

Warszawa, 14.08.2024.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Rafała Lendy

Pan mgr inż. Rafał Lenda przedstawił do oceny rozprawę doktorską pod tytułem *Analiza zależności pomiędzy strukturą i funkcją produktów proteolitycznego procesowania Nukleobindyny-2*, wykonaną w Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Ożyhara jako promotora i dr inż. Dominiki Bystranowskiej jako promotorki pomocniczej.

Rozprawa oparta jest na materiale badawczym zawartym w trzech artykułach, opublikowanych w latach 2021-2024. Doktorant jest pierwszym autorem w dwóch spośród tych artykułów i równorzędnym pierwszym autorem w trzecim, mającym charakter artykułu przeglądowego. Praca, napisana w języku polskim, ma charakter rozprawy w układzie klasycznym, zawierając kolejno Streszczenie, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Załącznik zawierający pomocnicze wyniki eksperymentalne, wykazy rysunków i tabel oraz opis dorobku Doktoranta, a na końcu Bibliografię, liczącą 270 pozycji.

36-stronicowy wstęp do rozprawy został poświęcony wyczerpującemu opisowi funkcji biologicznych nukleobindyn 1 i 2 oraz ich peptydów pochodnych. Przedstawiono również ich właściwości strukturalne, które w dużej mierze spekulatywne ze względu na brak danych eksperymentalnych oraz przez to, że zawierają one fragmenty inherentnie nieuporządkowane. Podano również dane dotyczące wiązania jonów metali przez nukleobindynę-2, pochodzące głównie z badań macierzystego laboratorium Doktoranta. Z uznaniem przyjmuję opanowanie przez Doktoranta gąszczu powiązań funkcjonalnych nukleobindyn w różnych procesach fizjologicznych. Udało mu się przekonująco wykazać, że są to białka ważne, a jednocześnie wymagające licznych dalszych badań. Mam tylko jedną uwagę do tej części rozprawy. Mianowicie mam wrażenie, że struktura nukleobindyny-2 obliczona za pomocą programu AlphaFold, przedstawiona na rys. 1.13, zawiera dużo więcej helis alfa, niż 45%, podane przez Autora w sekcji 1.2.4.5 na podstawie badań eksperymentalnych jego laboratorium. Chciałbym prosić o wyjaśnienie tej kwestii podczas obrony.

Na str. 41 Doktorant zamieścił Cel Pracy, sformułowany jako „*próba przeprowadzenia charakterystyki molekularnej ludzkiej i kurzej N1, N2, N1/2 oraz określenie wpływu potencjalnych ligandów – jonów metali dwuwartościowych na powyższą zależność*”. Doktorant uzasadnia ten cel potrzebą wyjaśnienia na poziomie molekularnym plejotropowych funkcji biologicznych nesfatyn i rozpisuje go na osiem celów szczegółowych, które są osnową strukturalną rozprawy. Cel rozprawy został sformułowany w sposób klarowny i przekonujący.

Następną częścią rozprawy jest opis zastosowanych materiałów i metod eksperymentalnych. Opisy i syntetyczne tabele zbierające użyte w rozprawie odczynniki, oligonukleotydy, plazmidy, komórki *E. coli* są pełne i szczegółowe. To samo można powiedzieć o protokołach eksperymentalnych, przedstawionych w dziale Metody rozprawy. W sumie ta część rozprawy spełnia swój cel, umożliwiając czytelnikom odtworzenie opisywanych eksperymentów. Należy zwrócić uwagę na szeroką gamę zastosowanych metod badawczych, obejmujących nadekspresję i oczyszczenie badanych białek, metody biofizyczne, w tym elektroforezę i Western blot, spektroskopię absorpcyjną, fluorescencyjną i dichroizmu kołowego, ultrawiórowanie analityczne, spektrometrię mas, w tym wymianę proton-deuter, kalorymetrię i dodatkowo obliczenia teoretyczne.

Od strony 65 rozpoczyna się zasadnicza część rozprawy – Wyniki. Doktorant najpierw przedstawia wykonane przez siebie procedury otrzymania badanych białek i weryfikacji ich poprawności za pomocą elektroforezy żelowej i spektrometrii mas. Nie mam uwag do tych opisów, które są wyczerpujące. Odnotować należy jedynie niską wydajność procesu otrzymywania nesfatyny gN2, która spowodowała ograniczenie skali eksperymentów z jej udziałem. Następnie przedstawiono wyniki analiz *in silico* struktury drugorzędowej białek, uzyskując dość solidne potwierdzenie obecności w nich fragmentów nieuporządkowanych. Bardziej szczegółowy opis struktury drugo- i trzeciorzędowej badanych białek został uzyskany przez zastosowanie trzech programów służących do predykcji struktury na podstawie sekwencji aminokwasowej: I-TASSER, AlphaFold i Modeller. Bardzo rozsądnym kryterium jakości tych obliczeń było tu porównanie teoretycznych widm CD, obliczonych w tych programach, z widmem eksperymentalnym. Zaciekawiał mnie fakt, że dla wszystkich trzech białek ludzkich sensowne wyniki otrzymano tylko dla programu Modeller. Tym bardziej proszę o wyjaśnienie, dlaczego do analizy analogów kurzych użyto programu I-TASSER. Chciałbym też prosić o wyjaśnienie, dlaczego dla miejsca wiązania jonu Zn(II) w hN1 założono koordynację przez resztę Lys70, obok dwóch histydyn. Uważam, że to nie jest możliwe. Grupa aminowa lizyny prawie nigdy nie ma właściwości koordynujących, ze względu na wartość $pK \sim 10$, a bardzo rzadkie wyjątki dotyczą otoczenia silnie hydrofobowego, które może radykalnie obniżyć pK tej grupy.

Opis eksperymentów biofizycznych Autor rozpoczyna od spektroskopii CD, służącej jako szubka metoda wyznaczenia zawartości struktur drugorzędowych w białkach. Przy okazji

wykorzystano ją do stałych wiązania jonów Zn(II). Eksperymenty wykonano prawidłowo. Widma mają dobrą jakość, co uprawdopodobnia estymacje procentowej zawartości struktur drugorzędowych, wykonane przez Autora. Niestety opis badań wiązania jonów Zn(II) w sekcji 4.4.1 należałoby uzupełnić. Po pierwsze w legendach rysunków przedstawiających miareczkowania należało podać stężenie molowe białka. Ta kluczowa wielkość nigdzie nie jest podana wprost, choć Doktorant niewątpliwie ją zna. Jedyne w części eksperymentalnej wspomina się, że do pomiarów CD użyto stężenia białek 0,15 mg/ml. To oznacza, że w każdym miareczkowaniu są inne stosunki białko:Zn(II). Doktorant w ten sposób komplikuje sobie sprawę interpretacji wyników, zwłaszcza w doświadczeniach z N2 i N1/2, gdzie otrzymane sigmoidalne krzywe miareczkowania zostały jedynie opisane i nie wskazano hipotetycznych choćby źródeł takiego zachowania. Gdyby oś x została opisana za pomocą stosunku molowego białko:Zn(II), to przynajmniej stechiometria oddziaływania, która na pewno jest inna niż 1:1, mogłaby być określona. Ten sam problem utrudnia interpretację krzywych topnienia w następnej sekcji, gdzie zamiast nadmiarów (niedomiarów?) Zn(II) nad białkami mamy oderwane wartości stężeń absolutnych jonów Zn(II).

Wyniki ultrawiwowania analitycznego są dość jednoznacznie interpretacyjnie i pokazują, że jony Zn(II) w wysokim stężeniu sprzyjają oligomeryzacji białek ludzkich, zwłaszcza hN1 oraz agregacji białek kurzych. Natomiast wyniki badań ograniczonej proteolizy białek z użyciem trypsyny zostały opisane w sposób mało przejrzysty. Zrozumienie wyników byłoby łatwiejsze, gdyby Autor porównał je z teoretyczną mapą fragmentacji białek przez trypsynę, tak jak uczynił to dla pepsyny w opisie eksperymentów HDx.

Opisane kolejno wyniki eksperymentów kalorymetrycznych, przeprowadzonych z powodzeniem jedynie dla białek hN1 i hN1/2, ze względów technicznych, które trzeba potraktować jako siłę wyższą. Wyniki dla hN1 są całkiem jasne, natomiast nie do końca rozumiem dlaczego nie podjęto próby dopasowania wyników dla hN1/2 dla innego modelu, np. wiązania sekwencyjnego. Podejście do tego zagadnienia za pomocą alternatywnej metody miareczkowania kompetycyjnego z użyciem barwnego chelatora (Zincon), opisane dalej, jasno pokazuje luki w powyższej analizie, ze względu na zupełnie inne wartości stałych wiązania otrzymane w tych eksperymentach. Łatwiej byłoby ocenić źródła tych rozbieżności, gdyby na rys. 4.29 pokazano również krzywe dopasowania, tak jak dla eksperymentów ITC powyżej i fluorescencyjnych poniżej. Te ostatnie wykonano przy użyciu zewnętrznej sondy, aktywowanej przez wiązanie do hydrofobowych obszarów białka. Ta metoda jest obciążona pewnym wewnętrznym błędem, gdyż takie oddziaływanie sprawia, że sonda musi wpływać na strukturę białka, a więc i na stabilność kompleksu. Niemniej jednak, jak stwierdza Doktorant, otrzymano wyniki zgodne z badaniami CD. Znów jednak nie podano kluczowego parametru dopasowania krzywej za pomocą równania Hilla, czyli n . Należy zwrócić uwagę, że w

dopasowaniu danych kalorymtrycznych użyto prostego równania na izotermę wiązania, a więc założono $n = 1$, co zapewne tłumaczy część rozbieżności wyznaczonych wartości stałych wiązania. Z drugiej strony zastosowanie sondy ANS dostarczyło cennych informacji o zmianach struktury białek pod wpływem wiązania jonów Zn(II).

Ostatnią częścią rozprawy poświęconą aspektowi ilościowemu wiązania jonów Zn(II) do badanych białek były pomiary fluorescencji ThT, wykonane w reżymie kinetycznym dla form apo białka kurzego gN1 (dlaczego tylko dla niego?) i w reżymie miareczkowania jonami Zn(II) dla białek hN1 i gN1. Celem pierwszej serii eksperymentów było wykrycie powolnego procesu agregacji. Natomiast miareczkowania zostały jak rozumiem wykonane szybko – bez uwzględnienia ewentualnych efektów kinetycznych. Uzyskano pozorne stałe wiązania podobne dla obu białek, a ponadto stała ok. 70 μM dla białka hN1 była w dużej zgodności z danymi dla sondy ANS. W tym wyodknie, jak rozumiem ThT nie raportował agregacji, a tylko odsłonięcie, w wyniku wiązania jonów Zn(II), rozpoznawanego przez ThT elementu struktury drugorzędowej białka.

Przedstawione następnie eksperymenty HDX stanowią ostatnią część wyników rozprawy. odnośne eksperymenty zostały wykonane bardzo dokładnie i dają jednoznaczny obraz zmian ekspozycji do roztworu/strukturyzacji poszczególnych odcinków sekwencji badanych białek w obecności jonów Zn(II). Dają również podstawę do wyjaśnienia oddziaływań między sekwencjami N1 i N2 w białkach N1/N2.

Rozbudowaną dyskusję wyników rozprawy Doktorant zaczyna od rekapitulacji biologicznego kontekstu swoich badań, następnie rozważając kolejno proces otrzymywania badanych białek, ich analizę strukturalną *in silico*, a następnie zbiorczo badania eksperymentalne ich właściwości molekularnych. Nie mam uwag do pierwszej części. Doktorant otrzymał materiał do badań i w pełni udokumentował jego tożsamość molekularną. W drugiej części dyskusji zawarto syntetyczne omówienie wyników analiz obliczeniowych, które jest poprawne, choć pytania, które postawiłem we fragmencie recenzji, poświęconym wynikom badań, pozostają w mocy. Ostatnia część dyskusji obejmuje wszystkie badania doświadczalne otrzymanych białek, ale jest podzielona na podrozdziały na temat form apo i związanych do jonów Zn(II). Dyskusja właściwości konformacyjnych badanych białek, skoncentrowana na wpływie sekwencji N2 na strukturę N1, jest dobrze osadzona w kontekście biologicznym i przekonująca dla Recenzenta. chciałbym w tym miejscu zapytać Doktoranta, czy nie sądzi, że N1 jest inhibitorem trypsyny i może też innych proteaz? Dyskusja wiązania jonów Zn(II) jest również przeprowadzona z punktu widzenia konsekwencji biologicznych. Bardzo ciekawym wątkiem, wartym kontynuacji, jest pomysł, że wiązanie jonów Zn(II) do sekwencji N1 może mieć funkcję biologiczną, przy pakowaniu białka do granul wydzielniczych. Podsumowując tę część rozprawy, pragnę stwierdzić, że stopień pogłębienia procesów wiązania jonów Zn(II) do

poszczególnych badanych białek jest wystarczający dla wstępnej analizy kontekstu biologicznego. Budzi jednak mój niedosyt pod względem badań biofizycznych, gdyż sądzę, że bardziej wnikliwa analiza uzyskanych wyników mogłaby doprowadzić do dokładniejszego opisu oddziaływań, co z kolei pozwoliłoby na lepsze uprawdopodobnienie postulatów biologicznych. Autor rozsądnie interpretuje odbiegające od pozostałych wyniki ilościowe uzyskane dla chelatora Zincon. Uważam jednak, że do pełnej oceny aspektów ilościowych wiązania jonów Zn(II) do badanych białek i wiarygodności interpretacji tych wyników bardzo przydatne byłoby ich zbiorcze zestawienie w tabeli ujawniającej również wartości współczynnika Hilla. Uwaga na str. 125, że dla hN1 uzyskano $n=2$ ma kluczowe znaczenie dla interpretowanej stechiometrii wiązania, a zatem i realnego powinowactwa białka do jonów cynkowych.

W krótkim Podsumowaniu Autor zebrał kluczowe wyniki i zarysował ciekawe (i zdecydowanie pożądane) perspektywy dalszych badań strukturalnych dla badanych białek.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że zamieszczone powyżej uwagi krytyczne, dotyczące przede wszystkim niektórych aspektów interpretacyjnych oddziaływań badanych białek z jonami Zn(II) będą mogły zostać wyjaśnione podczas publicznej obrony. Mają one charakter drugorzędny i nie obniżają ogólnie wysokiej oceny rozprawy. Stwierdzam zatem, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska p. mgr inż. Rafała Lendy spełnia wymogi, stawiane przed rozprawami doktorskimi przez art. 186 i 187 ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.