



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Wiktor Koźmiński,

Wydział Chemii UW

kozmin@chem.uw.edu.pl,

tel: 22 5526519

Warszawa, 3 września 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Lendy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Rafała Lendy pod tytułem: „*Analiza zależności pomiędzy strukturą i funkcją produktów proteolitycznego procesowania Nukleobindyny-2*”, w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, została wykonana w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej. Promotorem przedstawionej rozprawy doktorskiej byli: prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar oraz jako promotor pomocniczy dr inż. Dominika Bystranowska. Recenzowana praca jest kontynuacją i rozwinięciem tematyki, recenzowanej przeze mnie rok temu pracy Anny Skorupskiej-Stasiuk, która skupiała się na charakterystyce białka nukleobindyny-2 oraz jego podjednostki nesfatyny-3 z *Gallus gallus*, a do której mgr inż. Lenda kilkakrotnie się odwołuje.

Praca zawiera łącznie 182 strony i została podzielona na sześć głównych rozdziałów, które zostały poprzedzone dwujęzycznym streszczeniem i (co pomocne w lekturze) spisem używanych skrótów. Na koniec rozprawy następują: „Podsumowanie i perspektywy dalszych badań” (rozdział 6), załącznik zawierający między innymi sekwencja aminokwasowe otrzymanych nesfatyn, spis rysunków i tabel, opis dorobku naukowego Autora, oraz

zawierający 270 pozycji spis cytowanej literatury. Moim zdaniem praca napisana jest bardzo dobrze i klarownie, dając możliwość zrozumienia także czytelnikom reprezentującym inne specjalności. Nie dostrzegłem także istotnych uchybień redakcyjnych i stylistycznych. Na pochwałę zasługuje czytelny podział na część literaturową i wyniki własne Doktoranta. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w trzech artykułach (Doktorant jest pierwszym autorem dwóch z tych prac) w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (indeksowanymi w bazie Web of Science), a także prezentowane były w czterech wystąpieniach na konferencjach naukowych.

Tematem pracy Rafała Lendy jest charakterystyka nesfatyn - produktów proteolizy Nucleobindyny-2 na poziomie molekularnym. Temat ten jest bardzo ciekawy ze względu na wiele znanych i wiele wciąż nieznanymi funkcji biologicznych badanych białek.

W wyczerpującym i interesująco napisanym wprowadzeniu Autor zaczyna od omówienia ważnego zagadnienia białek inherentnie nieuporządkowanych (ang. IDP), lub zawierających takie fragmenty (IDR). Ich natywne nieuporządkowanie i plastyczność są obecnie przyjmowane jako kluczowe własności dla ich funkcji biologicznych. IDP nie mają stabilnej struktury trzeciorzędowej, a ich zmienność konformacyjna stanowi wyzwanie dla obowiązującego jeszcze do niedawna paradygmatu łączącego strukturę z funkcją. Obecnie wiadomo, że IDP odgrywają kluczową rolę w wielu ważnych procesach komórkowych organizmów eukariotycznych. Strukturalna zmienność IDP wymaga zastosowania odpowiednich metod eksperymentalnych. Podstawowym problemem opisu cząsteczek IDP jest zdefiniowanie przestrzeni konformacyjnej próbkowanej przez łańcuch polipeptydowy, a także charakterystyka jego równowag konformacyjnych opisywanych często jako „preferencje konformacyjne”. W dalszym ciągu wprowadzenia Autor podaje przegląd znanych właściwości i funkcji biologicznych nukleobindyn. Omówione zostały także znane informacje na temat wiązania przez te białka jonów metali co ma wpływ i na ich strukturę i na aktywność.

Po dającym Czytelnikowi rozeznanie w problemach dotyczących tematyki pracy wstępnie, Autor sformułował w krótkim rozdziale drugim cele pracy. Najważniejszym z nich

była próba przeprowadzenia charakterystyki molekularnej ludzkiej i kurzych nesfatyn oraz sprawdzenie wpływu ewentualnego oddziaływania z jonami metali na ich własności. Wymagało to przede wszystkim opracowania niezbędnej do dalszych prac procedury ekspresji i oczyszczania badanych białek, a następnie ich biochemiczną i spektroskopową charakteryzację, analizę struktury (drugo-, trzecio- i czwartorzędowej), identyfikację i analizę regionów dostępnych dla rozpuszczalnika, analizę oddziaływań z jonami metali. Dodatkowym celem było także zbadanie oddziaływań z Tioflawiną T jako sondy związanej z tworzeniem fibryli amyloidowych przez nesfatyny. Uważam, że cele pracy doktorskiej mgr inż. Rafała Lendy były ambitne i z powodzeniem zostały zrealizowane.

W rozdziale 3 „Materiały i metody”, Doktorant szczegółowo opisuje zastosowane w pracy liczne techniki eksperymentalne. Od biochemicznych technik oczyszczania DNA po techniki spektroskopowe. Opis jest kompletny i kompetentny, nie wymaga więc dalszego komentarza.

Największą część pracy, (co dobitnie świadczy o ilości pracy włożonej w projekt doktorski), (rozdział 4) zajmuje opis wyników. Rozpoczyna się on od szczegółowego opisu procedur prowadzących do ekspresji w bakteriach *E.coli* i oczyszczania próbek wybranych białek. (Przy czym badanie rozpuszczalności rekombinowanych homologów kurzej i ludzkiej nesfatyny N1/2 została wykonana wcześniej w ramach prac magisterskich Autora oraz mgr inż. Karoliny Błaszczak). Na kolejnych stronach opisana jest analiza bioinformatyczna badanych ludzkich i kurzych nesfatyn wskazująca na obecność licznych inherentnie nieuporządkowanych fragmentów tych białek. Wniosek ten potwierdzają opisane następnie badania za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego, wskazując także na zmiany strukturalne i zmiany stabilności termicznej indukowane pod wpływem jonów metali dwuwartościowych. Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD) wykazała również istotny i odmienny wpływ jonów cynku i wapnia na badane cząsteczki białek. W dalszej kolejności opisane są eksperymenty ultrawirowania analitycznego, którego wyniki świadczą o anomalnie dużym promieniu hydrodynamicznym, charakterystycznym dla obecności nieuporządkowanych fragmentów białek, pomiarów fluoroscencyjnych, wymiany H-D za pomocą spektroskopii mas (pokazującej

dostępność protonów amidowych dla rozpuszczalnika). Do analizy oddziaływań badanych białek z jonami metali użyto także metod kalorymetrycznych, co pozwoliło oszacować parametry termodynamiczne tych oddziaływań. Warto zauważyć że, we wszystkich przypadkach i za pomocą wszystkich zastosowanych technik stwierdzono istotny wpływ obecności jonów cynku na strukturę i oddziaływanie badanych białek. Innym ważnym spostrzeżeniem jest także wpływ jonów cynku na stan oligomeryczny nefatyn.

W rozdziale 5 Autor przeprowadził dyskusję uzyskanych wyników. Badane białka okazały się być w dużym stopniu białkami nieuporządkowanymi, a charakter ich oddziaływań z jonami metali dość złożony. Najważniejszym osiągnięciem pracy Rafała Lendy jest przeprowadzenie charakterystyki molekularnej, która stanowić będzie podstawę do zrozumienia zależności pomiędzy strukturą a oddziaływaniami (co za tym idzie funkcjami biologicznymi) produktów proteolizy ludzkiej i kurzej Nucleobindyny-2.

Rozdział 6 przedstawia perspektywy dalszych badań, Autor opisuje w nim wstępne próby krystalizacji, które po optymalizacji mogłyby dać materiał do badań metodami krystalografii rentgenowskiej. Tu trzeba pamiętać, że modyfikacje sekwencji aminokwasów, prowadzące do poprawy krystalizacji, mogą jednocześnie mieć wpływ na strukturę. Na przykład przez ustrukturyzowanie wcześniej nieuporządkowanego regionu białka, przeszkadzającego wcześniej w procesie tworzenia się kryształów. Autor rozważa także przeprowadzenie eksperymentów rozpraszania niskokątowego promieni X (SAXS). Mam nadzieję, że prace będą kontynuowane i przyniosą wiele nowych informacji na temat struktury i funkcji nefatyn. Dla mnie największym, choć nie zmniejszającym wartości rozprawy doktorskiej, brakiem jest nieobecność planów zastosowania spektroskopii NMR, o czym poniżej.

Doktorant wykonał wielką pracę eksperymentalną stosując bardzo wiele różnych technik biochemicznych i biofizycznych, nie mogę jednak powstrzymać się od komentarza, (niczym nie umniejszającego jakości niniejszej pracy), że bardzo ciekawym mogłoby okazać

się użycie spektroskopii NMR (choć zapewne mogłoby to stać się podstawą kolejnego doktoratu).

Spektroskopia NMR umożliwia badania białek na poziomie atomowym, na przykład przypisać szybkość wymiany protonów amidowych do konkretnych jednostek aminokwasowych, ustalić miejsca wiązania jonów metali lub innych cząsteczek czy szlaki allosteryczne.

Z opisu wynika, że możliwe jest uzyskanie białek w ilościach rzędu miligramów, po dalszej optymalizacji (zwłaszcza dla ubogiej pożywki) mogłoby być możliwe otrzymanie istotnych ilości białek znaczonych izotopowo. Wielkość badanych niesfatyn zestawiona na stronie 154 waha się od 103 i 106 aminokwasów dla N1 i N2 do 187 N1/2. Taka wielkość białka pozwala na pracę z użyciem klasycznego schematu znakowania izotopami węgla-13 i azotu-15. Oczywiście ważna jest także kwestia rozpuszczalności w odpowiednio dobranym buforze. Nawet białka o wielkości nukleobindyny-2 całej długości także można badać za pomocą NMR, choć z pewnością wymagałoby to deuterowania reszt bocznych a także wprowadzenia ^{13}C jedynie w grupach metylowych niektórych aminokwasów (ILVM). Mogłoby to być ciekawe na przykład w kontekście bogatego w leucyny i izoleucyny peptydu sygnałowego regionu wiążącego DNA (strona 28).

Podsumowując, chciałbym z pełnym przekonaniem stwierdzić, że przedłożona praca spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Rafała Lendy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam także, że znaczenie prowadzonych badań, uzyskane nowe wyniki i wkład pracy Doktoranta uzasadniają wniosek o wyróżnienie rozprawy.