



Joanna Grzyb, dr hab.

Wrocław, 29.09.2023

**Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Aleksandry Ferenc-Mrozek,
zatytułowanej „Zastosowanie wybranych metod fizyki i biologii molekularnej w bada-
niach struktury i oddziaływań białek z rodziny DcpS”**

Praca doktorska pani mgr Aleksandry Ferenc-Mrozek ma układ typowy dla prac doktorskich: rozpoczyna się streszczeniem i rozbudowanym wstępem, po których następuje przedstawienie celów pracy oraz stosowanych metod. Osobne dwa rozdziały poświęcone zostały wynikom badań własnych. Doktorantka zdecydowała się na rozdzielenie badań wpływu etykiety histydynowej na aktywność, strukturę i stabilność badanych enzymów, oraz badań dotyczących biofizycznej charakterystyki procesu agregacji badanych białek. Każda część ma wydzielone wnioski i dyskusję. Rozprawa zakończona jest rozdziałem Podsumowanie, łączącym cząstkowe wnioski w szersze ujęcie, oraz listą cytowanych referencji. Doktorantka dołączyła również wykaz swoich publikacji naukowych. W skład rozprawy wchodzi wykaz stosowanych skrótów, nieco nietypowo umieszczony na końcu rozprawy, a nie na początku.

Wstęp, liczący 39 stron, stanowi dobre wprowadzenie do zrozumienia wyników badań przedstawionych w dalszej części rozprawy. Obszernie omówiona została struktura mRNA i jego metabolizm, jak i patologie związane z nieprawidłowym przetwarzaniem mRNA. W tym miejscu brakuje mi jedynie zauważania, choćby na marginesie głównej narracji, że w organizmach żywych istnieją także inne formy RNA, w tym np. krótkie RNA, mające wpływ na metabolizm mRNA. Bardzo proszę doktorantkę o krótkie uzupełnienie tych informacji w trakcie prezentacji doktorskiej.

Bardzo dokładnie omówione zostały dotychczasowe informacje białko Decapping Scavenger (DcpS), co jest zrozumiałe ze względu na temat rozprawy. Czytelnik dowiaduje się o homologiach sekwencji i struktury tych enzymów u różnych organizmów, a także o zróżnicowaniu mechanizmu i specyficzności substratowej. Równą wagę przyłożono do omówienia procesu agregacji i zwijania białek, z uwzględnieniem roli fizjologicznej i patologicznych wersji tego procesu. Wartościowe jest także uwzględnienie krótkiej charakterystyki innych enzymów, związanych z hydrolizą czapeczki mRNA. Zastrzeżenia mam jedynie do rozdziału 1.2.8 zatytułowanego „Czy ludzki Dcps jest ciekawym obiektem badań z medycznego punktu widzenia?”. Przy tak sformułowanym tytule, czytelnik oczekuje jasno sformułowanej odpowiedzi na stawiane pytanie, tymczasem dostając jedynie kilka faktów literaturowych, bez jasnego z nich wniosku.

Dobrym pomysłem Doktorantki jest włączenie w treść wstępu „Słowniczków” - graficznie wyróżnionej tabeli, grupującej definicję najważniejszych, zdaniem doktorantki, pojęć,



używanych w dalszym tekście. Warto byłoby jedynie taki słowniczek uwzględnić w spisie treści jako jedną pozycję, a nie kilka rozrzuconych w różnych miejscach.

Cele badawcze pracy doktorskiej zostały określone w sposób precyzyjny, nie pozostawiając wątpliwości, że stawiany problem jest ważki, a jego rozwiązanie będzie istotną nowością w dziedzinie szeroko rozumianej biofizyki.

Metody stosowane w pracy zostały opisane w większości przypadków w sposób wystarczający, choć z mojego punktu widzenia można było pominąć omówienie wielu naprawdę technicznych elementów techniki PCR czy konstruowania wektorów ekspresyjnych. Na podobnej zasadzie Doktorantka nie tłumaczy podstaw fizycznych np. przy technikach fluorescencyjnych. Brakuje mi natomiast informacji o technice FTIR. Nie jest tu usprawiedliwieniem zlecenie badania zewnętrznemu laboratorium. Bardzo proszę, aby doktorantka podała informacje, jakie urządzenie zastosowano do pomiarów, a przede wszystkim, w jakim trybie mierzona była próbka (roztwór? uwodniony film na kryształ ATR?). Podobnie, proszę o wyjaśnienie, jak przygotowane i obrazowane były preparaty do techniki TEM (kropla naniesiona i osuszona na siatce? jaki faktyczny kontrast został zastosowany („najczęstszy”?) . Nie udało mi się także znaleźć informacji o liczbie powtórzeń poszczególnych eksperymentów (np. sączenia molekularnego zdenaturowanego białka), co jest niezwykle istotne dla interpretacji przedstawianych wyników. Bardzo proszę o, w miarę możliwości, uzupełnienie tych informacji w trakcie prezentacji doktorskiej.

W kilku miejscach w składzie buforów pojawia się NaClO_4 , w miejsce NaCl . Dlaczego stosowano tę sól, i czemu tylko w wybranych eksperymentach (CD?). Czy zmiana soli nie mogła wpływać na przebieg eksperymentu i spójność wyników uzyskanych różnymi metodami?

Pierwsza część wyników własnych to rozdział uzasadniający wybór właściwej formy białek DcpS do dalszych badań. Rozważano białko z Histagiem na N- i C-końcu, jak również wersję z odciętym tagiem. Ze względów praktycznych, wygodniej jest pracować z białkiem posiadającym tag, jednakże jego obecność może zmieniać właściwości białek. Doktorantka słusznie więc udowadnia, że wybrana przez nią wersja białka z Histagiem na C-końcu odpowiada wersji bez metki. W tym miejscu nie mogę jednak zgodzić się z wnioskiem doktorantki przy analizie struktury drugorzędowej białek DcpS (rozdział IV.3). Po pierwsze, porównanie podobieństwa wykresów kołowych jest mało precyzyjne; sięgnięcie do danych w tabeli pokazuje, że istnieją istotne różnice w zawartości procentowej poszczególnych elementów struktury drugorzędowej między formami wyjściowymi. O różnicach w strukturze drugorzędowej świadczy też bezpośrednie porównanie kształtu widm, przedstawionych na rys. IV B - białko z *A. suum* ma wyraźnie zmieniony, w porównaniu z białkiem z *H. sapiens* i *C. elegans*, stosunek intensywności sygnału dla 208 nm względem sygnału dla 222 nm. Różnice te są znacznie większe niż różnice pomiędzy wersjami N/C-tagowanymi. Wydaje się wręcz, że kształty widm dla białek N/C-tagowanych są identyczne z widmem dla białka bez metki, a pokazane różnice w intensywności mogą wynikać jedynie z niedokładności metody oznaczenia stężenia białka. Co więcej, wyciąganie wniosku o wysokiej homologii strukturalnej tylko na podstawie procentowej zawartości elementów struktury drugorzędowej jest wysoce nieuprawnione; bardzo prawdopodobna jest sytuacja, w której te proporcje będą identyczne dla różnych białek, natomiast rozmieszczenie przestrzenne elementów może być znacząco różne. Obecnie łatwo jest jednak uzyskać przynajmniej przybliżony model struktury trzeciorzędowej białek, czy to korzystając



z bazy alphaFold czy algorytmów modelowania homologicznego. Czy doktorantka próbowała takiego podejścia? Czy wyniki potwierdzają wniosek o wysokiej homologii strukturalnej?

Ciekawą jest obserwacja, że pomimo braku wpływu na strukturę i aktywność, obecność metki Histag na N-końcu białka powoduje problemy z oczyszczaniem, spowodowane niehomogennością nadprodukowanego białka. Brakuje mi jednak próby wyjaśnienia, dlaczego akurat taka lokalizacja peptydu 10xHis może losowo destabilizować niektóre z cząsteczek białka. Czy nie jest bez znaczenia, że tag na C-końcu składał się tylko z sześciu reszt histydynowych?

Druga część wyników własnych jest obszernym działem, dotyczącym mechanizmów agregacji i formowania włókien amyloidowych przez białka DcpS pochodzące z *H. sapiens*, *C. elegans* i *A. suum*. Doktorantka identyfikuje m.in. rejony o wysokiej tendencji do agregacji. Główna część dokonania to charakterystyka biofizycznej za pomocą szeregu metod, w tym skaningowej kalorymetrii różnicowej, skaningowej fluorymetrii różnicowej, mikroskopii konfokalnej i TEM, pomiarów dynamicznego rozpraszania światła, dichroizmu kołowego w zakresie bliskiego UV czy obserwacji zmian fluorescencji tioflawiny, wiążącej się do rejonów typu amyloidowego białek. Przedstawione wyniki pokazują, że każde z badanych białek agreguje, choć ich temperatury agregacji są różne. Przebieg kinetyki agregacji nieco różni się w zależności od badanego homologu DcpS. Doktorantce udało się również pokazać, że zjawisko separacji faz ciecz-ciecz może mieć znaczenie przy powstawaniu włókien amyloidowych z badanych białek.

Mam wątpliwości co do interpretacji termogramów. Doktorantka twierdzi, że niemożliwe jest wyznaczenie linii bazowej, ponieważ brak jest odcinków quasi liniowych. Moim zdaniem takie odcinki jak najbardziej daje się wyróżnić, choć rzeczywiście, nie są one składową jednej prostej. Dopasowanie tła dopuszcza nie tylko linię prostą. Czy takie podejście było rozważane? Zgadza się, że niemożliwe jest wprost wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu agregacji - można się jednak pokusić o dekonwolucję sygnału, bazując na założeniach o szerokości i kształcie pasm dla podstawowego endotermicznego przejścia denaturacyjnego. Oczywiście, wynik będzie obciążony pewnym błędem, natomiast da pojęcie o procesie. Czy Doktorantka próbowała wykonać takie dopasowania?

Opisując eksperyment z wiązaniem tioflawiny, Doktorantka wielokrotnie zwraca uwagę na wysoki poziom fluorescencji, w szczególności początkowy. Jednakże, jednostki fluorescencji są arbitralne, a intensywność sygnału zależy od parametrów pomiarowych, więc trudno jest powiedzieć, że 15 000 j.u to wysoki poziom. Zgadza się oczywiście, że porównanie intensywności emisji tioflawiny inkubowanej z białkiem denaturowanym i niedenaturowanym jest uprawnione, i można mówić o X-razy wyższym poziomie fluorescencji, trudno jednakże stwierdzić, że poziom jest wysoki. Czy próbowano odnieść otrzymane wartości do jakiegoś standardu zewnętrznego, np. białka tworzącego dobrze scharakteryzowane struktury amyloidowe?

Widma FTIR potwierdzają bezspornie powstawanie struktur amyloidowych. Dekonwolucja pasma Amid I pozwala oszacować skład struktury drugorzędowej. Czy Doktorantka próbowała przeprowadzić taką analizę? Czy skład struktury drugorzędowej dla białka niezagregowanego był zbliżony z danymi uzyskanymi techniką CD?

Bardzo proszę także o pokazanie w trakcie obrony dobrej jakości rysunku V.17 i jego dyskusję. Przebieg zapisu przewodnictwa (jak interpretuję dodatkowe linie na chromatogramie) sugeruje, że skala czasowa (oś X) dla białka podanego w 1 M chlorku guanidyny jest inna, niż



dla pozostałych rozdziałów. Stąd też możliwe, że chromatogram dla 1 M GdnHCl można interpretować jako mieszaninę stanów z 0.5 M GdnHCl i 1.5 M GdnHCl.

Jednym z problemów, które Doktorantka próbowała rozwikłać, była kinetyka agregacji DcpS. Z przeprowadzonych pomiarów wynikałoby, że brakuje początkowego etapu nukleacji. Dla weryfikacji postawionych hipotez, przetestowano między innymi zasiewanie krzyżowe. Czy sprawdzono procedurę odwrotną, a mianowicie pozbycie się z roztworu białka ewentualnych zarodków nukleacji, czy to przez filtrowanie, ultrawierowanie czy wręcz przepuszczenie preparatu białkowego przez kolumnę do sączenia molekularnego tuż przed eksperymentem? Nieco problematyczna jest hipoteza nukleacji w „martwym czasie” pomiędzy wyjęciem z lodówki a pomiarem. Cos takiego można by łatwo zweryfikować, obserwując zmiany przy podgrzewaniu próbki od 4°C wzwyż. Czy przeprowadzano takie próby? Pewne informacje o zbliżonej wadze zawiera nawet wykresu V.5.A.

Doktorantka nie rozstrzyga, czy formowanie amyloidu przez DcpS ma znaczenie fizjologiczne lub patologiczne. W tym miejscu proszę Doktorantkę o komentarz, wziawszy pod uwagę stosowane przez nią w badaniach stężenia białek i realne stężenia badanych białek w komórce oraz obecność czynników potencjalnie zaburzających badany proces. Czy możliwe jest, w świetle wyników przedstawionej pracy doktorskiej, powstanie amyloidu DcpS in vivo? Ciekawe wydaje mi się też potencjalne zastosowanie włókien amyloidowych w biotechnologii czy inżynierii biomedycznej. Proszę Doktorantkę o rozważenie, czy zbadany przez nią proces można by zaadaptować np. do formowania włókien polimerycznych czy nawet pokrywania powierzchni o żądanych właściwościach

Strona językowa oraz formatowanie pracy budzi niekiedy wątpliwości. Generalnie, praca napisana jest poprawnym językiem polskim, choć niezrozumiałe jest bogactwo ujmowania w cudzysłów wielu zwrotów, które tworzą całkowicie akceptowalne w języku naukowym sformułowania. Niezrozumiałe jest też stosowanie różnych odcieni szarości koloru czcionki do akapitów nawet na tych samych stronach; sprawia to wrażenie wyróżnienia fragmentu tekstu, ale czytając - nie znajduje powodu do takiego działania. Zastosowanie niebieskiego koloru do wyróżniania niektórych tytułów sekcji też wydaje się być losowe. W tekście pojawia się sporo literówek i niedociągnięć. Razi nieco pojawienie się w tekście potocznego „przy długości 217 nm” zamiast formalnego „przy długości fali 217 nm”. „Ujemne maksimum” (przy opisie widm CD) to po prostu minimum. „Pierwsza pochodna z 350 nm” wynosiłaby zero, doktorantce zapewne chodzi o „pierwszą pochodną z sygnału emisji fluorescencji dla $\lambda=350$ nm”. Nieszczerze wydaje mi się przyjęcie nazwy „forma natywna” dla białka bez metki histydynowej. Klasycznie forma natywna to po prostu białko prawidłowo zwinięte, w odróżnieniu np. od agregatu czy formy zdenaturowanej, którą to konwencje Doktorantka stosowała w drugiej części wyników własnych. Wystarczyłoby pisać o białku bez metki. Liczne rysunki, a w szczególności te przedstawiające chromatogramy, wymagają poprawienia ich czytelności. Niepoprawnym wydaje się też być używanie terminu „faldowanie białek” w miejsce „zwijania białek”.

Podsumowując, pragnę jednocześnie stwierdzić, że wypunktowane niedociągnięcia edytorskie nie umniejszają wagi przedstawianej pracy doktorskiej, a pytanie do strony merytorycznej mają stanowić punkt wyjścia do dyskusji i poznania opinii Doktorantki w danym temacie. Nie ulega wątpliwości, że przedstawiona rozprawa potwierdza teoretyczną wiedzę Kandy-



ZAKŁAD BIOFIZYKI

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 62 36

www.uni.wroc.pl

datki w dziedzinie nauk fizycznych oraz umiejętność prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki i ich dyskusja stanowią oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, jakim jest proces amyloidyzacji białek DcpS.

Z uwagi na ogrom podjętego wyzwania badawczego, wielość zastosowanych metod i przebijającą z narracji umiejętność samodzielnego sformułowania problemu badawczego i poszukiwania dróg jego rozwiązań, proszę Wysoką Radę o rozpatrzenie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Aleksandry Ferenc-Mrozek.

