

Prof. dr hab. Jan Antosiewicz
Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 28 października 2014 roku

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Doroty Kubackiej, pt.

Charakterystyka specyficzności miejsc wiążących ludzkich i żabich izoform eukariotycznego czynnika translacji 4E wyznaczających ich funkcję w procesie inicjacji biosyntezy białka

Rozprawa doktorska mgr Doroty Kubackiej dotyczy procesów syntezy białek w komórkach organizmów żywych, zwanej w biologii translacją. Sądzę, że w recenzji pracy z pogranicza fizyki i biologii molekularnej, pisanej dla Rady Wydziału Fizyki, należy zacząć od przedstawienia kontekstu historycznego podjętej w Rozprawie tematyki, w którym wyjdziemy od rzeczy jakie powinny być powszechnie znane.

Przed rokiem 1975, istotnym z punktu widzenia tematyki tej Rozprawy, wiadomo było, że synteza białek w komórkach jest procesem kilkietapowym, że zachodzi na organellach zwanych rybosomami, i że sekwencja syntetyzowanego łańcucha białkowego zakodowana jest w przyłączanym do rybosomu informacyjnym kwasie rybonukleinowym, w skrócie mRNA, od angielskiego terminu "messenger RNA". Pierwszy etap syntezy został nazwany inicjacją translacji.

W 1975 roku w laboratorium Aarona Shatkina w Roche Institute of Molecular Biology w Nowym Jorku odkryto, że mRNA w komórkach organizmów eukariotycznych, których główną cechą odróżniającą je od bakterii jest posiadanie jądra komórkowego, na swoim końcu od strony 5', zawiera strukturę składającą się z metylowanej w pozycji N7 guanozyny połączonej mostkiem trifosforanowym z pozycją 5' kolejnego nukleozydu¹. Strukturę tę nazwano kapem (po angielsku cap). Trzy lata później, w tym samym laboratorium, odkryto białko specyficznie wiążące się z końcem 5' mRNA, które w 1980 roku zostało nazwane eIF4E, od angielskich słów "eukaryotic Initiation Factor 4E". Stwierdzono, że przyłączenie białka eIF4E do końca 5' mRNA jest procesem rozpoczynającym etap inicjacji translacji w komórkach eukariotycznych.

¹Co zapisuje się symbolem m⁷GpppN, gdzie N dowolny nukleozyd.

Kolejne lata to systematyczne badania roli eIF4E w procesie inicjacji i regulacji translacji oraz molekularnych mechanizmów leżących u podłoża jego funkcjonowania w różnych organizmach eukariotycznych. Prowadzono badania zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Ogromną rolę w tych badaniach odegrały jedno i dwunukleotydowe fragmenty końca 5' mRNA, tzw. analogi kapu, syntetyzowane w laboratorium prof. Edwarda Darżynkiewicza, w Zakładzie Biofizyki. Związki te używane były zarówno w badaniach komórkowych, w których określano ich wpływ na przebieg procesu translacji, jak i w badaniach w roztworze, w których wyznaczano termodynamiczne i kinetyczne parametry charakteryzujące tworzenie ich kompleksów molekularnych z białkiem eIF4E. Określono też strukturę białka eIF4E, pochodzącego z różnych organizmów eukariotycznych, w formie *apo* i w kompleksie z kapem. Z tematem recenzowanej rozprawy doktorskiej wiąże się fakt, że pod koniec lat 90-tych ubiegłego stulecia, badania te zaowocowały odkryciem istnienia różnych form białka eIF4E w komórkach eukariotycznych należących do jednego gatunku. Te różne formy białka eIF4E należące do jednego gatunku biologicznego nazwano izoformami eIF4E. Forma eIF4E, która została odkryta jako pierwsza, i która uczestniczy w inicjacji i regulacji procesu translacji w komórkach wszystkich tkanek danego organizmu, nazwana jest w pracy kanoniczną izoformą eIF4E, pozostałe nazywa się niekanonicznymi izoformami eIF4E lub po prostu izoformami eIF4E.

Odkrycie izoform białka eIF4E zburzyło klarowny obraz procesu inicjacji translacji jaki wyłonił się z fizyko-chemicznych i biologicznych badań podjętych po odkryciu kanonicznej formy eIF4E i struktury kapu na końcu 5' mRNA. Niekanoniczne izoformy eIF4E wiążą się specyficznie z kapem, natomiast rola biologiczna jaką pełnią w komórkach, choć nie dla wszystkich odkrytych izoform poznana, wydaje się być inna niż formy kanonicznej. Na przykład, pewne izoformy, których rola biologiczna została ustalona, uczestniczą w wyciszaniu translacji niektórych mRNA i czasem dotyczy to tylko określonych stadiów rozwoju organizmu. Jednym z warunków koniecznych do opracowania nowego obrazu procesu inicjacji i regulacji translacji w organizmach eukariotycznych, i zrozumienia czemu Natura stworzyła izoformy eIF4E, jest poznanie molekularnych mechanizmów procesów, w których one uczestniczą. Rozprawa doktorska mgr Kubackiej przedstawia systematyczne badania tych mechanizmów dla pięciu wybranych form białka eIF4E: kanonicznej formy eIF4E człowieka (oznaczanej symbolem heIF4E1a), kanonicznej formy eIF4E żaby szponiastej (oznaczanej XeIF4E1a) oraz trzech izoform, stanowiących eukariotyczne czynniki represji translacji, dwóch ludzkich (oznaczanych symbolami heIF4E1b i heIF4E2) i jednej z żaby szponiastej (oznaczanej symbolem XeIF4E1b). Białka eIF4E1a i eIF4E1b były badane pod kątem tworzenia przez nie kompleksów z analogami kapu, natomiast izoformę heIF4E2 zbadano pod kątem

jej oddziaływania z białkiem oznaczanym symbolem 4E-T i wpływu tego oddziaływania na lokalizację eIF4E2 w komórkach ssaczych. Białko 4E-T zostało odkryte w roku 2000 przez grupę Nahuma Sonnenberga, jako białko wiążące eIF4E1a (nazwa pochodzi od angielskich słów "eIF4E-Transporter"), która wykazała, że jest to białko kursujące między cytoplazmą a jądrem i pośredniczące w transporcie eIF4E z cytoplazmy do jądra.

Praca mgr Kubackiej ma charakter prawdziwie multidyscyplinarny. Autorka wykorzystuje metody inżynierii genetycznej², biologii molekularnej³, biologii komórki⁴, spektroskopii molekularnej⁵ oraz bioinformatyki⁶. Razem można się doliczyć około 30 metod z obszaru nauk biologicznych, chemicznych, fizycznych i informatycznych. Procedury biologii molekularnej i inżynierii genetycznej Autorka stosuje w celu uzyskania próbek badanych białek do prowadzenia prac doświadczalnych metodami spektroskopii fluorescencyjnej i dichroizmu kołowego oraz w celu otrzymania preparatów do badania aktywności tych białek w żywych komórkach metodami mikroskopii fluorescencyjnej. Uwzględniając, oprócz pięciu izoform eIF4E i białka 4E-T, również ich formy modyfikowane, uzyskane przez Autorkę, otrzymujemy, że w pracy zbadano 19 różnych białek⁷. Do tego należy uwzględnić 13 różnych analogów kapu użytych przez mgr Kubacką w badaniach. Praca ta jest więc ogromnym projektem pod względem liczby stosowanych metod i liczby przygotowanych przez Autorkę układów molekularnych do badań biofizycznych. Z uwagi na obszerność pracy, niemożliwe jest omówienie w kilkustronicowej recenzji wszystkich uzyskanych wyników i wyciągniętych z nich przez Autorkę wniosków, skoncentruję się więc na tych, które wydały mi się najciekawsze.

Tworzenie kompleksów z analogami kapu przez ludzką i żabią izoformę eIF4E1b zostało zbadane zarówno ilościowo jak i jakościowo i porównane z tworzeniem tych kompleksów przez odpowiednie formy kanoniczne. Wyniki ilościowe

²Powielanie sekwencji cDNA metodą PCR, trawienie wektorów plazmidowych, ligacja plazmidu z docelowym genem, mutogeneza ukierunkowana przez nukleotyd

³Nadekspresja białek w bakteriiach *E.coli*, oczyszczanie białek i ich rekonstrukcja do formy natywnej, koimmunoprecypitacja, testy immunofluorescencyjne, metody chromatografii i elektroforezy

⁴Prowadzenie hodowli komórkowych w różnych warunkach żywieniowych, poddawanie hodowli stresowi oksydacyjnemu

⁵Spektroskopia fluorescencyjna, spektroskopia dichroizmu kołowego, w skrócie CD, i mikroskopia fluorescencyjna

⁶Analiza sekwencyjna białek, uliniowanie sekwencji, przewidywanie struktury białek, obliczanie widm CD białek w dalekim ultrafiolecie

⁷Pożyteczna byłaby tu kontrola czy wprowadzone mutacje nie zmieniają zbytnio struktury białek.

otrzymano metodami spektroskopii fluorescencyjnej, które dały stałe wiązania lub równoważne im standardowe zmiany energii swobodnej Gibbsa dla procesu tworzenia kompleksu molekularnego przez badane izoformy i analogi kapu. Wyznaczenie standardowych zmian energii swobodnej Gibbsa zostało wykorzystane do analizy roli poszczególnych oddziaływań lokalnych w stabilizacji tworzonych kompleksów molekularnych. Choć wkłady tych oddziaływań do energii swobodnej Gibbsa nie są ściśle addytywne, to, przykładowo, zwiększając liczbę grup fosforanowych w analogu kapu obserwuje się regularne zmiany w wartości $\Delta G^\ominus$, co daje podstawę do dyskusji roli tych grup funkcyjnych w cząsteczce mRNA w "rozpoznawaniu" przez białka eIF4E właściwego ligandu dla ich miejsca wiążącego. Wyznaczanie stałych równowagi dla procesów tworzenia kompleksów molekularnych metodą miareczkowania fluorescencyjnego, to standardowa procedura stosowana w biofizyce molekularnej i naukach pokrewnych. Autorka przeprowadziła te badania zgodnie z najlepszymi zasadami sztuki, ale główną wartość części pracy dotyczącej wiązania kapu widziałbym w analizie strukturalnej badanych izoform oraz analizie sekwencji par białek eIF4E1a i eIF4E1b z ośmiu kręgowców, która pokazała, że na poziomie struktury pierwszorzędowej białka eIF4E1a i eIF4E1b są ewolucyjnie wysoce zachowane, w tym w eIF4E1b zachowane są pozycje aminokwasów kluczowych dla oddziaływania eIF4E1a z kapem. Analiza sekwencji ujawniła również szereg zachowanych ewolucyjnie pozycji aminokwasów, które odróżniają białka eIF4E1b od eIF4E1a. Analizy te umożliwiły podjęcie decyzji, w których pozycjach w łańcuchu peptydowym izoform XeIF4E1a powinny być mutowane aminokwasy, aby uzyskać najlepszy możliwy wgląd w istniejące wymagania strukturalne i porównanie z rozpoznawaniem kapu przez formy XeIF4E1b.

Ciekawym fragmentem pracy w zakresie badań ilościowych jest analiza wiązania przez izoformy eIF4E analogów kapu, w których podstawnik metylowy w pozycji N7 guaniny został zamieniony na grupę etylową bądź benzyłową. Okazało się, że o ile stałe wiązania analogu kapu z podstawnikiem etylowym są niższe niż stałe wiązania zwykłego kapu przez izoformy zarówno eIF4E1a jak i eIF4E1b, to w przypadku wiązania analogu kapu z podstawnikiem benzyłowym formy eIF4E1b wykazują około dwa (dla izoformy z żaby) i pięć (dla izoformy ludzkiej) razy większe stałe wiązania. Wyniki te wskazują na większą tolerancję i możliwość konformacyjnych zmian w obrębie kieszeni wiążącej kap białek eIF4E1b względem większych podstawników takich jak benzył i możliwość udziału oddziaływań π -elektronowych, gdyż efektu tego nie obserwowano przy podstawniku etylowym.

Wyniki jakościowe, w części analizującej oddziaływania izoformy heIF4E1b z m^7 GTP, uzyskano metodami spektroskopii dichroizmu kołowego w zakresie dalekiego i bliskiego UV i metodami bioinformatycznymi, za pomocą których tworono modele badanych białek i ich kompleksów z ligandami. Analizując widma

CD w zakresie dalekiego UV, mgr Kubacka wykorzystała wysymulowane przez siebie struktury w formie apo i w kompleksie z kapem oraz serwer DichroCalc w laboratorium Jonathan'a D. Hirst'a z Uniwersytetu w Nottingham, UK, do obliczania widm CD białek w tym zakresie. Porównanie widm doświadczalnych i przewidywanych pozwoliło Autorce przedstawić interesującą dyskusję możliwości występowania w kompleksie $\text{heIF4E1b-m}^7\text{GTP}$ tzw. sprzężenia ekscytonowego, opisanego w literaturze dla układu chiralnego dwóch tryptofanów, znajdujących się blisko siebie w białkach globularnych⁸.

Charakter jakościowy mają również badania tworzenia kompleksów przez izoformy eIF4E z analogami kapu metodami spektroskopii CD w zakresie bliskiego UV. Choć nie ma jeszcze możliwości teoretycznego przewidywania tych widm dla założonej struktury białek, to powszechnie uważa się te widma za "odcisk palca" ich struktury trzeciorzędowej. W pracy przedstawiono widma CD w zakresie 250–360 nm żabiej formy kanonicznej XeIF4E1a i ludzkiej izoformy heIF4E1b , w funkcji stężenia dodanego m^7GTP . Widma te mają dość bogatą strukturę, różną dla obu białek, a ponadto w widmach różnicowych widoczne są różnice we wkładach oddziaływania z m^7GTP do intensywności różnych pasm. Wobec braku możliwości teoretycznych, mgr Kubacka zasugerowała, że wnioski strukturalne, dotyczące zmiany form apo na formy ze związanymi kapami, będą mogły być uzyskane po rejestracji widm dla białek ze zmutowanymi resztami tryptofanów biorących udział w wiązaniu i z szerszym spektrum analogów kapu. Choć brak tu ostatecznych konkluzji, to w tym fragmencie pracy autorka wykazała, że potencjał tkwiący w zastosowaniach spektroskopii CD w zakresie bliskiego UV do badania strukturalnych aspektów oddziaływań białek wiążących kap jest ogromny.

Jak już wspomniano powyżej, oprócz oddziaływań izoform eIF4E1a i eIF4E1b z kapem, mgr Kubacka zbadła również tworzenie kompleksów przez izoformę eIF4E2 z białkiem transportującym 4E-T. Tworzenie kompleksów eIF4E2 z 4E-T zostało wykazane w drożdżach, wykorzystując drożdżowy system dwuhybrydowy, i w komórkach ssaczych HeLa, dla których użyto metodę koimmunoprecypitacji, z zastosowaniem specyficznych przeciwciał z kurczaka, oraz metodę immunofluorescencji, która pozwoliła na stwierdzenie rekrutacji eIF4E2 do tzw. granulek P poprzez białko 4E-T. Autorka wykazała, że białko eIF4E2 w warunkach normalnych jest białkiem cytoplazmatycznym i w odróżnieniu od eIF4E1a , nie gromadzi się w granulkach stresu indukowanych arsenkiem sodu. Ponadto, eIF4E2 podobnie do eIF4E1a , jest transportowane do jądra, lecz transport ten nie jest zależny

⁸Chciałbym podkreślić, iż choć Autorka dziękuje mi w pracy za umożliwienie pomiarów w moim laboratorium i za cenne dyskusje, to nie mam z tą analizą, ani z innymi związanymi ze spektroskopią CD, nic wspólnego – są one wynikiem jej samodzielnej inicjatywy, poszukiwań w literaturze i przemysłów.

od białka 4E-T, jak to ma miejsce dla eIF4E1a, zatem najpewniej zachodzi on z udziałem innego partnera białkowego. Mgr Kubacka wnioskuje stąd, że eIF4E2 pełni inną funkcję niż eIF4E1a zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze.

Rozprawa doktorska mgr Doroty Kubackiej jest pracą kompletną tzn. czytelnik znający zagadnienia biofizyki molekularnej w zakresie podstawowym nie musi zaglądać do cytowanych odnośników czy też podręczników z dziedziny jakiej dotyczy praca, aby móc śledzić wyniki Autorki i ich osadzenie w literaturze przedmiotu. Świadczy to o tym, że Autorka dobrze opanowała technikę pisania prac tego typu. W zasadzie jedynym brakiem jaki można tu zauważyć jest ograniczenie się w Podsumowaniu pracy do wyliczenia uzyskanych wyników bez zastanowienia się czy z wyników tych można coś wnioskować o biologicznym znaczeniu istnienia wielu izoform białka eIF4E. Być może mgr Kubacka uznała, że umieszczanie tego typu dyskusji w Podsumowaniu byłoby przedwczesne, gdyż badane układy są naprawdę niezwykle złożone i z pewnością wiele jest jeszcze do zrobienia. Praca jest napisana po polsku i liczy 136 stron. Składa się z pięciu rozdziałów poprzedzonych spisem treści, streszczeniem w języku polskim, streszczeniem w języku angielskim i wykazem stosowanych skrótów. Na końcu pracy Autorka zamieściła spis cytowanej literatury, zawierający 121 pozycji, listę czterech publikacji, których jest współautorką, przedstawiających częściowe wyniki uzyskane w rozprawie doktorskiej, oraz cztery Dodatki, zawierające różne dane fizykochemiczne i sekwencje aminokwasowe badanych białek. Jeden z artykułów, przedstawiany w pracy jako wysłany do redakcji Journal of Molecular Biology, został ostatnio zaakceptowany do druku, można go więc traktować jak pracę już opublikowaną. Czasopisma, w których Autorka opublikowała wyniki częściowe, uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, to bardzo dobre czasopisma naukowe z tzw. Listy Filadelfijskiej. W trzech z tych prac mgr Kubacka jest pierwszym autorem lub drugim, z równym udziałem w pracy jak autor pierwszy. W czwartej publikacji mgr Kubacka jest trzecim autorem. Nie ma więc wątpliwości, że wkład Jej do tych publikacji jest bardzo istotny.

W pracy zauważyłem trochę potknięć językowych natury albo gramatycznej, albo związanych z nazewnictwem. Ponieważ moja ocena rozprawy doktorskiej mgr Kubackiej jest pozytywna, sądzę że nie ma sensu wyliczanie wszystkich zauważonych usterek językowych. Przykładem problemu z nazewnictwem może służyć użycie pojęcia "ekspresja białka", tak jakby było ono powszechnie znane, a przynajmniej akceptowane w świecie specjalistów. Tymczasem pojęcie "ekspresja" zostało wprowadzone do nauk biologicznych w kontekście znaczenia terminu "ekspresja genu", które oznacza proces, w którym informacja genetyczna zawarta w genie zostaje odczytana i przepisana na jego produkty, które są białkami lub różnymi formami RNA. Wprawdzie pojęcie "ekspresja białka" pojawia się w liter-

aturze coraz częściej⁹, to sądze, że należało je wyjaśnić w tekście przy pierwszym użyciu.

Podsumowując, uważam że rozprawa doktorska mgr Kubackiej spełnia warunki stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, chciałbym zauważyć, że realizacja tak szeroko zakrojonego programu badawczego jak ten przedstawiony w rozprawie doktorskiej mgr Kubackiej, musi budzić duże uznanie, tym bardziej że przedstawienie badań własnych i ich dyskusja są dobrze osadzone w cytowaniu literatury przedmiotu. Ta praca wyznacza pewien godny naśladowania sposób prowadzenia badań bardzo złożonych układów molekularnych, poprzez połączenie ilościowych metod spektroskopowych fizyki, tam gdzie można je było zastosować, z pomysłowymi działaniami metodami inżynierii genetycznej i biologii molekularnej, tam gdzie metody fizyczne dają obraz jakościowy. Wnoszę więc o wyróżnienie przez Radę Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego tej Rozprawy.


Jan Antosiewicz

⁹Szczególnie w formie "nadekspresja białka", patrz np. Bradley, M.K., Overexpression of proteins in eukaryotes, *Methods in Enzymology*, 182:112-132, 1990, ale z pierwszym zdaniem nawiązującym do tradycyjnego znaczenia: "The development of expression systems in eukaryotic cells has been progressing steadily."