

dr hab. Adam Jarmuła
Pracownia Bioinformatyki
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

Warszawa, 15 września 2023 r.

Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Łukasza Charzewskiego

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Charzewskiego na stopień doktora nauk fizycznych została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Bogdana Lesynga jako promotora oraz dr Krystiany Krzyśko jako promotora pomocniczego.

Rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Charzewskiego liczy w części zasadniczej wraz z literaturą 177 stron i jest podzielona na 9 głównych rozdziałów. Rozprawę rozpoczyna zwięźle ujęty Cel pracy, po czym następuje wstęp obejmujący 33 strony, będący wszechstronnym opisem właściwości i struktury białka metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9), które jest głównym bohaterem rozprawy. Kolejny rozdział, liczący 15 stron, to opis metod używanych w rozprawie. Zaś od strony 63 do strony 162 znajdują się Wyniki i dyskusja, rozdział traktujący o powstawaniu różnych modeli MMP-9, co wydaje się być kwintesencją rozprawy. Dalej znajduje się jeszcze 1-stronicowe Podsumowanie końcowe, 14 stronicowy spis Literatury oraz użyte w Rozprawie Protokoły metodyczne i Załączniki obejmujące wykresy z symulacji dynamiki molekularnej, wyniki dokowania oraz ważne kontakty występujące w wybranych kompleksach.

Białko MMP-9 posiada wiele interesujących właściwości, które promują jej znaczenie biologiczne. Jego aktywacja możliwa jest na drodze wielu szlaków metabolicznych. W szczególności, MMP-9 podlega aktywacji proteolitycznej – proces ten prowadzą inne białka z rodziny MMP, a także odrębne białka jak elastaza, kalikreina tkankowa, katepsyna, chymaza czy enzym trawienny trypsyna. Możliwa jest również tzw. autoaktywacja MMP-9, zachodząca pod wpływem białka NGAL oraz inne jeszcze aktywacje na drodze proteolitycznej. Innym rodzajem aktywacji MMP-9 o nieznaczonej procentowości występowania jest aktywacja nieproteolityczna stanowiąca wypadkową odchylenia propeptydu od domeny katalitycznej MMP-9, co umożliwia dostęp substratów. Innym rodzajem aktywacji nieproteolitycznej jest S-nitrozylacja cysteiny 99 zawartej w sekwencji przełącznika cysteinowego. Warto podkreślić, iż ten typ aktywacji występuje przede wszystkim w warunkach patofizjologicznych, np. w niedokrwieniu mózgu.

Innym przejawem aktywności MMP-9 jest aktywność enzymatyczna, której swoistość determinują takie cechy substratów jak: sekwencja, struktura przestrzenna oraz drugorzędowe miejsca wiązania odległe od miejsca aktywnego. Do ważnych substratów MMP-9 należą zdenaturowane włókna kolagenu typu I-V. Warto nadmienić, że za rozpoznawanie i wiązanie substratów przez MMP-9 jest odpowiedzialna ich domena fibronektynowa, natomiast procesy te nie zależą zupełnie od domeny hemopeksynowej oraz O-glikozylowanej (OG).

Wygaszanie MMP-9 jest ważną drogą regulowania aktywności tego białka, które z uwagi na udział w degradacji wielu białek strukturalnych musi podlegać takiej regulacji. Istotnymi inhibitorami MMP-9 są białka z rodziny TIMPs, a w szczególności TIMP-1.

Z tego krótkiego zestawienia jasno wynika, jak istotną rolę pełni w komórce białko MMP-9. Stąd potrzeba dokładnego rozpoznania różnych form strukturalnych MMP-9, czego mgr inż. Łukasz Charzewski spróbował dokonać w swojej pracy doktorskiej.

Przegląd metodyk zastosowanych w rozprawie daje wstępne wyobrażenie na temat biegłości metodycznej autora rozprawy. Wrażenie to potęguje się przy czytaniu części wynikowej, gdzie mgr inż. Charzewski zdaje się z łatwością posługiwać wieloma metodami takimi jak: mechanika molekularna, dynamika molekularna (DM) pełnoatomowa i gruboziarnista, dokowanie molekularne, dokowanie molekularne typu białko-białko oraz przeróżne metody analizy trajektorii DM, jak np. obliczanie energii swobodnej wiązania różnych domen MMP-9 lub ligandów do białka/jego domen w MMP-9.

Mgr inż. Łukasz Charzewski podał się zadania wymodelowania kilku różnych struktur MMP-9 i ich kompleksów zmieniających aktywność tego białka. Każdy model powstawał w wielu kolejnych postaciach, np. model monomerycznej MMP-9 z TIMP-1 został opracowany w postaci czterech coraz bardziej rozbudowanych kompleksów. Dwie pierwsze formy tego kompleksu to struktury fragmentaryczne, modele białka TIMP-1 bądź z domenami katalityczną i fibronektynową bądź z domeną hemopeksynową MMP-9. Trzeci model inkorporuje wszystkie wymienione domeny MMP-9. Wreszcie czwarty, najważniejszy model zawiera prócz trzech wspomnianych domen również kolejną domenę, OG, spajającą domeny katalityczną z hemopeksynową MMP-9, w kompleksie z TIMP-1.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej należą trzy modele MMP-9/jego kompleksów. Pierwszy model stanowi kompleks inhibicyjny pomiędzy MMP-9 i TIMP-1, którego etapy powstawania opisałem w poprzednim akapicie. Sukces tego modelowania polega m.in. na tym, że jest to, jak podkreśla doktorant, pierwszy opis kompletnego, złożonego układu inhibicyjnego w rodzinie białek MMPs. Ten wynik dostarcza wielu strukturalnych informacji na temat zaangażowania konkretnych

domen MMP-9 w oddziaływanie z TIMP-1 oraz wzajemnego oddziaływania domen w inaktywowanej przez TIMP-1 strukturze MMP-9.

Drugi model z serii kluczowych osiągnięć rozprawy doktorskiej to homotrimer proMMP-9. W tej strukturze białko MMP-9 występuje w formie latentnej, przez co nie może oddziaływać z TIMP-1 tak jak działo się to w przypadku monomeru MMP-9. Prawdopodobnie do takiego stanu rzeczy przyczyniają się specyficzne oddziaływania pomiędzy proMMP-9 i TIMP-1, które doktorantowi udało się zidentyfikować. Jednakże powinowactwo TIMP-1 do struktury homotrimerycznej proMMP-9 jest nawet większe niż dla monomeru MMP-9, co wynika z nowych oddziaływań wykrytych przez doktoranta pomiędzy TIMP-1 i propeptydem proMMP-9.

Trzeci model to struktura kompleksu MMP-9 z NGAL, której charakterystyka stanowi pierwszy dokładny opis tej formy MMP-9. Co ciekawe, funkcja pełniona przez kompleksy MMP-9-NGAL nie została dotąd zidentyfikowana. W związku z tym wyniki strukturalne dla tego kompleksu umożliwiają bardziej szczegółową analizę badań eksperymentalnych oraz zbliżają do poznania jego funkcjonalnego znaczenia.

Ciekawie brzmi rozdział poświęcony wynikom uzyskanym dzięki AlphaFold2. Doktorant opierał się na wynikach osiągniętych przez dr. Szymona Nowakowskiego, który wykonał predykcje modeli na podstawie plików FASTA. Spośród ogółu predykcji, jedynie struktury posiadające homologiczne kompleksy w bazie PDB, dały poprawne wyniki. Predykcje pozostałych modeli okazały się nieprzydatne w badaniach dotyczących MMP-9. Okazało się, że AlphaFold2 sprawdza się w modelowaniu stosunkowo prostych struktur, jak podjednostki opracowywanych kompleksów. Bardziej skomplikowane struktury nie zostały poprawnie przewidziane przez program. Wydaje się, że przyczyną tego niepowodzenia był brak układów o podobnych interfejsach, przez co nie znalazły się szablony do poprawnego wypracowania złożonych modeli. Przykładowo, model homotrimerycznego proMMP-9 zawierający fragmenty nieustrukturyzowane wymaga dla poprawnej konstrukcji uwzględnienia wiedzy biologicznej, z czego AlphaFold2 nie jest w stanie skorzystać. Nadto, struktury kompleksów potrzebujące modyfikacji w strukturach podjednostek, były przewidywane niepoprawnie. Reasumując, AlphaFold2 przegrywa rywalizację z metodami modelowania molekularnego w zakresie modelowania struktur MMP-9.

Generalnie, modele uzyskane w Rozprawie doktorskiej mogą pomóc w zrozumieniu mechanizmów kontroli aktywności MMP-9, które białko to realizuje poprzez tworzenie wielu różnych kompleksów. Autor rozprawy sugeruje że eksplorowanie aspektów strukturalnych wypracowanych modeli kompleksów może, z uwagi na ich podatność do dywersyfikowania aktywności enzymatycznej MMP-9, przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych oraz ksenobiotyków do użycia w schorzeniach odznaczających się podwyższoną aktywnością MMP-9.

Wśród słabszych stron rozprawy mogę wymienić serię błędów edytorskich, co jednak nie zmienia generalnie bardzo pozytywnego wydźwięku przedstawionej dysertacji. Rozumiem, że trudno jest całkowicie uniknąć błędów edytorskich, w związku z czym i wobec w innych aspektach bardzo zadowalającego poziomu rozprawy, nie będę ich tutaj wymieniał.

Reasumując, stwierdzam jednoznacznie że rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Charzewskiego jest napisana w sposób dojrzały i dowodzi biegłego opanowania szerokiego bioinformatycznego warsztatu badawczego przez doktoranta. Doktorant z wyczuciem dobiera metodykę do poszczególnych zadań i tłumaczy praktycznie każde podjęte w rozprawie działanie oraz jego konsekwencje, przez co uzyskane wyniki stają się bardziej dostępne dla czytelnika. Mgr inż. Łukasz Charzewski informuje, iż część wyników przedstawionych w Jego rozprawie doktorskiej (a konkretnie model inhibicyjny kompleksu MMP-9-TIMP-1 oraz model homotrimeru proMMP-9) została opublikowana w piśmie Scientific Reports, zaś wyniki dotyczące kompleksu MMP-9-NGAL są obecnie przygotowywane do publikacji. Ale jest to tylko fragment dotychczasowego dorobku doktoranta, który zawiera się w 9 solidnie opublikowanych artykułach (w tym 2 najnowszych z pierwszym autorstwem) oraz 13 wystąpieniach konferencyjnych (w tym w 3 wykładach i 10 posterach). Taki dorobek na obecnym poziomie kariery naukowej wydaje się być bardzo dobrym osiągnięciem. Doktorant spełnia w całej rozciągłości wymagania ustawowe (ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i zwyczajowe i w tej sytuacji wnoszę o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na bardzo wysoką jakość rozprawy doktorskiej i bardzo dobry dorobek naukowy mgr inż. Łukasza Charzewskiego wnoszę o wyróżnienie Jego rozprawy doktorskiej. Na szczególne uznanie zasługuje wymodelowanie inhibicyjnego kompleksu MMP-9 z TIMP-1 oraz kompleksu MMP-9 z NGAL. Te wyniki, wzbogacone o model homotrimerycznej postaci proMMP-9, mają znaczenie zarówno dla pełniejszego zrozumienia aktywności biologicznej MMP-9 oraz otwierają drogę do skutecznych terapii wygaszających rzeczoną aktywność.

Dr habilitowany
Adam Jarmuła

