

Wpłynęło dnia 2019 -03- 07



Institute of Biochemistry and Biophysics
Polish Academy of Sciences

Pawińskiego 5a; 02-106 Warszawa; Tel.: +48 22 / 592 21 45; Fax: +48 22 / 592 21 90; e-mail: secretariate@ibb.waw.pl; <http://www.ibb.waw.pl>

Prof. Jarosław Poznański
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5A, 02 106 Warszawa

Warszawa 5 marca 2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Małgorzaty Narczyk pt.

„Biofizyczne podstawy działania fosforylasy nukleozydów purynowych z *E. coli* - mechanizm katalizy, związek między funkcją białka a jego strukturą oligomeryczną”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Narczyk została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką prof. dr hab. Marii Agnieszki Bzowskiej. Należy zaznaczyć, że promotor jest uznaną specjalistką w zakresie biofizycznych i biochemicznych badań nad metabolizmem nukleozydów purynowych (wg bazy WoS 79 publikacji cytowanych łącznie ponad 1500 razy). Można więc domniemywać, że przedłożona rozprawa jest fragmentem szerszego planu badawczego realizowanego w grupie badawczej prof. Marii Agnieszki Bzowskiej.

Zasady purynowe (adenina, guanina) są nie tylko podstawowymi składnikami kwasów nukleinowych (RNA i DNA), ale także nośnikami energii w wielu szlakach metabolicznych (ATP i GTP). Nie jest więc dziwne, że nawet niewielkie niekontrolowane zmiany w ich poziomie zwykle prowadzą do poważnych zaburzeń w homeostazie. Synteza *de novo* adeniny i guaniny, odbywa się poprzez modyfikację rybofosforanu inozyny (IMP), który powstaje w wyniku wieloetapowej kaskady reakcji prowadzonych przez kilkanaście enzymów w obecności wielu specyficznych czynników, której towarzyszy hydroliza przynajmniej sześciu cząsteczek ATP. Niewątpliwie jest to proces niezwykle kosztowny energetycznie, a więc w toku ewolucji musiały wykształcić się wydajne mechanizmy recyklingu zasad purynowych zmniejszające zapotrzebowanie na ich syntezę *de novo* poprzez szlak IMP. I to właśnie aktywność fosforylasy purynowych, z których jedna była przedmiotem badań Doktorantki, jest głównym źródłem zasad purynowych w komórce. W mojej ocenie zagadnienie badawcze jest niezwykle istotne, a potwierdza to nie tylko bogata literatura na temat metabolizmu zasad purynowych, ale przede wszystkim liczba

cytowań takich prac przekraczająca 10k rocznie. Należy zaznaczyć, że badany obiekt (tnz. fosforylaza purynowa z bakterii *E. coli*) jest bardzo trudny do analiz biochemicznych czy biofizycznych. Przede wszystkim badane białko jest heksamerem (a właściwie trimerem dimerów) – a więc potencjalnie mogą wystąpić przynajmniej trzy rodzaje centrów katalitycznych, których biochemiczna aktywność lub biofizyczne powinowactwo do substratów może zależeć od stanu sąsiadów. W ogólności, nawet dla homogennej próbki białka można się spodziewać aktywności na trzech różnych poziomach. Obraz ten dodatkowo komplikuje postępująca w czasie dezaktywacja enzymu. Należy więc uznać, że problem badawczy, jaki postawiła przed sobą mgr Marta Narczyk jest niezwykle wymagający.

Formalna ocena rozprawy

Treść rozprawy została oparta na siedmiu wieloautorskich artykułach w większości opublikowanych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach (łączny czynnik oddziaływania 23.2). Były one cytowane już 57 razy. Z obowiązku recenzenta muszę jednak zaznaczyć, że jedynie w jednej z nich mgr Narczyk jest pierwsza na liście autorów (FEBS Journal, 2018). Należy zwrócić uwagę na niemal dwukrotny wzrost liczby cytowań publikacji Doktorantki w ostatnim roku, co pokazuje, że Jej kariera naukowa może się szybko rozwinąć.

Forma przedłożonej niemal 150-cio stronicowej rozprawy jest w zasadzie zgodna kanonem. W skład rozprawy wchodzi kolejno: spis treści, streszczenie w języku polskim, wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy, wykaz stosowanych skrótów, 13-to stronicowy wstęp stanowiący wprowadzenie w tematykę badań, cele pracy, 20-to stronicowy opis użytych materiałów i stosowanych metod, 67-mio stronicowy opis uzyskanych wyników oraz 10-cio stronicowa dyskusja uzyskanych wyników (zatytułowana Wnioski). Rozprawa została uzupełniona o załącznik demonstrujący szczegóły procesu badawczego oraz spis 94 pozycji literaturowych, z których ponad 20% ma nie więcej niż 5 lat). Nie znalazłem natomiast spisu rycin i tabel.

Rozprawa została napisana w języku polskim. Niestety odnoszę wrażenie, że Doktorantka działała pod silną presją czasu, co znalazło wyraz w licznych błędach, których w znacznej części można było uniknąć przeprowadzając staranniej korektę (np. pojedyncze słowa angielskie niespodziewanie pojawiające się w tekście Rozprawy - str. 20 i 21, czy angielska nazwa benzimidazolu: „Benzoimidazol” na str. 12). Licznym błędem literowym (np. „*Trihomonas vaginalis*”) towarzyszą niestety błędy merytoryczne (np. powodowana przez

bakterię *Helicobacter pylori* choroba wrzodowa żołądka została przedstawiona jako pasożytnicza). W wielu miejscach Doktorantka stosuje niewłaściwe lub niezręczne określenia. Czasami są to drobniejsze błędy wynikające z użycia zwrotów żargonowych, które nie powinny znaleźć się w tekście naukowym. Kilka reprezentatywnych przykładów zamieszczam w załączniku do recenzji. Niestety, taka niestaranność czasami prowadzi do błędów merytorycznych: np. „Stałe wiązania wynoszą $(5,9 \pm 0,4) \mu\text{M}$ i $(2,1 \pm 0,3) \mu\text{M}$ ” - podczas gdy powyższe liczby muszą odnosić się do stałych dysocjacji (K_{diss}), które są wyrażane w M, a nie do K_{bind} , dla których jednostką jest M^{-1} . Podobne, nieścisłości wkradły się do opisu pomiarów MST „Wybierano moc lasera podgrzewającego próbkę”, podczas gdy istotą pomiaru termoforetycznego jest wygenerowanie gradientu temperatury, a nie podgrzanie próbki stosowane w pomiarach DSF. Kilkukrotnie w Rozprawie pomyłone zostały podstawowe pojęcia termodynamiczne - np. w opisie procedury miareczkowania kalorymetrycznego sformułowania „rozpuszczanie” i „rozcieńczanie” pojawiają się zamiennie, podczas gdy dotyczą one zupełnie odmiennych procesów, a Doktorantka badała jedynie efekt rozcieńczania liganda. Z kolei jednostką stężenia oraz stałej dysocjacji nie jest mol, ale mol/l (zwykle oznaczany M; błędne oznaczenia znalazłem na stronach 30, 33, 35, 43, 48, 62, 65, 67, 84 i 88).

Przy okazji chciałem zwrócić uwagę na nieścisłości obliczeniowe: wartość $\text{RSS}=0.925$ dla modelu jednomiejscowego z tabeli 7.7 jest sprzeczna z wartościami RSS dla pozostałych modeli opisanych w tej tabeli. Jednostki K_{d3} w Tabeli 7.7 różnią od tych z Tabeli 5.2.1 (odpowiednio mM i μM), mimo że obie tabele przedstawiają te same dane. Jest to zapewne konsekwencją literówki, ale powoduje, że wartości ΔG_3 w tabeli 5.2.1 nie odpowiadają wartościom K_{d3} . W kilku tabelach błędy ΔS_2 zostały źle oszacowane (są z grubsza 1000 razy za małe), ale nie dotyczy to już niepewności ΔS_1 i ΔS_3 . Jest to zapewne konsekwencją błędnie zapisanej formuły, której wyniki zostały następnie skopiowane do tekstu rozprawy. Pełniejsza lista znalezionych błędów została przekazana Doktorantce.

Reasumując, w mojej ocenie poziom edytorski przedstawionej do oceny Rozprawy znajduje się na granicy akceptowalności.

Merytoryczna ocena Rozprawy

Wstęp Rozprawy dość dobrze wprowadza w zagadnienia związane z tematyką badań. Niestety Autorka nie uniknęła kilku nieścisłości. Tak dla przykładu, wartości przedstawione przez Doktorantkę (0.1 M przy 1.2 mM stężeniu inozyiny) nie odpowiadają danym kinetycznym

dla jonu fosforanowego (K_M) zawartym w Tabeli 4 cytowanej publikacji [1] (0.12 mM przy 2 mM stężeniu inozyny). Zapewne jest to także literówka, ale niefortunnie wypacza termodynamiczny opis zjawiska. Na schemacie 3 została błędnie zaznaczona reakcja przekształcenia kompleksu dwuskładnikowego E+Ino w trójskładnikowy E+Ino+Pi.

Niejasno zostały zaprezentowane cele pracy. Doskonale rozumiem, że nieoczekiwane wyniki uzyskane w trakcie badań zmusiły doktorantkę do, przynajmniej częściowej, zmiany priorytetów. Jednak stwierdzenie „*Celem pracy było sprawdzenie, czy zaproponowany dla ecPNP w pracy Koellner et. al. (2002) [2] mechanizm katalizy jest poprawny oraz ustalenie roli kooperacji podjednostek dimeru w katalizie*” niepotrzebnie zawęża zakres badań rzeczywiście przeprowadzonych przez Doktorantkę.

W opisie warunków pomiarowych brak jest części istotnych danych. Podane są nazwy przyrządów pomiarowych, często brak jest konkretnych informacji o zastosowanych protokołach pomiarowych. Tak na przykład w opisie pomiarów ITC nie podano, jakie były rzeczywiste objętości dodawanego liganda. Wiadomo tylko, że objętości te były zmienne. Pomiary MST miały być prowadzone dla 5 do 9 powtórzeń, ale na podstawie danych zawartych w tabeli 7.5 można wywnioskować, że analizowano raczej pojedyncze powtórzenia dla tej samej próbki, ale przy różnych gradientach temperatur (identyfikowanych jako „moc lasera podgrzewającego próbki”).

Pewne zastrzeżenia wzbudził we mnie opis stosowanych przez Doktorantkę metod analizy danych. Zupełnie nie rozumiem, dlaczego parametry termodynamiczne uzyskane dla kilku serii pomiarowych wyznaczano rozłącznie i dopiero potem je uśredniano (str. 36). Przecież zastosowanie dopasowania globalnego musi dać poprawniejsze wyniki. Nie rozumiem także, dlaczego do porównania wartości wyznaczonych w różnych eksperymentach stosowano test 3σ , a nie test Fishera-Snedecora dla wariancji rezydualnej, co pozwoliłoby na formalną ocenę istotności różnic w wartościach parametrów termodynamicznych wyznaczonych za pomocą kolejnych technik doświadczalnych. Mam też zastrzeżenia dotyczące opisu procedury analizy danych kalorymetrycznych oraz miareczkowań śledzonych metodami optycznymi (Fluorescencja CD, MST). W obu przypadkach padają nazwy użytych programów (NITPIC i DynaFit), brak jest jednak ogólnych informacji dotyczących parametryzacji zastosowanych w tych programach algorytmów (np. jaka była metoda optymalizacji parametrów – simplex, największego spadku, czy sprzężonego gradientu?), co bardzo utrudnia przeprowadzenie

analogicznych obliczeń przez osoby używające innych programów. A opisane przez Doktorantkę problemy w inicjalizacji parametrów oraz uzyskaniu zbieżności algorytmu świadczą, że problem ten nie jest czysto akademicki.

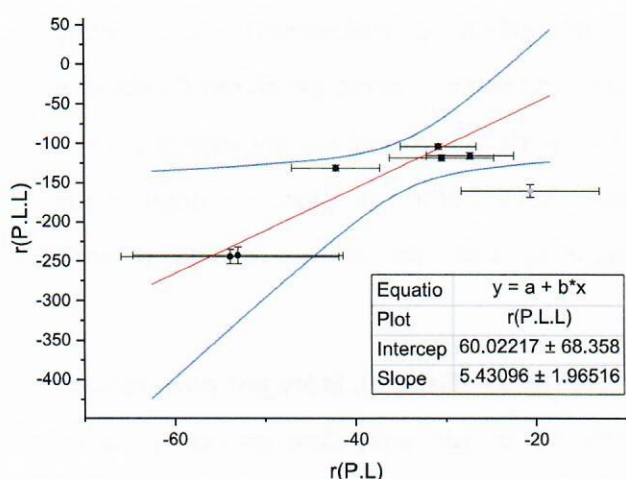
Nie zgadzam się ze stwierdzeniem Doktorantki „w przypadku modeli bardziej skomplikowanych niż wiązanie o stechiometrii jeden, równania takie dają się wyprowadzić tylko przy zastosowaniu rozmaitych przybliżeń”, które jest formą agitacji za użyciem programu DynaFit. Chciałem zwrócić uwagę, że analityczne wzory na pierwiastki równania trzeciego stopnia, do których prowadzi algebraiczna analiza układu o stechiometrii 1:2, zostały wyprowadzone przez Niccolo Tartaglię i później opublikowane w przez Gerolamo Cardano w 1545 roku, a dla równania czwartego stopnia (stechiometria 1:3 lub 2:2) zostały wyprowadzone przez Lodovico Ferrari w 1540 roku. Twierdzenie Abela-Ruffiniego głosi, że dopiero dla wielomianów stopnia wyższego niż 4 (stechiometria 1:4) nie istnieje ogólna metoda algebraiczna wyznaczenia wartości pierwiastków.

Zdumiewa mnie pominięcie przez Doktorantkę testu F (Fishera), który jest powszechnie stosowany nie tylko do wyboru lepszego z modeli, ale przede wszystkim do oceny, na ile testowany model opisuje dane doświadczalne. Szybka analiza wartości RSS z tabeli przedstawionych w Załączniku Rozprawy pozwala domniemywać, że test F byłby równie skuteczny jak kryterium Akaike. Chciałem jednak przypomnieć Doktorantce, że kryterium Akaike stosuje się głównie do oceny, czy testowany model nie został „przeparametryzowany”, a jego spełnienie nie gwarantuje, że dany model jest poprawny. Jako przykład można podać funkcję $F(t)=\sin(\omega t)$, która dla odpowiednio dobranej wartości ω będzie spełniać kryterium Akaike dla serii danych „doświadczalnych” o stałej wartości zero.

Duży niedosyt budzi sposób porównania danych uzyskanych za pomocą różnych technik doświadczalnych (np. CD, fluorescencja, MST), który w zasadzie ogranicza się do zestawienia odpowiednich parametrów termodynamicznych w tabeli (np. Tabele 5.1.16, 5.3.5). A przecież (zgodnie z opisem Doktorantki) program DynaFit umożliwia globalną analizę różnych typów danych. Można więc pokusić się o wyznaczenie uniwersalnych wartości stałych dysocjacji dla poszczególnych typów kompleksów, a przy okazji stosując test F przeprowadzić formalną analizę, na ile wyniki uzyskane z różnych eksperymentów są ze sobą zgodne. Należy zaznaczyć, że przy każdej z użytych metod doświadczalnych stosuje się inne stężenie reagentów. Spójność

modelu dopasowanego do danych uzyskanych różnymi metodami byłaby więc poważnym argumentem świadczącym o poprawności założonego modelu reakcji.

Problem koncepcyjny stanowią wprowadzone przez Doktorantkę lokalne współczynniki odpowiedzi. Rozumiem, że to jest jedyny sposób uwzględnienia niemożliwego do opanowania procesu postępującej dezaktywacji materiału biologicznego. Jednak wydaje się, że zmiany wartości tych parametrów nie są niezależne. Tak dla przykładu, zgrubna analiza danych z tabeli



5.1.4 pokazuje, że wartości $\Delta FP.L \rightarrow P.L.L$ i $\Delta FP.L.L \rightarrow P.L.L.L$ są ze sobą silnie skorelowane. Formalna analiza współczynników $r(P,L)$ i $r(P.L,L)$ zebranych w tabeli 7.1 (przedstawiona obok) dowodzi, że wartości współczynników odpowiedzi są do siebie proporcjonalne. Nie dziwi to, gdyż we wszystkich stosowanych przez Doktorantkę technikach

odpowieź układu jest kombinacją liniową stężeń poszczególnych obiektów. W tym konkretnym przypadku wyniki analizy sugerują także, że jedna z serii pomiarowych powinna zostać pominięta. Najprawdopodobniej można więc znacząco ograniczyć ilość takich współczynników, co niewątpliwie przyczyniłoby się do poprawy stabilności algorytmów optymalizacyjnych.

Nie znalazłem także próby analizy wpływu czasu na wartości tych współczynników, a przecież można oczekiwać, że ich zmiany będą monotoniczne. Intrygującym jest fakt, że dane w tabelach zawartych w Załączniku Rozprawy nieznacznie odbiegają od wartości zebranych w tabelach z głównego tekstu (np. tabele 5.1.4 i 7.3). Przeprowadzona została natomiast długofalowa analiza zmian wartości stałych dysocjacji zmierzonych dla kolejnych partii próbki „starzejącego” się białka. Chciałem zwrócić uwagę, że opierając się na danych zebranych w tabeli 8 można wykazać, że np. wartości $kd1$ są silnie skorelowane z wartościami $kd2$. Obecność takiej korelacji sugeruje, że dla wszystkich typów miejsc wiążących istnieje wspólny mechanizm dezaktywacji, a jako możliwego kandydata wskazałbym proces utleniania jednego z aminokwasów centrum wiążącego ligand. Hipoteza taka jest możliwa do szybkiej weryfikacji za pomocą LC-MS.

W tym miejscu muszę zaznaczyć, że większość moich uwag dotyczących metodologii analizy danych jest wysoce subiektywna i wynika z trzydziestoletniego doświadczenia w modelowaniu rozmaitych procesów. Oczywiście nie neguję poprawności analiz przeprowadzonych przez Doktorantkę, a chciałem jedynie wskazać, że przynajmniej niektóre z nich można było przeprowadzić w mniej siłowy sposób.

W Rozprawie przedstawiona jest imponująca liczba danych doświadczalnych zebranych przez Doktorantkę. Co więcej, udało się jej połączyć w spójny system cztery odmienne metody pomiarów biofizycznych (fluorescencja, dichroizm kołowy, izotermiczna kalorymetria miareczkująca oraz termoforeza mikroskalowa) z danymi biochemicznymi (pomiar kinetyki reakcji enzymatycznej) i wszystkie wspólnie przeanalizować je w kontekście dostępnych danych strukturalnych, w uzyskania których także brała udział. Dowodzi to, że mgr Marta Narczyk biegle opanowała nowoczesne metody badawcze. Co więcej, z powodzeniem udało się Jej je zastosować do rozwiązania niezwykle trudnego problemu związanego z kooperacją między poszczególnymi podjednostkami homooligomerycznego kompleksu enzymatycznego. Po drodze musiała wypracować sposób pracy z materiałem biologicznym, który z upływem czasu traci swoją aktywność, a uzyskane wyniki pozwoliły zaproponować model stopniowej dezaktywacji heksamerycznej struktury enzymu. Uzyskane wyniki (szczególnie metodologia) mogą w przyszłości ułatwić poszukiwanie inhibitorów skierowanych przeciwko fosforylazom nukleozydów purynowych organizmów patogennych. Na zakończenie oceny chciałem podkreślić, że treść Rozprawy opiera się na siedmiu bardzo dobrych publikacjach naukowych.

Właśnie z powodu wartości naukowej przedstawionych badań uznaję, że mimo opisanych wcześniej braków edytorskich, przedłożona praca spełnia formalne wymagania określone w Ustawie z dnia 18 marca 2011 o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie stopnia doktora nauk fizycznych w dyscyplinie biofizyka. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Marty Małgorzaty Narczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jarosław Poznański



Prof. Jarosław Poznański
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5A, 02 106 Warszawa

Warszawa 5 marca 2019

Załącznik do Recenzji rozprawy doktorskiej mgr Marty Małgorzaty Narczyk pt.

***„Biofizyczne podstawy działania fosforylasy nukleozydów purynowych z *E. coli* -
mechanizm katalizy, związek między funkcją białka a jego strukturą oligomeryczną”***

Przykłady błędów edytorskich/językowych znajdujących się w przedłożonej do oceny Rozprawie

- str. 7 „Mutując Asp204, Arg217 i Arg24 na alaninę” zamiast „zamieniając” lub jeszcze poprawniej „wprowadzając mutację powodującą zamianę”,
- str. 15 „Badania stabilizacji termicznej białka w obecności substratów i produktów” (podczas, gdy bada się stabilność termiczną),
- str. 17 „struktura uzyskana z PEGu 4000”,
- str. 21 „Niezwyczajną cechą kompleksu 1k9s ...” (tutaj Autorka ma na myśli strukturę dostępną w bazie Protein Data Bank jako 1k93),
- str. 27 „Jeżeli zmiennym substratem był nukleozyd ...” (substratem, którego stężenie było zmieniane ???)
- str. 30 „Próbka ligandu została rozpuszczona w buforze z dializy” (podializacyjnym; wobec którego prowadzono dializę białka),
- str. 30 „Zabieg ten miał na celu gęściejsze przepróbkowanie początkowego fragmentu izotermy wiązania”,
- str. 31 „Najlepsze długości fal do obserwacji”,
- str. 32 „przy szczelinach ustawionych na 5nm”,

- str. 71 „Nastawiono kilkanaście płytek 24-dołkowych wokół wyznaczonych w eksperymentach przesiewowych warunków”,
- str. 87 „Analiza „zsytej” krzywej miareczkowania pokazała” (w tym wypadku została przeprowadzona globalna analiza serii eksperymentów),
- str. 90, dwukrotnie „wytworzyć wiązanie wodorowe” (raczej utworzyć),
- str. 94. „Najpierw wyznaczono czasy denaturacji obu białek”, Nie wiadomo, co to jest czas denaturacji, badana była chyba szybkość spontanicznej dezaktywacji próbki białka
- str. 96 „aminokwasy tworzące wiązania wodorowe i mostki solne powinny zostać zmutowane na aminokwasy polarne” (raczej zamienione),
- str. 97 „ponieważ białko schodziło z kolumny znacznie wcześniej”,
- str. 99 „uruchamiano algorytm fitujący”

