

Dr hab. inż. Emilia Sikorska, prof. uczelni
Katedra Chemii Organicznej
Pracownia Badań Strukturalnych Biopolimerów
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 01.09.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Lendy zatytułowanej
„Analiza zależności pomiędzy strukturą i funkcją produktów proteolitycznego
procesowania nukleobindyny-2”**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Rafała Lendy została wykonana w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Ożyhara oraz promotor pomocniczej dr inż. Dominiki Bystranowskiej. Nukleobindyna-2, będąca tematem badań w ramach rozprawy doktorskiej, jest wielodomenowym, prekursorowym białkiem, z którego w wyniku potranslacyjnej hydrolizy powstają trzy produkty: nesfatyna 1 (N1), nesfatyna 2 (N2) i nesfatyna 3 (N3). Fizjologiczna rola nukleobindyny-2 oraz nesfatyny 1 jest w ostatnim czasie intensywnie badana. Rola pozostałych nesfatyn wciąż pozostaje nieznana. Nie określono również struktur przestrzennych nukleobindyny-2 i produktów jej proteolizy. Nukleobindynę-2 zalicza się do białek zawierających fragmenty inherentnie nieuporządkowane, które wykazują zdolność do przyjmowania odpowiedniej konformacji w zależności od zaistniałych warunków, co sprawia, iż białko to może pełnić różnorodne funkcje w organizmie. Dlatego też, tematyka badań podjęta w ramach rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Lendy, dotycząca charakterystyki molekularnej ludzkich i kurzych nesfatyn (N1, N2 oraz N1/2), będących produktami proteolizy odpowiednio ludzkiej i kurzej nukleobindyny-2, jest jak najbardziej uzasadniona.

Rozprawa doktorska mgr inż. Rafała Lendy została napisana w języku polskim i posiada strukturę zgodną z powszechnie obowiązującymi standardami przyjętymi dla prac doktorskich z dyscypliny nauk chemicznych. Dysertacja liczy sobie 164 strony i została podzielona na sześć głównych, ponumerowanych rozdziałów: *Wprowadzenie*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja* oraz *Podsumowanie i dalsze badania*. Całość została poprzedzona podziękowaniami, streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem treści oraz wykazem stosowanych skrótów. Dysertację kończą w formie

nieponumerowanych rozdziałów kolejno: *Załączniki, Spis rysunków i tabel, Dorobek naukowy i pozanaukowy* oraz *Literatura* (270 pozycji literaturowych).

Rozdział *Wprowadzenie*, mgr inż. Rafał Lenda rozpoczyna od krótkiej charakterystyki białek inherentnie nieuporządkowanych. W kolejnych podrozdziałach *Wprowadzenia*, Kandydat do stopnia naukowego doktora skupia się już na nukleobindynach i ich pochodnych, opisując ich budowę, genezę oraz szerokie spektrum pełnionych przez nie funkcji fizjologicznych. *Wprowadzenie*, a zwłaszcza wykazanie luk w wiedzy o nukleobindynach, stanowi jednocześnie świetne uzasadnienie podjętych w ramach rozprawy doktorskiej badań. W rozdziale *Cel pracy*, mgr inż. Rafał Lenda podaje główne założenia zaplanowanych badań. Kolejny rozdział, *Materiały i metody*, jak sama nazwa wskazuje, zawiera wykaz użytych odczynników, szczegóły dotyczące ekspresji białek, ich oczyszczania i identyfikacji oraz wszystkich badań, którym zostały poddane. Rozdział *Wyniki* stanowi najważniejszą część rozprawy doktorskiej. W rozdziale tym Kandydat do stopnia naukowego doktora ze szczegółami opisuje rezultaty otrzymywania i oczyszczania rekombinowanych nesfatyn. Wydajność syntez wahała się w zakresie 0,4-10 mg z litra hodowli, a otrzymane białka cechowały się czystością na poziomie 96-98%. W tej części rozprawy brakuje podrozdziału dotyczącego oczyszczania nesfatyny gN2. Wyjaśnienie dlaczego pojawia się dopiero w podrozdziale dotyczącym wyznaczania mas cząsteczkowych nesfatyn, gdzie autor rozprawy informuje, iż ze względu na bardzo niską wydajność, związek ten nie został poddany zaplanowanym analizom metodami eksperymentalnymi. Wszystkie natomiast zaplanowane do badań związki zostały przeanalizowane za pomocą narzędzi bioinformatycznych, celem przewidzenia struktury drugorzędowej, w tym potencjalnych regionów inherentnie nieuporządkowanych, oraz struktury trzeciorzędowej. Zostały również wygenerowane teoretyczne widma dichroizmu kołowego, które zestawiono z eksperymentalnymi widmami CD, co umożliwiło wybór najodpowiedniejszych teoretycznie przewidzianych struktur przestrzennych. Na podstawie eksperymentalnych widm CD, mgr inż. Rafał Lenda wyznaczył zawartości procentowe poszczególnych struktur drugorzędowych zarówno dla białek bez jak i z dodatkiem jonów cynku. Widma CD kurzych i ludzkich homologów nesfatyn zostały również zarejestrowane w obecności jonów wapnia, jednakże nie zaobserwowano żadnych zmian strukturalnych indukowanych tymi jonami. Dlatego też, w dalszych etapach badań autor rozprawy skupił się na badaniu oddziaływań z jonami cynku. Z wykorzystaniem pomiarów CD w funkcji temperatury określił wpływ jonów Zn(II) na stabilność termiczną badanych nesfatyn. Kolejne badania obejmowały analizę wpływu jonów cynku na stan oligomeryczny nesfatyn z wykorzystaniem ultrawiarowania analitycznego,

wyznaczenie stałych dysocjacji kompleksów z jonami cynku metodami spektrofotometrycznymi i kalorymetrycznymi, określenie zdolności nesfatyn do formowania struktur amyloidowych oraz mapowanie położenia rejonów nieuporządkowanych techniką wymiany proton/deuter. W rozdziale *Dyskusja* Kandydat do stopnia naukowego doktora omówił najważniejsze rezultaty swoich badań, wykazując podobieństwa i różnice pomiędzy ludzkimi i kurzymi homologami oraz przestawił wyniki swoich badań na tle doniesień literaturowych. Ostatni ponumerowany rozdział obejmuje krótkie podsumowanie i plany dalszych badań tej grupy związków.

Za mocną stroną pracy uważam logikę w planowaniu kolejnych etapów badań oraz ich interdyscyplinarny charakter. Dyskusja otrzymanych wyników w świetle danych literaturowych potwierdza, iż mgr inż. Rafał Lenda bardzo dobrze orientuje się w tematyce oraz świetnie porusza się w literaturze z tematu pracy. Za najważniejsze osiągnięcie naukowe uważam: opracowanie wydajnych procedur ekspresji nesfatyn oraz ich oczyszczania; określenie wpływu jonów cynku na strukturę przestrzenną produktów proteolizy ludzkiej i kurzej nukleobindyny-2; wskazanie roli fragmentu N2, który połączony z N1 zmienia jego właściwości molekularne; wykazanie różnic w wiązaniu jonów cynku pomimo wysokiej homologii sekwencyjnej, co sugeruje istnienie funkcji nesfatyn specyficznych dla danego organizmu; wykazanie tendencji do oligomeryzacji pod wpływem jonów cynku oraz wykazanie, iż homologi halo-N1 posiadają motyw amyloidowy, co sugeruje ich potencjalny udział w procesach neurodegeneracyjnych. Wyniki badań stanowią ważny wkład w analizę strukturalną nesfatyn w kontekście ich szerokiej roli fizjologicznej i stanowią solidną podstawę do dalszych badań. Niemniej jednak, w dysertacji pojawiły się pewne nieścisłości. Ponadto, lektura dysertacji nasunęła również kilka pytań. Jedne i drugie zostały wymienione poniżej:

- Str. 8 Autor dysertacji podkreśla, iż fragmenty inherentnie nieuporządkowane w odróżnieniu od białek globularnych zawierają naładowane, polarne reszty promujące nieuporządkowanie, przy czym tylko dwie wymienione w nawiasie reszty, Arg i Asp, odpowiadają temu opisowi;
- Mgr inż. Rafał Lenda dość często podaje informację, iż dane eksperymentalne zostały dopasowane do odpowiedniego modelu. Czy nie powinno dopasowywać się modelu do danych eksperymentalnych?
- Str. 23 W podpisie do rysunku 1.8 dwukrotnie pojawia się panel E;

- Str. 25 W podpisie do rysunku 1.10 brakuje podanej literatury. Podobnie w podpisach do rys. 1.11 na str. 27 oraz rys. 1.15 na str. 39. Czy rysunki te zostały w całości przygotowane przez autora samodzielnie?
- Str. 30. W podpisie do rysunku 1.12A Kandydat do stopnia naukowego doktora wskazuje, że na rysunku na czerwono zaznaczono PVN (jądro przykomorowe) oraz LC (miejsce sinawe), jako główne ośrodki przetwarzające odpowiedź na stres. Nie zgadza się podany kolor;
- Brakuje odnośnika literaturowego do programu CDPro, używanego do dekonwolucji widm CD;
- Str. 55 Jaką metodę jonizacji stosowano podczas pomiarów widm masowych?
- Str. 77 i 79. Na rysunkach 4.10A i 4.11A znajdują się wykresy w kolorze granatowym. Natomiast w podpisie do panelu A pojawia się wyjaśnienie, że czarna i czerwona linia odpowiadają wynikom przewidywania regionów inherentnie nieuporządkowanych w N1 i N2. To wyjaśnienie powinno być przesunięte do opisów paneli C-D. Ponadto, w przypadku podpisu do rysunku 4.11C zamiast kurzej nesfatyny gN1/2 pojawia się ludzki odpowiednik hN1/2;
- Str. 88, Podpis do rys. 4.18 sugeruje obecność trzech paneli, A, B i C, przy czym panel B ma odpowiadać widmom CD kurzej nesfatyny gN2. W tekście natomiast podana jest informacja, iż ze względu na niską wydajność otrzymywania gN2, białko to nie zostało poddane analizie;
- Str. 91 Autor dysertacji przeanalizował wpływ stężenia jonów Zn(II) na widma CD nesfatyn, zauważając, iż w przypadku gN1/2 przy stężeniu jonów Zn(II) równym 75 μM i 100 μM dochodzi do wyrównania średniej wartości eliptyczności molowej przy długościach fal 208 i 222 nm. Z czego to może wynikać?
- Str. 105 Miareczkowanie kalorymetryczne białka hN1 jonami cynku wykazało reakcję endotermiczną. Z kontekstu opisu rezultatów badań wynika, iż na tej podstawie mgr inż. Rafał Lenda stwierdził, że dane te wskazują na niską wartość stałej K_d . Czy reakcja endotermiczna definiuje jednocześnie niską wartość stałej K_d ? Który element krzywej dopasowania jest związany z wartością stałej K_d ? Ponadto, czy otrzymana wartość stałej $K_d = 61 \mu\text{M}$ faktycznie jest niska, zwłaszcza gdy porównamy ją z wartością stałej K_d wyznaczonej w tym samym rozdziale dla hN1/2 (7,8 μM)?
- W rozdziale *Podsumowanie i dalsze badania* mgr inż. Rafał Lenda wspomina o próbach krystalizacji wybranych nesfatyn. Dlaczego badania te nie zostały zamieszczone w rozdziale *Wyniki*?

- Str. 148. Rysunek pokazuje mikrofotografie z prób krystalizacji hN1 w obecności jonów cynku, a nie przy ich braku.

Kandydat do stopnia naukowego doktora nie uniknął błędów edycyjnych i językowych, takich jak „literówki”, brak spacji, brak przecinków, zaimków, błędy składniowe i fleksyjne itp. Dla przykładu: „opowiadająca struktura” (str. 6), „białka czaperoniowe” zamiast „chaperonowe” (ewentualnie „czaperonowe”) (str. 7); „dania przegowanego” zamiast „danie przegowanego” (str. 13), czy urwane zdanie rozpoczynające rozdział 4.2.1 (str. 67). W pracy pojawiają się też niefortunne sformułowania: „dochodzi do utraty połowy wartości widma CD” (str. 92), aminokwasy kwaśne zamiast kwasowe czy region kwaśny zamiast kwasowy (np. str. 10).

Rezultaty badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Lendy zostały opublikowane w dwóch artykułach w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku wpływu równym 16,6 (Cell Communication and Signaling, $IF_{2022}=8,4$ i $IF_{2023}=8,2$), w których mgr inż. Rafał Lenda jest pierwszym autorem. Mgr inż. Rafał Lenda jest też współautorem przeglądowej publikacji dotyczącej roli nukleobindyny-2/N1 w procesach kancerogenezy i apoptozy (International Journal of Molecular Science, $IF_{2021}=6,2$). Kandydat do stopnia naukowego doktora prezentował również wyniki swoich badań na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Tematyka rozprawy doktorskiej pokrywa się także z projektem NCN 2018/29/B/NZ1/02574 „Analiza molekularna strukturalnego nieuporządkowania nukleobindyny-2, białka o wielu funkcjach”, kierowanym w latach 2019-2023 przez promotora rozprawy doktorskiej, prof. dr hab. inż. Andrzeja Ożyhara.

Podsumowując, wyniki badań uzyskanych przez mgr inż. Rafała Lendę w ramach Jego rozprawy doktorskiej stanowią cenne źródło wiedzy w zakresie badań strukturalnych niefatyn. W mojej opinii, Kandydat do stopnia naukowego doktora wykonał ogrom ciężkiej pracy w laboratorium, a przeprowadzone przez Niego badania zostały odpowiednio zaplanowane. Niedociągnięcia edycyjne i językowe pojawiające się w pracy, w żaden sposób nie umniejszają jej wartości merytorycznej. Wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokich współczynnikach wpływu. Dlatego też, nie mam najmniejszych wątpliwości, iż Kandydat posiada znakomity, ukształtowany po opieką promotora oraz promotor pomocniczej rozprawy warsztat naukowy i jest gotowy do samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych.

Mając na uwadze powyższe stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Rafała Lendy zawiera elementy nowości naukowej i w pełni spełnia ustawowe (w świetle art. 187

ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) oraz zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Kandydata do stopnia naukowego doktora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. inż. Emilia Sikorska, prof. uczelni