



POLSKA AKADEMIA NAUK

Prof. dr hab. Jan Barciszewski



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19
fax: 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327
NIP 777-00-02-062

e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

24 lipca 2018

Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Martyny Kutty-Siejkowskiej
pt.

Badanie oddziaływań G-kwadrupleksów o sekwencji protoonkogenów z ligandami

1. Tematyka rozprawy

Badania objęte rozprawą doktorską dotyczą zmian strukturalnych DNA oraz ich znaczenia w regulacji ekspresji genetycznej na poziomie transkrypcji. Mają one długą, ponad 100 letnią historię, kiedy podwójna helisa DNA nie była jeszcze znana. W 1910 norweg Ivar Bang zauważył, że stężone roztwory kwasu guanylowego tworzą żełe. 50 lat później Aleksander Rich (1958) zaproponował model budowy kwasu inozynowego, w którym cztery łańcuchy połączone są pojedynczymi wiązaniami wodorowymi. 4 lata później David Davies w 1962 stwierdził, że roztwór GMP o stężeniu 25 mg/ml ma tak dużą lepkość, że po ochłodzeniu tworzy żel. Zauważył, że włókna osuszonego żelu kwasu guanozynowego tworzą helisę, w której 4 guaniny ułożone są względem osi 4-krotnej. Taką organizację zapewniają 2 wiązania wodorowe przypadające na pojedynczą zasadę, a nie jedno wiązanie, jak proponował wcześniej A. Rich. Tworzenie tetramerów guanozyny wskazuje na możliwość powstawania liniowych agregatów, które od 1989 nazywamy kwadrupleksami.

Dzisiaj wiadomo, że jednoniciowe, bogate w guaninę polinukleotydy tworzą czteroniciowe struktury, G-kwadrupleksy.

Ich nazwa pochodzi od G-tetrad, tj. czterech guanozyn położonych w jednej płaszczyźnie) stabilizowanych poprzez wiązania wodorowe Hoogsteen'a oraz jony metalu (np. sodu lub potasu).

Choć te struktury są znane już od dłuższego czasu, ich pełna funkcja w komórce nie jest dotąd znana. Jednym z głównych miejsc ich występowania są regiony genomu o wysokiej aktywności transkrypcyjnej, dlatego oczywistym jest, że biorą udział w regulacji ekspresji genów. Szacuje się, że w genomie człowieka w regionach promotorowych i w telomerach występuje ponad 3,5 mln takich sekwencji. W zależności od różnych czynników, G-kwadrupleksy mogą powodować zarówno aktywację lub inhibicję poszczególnych genów.

Obecność sekwencji bogatych w guanozynę, wykazano w końcowych fragmentach chromosomu. Tworzą one G-kwadrupleksy, które ochraniają chromosom przed uszkodzeniami podczas replikacji. Hamują aktywność telomerazy, enzymu odpowiedzialnego za utrzymanie stałej długości telomerów. Nadekspresja telomerazy jest charakterystyczną cechą wielu typów komórek nowotworowych, dzięki czemu mogą się one dzielić nieskończenie wiele razy. Zatem hamujący wpływ G-kwadrupleksów na telomerazę może stanowić atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu nowotworów. Z drugiej strony należy pamiętać o pozytywnych efektach większej aktywności tego enzymu w komórkach prawidłowych, dla których G-kwadrupleksy mogą być toksyczne.

G-kwadrupleksy są zaangażowane także w rozwój schorzeń neurologicznych. Mogą one także indukować powstawanie mutacji niekorzystnie wpływających na aktywność białek je wiążących. Tak jest w przypadku genu *FMRI* i związanego z nim zespołu łamliwego chromosomu X.

Dotychczasowe dane o właściwościach i funkcji G-kwadrupleksów w komórce wskazują, że ich potencjał terapeutyczny jest znaczący, jasny a nade wszystko rosnący.

Obecnie wiele zespołów badawczych na świecie pracuje nad terapiami celującymi w struktury kwadrupleksowe DNA. Efektem tych prac jest opracowanie m.in. cząsteczki MM41, pochodnej diimidu naftalenowego, która w badaniach *in vivo* hamowała wzrost guza trzustki o 80%. Uważa się, że związek ten specyficznie wiąże się do G-kwadrupleksów dwóch onkogenów, *KRAS* i *BCL2*, i zmniejsza ich ekspresję.

Zatem interesujące i oczywiste wydaje się być zastosowanie ligandów G-kwadrupleksów jako elementów terapii skojarzonej. Podejście to bazuje na obserwacji, że ligandy prowadzą do powstania dwuniciowych pęknięć DNA, naprawianych na szlakach rekombinacji homologicznej (HR) lub niehomologicznego łączenia końców (NHEJ). Połączenie cząsteczek skierowanych przeciwko G-kwadrupleksom z cząsteczkami hamującymi naprawę uszkodzeń DNA wywiera efekt synergistyczny i wyraźnie obniża przeżywalność komórek nowotworowych. Inny związek porfiryna T4 specyficznie wiąże się do sekwencji

kwadrupleksowych w telomerach, doprowadzając do zahamowania aktywności telomerazy i wywiera efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych.

Podsumowując należy stwierdzić, że te nietypowo zbudowane struktury DNA mogą odgrywać ważne role biologiczne w procesach regulacji genów, i dlatego od niedawna stały się atrakcyjnymi tematami badawczymi przy projektowaniu leków dla terapii antynowotworowych.

Oceniana rozprawa doktorska wpisuje się w ten obszar badań, podejmując wpływ i rolę związków małowcząsteczkowych na stabilność i właściwości kwadrupleksów:

2. Cele pracy

Mając na uwadze olbrzymi potencjał regulacyjny i aplikacyjny nietypowych struktur DNA głównym celem pracy była analiza wpływu ligandów karbazolowych na trwałość struktury G-kwadrupleksów zbudowanych z reszt guanozynowych występujących w odcinkach regulatorowych niektórych genów o znanej funkcji biologicznej.

Do badań wybrano sekwencje DNA bogate w guanozyny znajdujące się w promotorach proto-onkogenów człowieka C-MYC, C-KIT oraz BCL-2. Budowa tych G-kwadrupleksów była określona przy pomocy magnetycznego rezonansu jądrowego, a odpowiednie dane strukturalne znajdują się w ogólnodostępnym banku danych białkowych (PDB).

Badano trwałości G-kwadrupleksów w kompleksach z 3 pochodnymi karbazolowymi.

Charakteryzują się one ładunkiem dodatnim na atomie azotu grupy benzotiazolowej oraz podstawnikami przy atomie azotu zbudowanymi z reszt azolowych (imidazol i triazol) oraz łańcucha alifatycznego.

Oddziaływania ligandów z G-kwadrupleksem analizowano metodami modelowania molekularnego oraz symulacjami dynamiki molekularnej.

3. Wyniki badań

3.1. Wykazano, że swoboda konformacyjna ligandu zawierającego triazol (ligand 2) jest większa niż związku zawierającego imidazol (ligand 3).

3.2. Dokowanie wskazuje na występowanie oddziaływań warstwowych między ligandem 1 końcowymi G-tetradami. Ligandy 2 i 3 tworzą także wiązania wodorowe z nukleotydami znajdującymi się w odcinku jednoniciowym pętli.

3.3. W kompleksach G-kwadrupleksu onkogeny C-KIT z ligandami 2 i 3, grupy triazolowe i imidazolowe znajdują się w bruzdzie między resztami A5 i C9. Obie reszty azolowe tworzą wiązanie wodorowe z atomem azotu guanozyny 4 (G4) kwadrupleksu.

- 3.4. Trwałość szkieletu G-kwadrupleksów w kompleksach jest zależna od rodzaju ligandu. Wartości RMSD i RMSF dla kompleksów kwadrupleksów C-MYC, BCL-2 i ligandu 2 zmieniają się. Obserwowano jest także jedna dominująca konformacja.
- 3.5. G-kwadrupleks C-KIT w kompleksie z ligandem 1 jest najbardziej stabilny.
- 3.6. Kontrybucja pierścienia triazolowego (ligand 2) do stabilności kompleksu z G-kwadrupleksami jest większa niż pierścienia imidazolowego (ligand 3).
- 3.7. Wartości obliczonej energii swobodnej kompleksów dla ligandów 2 i 3 są znacząco mniejsze.
- 3.8. Analiza wiązań występowania (average occupancy) wiązań wodorowych Hoogsteena w wolnych G-kwadrupleksach i ich kompleksach z ligandami wskazuje na ich dużą trwałość niezależnie od typu i charakteru ligandu.

Wszystkie te wyniki zostały zawarte w dwóch pracach eksperymentalnych opublikowanych w marcu i maju 2018 w czasopiśmie International Journal of Biological Macromolecules (Ref. 182) oraz Molecules (Ref. 180). Doktorantka jest współautorem tych prac.

4. Uwagi formalne

- 4.1. Jak wiadomo sekwencje bogate w guanozyny spontanicznie tworzą kwadrupleksy, które są zaangażowane w regulację procesów replikacji transkrypcji i translacji przebiegających z udziałem kilku polimeraz. Warunkiem tego jest swoiste rozpoznawanie i wysokie powinowactwo swoistych białek (helikaz) do kwadrupleksów. Dla pełnej ewaluacji potencjału małowzrostkowych regulatorowych warto uwzględnić i przeanalizować oddziaływania kwadrupleksów z helikazami.
- 4.2. Spis treści rozprawy nie jest przejrzysty i zawiera liczne błędy, łącznie z numeracją rozdziałów.
- 4.3. We wstępie autorka pisze, że analiza uzyskanych wyników miała na celu lepsze zrozumienie prowadzonych badań eksperymentalnych. To bardzo trafne określenie nie zostało jednak wyczerpująco zrealizowane w dyskusji wyników własnych prac.
- 4.4. Rys. 1 (Figure 1) sugeruje błędną lokalizację jonu jednowartościowego w płaszczyźnie tetrady guanozyn i dlatego powinien być dokładnie opisany.
- 4.5. Na wstępie autorka przywołuje badania literaturowe, w których 22 nt kwadrupleks RNA był otrzymany z analogicznego kwadrupleksu DNA, poprzez dodanie grupy 2'-OH, nie komentując jednak podstawowej różnicy między strukturami DNA i RNA.
- 4.6. Praca dotyczy badania oddziaływań ligandów z trzema kwadrupleksami występującymi w onkogenach C-KIT1, C-MYC oraz BCL-2. Charakterystyka tych modelowych

obiektów przedstawiona w krótkich 3-5 zdaniowych komentarzach jest daleko niewystarczająca w pracy promocyjnej i nie pozwala w pełni zrozumieć budowy tych kwadrupleksów a także zagadnienia regulacji aktywności biologicznej omawianych genów.

- 4.7. Uzasadnienie wyboru karbazolowych ligandów do badań jest mało przekonujące. Brak np. informacji o ich cytotoksyczności, stałej inhibicji oraz IC50. Nie zauważyłem nazw systematycznych badanych ligandów (Figure 9).
- 4.8. Rysunki (Figure 6 i 7) powinny mieć numerację 10 i 11.
- 4.9. Odniesienie do Fig. 10 (str. 96 i 97) jest błędne i powinno być do Fig. 11.
- 4.10. Cytowana literatura np. pozycje 33, 36, 49, 68, 95, 147, 167 wymagają korekty.
- 4.11. Dodatkowe spisy rysunków oraz tabel przy końcu rozprawy wydaje się być zbyteczne.
- 4.12. Referencja nr 3 dotycząca pracy z 1909 powinna być dokładna. Jej przywołanie jest zbędne, gdyż nie ma ona związku z badanym problemem. Dotyczy to również ref. 137.

5. Wniosek końcowy

- 5.1. Wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej mgr Martyny Kuty-Siejkowskiej są bardzo rzetelnym materiałem naukowym dotyczącym badań mechanizmów kontroli ekspresji genów a w szczególności tworzenia struktur kwasów nukleinowych wyższego rzędu. Są one dobrym przykładem szerokiego wykorzystania metod obliczeniowych w biologii chemicznej. Rozprawa stanowi istotny wkład do badań a także do wiedzy o udziale i sposobach kontroli oddziaływania kwadrupleksów DNA z niskocząsteczkowymi związkami o dużym potencjale terapeutycznym.
- 5.2. Stwierdzam, że oceniana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami wprowadzonymi przez Dz. U. z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2010 r., Nr 96, poz. 620, Dz. U. z 2010, Nr 182, poz. 1228) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii UAM o dopuszczenie p. mgr Martyny Kuty-Siejkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

