

DZIEKANAT WYDZIAŁU FIZYKI

WPLYNĘŁO

2014 -11- 06

Warszawa, dn. 6.11.2014

Prof. dr hab. Ryszard Stolarski
UNIwersytet Warszawski
Wydział Fizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Zakład Biofizyki
ul. Żwirki i Wigury 93
02-89 Warszawa

Tel. 55 40772

Fax: 55 40771

E-mail: stolarsk@biogeo.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy habilitacyjnej p.t. „Znaczenie oligomeryzacji dla aktywności enzymatycznej trimerycznych fosforylaz nukleozydów purynowych - badania biofizyczne z wykorzystaniem klasy inhibitorów multisubstratowych”

oraz

całokształtu dorobku naukowego i dydaktycznego dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej

Koncentracja wysiłków badawczych na zagadnieniach fizycznych podstaw funkcjonowania białek enzymatycznych w procesach katalizy reakcji biochemicznych w komórce skutkuje wysoką i stale wzrastającą ilością publikacji w zakresie badań podstawowych oraz wykorzystania wyników tych badań w chemioterapii. Szybki rozwój nowych dziedzin biologii: genomiki, proteomiki, a zwłaszcza transkryptomiki, związanych z nowymi wyzwaniami badawczymi, prowadzi do uzyskiwania coraz szerszego zakresu informacji o enzymach i stawia do rozwiązania nowe problemy, dotyczące biologicznej roli i molekularnych mechanizmów funkcjonowania enzymów białkowych. Standardowo, punktem wyjścia są badania strukturalne kompleksów białek enzymatycznych z ligandami: substratami, inhibitorami i kofaktorami. Na podstawie wyników strukturalnych i wyników dodatkowych eksperymentów, przeprowadzonych w celu analizy aspektów dynamicznych i kinetycznych reakcji enzymatycznych, podejmowane są próby konstruowania molekularnych modeli funkcjonowania enzymów w żywej komórce oraz ich wykorzystania w racjonalnym projektowaniu środków terapeutycznych (*rational drug design*). Badania strukturalne z zastosowaniem dyfrakcji rentgenowskiej i/lub wielowymiarowego magnetycznego rezonansu jądrowego NMR oraz komputerowego projektowania molekularnego wymaga więc wspomaganie ze strony metod spektroskopowych i mikrokalorymetrycznych.

Dr Beata Wielgus-Kutrowska podejmuje w rozprawie habilitacyjnej kluczowe zagadnienia dla pełnej charakterystyki funkcjonowania trimerycznych fosforylaz nukleozydów purynowych PNP (*purine nucleoside phosphorylase*). **Zbiór dziewięciu prac stanowiących**

osiągnięcie naukowe jest zwarty tematycznie jeśli chodzi o obiekty badawcze, trimeryczne enzymy PNP z różnych organizmów i ich mutanty, oraz prezentuje wyniki uzyskane przy zastosowaniu bardzo **szerokiej klasy metod biofizycznych**: dyfrakcji rentgenowskiej, spektroskopii emisyjnej (fluorescencji) i absorpcyjnej o charakterze stacjonarnym i zatrzymanego przepływu (*stopped-flow*), dichroizmu kołowego, mikrokalorymetrii miareczkującej ITC (*isothermal titration calorimetry*) i skaningowej DSC (*differential scanning calorimetry*) oraz techniki ultrawiarowania analitycznego, przeżywającej aktualnie swój renesans. W zakresie większości wymienionych technik habilitanta sama wykonywała eksperymenty, a w niektórych (dyfrakcja rentgenowska) czynnie uczestniczyła w analizie wyników uzyskanych w ramach współpracy. Prace współautorstwa dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej prezentują oryginalne wyniki doświadczalne, opublikowanych w latach 2004 - 2014 w dobrych czasopismach z „listy filadelfijskiej” i liczą od dwóch do dwunastu współautorów, przy czym **w czterech publikacjach habilitantka jest pierwszym współautorem**. Oświadczenia pozostałych współautorów nie budzą wątpliwości, co do **decydującego lub znaczącego wkładu** dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej we wszystkich fazach badań eksperymentalnych, opracowywania wyników i powstawania manuskryptów, zgodnie z jej oszacowaniami udziału własnego. *Impact factor* czasopism wynosi od ok. 1,6 do 3,9. Zbiór publikacji stanowiących przedmiot rozprawy poprzedza 32-stronicowe wprowadzenie w języku polskim, zawierające charakterystykę podstawowych zagadnień i wyników zamieszczonych w pracach oryginalnych, na tle badań prowadzonych w innych ośrodkach (16 odnośników do literatury przedmiotu).

Tematykę badawczą rozprawy przedstawię w zarysie przez podanie najważniejszych wyników kolejnych publikacji składających się na osiągnięcie naukowe habilitantki. Chciałbym w tym miejscu wyraźnie podkreślić, że wszystkie publikacje przeszły procedury recenzowania poprzedzające druk w dobrych czasopismach, a więc wysoka wartość merytoryczna wyników nie podlega dyskusji. Dlatego nie będę wymieniał ani komentował szczegółowo wszystkich wyników zawartych w dziewięciu publikacjach, a jedynie (moim zdaniem) najistotniejsze, wraz z ewentualnymi uwagami krytycznymi, które dotyczą merytorycznych aspektów wyników lub sformułowań w ich przedstawianiu. Pierwsza publikacja (Bzowska i wsp. *J. Mol. Biol.* 342, 1015, 2004), słusznie uważana przez habilitantkę w autoreferacie za „punkt wyjścia dalszych badań” fosforylaz nukleozydów purynowych o trimerycznej strukturze czwartorzędowej, prezentuje struktury krystalograficzne kompleksu PNP ze śledziony cielej z multisubstratowym inhibitorem (S)-

PMPDAP w warunkach obecności i braku fosforanu. Uzyskanie kryształu z pełną strukturą trimery (pary trimerów) w jednostce asymetrycznej pozwoliło na bardziej gruntowną analizę struktury przestrzennej enzymów trimerycznych w kontekście potencjalnych, chociaż nie zaobserwowanych w PNP ze śledziona cielej, różnic w konformacji poszczególnych podjednostek. Z kolei stosunkowo niewielkie różnice struktur kompleksów uzyskanych w obecności i nieobecności fosforanu pokazały „prawdziwie” multisubstratowy charakter inhibitora (S)-PMPDAP, którego grupa fosforanowa okupuje miejsce wiązania reszty fosforanowej w PNP. Kluczowe znaczenie dla mechanizmu wiązania (i reakcji) ma również stwierdzona konieczność protonacji pozycji N(1) w nukleozydach wiązanych przez enzym. Zarzut krytyczny dotyczy braku dyskusji różnicy o czynnik 10 wartości stałych dysocjacji K_d wyznaczanych metodami miareczkowania fluorescencyjnego ($K_d \sim 0,3 \mu\text{M}$) i miareczkowania kalorymetrycznego ITC ($K_d \sim 4 \mu\text{M}$). Wprawdzie kluczowym parametrem do porównania z wynikami dyfrakcji rentgenowskiej była stechiometria składników kompleksu, a jej wartość wynosi 3:1 na podstawie obu metod, to jednak tak wyraźne różnice wiązania ligandu wymagały komentarza. Dwie kolejne prace (Biochim. Biophys. Acta 1764, 887, 2006 i Biophys. Chem. 125, 260, 2007) w których habilitantka jest pierwszym współautorem z dominującym udziałem, gromadzą wyniki badań spektroskopowych procesu fosforolizy i syntezy naturalnych nukleozydów przez trimeryczny enzym PNP z bakterii *Cellulomonas*, wpływu na fosforolizę inhibitorów multisubstratowych (S)-HPMP-6-Gua, PME-6-thioGua i PME-8-aza-DAP (Biochim. Biophys. Acta 1764, 887, 2006) oraz powinowactwa tych inhibitorów do enzymu (Biochim. Biophys. Acta 1764, 887, 2006 i Biophys. Chem. 125, 260, 2007). Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie techniki zatrzymanego przepływu (*stopped-flow*) w drugiej z wymienionych prac do precyzyjnej analizy kinetyki reakcji z wykazaniem jednoetapowego charakteru wiązania PME-6-thioGua. Z trzech konkurencyjnych modeli zaproponowanych w literaturze przedmiotu, wyniki badań habilitantki pozwalają na wyraźne poparcie dla struktury substratu w stanie przejściowym w centrum aktywnym PNP, postulowanego w zespole prof. M. A. Bzowskiej (Tebbe i wsp. J. Mol. Biol. 294, 1239, 1999.). Ponadto, został zaproponowany całościowy molekularny schemat przebiegu katalizy (Scheme 2 w publikacji w Biochim. Biophys. Acta). Ponieważ schemat reakcji uzyskiwany na podstawie analizy wiązania inhibitorów przez enzym jest zawsze obarczony pewną dozą niepewności, wydaje się, że ograniczenie badań jedynie do inhibitorów multisubstratowych z pominięciem inhibitorów stanu przejściowego jest pewnym mankamentem prac. Szczególnie wobec postulowanej przez inne zespoły kooperacji negatywnej między podjednostkami. To

niedociągnięcie zostało „naprawione” w krystalograficznej pracy (Chojnowski i wsp. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 703, 2010) kompleksu rekombinowanego PNP ze śledziona cielej z inhibitorem DFPP-DG, o cechach zarówno multisubstratowych jak i stanu przejściowego. Wyniki krystalograficzne pokazały związanie trzech cząsteczek inhibitora, czyli przez każdą z podjednostek cząsteczki enzymu, zgodnie z wynikami miareczkowania fluorymetrycznego. Warto podkreślić, że wykonanie badań było możliwe dzięki opracowaniu procedury uzyskiwania białka rekombinowanego, gdy ze sprzedaży wycofano enzym izolowany ze śledziona. Otrzymanie enzymu rekombinowanego i wykazanie jego identycznych własności z handlowym enzymem izolowanym zostało opisane w pracy współautorstwa dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej (Breer i wsp. Protein Expr. Purif. 61, 122, 2008). Inhibitor DFPP-DG został szerzej wykorzystany w badaniach inhibicji rekombinowanego PNP ze śledziona cielej metodami spektroskopowymi miareczkowania fluorescencyjnego i kinetyki zatrzymanego przepływu z detekcją fluorescencyjną (Breer i wsp. FEBS J. 277, 1747, 2010). Dwuetapowy mechanizm wiązania DFPP-DG przez PNP, podobnie jak inhibitorów immucylinowych (nie znalazłem stosownego odnośnika w publikacji w FEBS J.) jest odmienny niż w przypadku PME-6-thioGua. Wydaje się, że ta różnica między inhibitorami o cechach multisubstratowych i cechach stanu przejściowego mogłaby być szerzej potraktowana w dyskusji i ew. eksperymentach *stopped-flow* wykonanych dla tego samego enzymu (enzymów). Miareczkowanie ITC rekombinowanego enzymu ze śledziona inhibitorem DFPP-DG wykazało nietypowy przebieg sygnałów efektów cieplnych, najpierw endo- a następnie egzotermiczny (Breer i wsp. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 1203, 2010), w przeciwieństwie do PNP izolowanego ze śledziona. Ta i następna publikacja, w której habilitantka jest pierwszym współautorem (Bioorg. Med. Chem. 20, 6758, 2012) dotyczą analizy i wyjaśnienia zaobserwowanego efektu. Pokazanie, że w wyniku ekspresji białka w bakteriach część miejsc wiązających zostaje zajęta przez naturalnie występującą w *E. coli* hipoksantynę (produkt fosforolizy) doprowadziło do wykazania braku postulowanego wcześniej przez grupę prof. Schramma efektu kooperacji miejsc wiązających „*third-of-the-sites-binding*”. Ostatnia praca rozprawy, Wielgus-Kutrowska i wsp. Arch. Biochem. Biophys. 549, 40, 2014, jest poświęcona wyjaśnieniu wpływu trimerycznej struktury czwartorzędowej na funkcjonowanie PNP, w świetle obserwacji, że każda podjednostka wiąże ligand niezależnie. Badania rekombinowanego, cielej PNP *wild type* i dwóch mutantów, głównie z wykorzystaniem ultrawiorowania analitycznego, pokazały stabilizację białka w strukturze trimeru, która przeciwdziała tworzeniu nieaktywnych,

wysokocząsteczkowych agregatów. Nie do końca jest dla mnie jasne przedstawienie miareczkowań TLC na rysunkach w pracy Breer i wsp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1203, 2010 (Fig. 1), gdzie stosunek stechiometryczny ligand:enzym wynosi 1:1 (lub mniej), w porównaniu z Fig. 6 w pracy Bzowska i wsp. *J. Mol. Biol.* 342, 1015, 2004, w której ten stosunek wynosi 3:1. Czy w pracy z 2010 r. stosunek stechiometryczny jest liczony na jeden monomer enzymu?

Za najważniejsze osiągnięcia **całej rozprawy** (osiągnięcia naukowego) uważam:

(A) Wyjaśnienie znaczenia trimerycznej struktury czwartorzędowej w stabilizacji struktury natywnej jako niezbędnego warunku dla funkcjonowania enzymów PNP.

(B) Rozstrzygnięcie hipotezy silnej kooperacji negatywnej między podjednostkami PNP i wykazanie, że jest to artefakt polegający na związaniu ligandu w części centrów aktywnych podczas nadekspresji białka w systemie bakteryjnym.

Oba rezultaty wydają się mieć kluczowe znaczenie dla charakterystyki funkcjonowania białek PNP na poziomie molekularnym.

U podstaw znaczących wyników naukowych habilitantki leżą dwa czynniki o charakterze badawczo-organizacyjnych. Uczestnictwo w licznych projektach badawczych (w sumie 11 w latach 1993-2013), opartych na szerokiej współpracy krajowej i międzynarodowej zespołu badawczego, którego jest członkiem, kierowanego przez prof. Marię Agnieszkę Bzowską (Zakład Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego) oraz aktywność w organizowaniu warsztatu badawczego poprzez rozwój laboratoriów finansowanych z dwóch Projektów Operacyjnych Innowacyjna Gospodarka, POIG.02.01.00-14-122/09 i POIG 02.02.00-00-025/09. W ramach drugiego projektu zostało zorganizowane konsorcjum „Krajowe Laboratorium Multidyscyplinarne Nanomateriałów Funkcjonalnych - NanoFun” i zrealizowano zakup nowoczesnej ultrawirówki analitycznej do badań m. in. procesów zwijania i agregacji białek.

Poza dziewięcioma pracami ujętymi w rozprawie habilitacyjnej habilitantka jest współautorem dalszych dwudziestu czterech prac w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (lista filadelfijska), z których siedemnaście powstało po uzyskaniu doktoratu. Uczestnictwo w dwudziestu sześciu międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych z jednym referatem zaproszonym dobrze świadczy o aktywności naukowej dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej. **Ilość cytowań 224** (bez autocytowań) daje dobry **indeks Hirscha równy 9**. Dorobek naukowy habilitantki obejmuje dodatkowo dwa zagadnienia: bezpośrednio związany z omówionym osiągnięciem naukowym cykl publikacji poświęcony

analizie heksamerycznych enzymów PNP oraz całkowicie nowy problem związania (*folding de novo, refolding*) i agregacji białek z wykorzystaniem szeroko stosowanego w biofizyce i biologii modelowego białka GFP (*green fluorescence protein*). Nowa tematyka jest związane z 11-miesięcznym, podoktorskim stażem dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej w 2003 r. w laboratorium prof. Patrici Clark na Uniwersytecie Notre Dame, USA. Dalszy rozwój badań po powrocie ze stażu jest przede wszystkim związane z wykorzystaniem nowoczesnej ultrawirówka analitycznej w Zakładzie Biofizyki. Habilitantka uzyskała również fundusze z własnego projektu badawczego MNiSW, którym kierowała w latach 2008 - 2013. W porównaniu ze znaczącymi osiągnięciami w badaniach heksamerycznych enzymów PNP, wyniki badań GFP należy ocenić bardziej krytycznie. Poza pierwszą, dwuautorską pracą dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej i prof. Patrici Clark w 2004 r. w bardzo dobrym czasopiśmie *Biophysical Journal* z wyników uzyskanych podczas stażu zagranicznego, kontynuacja badań GFP po powrocie do Polski ciągle nie doczekała się bardziej spektakularnych osiągnięć. Efekt to tylko dwie niewielkie prace opublikowane w *Journal of Physics Condensed Matter* (2007) i w *Spectroscopy-International Journal* (2010) oraz jedna praca przyjęta do druku w *Biomedical Spectroscopy and Imaging* (2014). Jest to temat trudny, ale o dużym znaczeniu dla kluczowego w biofizyce molekularnej zagadnienia mechanizmu związania białek.

Dr Beata Wielgus-Kutrowska jest aktywnie zaangażowana w działalność dydaktyczną dla otwartego ostatnio na Wydziale Fizyki nowego kierunku „Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”, a konkretnie dwóch z pięciu specjalności tego kierunku: „Biofizyka molekularna” i „Projektowanie molekularne i bioinformatyka. Oprócz prowadzenia zajęć laboratoryjnych i wykładów, habilitantka czynnie współuczestniczyła w tworzeniu programów dydaktycznych obu specjalności i przygotowywaniu nowych zajęć, ćwiczeń na pracowniach i kursowego wykładu z ćwiczeniami rachunkowymi „Metody biofizyki molekularnej”. Habilitantka stale prowadzi zajęcia laboratoryjne ze studentami pierwszych lat kierunku „Fizyka” na „I Pracowni fizycznej” i „Pracowni fizycznej dla zaawansowanych”. Opieka czterema ukończonymi pracami magisterskimi i czterema pracami licencjackimi pokazuje atrakcyjność oferty naukowej dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej dla studentów i jej umiejętności w kierowaniu pracą młodych badaczy na starcie kariery zawodowej. Z działalnością dydaktyczną wiąże się duże zaangażowanie w popularyzacji nauki podczas „Letnich Szkół Fizyki”, kursów „Uniwersytetu Otwartego” i „Festiwalu Nauki”, a także publikacjach popularnonaukowych w czasopiśmie „Wiedza i Życie”. Również w zakresie dydaktyki, podobnie jak w badaniach naukowych habilitantka aktywnie włączyła się pozyskiwanie

funduszy na organizację i funkcjonowanie nowego kierunku z europejskiego Programu Operacyjnego kapitał Ludzki „Fizyka wobec wyzwań XXI Wieku” (POKL.04.01.01-00-150/09).

Podsumowując merytoryczną stronę rezultatów uzyskanych przez habilitantkę można jednoznacznie stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa mieści się w szerokim nurcie **biofizycznej analizy** oddziaływania złożonych układów makromolekularnych, jakimi są cząsteczki białek enzymatycznych z ligandami w roztworze wodnym i wpływu tych oddziaływań na biologiczne funkcjonowanie enzymów. **Osiągnięcia naukowe rozprawy oceniam pozytywnie.** Grupuje prace o tematyce istotnej z punktu widzenia współczesnego nurtu badań makromolekularnych, które wnoszą znaczący wkład w zrozumienie funkcjonowania szerokiej klasy enzymów o potencjalnym znaczeniu w projektowaniu środków immunosupresyjnych. Można stwierdzić, że dr Beata Wielgus-Kutrowska wykazuje cechy samodzielnego badacza jeśli chodzi o dorobek naukowy, zainteresowania badawcze, aktywność w organizowaniu warsztatu badań i, co bardzo ważne, w umiejętności stosowania szerokiej gamy doświadczalnych metod biofizycznych w analizie zagadnień stanowiących przedmiot badań. Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe p.t. „Znaczenie oligomeryzacji dla aktywności enzymatycznej trimerycznych fosforylaz nukleozydów purynowych - badania biofizyczne z wykorzystaniem klasy inhibitorów multisubstratowych” oraz całokształt aktywności naukowej, w tym pozostała część dorobku naukowego dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej oraz jej osiągnięcia dydaktyczne **spełniają w mojej opinii wszystkie podstawowe kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego**, zarówno te, określone przepisami ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (ze zmianami z dn. 18.03.2011 r.), jak i kryteria zwyczajowo przyjmowane w środowisku naukowym. W związku z tym **wniosuję o dopuszczenie dr Beaty Wielgus-Kutrowskiej do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.**



Ryszard Stolarski