

Recenzja

rozprawy doktorskiej pana Krzysztofa Wyciska pt. „Analiza roli N-terminalnej domeny jako czynnika modulującego funkcję domen globularnych receptora *Ultraspiracle*”

Kontekst

Rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Wyciska jest kolejną z serii prac poświęconych badaniom białek całkowicie lub częściowo nieuporządkowanych, jakie od ok. 10 lat prowadzone są w Zakładzie Biochemii Politechniki Wrocławskiej. Tematyka ta jest bardzo ciekawa z wielu względów: białka nieuporządkowane były przez dziesięciolecia pomijane i lekceważone, pomimo, że stanowią aż 30 % wszystkich białek. Dziś w pełni już docenia się ich zalety, do których należą m.in. elastyczność i możliwość dostosowania konformacji do aktualnie pełnionej funkcji. Obranie tych niezwykle białek jako obiektu badań ma jednak swoją cenę: przestają działać standardowe procedury służące charakteryzowaniu wielkości i kształtu białek, ponieważ opracowane były dla białek globularnych. Należy docenić determinację zespołu Zakładu Biochemii w opanowywaniu nowych technik służących ustalaniu właściwości strukturalnych i funkcjonalnych białek nieuporządkowanych, co dokonuje się oczywiście równoległe z próbami umiejscowienia ich roli w różnych procesach życiowych.

„Ofiarami” tego postępu są doktoranci Zakładu Biochemii, na których barki spada nie tylko większość żmudnej pracy laboratoryjnej, na co są przygotowani, ale i konieczność uzupełniania wiedzy z fizyki, statystyki, czy informatyki w celu lepszego wyboru i zrozumienia stosowanych nowych technik badawczych. Kolejną pracą doktorską, którą mam przyjemność recenzować jest rozprawa pana magistra Krzysztofa Wyciska.

Statystyka i zawartość

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Wyciska składa się z sześciu zasadniczych części, uzupełnionych o spis treści, spis skrótów, streszczenie, spis rysunków i tabel oraz materiały dodatkowe i literaturę. W obrębie dostarczonej mi książeczki znalazł się także spis publikacji i zestawienie dokonań naukowo-popularyzatorskich Doktoranta.

W lekturze bardzo pomocny był Wstęp, który w przejrzysty sposób nakreślił problem badawczy, rozpoczynając od wyjaśnienia roli receptorów jądrowych i scharakteryzowania ich rodzajów, poprzez podanie sposobów ich działania, wyszczególnienie elementów struktury z opisem ich cech i funkcji oraz

podanie mechanizmów regulacji ich działania. Ostatnią część Wstępu poświęcono białkom w całości lub w części inherentnie nieuporządkowanym ze szczególnym uwzględnieniem białka *Ultraspiracle* będącego zasadniczym przedmiotem badań pracy doktorskiej.

Nieco rozczarowuje rozdział o ambitnym tytule „Cel pracy”, w którym znajdujemy jeden akapit z dziewięcioma liniami tekstu. Temu zdecydowanie hasłowo potraktowanemu rozdziałowi bardzo pomógłby tekst zamieszczony na początku rozdziału Wyniki na str. 72. Nie można mieć tu zastrzeżeń merytorycznych, ale stopień kondensacji myśli stoi w głębokiej sprzeczności z ogromem pracy włożonej w badania i opracowanie ich wyników.

Rozdział czwarty – Materiały i Metody – wyczerpująco opisuje zarówno pochodzenie wszystkich odczynników, jak i procedury biochemiczne oraz fizyczne metody badań uzyskanych preparatów. Wydaje się, że nie powinno być trudności z odtworzeniem wszystkich opisanych procedur. Zastrzeżenia mam tylko do żargonowego sformułowania „procesować dane” oraz wołającej o pomstę do nieba formy równania 4.4, które zostało zapisane tak, że funkcja „*exp*” została oddzielona od swojego argumentu znakiem mnożenia. Zakładam, że to pomyłka edytorska, a nie kompletny brak zrozumienia matematyki na poziomie dość podstawowym.

Na uwagę zasługuje spora liczba programów komputerowych użytych do analizy wyników. Wynika to z pewnością z nieuporządkowanej struktury badanych preparatów i konieczności użycia wielu komplementarnych narzędzi zastępujących standardowe procedury stosowane do białek globularnych. Rozdział Wyniki rozpoczyna się od krótkiego wstępu zawierającego *de facto* cele pracy. Dalej przedstawione są wyniki analizy informatycznej (*in silico*), które poprzez zbyt rzadki podział na akapity jest mało czytelny w pierwszej części. Niemniej, nie ma zastrzeżeń co do wyników: wykazano mieszaną strukturę białka HaUsp i jednoznacznie zidentyfikowano jego NTD jako fragment inherentnie nieuporządkowany.

W rozdziale 5.2 opisano procedurę otrzymywania i oczyszczania rekombinowanych białek oraz pokazano dowody jakości otrzymanych preparatów. Jest to o tyle ważny rozdział, że jakość preparatu decyduje o wiarygodności wszystkich pozostałych wyników. Podstawowymi preparatami są białka HaUsp oraz jego wersja pozbawiona NTD (HaUsp_ΔNTD).

Część analityczną rozpoczyna rozdział 5.3 od analizy widm dichroizmu kołowego w celu ustalenia zawartości i rodzaju struktur drugorzędowych w obu białkach. Na uwagę zasługuje tu nieoczekiwany wynik z Tabeli 5.1 pokazujący zbliżoną procentową zawartość regionów nieuporządkowanych w obu białkach, a więc sugerujący, że usunięcie sporej domeny NTD, z założenia mocno nieuporządkowanej, nie wpływa na procentowy udział takich regionów.

Bardzo ciekawą technikę pokazano w rozdziale 5.4, a mianowicie badania wymiany izotopowej proton-deuter. Wyniki jednoznacznie pokazały bardzo dużą ekspozycję na rozpuszczalnik całej domeny NTD, co przekonująco klasyfikuje ją jako strukturę nieuporządkowaną.

W rozdziale 5.5 opisany jest nieco nieoczekiwany przebieg zmian promienia hydrodynamicznego HaUsp w funkcji stężenia soli denaturującej. Obserwowany efekt polegał na zmniejszeniu promienia białka w dla stężenia soli denaturującej równej około 300 mM, a więc wciąż stosunkowo niskiego w porównaniu z tym potrzebnym do całkowitego rozfałdowania HaUsp: 1,75 M. Autor tłumaczy ten efekt wpływem obecności soli na stabilność otoczki hydratacyjnej. Moim zdaniem, dużo bardziej prawdopodobna wersja to ekranowanie oddziaływań, które pozwala nieuporządkowanej części białka na przyjęcie bardziej zwartej konformacji niż w czystym buforze. Zjawisko takie było obserwowane dla innych białek nieuporządkowanych badanych w Zakładzie Biochemii (dodatek NaCl i CaCl₂) i z pewnością powinno być znane autorowi. Łatwo to sprawdzić dodając do roztworu białka sól niedenaturującą, np. NaCl, w podobnym stężeniu. Być może takie badania uzupełniające pozwoliłyby na lepszą ocenę stopnia rozfałdowania w obecności soli denaturującej, bo znany byłby wpływ samej siły jonowej na zapadanie „elektrostatyczne” białka.

W rozdziale 5.6 autor zawarł wyniki analizy oddziaływania HaUsp i HaUsp_ΔNTD ze specyficznymi sekwencjami DNA. Wykazano, że oba rodzaje białek wiążą się z badanymi sekwencjami DNA, a obecność domeny NTD wyraźnie wpływa na charakter tego oddziaływania.

Następne rozdziały przynoszą wyniki analizy właściwości hydrodynamicznych i strukturalnych białek HaUsp i HaUsp_ΔNTD mające na celu zarówno określenie ich struktury jak i skłonności do oligomeryzacji. Ze względu na częściowo nieustrukturyzowaną postać białek jest to zadanie bardzo trudne. Białka takie wymykają się standardowym procedurom opracowanym dla białek globularnych o zwartej budowie. Interpretacja wyników wymaga dużej ostrożności i holistycznego potraktowania problemu. W rozdziale 5.7 analizowane są wyniki ultrawierowania obu badanych białek. Zarówno w wirowaniu szybkościowym jak i równowagowym wykazano tendencję białek do dimeryzacji już od najniższych stosowanych stężeń (ok. 0,2 mg/ml). Zaawansowane modele analizy pozwoliły w wirowaniu szybkościowym wyznaczyć masę cząsteczkową monomerów i oligomerów oraz udział obu składników w funkcji stężenia. W wirowaniu równowagowym udało się nawet wyznaczyć stałe dysocjacji dimerów obu białek. Wykazano, że obecność domeny NTD osłabia stabilność dimeru.

Rozdział 5.8 nosi tytuł „Wyznaczanie parametrów hydrodynamicznych białek za pomocą SEC-MALS”, ale analizowana jest tylko masa cząsteczkowa białek wyznaczana ze statycznego rozpraszania światła. Warto na przyszłość zdawać sobie sprawę z różnicy pomiędzy parametrami wyznaczanymi ze współczynnika tarcia f (dyfuzja, sedymentacja, ultrawierowanie), a tymi z pomiarów rozproszeniowych (SLS, SAXS, SANS). W wynikach SEC-MALS na uwagę zasługuje niewielki udział agregatów w próbce HaUsp_ΔNTD w zakresie niskich stężeń, dla których w ultrawierowaniu wyraźnie widoczne były piki przypisywane dimerom. Również dla pełnej wersji białka HaUsp piki oligomerów zaznaczono jako wyraźnie mniejsze niż te odpowiadające monomerom. Należy zaznaczyć, że techniki rozproszeniowe są bardzo czułe na oligomeryzację, ponieważ mierzony sygnał jest proporcjonalny nie tylko do stężenia wagowego, ale i masy cząsteczkowej, a więc dimery wyraźnie widoczne w ultrawierowaniu powinny

wybić się znacznie mocniej w technice MALS. Z opisu metody nie wynika, czy pokazano wyniki przeliczone na stężenie wagowe, czy w postaci „surowej”, a więc ważone po prostu sygnałem światła rozproszonego na próbce. Jakościowo obraz MALS zgadza się z wynikami ultrawiwowania, natomiast ciekawy jest właśnie ten efekt słabszej oligomeryzacji obserwowany w SEC-MALS. Być może jest on wynikiem faktu, że pomiar odbywa się bezpośrednio po rozdiale chromatograficznym, który najprawdopodobniej rozbił wszystkie oligomery na monomery, a oligomeryzacja dopiero zaczyna zachodzić. Pod tym względem technika ta nie ma sobie równych, bo w żadnej innej pomiar nie odbywa się natychmiast po rozdiale chromatograficznym. Jej wyniki powinny być zawsze stosowane jako punkt odniesienia, a odchylenia wartości masy cząsteczkowej uzyskanych innymi metodami (lub po prostu po dłuższym czasie od rozdziału) powinny być odpowiednio interpretowane.

Rozdział 5.9 zawiera wyniki SAXS oraz bardzo rozbudowaną i ciekawą analizę tych wyników. Całość rozpoczyna się od analizy kształtu i rozmiarów cząsteczek HaUsp i HaUsp_ΔNTD w różnych stężeniach. Zgrubne oszacowanie stopnia zwartości struktury uzyskano z wykresu Kratky'ego poprzez porównanie go z wykresem dla mioglobiny, a więc typowego białka globularnego. Szkoda, że zabrakło na Rys. 5.18A przykładowego wykresu dla struktur innego typu, np. kłębka i pałeczki. Wydaje się również, że dane dla mioglobiny są dość kiepskiej jakości i z dużym tłem, które w sposób sztuczny wygenerowało na wykresie Kratky'ego wysoka parabolę niepotrzebnie zaciemniającą obraz i zwracającą na siebie główną uwagę czytelnika. Ten efekt to artefakt i lepiej byłoby go nie eksponować. Z przebiegu wykresów uzyskanych dla HaUsp i HaUsp_ΔNTD wyraźnie widać, że ich budowa ma charakter pośredni między strukturą zwartą jak dla mioglobiny a rozwlekłą jak dla kłębka. Tego ostatniego niestety zabrakło na rysunku, a przydałoby się to dla czytelnika mniej biegłego w interpretacji wyników SAXS.

Wykresy Guiniera pozwoliły na obliczenie promieni żyracji, a w połączeniu z danymi odniesienia dla BSA – również masy cząsteczkowej mierzonych próbek HaUsp i HaUsp_ΔNTD w zakresie dość wysokich stężeń (1 – 8 mg/ml). Dla obu białek zarówno wartości R_g jak i M_w przekraczały te uzyskane z MALS i ultrawiwowania. Być może, że powodem jest efekt wspomniany przeze mnie wcześniej – eksponowanie oligomerów poprzez wpływ czynnika M_w , ale równie prawdopodobny jest wpływ czasu lub sposobu przechowywania i traktowania próbek (zagęszczanie?). Bardzo dobrym odniesieniem dla SAXS są wyniki MALS (szczególnie z opcją DLS), ale pod warunkiem, że wagi stosowane w analizie były takie same, a tego niestety nie wiemy z opisu.

Rozkłady wielkości uzyskane z analizy opartej na odwrotnej transformacji Fouriera są spójne z wynikami pomiaru masy cząsteczkowej i również wskazują na dominację sygnału pochodzącego z oligomerów. Mam co najwyżej uwagę do interpretacji kształtu $p(r)$: wydaje mi się, że asymetrię zbliżoną do tej obserwowanej można zobaczyć również dla cząsteczek spłaszczonych, a więc ogólnie – niesferycznych.

Bardzo ciekawa jest analiza wyników SAXS oparta na modelowaniu kulkowym, zarówno w wersji „sztywnej” (DAMMIN), jak i „elastycznej” (EOM). Przekonująca jest argumentacja z wyników DAMMIN

wskazująca na wydłużony kształt obu białek w wersji dimerycznej. Z kolei program EOM wygenerował rodziny konformacji pozwalające na dopasowanie przybliżonego modelu atomowego w dimerach obu białek.

Należy docenić wysiłki autora włożone w interpretację wyników SAXS, ponieważ badane cząsteczki wymykają się standardowym metodom analizy ze względu na swoją częściowo nieuporządkowaną strukturę.

Uwaga techniczna: we wszystkich innych rozdziałach poza 5.9 rozmiary cząsteczek podawane są w nanometrach, a w rozdziale 5.9 – w Ångstrmach. W zasadzie jestem skłonny się zgodzić z taką konwencją, bo zastosowano jednostki zwyczajowo używane w konkretnych technikach i na pewno ułatwia to zrozumienie wyników przez zaawansowanego czytelnika. Ale dla porządku warto byłoby to odnotować np. na początku rozdziału „Wyniki” lub jednak zdecydować się na ujednoczenie jednostek.

Praca zawiera 214 starannie dobranych odnośników literaturowych, w zestawieniu których nie znalazłem żadnego błędu. Znajduje się tu również ogromna liczba starannie wykonanych wykresów, rysunków i tabel. Od strony edytorskiej praca wypada bardzo korzystnie.

Dorobek naukowy pana mgr. Krzysztofa Wyciska nie budzi wątpliwości: praca opublikowana w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu oraz liczne wystąpienia na konferencjach międzynarodowych pozwalają spokojnie myśleć o jego ewentualnej karierze naukowej.

Podsumowanie

Uważam, że przedstawiona praca doktorska mgr Krzysztofa Wyciska pt. „Analiza roli N-terminalnej domeny jako czynnika modulującego funkcję domen globularnych receptora *Ultraspiracle*” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę przemyślany plan pracy i jego systematyczną realizację z wykorzystaniem najnowocześniejszych metod badawczych, **wnoszę również o wyróżnienie tej rozprawy.**

Jacek Gapiński

Ponieważ nie wszędzie w tekście recenzji jasne jest co jest „zarzutem”, a co tylko komentarzem, zamieszczam poniżej listę uwag, na które oczekuję choć krótkiego komentarza ze strony autora:

- 1) Rozdział „Cel pracy” zbyt ubogi
- 2) Żargon („procesować dane”)
- 3) Równanie 4.4
- 4) Analiza bioinformatyczna – ogromne akapity
- 5) Rozdział 5.5 – czy początkowy spadek wielkości promienia mógł wynikać z zapadania struktury na skutek zwiększenia siły jonowej?
- 6) Rozdział 5.8 – brak wyników określonych w tytule rozdziału (parametry hydrodynamiczne vs M_w)
- 7) Rozdział 5.8 – jakiego rodzaju rozkłady masy uzyskano z MALS – przeliczone na stężenia, czy „surowe” uzyskane z samego natężenia sygnału?
- 8) Rozdział 5.9 – kształt wykresu Kratky’ego dla mioglobiny i brak wykresów porównawczych dla bardziej „luźnych” struktur
- 9) Rozdział 5.9 – czy asymetryczny kształt $p(r)$ można uzyskać tylko dla cząsteczek wydłużonych?
- 10) Rozdział 5.9 – jednostki (Å vs nm)