



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

Warszawa, 15.03.2023.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Małgorzaty Krasowskiej

Pani mgr Joanna Małgorzata Krasowska przedstawiła do oceny rozprawę doktorską pod tytułem „*Badania metodami biofizycznymi procesu przyjmowania struktury natywnej i właściwości białek z rodziny GFP*”, wykonaną w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem dr hab. Beaty Wielgus-Kutrowskiej.

Praca doktorska jest oparta na materiale badawczym zawartym w pięciu artykułach, opublikowanych w latach 2010-2021 i jednym manuskrypcie w przygotowaniu. Doktorantka jest pierwszą autorką w czterech spośród tych artykułów. Praca, napisana w języku polskim, ma charakter rozprawy w układzie klasycznym, zawierając kolejno Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Podsumowania i Bibliografia, poprzedzone zwięzłym Streszczeniem.

Tytuł rozprawy precyzyjnie opisuje jej treść, przedstawiając obiekty pracy – rodzinę GFP (zielonych białek fluorescencyjnych), przedmiot badań – proces ich zwijania do struktury natywnej oraz metodologię – metody biofizyczne. Wstęp, liczący 32 strony, rozpoczyna się od podania definicji biofizyki, jako dziedziny badań procesów życiowych metodami fizykochemicznymi, a następne jego części poświęcone są opisowi zjawiska fluorescencji, wraz z krótkim omówieniem znaczników fluorescencyjnych, następnie elementarnemu omówieniu właściwości białek, ze szczególnym naciskiem na zjawiska ich zwijania i agregacji, a na koniec opisowi rodziny GFP, wraz z mechanizmem powstawania szczególnego fluoroforu tych białek i przedstawieniem aktualnego stanu wiedzy na temat ich zwijania i agregacji. Opis ten uwzględnia białko dzikie i jego najważniejsze mutanty o właściwościach użytkowych. Wstęp napisany jest w sposób wyważony: zawiera niezbędne minimum informacji ogólnych, ale tam, gdzie będzie to potrzebne dla wprowadzenia czytelników w zagadnienia badań własnych, takich jak mechanizm i kinetyka procesu zwijania białek GFP, Doktorantka płynnie przechodzi do opisów szczegółowych, nie tracąc przy tym płynności i klarowności narracji. Drobiazgowo opisany jest problem licznych ścieżek zwijania białka (lub licznych koncepcji na ten temat). W ostatniej części wstępu Autorka wskazuje na luki w dotychczasowym opisie agregacji GFP. Wstęp jest adekwatnie zilustrowany, a rysunki własne



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

Autorki są bardzo starannie dopracowane również pod względem wizualnym. Nie mam uwag krytycznych do tej części rozprawy.

Następnie, na str. 46 znajduje się jednostronicowy rozdział Cel Pracy. Doktorantka wymienia w nim szereg aspektów badań nad procesem zwijania białek GFP, które jej zdaniem nie zostały dostatecznie zbadane i na tej podstawie formułuje pięć pytań konstytuujących cel i plan swoich badań. Dotyczą one zwijania białka *de novo* (w odróżnieniu od drobiazgowo zbadanego uprzednio refoldingu), związków między zwijaniem i agregacją białka, a także potencjalnej funkcji fotoochronnej GFP. Uważam takie zwięzłe i precyzyjne potraktowanie celu rozprawy za wzorcowe.

Kolejną częścią rozprawy jest opis wykorzystanych przy jej realizacji materiałów i zastosowanych metod badawczych. Są to kolejno nadekspresja i oczyszczanie wykorzystywanych wariantów białek EGFP z *E. coli*, dobór środowisk reakcji, a dalej podstawowy opis metod badawczych: spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej w zakresie UV-vis, dichroizmu kołowego, ultrawirowania analitycznego, techniki zatrzymanego przepływu oraz spektroskopii EPR. Następnie Doktorantka zamieszcza protokoły poszczególnych eksperymentów. Są one przedstawione w sposób narracyjny, z wyjaśnieniem przyczyn przyjęcia kluczowych decyzji technicznych, a w przypadku badań EPR również zilustrowane schematami tworzenia trwałych rodników, wykrywanych tą metodą. Ostatnim podrozdziałem części Materiały i Metody jest opis wykorzystanych technik analizy danych. Również ta część rozprawy znakomicie spełnia swój cel, czyli umożliwienie powtórzenia opisywanych eksperymentów. Oceniam ją jako ponadprzeciętną, ze względu na dokładne przedstawienie przyczyn wykorzystania takich a nie innych metod i protokołów. Znacznie ułatwi to następcom kontynuację i dalszy rozwój opisywanych badań.

Od str. 70 rozprawy zaczyna się jej część główna – Wyniki, która zawiera również dyskusję otrzymanych danych. Zastosowano przyjazną dla czytelnika strukturę opisu, z cząstkowymi podsumowaniami i interpretacjami wyników, zamieszczonymi po każdej serii eksperymentalnej. Doktorantka rozpoczyna opis eksperymentów od badań stanu różnych wariantów EGFP w pH 1 i w pobliżu tej wartości. Celem tych badań, wykonanych za pomocą spektroskopii elektronowych i ultrawirowania, było ustalenie odpowiednich warunków startowych dla eksperymentów zatrzymanego przepływu z użyciem skoku pH. Autorka potwierdziła słuszność wyboru pH 1, jako



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

środowiska wymuszającego najmniejszą możliwą zawartość elementów drugorzędowych struktury. Bardzo ciekawym wynikiem było stwierdzenie za pomocą ultrawirowania dużej zawartości zagregowanych form białka w preparatach o nienatywnej strukturze. Zjawisko to nie było widoczne dla innych zastosowanych technik badawczych.

Badania kinetyki procesów zwijania i rozwijania EGFP Doktorantka rozpoczęła od eksperymentów rozwijania natywnie zwiniętego białka z chromoforem przez skok pH od 8 do 1. Proces ten był dość szybki, o charakterze monoeksponencjalnym. Następnie zbadała proces odwrotny, zwijając warianty EGFP z utworzonym i nieutworzonym chromoforem przez skok pH od 1 do 8. Zgodnie z przewidywaniami opartymi na danych literaturowych, ten proces jest znacznie bardziej skomplikowany. Autorka wstępnie wyróżniła w nim cztery skale czasowe w zakresie od milisekundowej do minutowej/godzinowej. Wykazała też różnice w zachowaniu próbek o różnych stężeniach, co doprowadziło do wniosku o istotnej roli agregacji białka EGFP w procesie refoldingu. Z uwagi na ewidentną separację czasową procesu tworzenia struktury białka i dużo wolniejszego dojrzewania chromoforu, pomiary zatrzymanego przepływu zostały uzupełnione o obserwacje wykonane z użyciem ręcznego mieszania próbki i detekcji sygnałów fluorescencyjnych w okresie do 12 h. W ten sposób Autorka uzyskała drobiazgowy opis ilościowy poszczególnych aspektów procesu zwijania, przedstawiony w formie tabel czasów charakterystycznych dla poszczególnych form białka i aspektów procesu. Zaobserwowała również rozbieżność między dwiema metodami swoich badań, mianowicie proces eksponencjalnego wzrostu fluorescencji aminokwasów aromatycznych EGFP był jak gdyby dostosowany do metody – tzn. w eksperymentach zatrzymanego przepływu nasyczał się w czasie 100-krotnie krótszym, niż podczas eksperymentów wykonanych w spektrofлуorymetrze. Autorka wykonała szereg badań kontrolnych procedur mieszania próbki – najbardziej jej zdaniem różnicujących te eksperymenty, ale nie znalazła przyczyny rozbieżności. Wydaje mi się, że alternatywną przyczyną może być dużo większy kontakt białka z powierzchnią w mikserze aparatu stopped-flow. Można spekulować, a nawet sprawdzić eksperymentalnie, czy przejściowa adsorpcja niezwinętego, lub częściowo zwiniętego białka EGFP na powierzchni metalicznej (lub jakiegokolwiek innej), albo choćby zderzenia z tą powierzchnią, nie pozwalają na mechanochemiczną konwersję energii i przeskoczenie barier energetycznych w procesie zwijania.



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

W kolejnej części rozprawy Doktorantka wykorzystała omówione wyniki doświadczalne dla wariantów EGFP, wraz z danymi literaturowymi, do zbudowania modeli zwijania *de novo* i ponownego zwijania białek GFP, poszerzonego o proces agregacji. Modele te, przedstawione na Schemacie 4, są logiczne i dobrze osadzone w danych doświadczalnych. Bardzo ważnym wnioskiem, płynącym z tej części badań jest konieczność monitorowania agregacji białek GFP, w tym białek fuzyjnych, zawierających GFP, dla uniknięcia nieprzyjemnych, a nawet potencjalnie zabójczych artefaktów doświadczalnych.

Idąc tym tropem, w następnej części wyników rozprawy, Autorka zastosowała ultrawiórowanie analityczne z detekcją fluorescencyjną i absorpcyjną do zbadania związku między agregacją białka EGFP zwijanego *de novo* i jego zdolnością do utworzenia konformacji natywnej z dojrzałym, funkcjonalnym chromoforem w tym procesie. W tych badaniach uzyskała bardzo jednoznaczny wynik, świadczący o tym, że agregują praktycznie wyłącznie formy niezawierające chromoforu, natomiast ich udział w całości produktu procesu zwijania *de novo* jest znaczny. Wynik ten, według stwierdzenia Doktorantki, z którym się w pełni zgadzam, ma duże znaczenie praktyczne, gdyż twórcy i użytkownicy fuzyjnych znaczników fluorescencyjnych z rodziny GFP mogą znacznie przeszacowywać ich ilość. Niestety forma prezentacji danych na Rys. IV.11. nie pozwala recenzentowi na docieczenie, jaki właściwie procent całości białka uległ agregacji w przedstawionym eksperymencie.

W kolejnym rozdziale Doktorantka zmierzyła się z zagadnieniem dojrzewania chromoforu białka GFP, wykorzystując do tego celu mutant S65T-GFP i jego nieświecący odpowiednik z dodatkową mutacją G67A. Korzystając ze specyficznych zmian masy białka, towarzyszących procesowi tworzenia chromoforu, postanowiła zweryfikować proponowane w literaturze warianty kolejności etapów (utleniania i dehydratacji). Eksperyment, oparty na trawieniu białek papainą i analizie zbioru peptydów pochodnych, nie dał w pełni jednoznacznych wyników, w pewnej mierze z powodu problemów eksperymentalnych. Wykryto jedynie produkt o masie –18 Da, co sugeruje ścieżkę dojrzewania, w której dehydratacja poprzedza utlenianie chromoforu, przynajmniej dla wersji S65T. Ciekawe tu byłoby porównanie z innymi wariantami GFP. Być może możliwe w chwili obecnej byłby technicznie możliwy pomiar masy całego białka z wymaganą rozdzielczością?



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

W przedostatniej części wyników rozprawy Doktorantka zajęła się odpowiedzią na pytanie, czy chromofor obecny w białku EGFP może pełnić funkcję fotoochronną. Kwestię tę podjęła w kontekście doniesień literaturowych, wskazujących, że pewne białka z szeroko pojętej rodziny GFP mogą pełnić taką funkcję *in vivo*, a pewne warianty syntetyczne mogą fotokatalitycznie generować toksyczne wolne rodniki tlenowe. W tym celu posłużono się stabilizacją wolnych rodników za pomocą pułapek spinowych i detekcji EPR trwałych rodników. Stwierdzono, że EGFP nie generuje rodników pod wpływem światła, natomiast ma istotną zdolność do dezaktywacji tlenu singletowego i rodników ponadtlenkowych, wytwarzanych fotochemicznie w układzie eksperymentalnym. Procesowi temu towarzyszy fotowygaszanie chromoforu EGFP, co potwierdza jego funkcję fotoochronną.

Ostania część wyników rozprawy poświęcona została zastosowaniu mutantów monocysteinowych C48S i C70S do badania procesu zwijania EGFP. Stanowią one bardzo dogodne modele badawcze, gdyż wymienione reszty Cys nie tworzą mostków disiarczkowych, a więc jak stwierdza Doktorantka, można próbować modyfikować je za pomocą znaczników spinowych czy fluorescencyjnych, lub w inny sposób, na przykład przez „prawie izostrukturalną” zamianę Cys na Ser. Oba mutanty otrzymano za pomocą nadekspresji w *E. coli*, a następnie zbadano ich właściwości spektroskopowe i odporność na denaturację. Stwierdzono, że mutant C48S zachowuje się podobnie do białka natywnego, natomiast mutant C70S jest mniej odporny na denaturację z powodu zaburzenia struktury trzeciorzędowej. Wskazane jest zatem rozwijanie technik badawczych w oparciu o analogi podstawione na reszcie Cys48, która jest mniej istotna dla stabilności białka EGFP.

Rozprawę wieńczy trzystronicowe Podsumowanie, w którym Autorka przypisuje zaprezentowane w rozprawie wyniki do poszczególnych publikacji, a także zwięźle i klarownie podsumowuje swoje dokonania, omówione powyżej, na pierwszy plan wysuwając swoje pionierskie badania wzajemnych związków zwijania i agregacji białek z rodziny GFP i możliwej interferencji poszczególnych etapów tych procesów z zastosowaniami praktycznymi tych białek. Rozprawa opatrzona jest wyczerpującą bibliografią, liczącą blisko 300 pozycji.



Prof. dr hab. Wojciech Bal
wbal@ibb.waw.pl
tel. +48225922370

Należy zwrócić uwagę na fakt, że, co oczywiste przy pracach wieloautorskich, niektóre eksperymenty przedstawionych w doktoracie zostały wykonane przez współpracowników. Doktorantka każdorazowo precyzyjnie opisała ten wkład. Mnogość zastosowanych i spójnie wykorzystanych metod eksperymentalnych jest imponująca. Niemniej, biorąc również pod uwagę fakt, że niektóre wyniki badawcze zostały opublikowane nieco dawniej, w tym w latach 2011 i 2014, chciałbym poprosić o komentarz, czy i o jakie obecnie dostępne techniki Doktorantka rozszerzyłaby swoje badania, gdyby było to możliwe.

Aspekt graficzny i poziom edytorski rozprawy są znakomite. Równie dobry jest styl. Rozprawę czyta się z łatwością, nie gubiąc, skądinąd zawiłych, wątków narracji.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska p. mgr Joanny Małgorzaty Krasowskiej spełnia wymogi, stawiane przed rozprawami doktorskimi przez art. 186 i 187 ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pragnę również wniesć o wyróżnienie tej rozprawy.

W. Bal