

Prof. dr hab. Jerzy Sepiol
jsepiol@ichf.edu.pl
tel. +48223433052

Warszawa, 12.11.2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ferenc-Mrozek

Pani mgr Aleksandra Ferenc-Mrozek przedstawiła do oceny rozprawę doktorską zatytułowaną: „Zastosowanie wybranych metod fizyki i biologii molekularnej w badaniach struktury i oddziaływań białek z rodziny DcpS”, wykonaną w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką Prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza i Prof. dr hab. Jana Antosiewicza.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ferenc-Mrozek stanowi istotne *novum* w stosunku do dotychczasowych badań zapoczątkowanych ponad 30 lat temu przez prof. Edwarda Darżynkiewicza w Zakładzie Biofizyki UW, a związanych głównie z różnymi aspektami budowy i funkcjonowania charakterystycznej struktury molekularnej na końcu informacyjnego kwasu rybonukleinowego mRNA w komórkach, nazywanej z angielskiego kapem.

Autorka rozprawy za główny obiekt badań wybrała tzw. białka degradujące określane skrótem DcpS, które biorą udział w degradacji mRNA. Konfrontowane między sobą były trzy białka DcpS, pochodzące od człowieka oraz od 2 rodzajów nicieni – *C.elegans* i *A.suum*. Głównym celem badawczym było określenie stabilności, aktywności enzymatycznej białek a także poznanie mechanizmów ich agregacji.

Rozprawa składa się ze spisu treści, streszczenia, pięciu rozdziałów, podsumowania, bogatego (365 pozycji) spisu odnośników do literatury, oddzielnego wykazu publikacji naukowych Autorki, a także wykazu zastosowanych skrótów. W sumie rozprawa liczy 160 stron z 70 rysunkami, w tym około 1/3 rysunków znajduje się w 40-stronicowym wstępie.

We wstępie autorka umiejętnie wykorzystuje dane literaturowe i prezentuje odpowiednie rysunki dla zobrazowania metabolizmu mRNA *Eucariota*. Zaakcentowane zostały konsekwencje zaburzeń tego metabolizmu związane z dysfunkcją zaangażowanych komponentów (np.enzymu DcpS), które mogą prowadzić do niesprawności intelektualnej, schorzeń układu sercowo-naczyniowego oraz do chorób nowotworowych.

Następny podrozdział wstępu opisuje dokładnie ludzkie białko DcpS, jego strukturę i lokalizację w komórkach, aktywność katalityczną i specyficzność substratową. Zawiera też istotne informacje o sekwencji aminokwasów w ludzkim enzymie DcpS na tle sześciu wybranych enzymów DcpS pochodzących z różnych organizmów. Analiza sekwencji dostępnych genomów kodujących białko DcpS umożliwiła określenie poziomu identyczności homologów, który w stosunku do ludzkiego białka jest w przypadku szympansa na wysokim poziomie 99%, a w przypadku prezentowanych w rozprawie nicieni na poziomie 45% dla *A. suum* i 41% dla *C. elegans*. Na zakończenie tego podrozdziału Autorka stawia skłaniające do refleksji pytanie „Czy ludzki DcpS jest ciekawym obiektem badań z medycznego punktu widzenia?” na które na razie brak jednoznacznej odpowiedzi.

W dalszej części wstępu Autorka przekonująco uzasadnia rozszerzenie swoich badań na 2 wspomniane wyżej białka DcpS pochodzące od nicieni, a następnie dokonuje przeglądu opisanych w literaturze innych enzymów, które podobnie jak DcpS mają zdolność hydrolizy cząsteczek kapu.

Ostatni podrozdział wstępu traktuje o fizykochemii agregacji białek. Barwne rysunki z obszernymi opisami w atrakcyjny sposób przedstawiają drogi powstawania różnych form agregatów białkowych od amorficznych zespolów do uporządkowanych włókien amyloidowych. W zamieszczonej tabeli znajdujemy przykłady chorób – amyloidoz dotykających różne narządy człowieka. Silną motywacją do przedstawienia we wstępie przeglądu możliwych mechanizmów agregacji w oparciu o aktualną literaturę były przeprowadzone i dyskutowane w Rozdziale V badania nad agregacją wybranych białek DcpS.

W Rozdziale II mgr A. Ferenc-Mrozek przedstawiła wspomniane już wcześniej cele badawcze, które realizowała w trakcie wykonywania pracy doktorskiej. Dotyczyły one badań nad stabilnością, aktywnością enzymatyczną oraz mechanizmami agregacji wybranych 3 enzymów DcpS w warunkach ekspozycji na czynniki stresowe takie jak zmieniająca się temperatura lub obecność w roztworze denaturanta o określonym stężeniu.

W Rozdziale III „Materiały i metody zastosowane w przedstawionej pracy” Autorka opisała na początek skomplikowaną „kuchnię”, która umożliwiła jej wytworzenie odpowiednich białek, będących następnie obiektem badań. Wśród mnóstwa parametrów opisujących warunki produkcji białka do badań, tylko jeden - „OD=0,6” (str.49) - wydaje się niekompletny bez podania długości fali i długości drogi optycznej. Warto zauważyć że Autorka do wszystkich badań przedstawionych w następnym rozdziale (IV) wykorzystywała świeży DcpS, a to wymagało wielokrotnego powtarzania procesu produkcji i oczyszczania białka oraz odpowiedniego planowania eksperymentów.

W tym rozdziale poznajemy również szereg zastosowanych metod badawczych. Są to: spektroskopia mas, spektroskopia fluorescencyjna, spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), spektroskopia fourierowska w podczerwieni (FTIR), różnicowa fluorymetria skaningowa (DSF i nanoDSF), dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (CLSM) i wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Specyfika każdej z tych metod wymaga odpowiedniego przygotowania próbek (odpowiedniego buforu, odpowiedniej grubości kuwety, dostosowania stężenia, temperatury i innych parametrów) co w przypadku materiału biologicznego z ograniczoną stabilnością stanowiło niewątpliwie wielkie wyzwanie.

Pierwsza część badań własnych przedstawiona w rozdziale IV traktuje o wpływie etykiety histydynowej na aktywność hydrolityczną, strukturę oraz stabilność enzymów DcpS. Etykieta ta (składająca się z 10 histydyn na N-końcu białka i 6 histydyn na C-końcu) jest obecna w sekwencji aminokwasów badanego białka za sprawą stosowanej procedury otrzymywania białek. Badania nad trzema białkami DcpS z etykietami histydynowymi na N- lub C- końcu pozwoliły stwierdzić że białka z etykietami na C-końcu mają strukturę drugorzędową, aktywność oraz stabilność termiczną zbliżone do ich form natywnych. Natomiast etykieta histydynowa na N-końcu powoduje niehomogenność białek potwierdzoną widmami chromatografii masowej. Wyniki badań stałych szybkości reakcji hydrolizy m^7GpppG pokazały znacznie większy wzrost szybkości reakcji dla białek z etykietami w stosunku do formy natywnej tylko w przypadku *C. elegans* DcpS (patrz rys.IV.3) co być może wiąże się z jego stosunkowo niskim poziomem identyczności homologów (41 %, jak podano we wstępie). Warte podkreślenia jest rozstrzygnięcie w tych badaniach kontrowersji istniejących w literaturze - poprzez jednoznaczne wskazanie, że m^7GDP nie jest substratem dla natywnych białek DcpS i białek z etykietami. Natomiast ligand m^7GDP jest silnie wiązany przez enzymy DcpS z człowieka i nicieni powodując wzrost stabilności termicznej białek.

Opisane w tym rozdziale badania stały się bazą do materiału już opublikowanego w czasopiśmie ACS Omega w 2020 roku z wysokim IF (3,5 – 2020; 4,13 - 2023). W publikacji tej mgr.A. Ferenc-Mrozek jest pierwszym wśród 5 współautorów.

Zawarta w Rozdziale V druga część badań odnosi się do procesów agregacji wybranych trzech białek DcpS z dodatkowym rozszerzeniem o zmutowane białko ludzkie z pierwszą zidentyfikowaną mutacją wzbogacającą sekwencję o dodatkowe 15 aminokwasów (HSDcpS^{INS15}). Jednym ze sposobów przyspieszenia agregacji białek w warunkach *in vitro* jest zastosowanie czynników stresowych. W tym przypadku była to zmiana temperatury oraz zastosowanie chlorowodoru guanidyny (GdnHCl) o rozmaitych stężeniach jako denaturanta. Autorka w przekonujący sposób wyszczególnia kilka istotnych powodów (m. in. skrócenie czasu badań, łatwiejsze wykrywanie większej ilości agregatów), dla których przyspieszenie agregacji białek jest pożądane.

Gdy dokładnie znana jest struktura białka (np. z badań krystalograficznych), wówczas można ocenić zdolność danego białka do agregacji analizując sekwencję aminokwasów z zastosowaniem dostępnych programów (np. Waltz lub Aggrescan), co zostało wykonane w ocenianej pracy. Modelowanie programowe pokazało, że większość regionów sprzyjających agregacji pokrywa się dla białka ludzkiego i białek z nicieni.

Do badań temperaturowej denaturacji i towarzyszącej jej agregacji wybranych trzech białek zastosowano kilka wspomnianych wcześniej metod badawczych. Wyniki badań wskazują, że wyznaczana metodą DLS temperatura agregacji (T_{agg}) białek DcpS jest bliska wyznaczonej dla nich w aparaturze do pomiaru nanoDSF temperaturze „topnienia”, czyli utraty struktury drugorzędowej białka w roztworze (T_m). Stwierdzono, że wiązanie wspomnianego liganda m^7GDP przez białka DcpS powoduje wzrost mierzonej temperatury T_m .

Autorka rozszerzyła badania białek DcpS na analizę struktury produktu powstającego w procesie agregacji. Zastosowała w tym celu pomiary fluorescencji z wykorzystaniem barwnika tioflawiny T (ThT), który jest sprawdzoną sondą stosowaną do śledzenia kinetyki procesu formowania włókien amyloidowych. Równolegle były badane produkty agregacji białek wykorzystując obrazy agregatów przy użyciu mikroskopu elektronowego. Te wnikliwe badania dały podstawę do stwierdzenia że badane 3 białka DcpS podczas inkubacji w temperaturze 37°C tworzą agregaty o morfologii i strukturze charakterystycznej dla włókien amyloidowych. Zastosowanie denaturacji chemicznej z użyciem chlorowodoru guanidyny znacznie skracało czas formowania agregatów amyloidowych. W schemacie obrazującym potencjalne ścieżki agregacji białka DcpS zaproponowano obecność „stanu pośredniego” białka powstającego w wyniku oddziaływania z guanidyną, który wzmacnia ścieżkę agregacji w kierunku tworzenia włókien amyloidowych.

W podsumowaniu rozprawy Autorka informuje o przygotowywanej publikacji (wg spisu, siódmej w Jej dorobku publikacyjnym), w której znajdują się omawiane wyżej oryginalne badania agregacji w warunkach *in vitro* wybranych białek DcpS.

Autorka rozprawy nie ustrzegła się przed rozsianymi w tekście literówkami, z których kilka wymienię: w tytule do rozdziału V (spis treści i str.76), w nazwie leku S(i)pinraza (str.16), w nazwisku Kiled(ij)an (str.46,122), w nazwie metody F(IT)R (str.57), w opisie współrzędnej y na rys IV.3.B. Z innych zauważonych niedociągnięć to: niejednoznaczności (dla znanych struktur kapu) w opisie Rys.I.3, w opisie do Rys.III.4 –raczej „ścieżki 3,4,5” niż „2,3,4”), w bibliografii dwa odnośniki do tej samej pracy (ref.129, ref.365). Zaobserwowane uchybienia edytorskie tylko w niewielkim stopniu obniżają komfort czytania pracy.

Podsumowując, uważam że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Ferenc-Mrozek spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2023 r.poz.742, z późn.zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr A. Ferenc-Mrozek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorąc pod uwagę fakt otwarcia przez Doktorantkę nowego obszaru badań w Zakładzie Biofizyki, wysoki poziom trudności w samodzielnym przygotowywaniu próbek biologicznych, szeroki zakres zastosowanych metod od biologii molekularnej i kalorymetrii po różne metody spektroskopii molekularnej i mikroskopii oraz realizację ambitnych celów poznawczych, przedstawiam wniosek o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Języ Lysiot