. dr hab. Ryszard Stolarski
UNIwersytet Warszawski
Wydział Fizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Zakład Biofizyki
ul. Pasteura 5
02-093 Warszawa

Tel. 22 55 32 303

E-mail: Ryszard.Stolarski@fuw.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Małgorzaty Narczyk:
„Biofizyczne podstawy działania fosforylaz nukleozydów purynowych z *E. coli* - mechanizm katalizy, związek między funkcją białka a jego strukturą oligomeryczną”**

Konstruowanie molekularnych mechanizmów wiązania ligandów przez cząsteczki białka i katalizy enzymatycznej oraz projektowanie na tej podstawie środków chemioterapeutycznych stanowi jedno z kluczowych zagadnień współczesnej biofizyki molekularnej, polegające na wyjaśnianiu przebiegu procesów biologicznych na podstawie strukturalno-dynamicznych analiz białek, które są zaangażowane w te procesy. Punktem wyjścia badań o charakterze podstawowym jest znajomość funkcjonalnej, natywnej struktury przestrzennej białka i jego kompleksów z ligandami. Dane strukturalne wraz z wyznaczonymi parametrami wiązania ligandów i kinetyki katalizy umożliwiają opracowywanie molekularnych mechanizmów działania enzymów, a silne inhibitory projektowane w oparciu o strukturę centrum aktywnego i znajomość mechanizmu katalizy uzyskują potencjalne wykorzystanie praktyczne w medycynie.

Rozprawa doktorska mgr Marty Narczyk, wykonana w Zakładzie Biofizyki IFD na Wydziale Fizyki UW dotyczy molekularnych podstaw katalizy reakcji hydrolizy wiązania glikozydowego przy udziale fosforanu nieorganicznego (i reakcji odwrotnej) przez złożony z sześciu podjednostek

(heksameryczny) enzym bakteryjny, fosforylaze nukleozydów purynowych PNP (*purine nucleoside phosphorylase*). Badania strukturalne szerokiej klasy białek PNP, zarówno heksamerycznych jak i trimerycznych (z organizmów eukariotycznych) z wykorzystaniem szeregu metod biofizycznych, m. in. dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego, spektroskopowych metod wyznaczania kinetyki reakcji katalizowanej przez PNP i ukierunkowane na chemioterapię poszukiwanie efektywnych inhibitorów o potencjalnym działaniu chemioterapeutycznym, są od wielu lat prowadzone w zespole kierowanym przez prof. Marię Agnieszkę Bzowską, promotora rozprawy. W ostatnim okresie duże znaczenie uzyskały badania z wykorzystaniem różnic specyficzności substratowej enzymów PNP i odpowiednio zaprojektowanych mutantów pod kątem zastosowań w terapii genowej niektórych rodzajów nowotworów, m. in. czerniaka złośliwego. Rozprawa doktorska mgr Marty Narczyk jest oparta na podstawie siedmiu prac opublikowanych w latach 2011–2018 w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, w których doktorantka jest współautorem. Prace powstały we współpracy z ośrodkami w Chorwacji: Instytutem Ruđera Boškovića (Zagrzeb) i Wydziałem Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu w Zagrzebiu.

Podstawowe aspekty dotychczas opublikowanych w literaturze wyników badań heksamerycznej fosforylasy nukleozydów purynowych z bakterii, jak i (porównawczo) enzymów ze źródeł ssaczych o strukturze czwartorzędowej trimery, są wyczerpująco przedstawione we wstępnym rozdziale pracy doktorskiej (Wstęp) i stanowią uzasadnienie jasno i logicznie sformułowanego celu pracy badawczej podjętej przez doktorantkę, krótko scharakteryzowanego w następnym rozdziale (Cel pracy). Mgr Marta Narczyk sformułowała dwa zasadnicze cele swoich badań. Pierwszy to weryfikacja modelu katalizy zaproponowanego w publikacji Koellner i wsp. *Journal of Molecular Biology* 315, 351-371, 2002 (praca powstała w grupie prof. Agnieszki Bzowskiej) i

wyjaśnienie związanego z tym modelem problemu kooperacji między sześcioma podjednostkami PNP. Drugi to analiza procesu przejścia między formą aktywną i nieaktywną białka enzymatycznego, z zaproponowaniem stanów przejściowych o zróżnicowanej aktywności enzymatycznej na drodze procesu dezaktywacji białka. Tak postawione cele badawcze wymagały przeprowadzenia dużej liczby eksperymentów dla kompleksów białko-ligand(y). Doktorantka wykonała pomiary dla białka PNP szczepu dzikiego (*wild type*) z *E. coli* i dla jego dziewięciu odpowiednio zaprojektowanych mutantów. Jako ligandy wykorzystała nukleozydy-substraty: inozyna, adenozyna, guanozyna, 7-metyloguanozyna i formycyna A jako inhibitor, oraz jony: fosforanowy i jego analog jon siarczanowy. Starannie opracowana część doświadczalna rozprawy chyba najpełniej oddaje wkład pracy doktorantki w bardzo dużą liczbę wykonanych eksperymentów biofizycznych i w interpretację uzyskanych wyników. Liczące w sumie 20 stron rozdziały „Metody badawcze” i „Metody analizy wyników” przedstawiają stosowane przez autorkę rozprawy techniki doświadczalne: spektrofotometryczne wyznaczanie parametrów kinetyki enzymatycznej (w tym dla mutantów o aktywnościach "śladowych") i profile stabilności termicznej enzymów oraz cztery rodzaje miareczkowań białka ligandami: kalorymetryczne, fluorescencyjne, miareczkowanie z wykorzystaniem dichroizmu kołowego (CD) i miareczkowanie przy użyciu termoforezy mikroskalowej (MST). Ta ostatnia z wymienionych technik miareczkowania dopiero w ostatnim czasie uzyskała szersze zastosowanie, m. in. ze względu na możliwości badania wiązania makromolekuła-ligand w warunkach zbliżonych do *in vivo*. Zwraca uwagę bardzo staranna analiza statystyczna wyników, w której autorka rozprawy zrezygnowała ze stosowanych często uproszczeń i przybliżeń (liniowych). W sposób ścisły rozpatrzyła modele kinetyki wiązania z jednym i z dwoma, kooperacyjnymi rodzajami miejsc aktywnych oraz trzy- i dwumiejscowy model wiązania ligandów. Wszystkie

parametry są wyznaczone z podaniem błędów pomiarowych, a dyskryminacja między modelami została oparta na równomierności rozkładu odchyleń rezydualnych (AOR) i statystycznym kryterium Akaike (AIC). W załącznikach zostały zamieszczone przykładowe wyniki tych analiz, ze szczegółowym określeniem jakości dopasowania krzywych modelowych do punktów pomiarowych. Całą pracę cechuje wysoka dbałość o właściwy dobór warunków eksperymentalnych i wykonywanie pomiarów kontrolnych.

Wyniki badań (rozdz. 5) są zaprezentowane w sposób wyczerpujący dla kolejno badanych obiektów i kończone wnioskami podsumowującymi. Złożona z sześciu podjednostek PNP okazała się trudnym obiektem badań ze względu na szereg czynników, które wymagały ustalenia już na wstępnym etapie badań.

(1) Jon fosforanowy jako substrat reakcji enzymatycznej wymagał przeprowadzenia drobiazgowych badań związanych z wyborem buforu(ów), tak aby ew. wchodzenie jonów buforu do centrum wiążącego białka nie zaburzało pomiaru parametrów kinetycznych reakcji i wiązania fosforanu (wartości i ilości stałych asocjacji). Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka wybrała (jako kompromis) bufor HEPES do pomiarów kinetycznych i bufor TRIS do badania wiązania ligandów, a w badaniach w warunkach stosowanych przy krystalizacjach dodatkowo bufor cytrynianowy.

(2) Brak tryptofanów jako fluoroforów wewnętrznych i relatywnie słaba w związku z tym fluorescencja PNP wymagało skonstruowania mutantu z tryptofanem w miejscu aktywnym (Y160W) do badania równocześnie miejsc wiążących w białku. Autorka rozprawy wykazała zasadniczą zgodność istotnych dla pomiarów właściwości mutantu Y160W i białka szczepu dzikiego.

(3) Niezbędne dla modelu wiązania i modelu kinetyki określenie kooperacji między podjednostkami PNP wymagało przeprowadzenia miareczkowań dla pięciu mutantów centrum aktywnego ze zmienionymi, kluczowymi aminokwasami: Arg24, Arg217, Asp204 oraz dla trzech mutantów powierzchni

oddziaływania między dimerami (3, 4 i 6 aminokwasów zmodyfikowanych), w celu destabilizacji tego oddziaływania.

(4) Na wymienione czynniki nałożył się problem dezaktywacji białka poprzez formy pośrednie i związany z tym efektem brak tożsamości frakcji białka aktywnego i frakcji białka wiążącego poszczególne ligandy.

Za najważniejsze osiągnięcie doktorantki uważam wszechstronną analizę funkcjonowania heksameru PNP, a w szczególności zaproponowanie powiązanych ze sobą modeli katalizy enzymatycznej i dezaktywacji białka wraz z określeniem poszczególnych form przejściowych (podsumowane graficznie na schematach nr 6 i 7) w odniesieniu do znanych struktur krystalograficznych. Kooperacja w tym ujęciu zachodzi pomiędzy wszystkimi podjednostkami w heksamerze *apo* (wiązanie fosforanu) oraz przy katalizie flip-flop w ramach poszczególnych dimerów, jednego w konformacji otwartej a drugiego w konformacji zamkniętej. Dynamiczny, jak sugeruje doktorantka, mechanizm przekazywania sygnału kooperacji między podjednostkami (szczególnie wewnątrz dimeru) wymaga dalszych badań. Warto zauważyć, że tego typu modele (dynamiczne) wykraczają poza porównywanie statycznych struktur krystalograficznych i są w związku z tym trudne do zweryfikowania.

Pracę cechuje duża staranność w opisie wyników, w formułowaniu wniosków i w ich uzasadnianiu. co odzwierciedla przejrzysty sposób prezentacji wyników, chyba najlepszy z możliwych dla tak znacznej ilości zgromadzonych danych doświadczalnych. Zauważone nieliczne, drobne błędy i niejasności nie mają wpływu na wartość merytoryczną rozprawy. Przytaczam je w kolejności pojawiania się w tekście.

(a) str. 13: stwierdzenie „Chociaż podobieństwo sekwencji tych białek (*tn. heksamerycznych PNP*) nie jest duże, podobieństwo struktur krystalograficznych jest wysokie” wydaje się nie do końca słuszne, ponieważ

białka o podobieństwie sekwencji 30%–40% mają typowo ponad 80% podobieństwa strukturalnego;

(b) str. 26: brak szczegółów dotyczących wyznaczania aktywności specyficznej PNP (metoda spektrofotometryczna ?);

(c) str. 73. i tabela 5.2.2: nie jest jasne, dlaczego metodą kalorymetryczną wykonano miareczkowanie (podano wyniki miareczkowania) formycyną A tylko kompleksu PNP-P_i, podczas gdy metodą MST wykonano również miareczkowanie formy *apo*.

Podsumowując, podjęta w pracy doktorskiej problematyka badawcza ma w wymiarze ogólnym istotne znaczenie dla rozwoju biofizycznych podstaw mechanizmów tworzenia kompleksów białko-ligand i metodyki ich badania, a jeśli chodzi o rezultaty szczegółowe wzbogaca wiedzę na temat funkcjonowania enzymów PNP i projektowania ich inhibitorów o potencjalnym znaczeniu medycznym. Szczegółowe cele rozprawy zostały zasadniczo zrealizowane, przyjmując formę jasno sformułowanych tez. Nieliczne, drobne niedociągnięcia nie wpływają na **bardzo dobrą ocenę** recenzowanej pracy. Rozprawa doktorska mgr Marty Narczyk spełnia zarówno ustawowe kryteria określone w art. 13 ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami) jak i wymogi zwyczajowe, powszechnie przyjęte w środowisku naukowym do oceny rozpraw doktorskich. **Wnioskuje o dopuszczenie mgr Marty Narczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

