



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Adama Górki „Analiza wewnątrzcząsteczkowych interakcji pomiędzy domenami ludzkiego czynnika transkrypcyjnego YIN YANG 1, w układzie *in vitro*”.

Rozprawa doktorska mgr Adama Górki „Analiza wewnątrzcząsteczkowych interakcji pomiędzy domenami ludzkiego czynnika transkrypcyjnego YIN YANG 1, w układzie *in vitro*” jest monografią przedstawiającą badania niezwykle interesującego białka YIN YANG 1, którego nazwa sugeruje dualną naturę zarówno z punktu widzenia funkcji (aktywacja – represja transkrypcji), jak i struktury (wewnętrznie nieuporządkowana domena N-końcowa – C-końcowa domena palców cynkowych). Autor postanowił zweryfikować tezę o przełączaniu funkcji w oparciu o zmiany konformacyjne prowadzące do kontaktu obu domen wobec elementu regulatorowego. Praca przygotowana pod kierunkiem prof. Marty Dziejickiej-Wasylewskiej i dr Andrzeja Góreckiego, jest niezwykle długa (269 stron), z jednej strony bardzo precyzyjna w opisie eksperymentów i ich biofizycznej analizie, co świadczy o znawstwie badanych obiektów, problemów metodycznych, profesjonalnej realizacji eksperymentów, a także krytycznym podejściu do wyników, z drugiej zawierająca stanowczo zbyt dużą ilość potknięć redakcyjnych.

Rozprawa składa się z pięciu głównych rozdziałów (Wprowadzenie, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja). Część wyników dotyczących znakowania fluorescencyjnego fragmentu IDP YY1 opublikowano w *Protein Sci. (IF 2,41)*, w publikacji, w której Doktorant jest pierwszym autorem.

Cel pracy został jasno sformułowany i skupia się na weryfikacji modelu, według którego domena C-końcowa YY1 ulega takim zmianom konformacyjnym, które skutkują „przykryciem” aktywności transkrypcyjnej domeny N-końcowej. Kluczem realizacji było otrzymanie odpowiednich mutantów cysteinowych różnych wariantów białka, ich znakowanie fluorescencyjne, pomiary interakcji domen, w oparciu o analizy FRET, w obecności i nieobecności DNA.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

We Wstępie, na 40-stu stronach Autor, w zakresie nawiązującym do dalszej treści, przedstawił podstawowe informacje dotyczące mało znanej, przynajmniej wśród biochemików, teorii poliamfolitów w odniesieniu do białek (10 stron; chociaż przytaczanie kolejnych 34 równań może być przesadą) i dalej budowy, funkcjonowania i relacji struktura-funkcja białek samoistnie nieuporządkowanych (IDP) (20 stron) i białka Yin-Yang 1 (9 stron).

Jako recenzent cenię zawartość merytoryczną Wstępu, z obowiązku wnoszę kilka uwag. Dobór skrótów (str. 17) jest dość przypadkowy i niepełny, a mieszanie nazw angielskich i polskich nieuzasadnione (np. używanie nazw angielskich w rozwinięciach skrótów ANS, SLS, czy białka MBP). Glicyna w białku (str. 17) nie jest aminokwasem polarnym. Niestety, odmiana i pisownia nazwisk w całej pracy jest całkowicie dowolna i pełna pomyłek (np. Fluory- Flory, Hugins-Huggins, Debye-Debey, Marion Mckinley Bradford to mężczyzna więc metoda Bradforda, a nie Bradford, Lamelli-Lameli-Laemml, Thompom – Thompson, Beer – Ber, Gauss – Gaus, Pappau – Pappu, Boltzman – Boltzmann, także zbędne jest dodawanie w kilku przypadkach tytułów naukowych np. profesor Gale Rhodes czy profesor Uversky itd.). Tzw. literówek, braku kropek na końcu zdań, anglicyzmów (np. kit, pixel, mix, formułowanie do buforu), nieprawidłowego używania wielkiej litery jest stanowczo za dużo. W literaturze polskojęzycznej nie trafiłem na określenia „szczeciny i szuwały entropowe” (str. 41). Odnośniki w tekście do Rysunku 1A-D na str. 31-32 powinny być oznaczone jako 2 A-D. Sedymentacja (str. 47) jest zjawiskiem fizycznym, a nie techniką, natomiast ultrawirowanie analityczne opiera się na zjawisku sedymentacji.

Dyskusyjne jest zdanie na str. 37 definiujące białka IDP, jako te, które „*ekspresjonowane i oczyszczone w formie pojedynczego łańcucha polipeptydowego w izolacji od innych białek nie fałdują się do stabilnych form przestrzennych*”. Wg mnie chodzi raczej o strukturę albo jej brak w warunkach natywnych. Można zgodzić się ze stwierdzeniem, że „*IDPs działają inaczej niż białka uporządkowane*” ze względu na „*giętkość i dynamizm łańcucha*”, chociaż należy pamiętać, że funkcjonowanie białek globularnych w tym enzymów też często polega na silnych zmianach konformacyjnych. Autor pisze również o tzw. „*wewnętrznym ukryciu*” jako elemencie funkcjonowania IDP. Może warto było w tym miejscu wspomnieć o bardzo



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

rozwijających się badaniach związanych z separacją faz ciecz-ciecz i tworzeniem struktur/organeli bezbłonowych, tym bardziej, że wydaje się, że mają fundamentalne znaczenie dla funkcjonowania receptorów jądrowych i ich fragmentów nieuporządkowanych, a wiedza ta może mieć wpływ na planowanie eksperymentów np. w warunkach tłoku molekularnego.

Bardzo interesująco Doktorant przedstawił swój obiekt badawczy w tym osobisty stosunek do kolejnych mechanizmów działania YY1. Co ciekawe proponowane modele działania pochodzą z przełomu wieków, a nigdy nie zostały zweryfikowane eksperymentalnie. W tym fragmencie jedynie zwróciłbym uwagę na fakt, że stężenie (str. 56) nie wyraża się w mikrogramach; nie wiem dlaczego Autor używa wszędzie myślnika po przedrostku „ko” w słowach takich jak koaktywator, kotransfercja, korepresor, a widma raczej nie mogą „się komplementować” (str. 59).

Cel pracy został jasno sprecyzowany jako próba udowodnienia efektu maskowania N-końcowej domeny aktywatorowej YY1 przez domenę C-końcową.

Na kolejnych 61 stronach (12 - Materiały + 49 - Metody) zostały opisane używane materiały i techniki badawcze wykorzystane w pracy. Nie mam zastrzeżeń, do dobrze merytorycznie napisanych rozdziałów, a jedynie kilka uwag „natury technicznej”. Jednocześnie doceniam ogrom pracy włożonej w opanowanie technik i prowadzenie eksperymentów z zakresu biofizyki, biochemii i biologii molekularnej od izolacji hodowli komórkowych, przez prace z komórkami i białkami, aż po statystyczną ocenę wyników. Wśród drobnych uwag wymieniałbym poniższe. Warunki wirowania raczej wyraża się w jednostkach g , a nie równoważnych im $krcf$. Proszę o wyjaśnienie opisu (str. 77) odnoszącego się do równania 35. Ponieważ jak pisze Autor białko agregowało, co powodowało spadek stężenia po wirowaniu, wydaje się więc, że proces mógł zachodzić cały czas, a pomiary absorpcji na poziomie kilku setnych obciążone dużym błędem. Kolejne zdanie dotyczące DTT jako pozbawione orzeczenia jest zupełnie niejasne. Molowe współczynniki ekstynkcji (FAM, MIANS) mają jednostki $M^{-1}cm^{-1}$ i wypada je podawać. Nb. wybór MIANS wydaje się być dość ryzykowny do znakowanie białka IDP ze względu na niską wydajność kwantową znacznika w warunkach ekspozycji do środowiska hydrofilowego, chyba że chodziło o wyraźne zmiany parametrów fluorescencji w



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

warunkach zmian konformacyjnych. Nie rozumiem zdania ze str. 77 dotyczącego wyznaczania stężenia MIANS, według którego przyjęto dla długości fali 490 nm współczynnik odpowiadający 322 nm. Nb. wartość $27000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dotyczy adduktu z 2-merkaptoetanołem, a dla nieprzereagowanego związku w MeOH - $13000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ przy 443 nm. Wielkość porów (str. 79) w błonie dializacyjnej nie podaje się w kDa, chociaż wiadomo o co Autorowi chodziło, a promień hydrodynamiczny (str. 117) podaje się w Ångstromach. Stężenia YY1 (str. 97) nie wyraża się w ml/ml. Jak długo inkubowano białka z mocznikiem (str. 97). W przypadku domeny ustrukturyzowanej może to mieć istotne znaczenie dla interpretacji wyników ze względu na duże różnice w szybkości fałdowania/refałdowania (wykres Chevrona). Doceniając pomiary anizotropii fluorescencji prosiłbym o odniesienie się do stwierdzenia ze str. 99 „*prawidłową aktywność uzyskanych preparatów YY1 typu dzikiego i jego mutantów weryfikowano przez pomiary stałej dysocjacji*”. Uważam, że zdanie jest nieco na wyrost, a odnosi się do wiązania białko-DNA i przyjętego modelu, a nie aktywności białka. Czy jako kontrolę prowadzono choćby eksperymenty EMSA, które wprawdzie w warunkach nierównowagowych, mogą pokazać zarówno stechiometrię wiązania, jak i zastępczą stałą równowagi. Kolejne pytanie dotyczy analiz termodynamicznych poczynawszy od równania 69. Kluczowym założeniem modelu dwustanowego jest odwracalność procesu. W pracy nie znalazłem informacji czy ją kontrolowano.

Dość karkołomnym zadaniem było wyznaczenie uśrednionej odległości pomiędzy dwoma resztami tryptofanowymi oraz MIANS - znaczniku reszt tiolowych (nb. nazwa maleimid MIANS-u (str. 139, 146) brzmi jak „masło maślane”), biorąc pod uwagę dwa naturalne czasy życia reszt Trp, kłopoty ze znakowaniem białka i dynamikę strukturalną domeny N-końcowej. Autor, co opisuje szczegółowo w Dyskusji, zdawał sobie sprawę z ograniczeń metodyki i traktował wyniki raczej jakościowo. Wydaje się, że wobec wielu mutantów, które przygotował, można było spróbować jeszcze otrzymać preparaty z jednym Trp, bo jednak odległość między resztami 205, a 226 może być całkiem spora, a homoFRET też może mieć wpływ na wyniki. Proponowałbym w przyszłości spróbować pomiarów na poziomie pojedynczych cząsteczek (smFRET) najbardziej nadających się do IDP



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

np. w pracowni cytowanego w pracy Bena Schulera. Według informacji na str. 118 czasy rotacyjnej korelacji wyznaczano z modelu Perrina przy założeniu kulistego (nie *kolistego*) kształtu cząsteczki. Biorąc pod uwagę własności IDP wydaje się, że elipsoida obrotowa byłaby bardziej odpowiednia, a ultrawiarowanie analityczne ew. pomiary FCS czy SAXS dałyby odpowiedź na pytanie o kształt cząsteczki.

Wyniki badań przedstawiono na 84 stronach w tym 12 - Suplementu. Autor w tej części przedstawia „suche” wyniki, a dopiero w Dyskusji się do nich odnosi. Może dobrze byłoby gdyby pojawiał się nawet jednozdaniowy cel eksperymentu i wnioski. Długi fragment dotyczy „walki” Doktoranta z warunkami specyficznego znakowania fluorescencyjnego różnych wariantów YY1. Słusznie, choć nieco zbyt patetycznie pisze, że było” to „*najważniejszym kamieniem milowym*” pracy. Proszę wyjaśnić czy Autor ma jakieś wyjaśnienie poprawy selektywności znakowania (str. 131) w obecności DNA. Wydaje się, że można było skrócić opis częściowo nieudanych eksperymentów (str. 132-138) związanych np. z wpływem jonów Zn^{2+} na znakowanie YY1. Zależność stałej szybkości znakowania od stężenia fragmentu NTFYY1 na rys. 19 nie jest liniowa w obecności jonów Zn^{2+} , a sugeruje silną zmianę konformacyjną białka. Jak Autor ten wynik interpretuje. Wydaje się też, że wobec braku pełnego wysycenia krzywych zależności anizotropii fluorescencji od stężenia białka (rys. 25) wartości stałych dysocjacji są obciążone dużym błędem, chociaż oczywiście wnioski jakościowe są uprawnione. Z kolei interpretacja zamieszczona w Dyskusji dotycząca spadku (!) anizotropii podczas tworzenia kompleksu YY1-DNA do mnie przemawia. Próby dopasowywania wyników z Rys. 27 i 28 do równania 68 nie miało większego sensu wobec prawie liniowej zależności $A=f(c)$, braku wysycenia. Tym samym wartości r kompleksu mogły zostać pominięte. Nb. często wobec denaturanta chemicznego obserwuje się zapadanie cząsteczki IDP w obecności niskich stężeń denaturanta, co może wywoływać różny wpływ na parametry hydrodynamiczne cząsteczki.

Nie do końca zgadzam się z interpretacją wyników wpływu NaCl na promień hydrodynamiczny YY1 i NTF-YY1 jako „*atypowe*” (str. 156). Otóż dla białek IDP jest to raczej typowy efekt wpływu jonów dodatnich, przeważnie silniejszy jonów dwuwartościowych, zmniejszania R_h . Natomiast w przypadku białka pełnej długości



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

obserwuje się zapewne wpływ wypadkowy. Może pomiary DLS lub SAXS dałyby bardziej konkluzywne wyniki. Analogicznie, jako wyłącznie jakościowe traktowałbym wyniki wpływu soli na anizotropię fluorescencji w związku z braku wstępnego plateau (rys. 32-35, Tab. 8), co zresztą jest typowe dla białek IDP, ale w konsekwencji ogranicza stosowanie modelu dwustanowego, a wartości parametrów termodynamicznych opatrzyłbym dodatkiem „pozorna, zastępcza itp.”.

Kolejnym, niezwykle interesującym i ważnym dla wniosków końcowych, etapem pracy były badania zmian konformacyjnych YY1, polegające na pomiarach odległości między wybranymi punktami białka i DNA techniką wykorzystującą FRET. Biorąc pod uwagę cały szereg założeń i przybliżeń, z których większości Doktorant zdawał sobie sprawę, cel pracy został osiągnięty. Można oczywiście dyskutować nad doborem par donora i akceptora zbyt odległych od R_0 równego np. 24 Å dla pary Trp – MIANS wobec wyznaczonych odległości 73 Å-87 Å dla mutantu S14C w różnych warunkach eksperymentalnych, co jest poza zakresem $0.5R_0-2R_0$ typowo przyjmowanym dla pomiarów FRET (Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; str. 446). Podobnie wypadałoby przedyskutować wartość współczynnika kierunkowego przyjętego jako $2/3$, co zakłada pełną swobodę rotacji znacznika, szczególnie w odniesieniu do białka pełnej długości. To mimo tych zastrzeżeń uważam, że obraz zmian konformacyjnych YY1 wobec elementu regulatorowego został przedstawiony prawidłowo. Ciekawe czy Autor próbował spojrzeć na kompleks białko-DNA z punktu widzenia zmian konformacyjnych cząsteczki DNA. W literaturze opisywane jest zjawisko zginania DNA podczas interakcji z białkiem jako element regulacji transkrypcji.

Nie do końca dla mnie jasnym było przesłanie dotyczące badania wpływu pH na różne warianty YY1. Uzasadnienie dotyczące możliwości zastosowania FAM jest jasne. Może jednak trzeba było rozważyć użycie jednego z wariantów znaczników cyjanidynowych, biorąc pod uwagę znane kłopoty z fluoresceiną. Natomiast z oczywistych względów 31 reszt Asp i 2 Glu YY1 ulega uprotonowaniu w niskich pH, co często prowadzi do fałdowania białek IDP i tak bym interpretował wykresy zależności $r=f(\text{pH})$.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

Na str. 181, w podsumowaniu pomiarów anizotropii, pojawia się stwierdzenie o braku początkowego plateau na krzywych denaturacji, z odniesieniem do równania 85 na str. 108, a nie - 77). Dobrze byłoby wyjaśnić co Doktorant rozumie przez pojęcie denaturacji w odniesieniu do białka IDP i w jaki sposób „*dopasowanie globalne*” uprawnia do wyciągania wniosków przedstawionych w Tab. 11. Wcześniejsza uwaga dotycząca odwracalności pozostaje w mocy.

Nie mając zastrzeżeń do pomiarów CD chciałbym zapytać jak Autor interpretuje przebieg widma domeny wiążącej DNA i brak przejścia denaturacyjnego (rys. 56, 57) skoro zawiera ponad ok. 65% struktur uporządkowanych. Widma na rys. 56 można było przedstawić w szerszym zakresie długości fal, a nie rozpoczynać od 210 nm, szczególnie przy niższych stężeniach mocznika.

Dyskusja (38 stron w tym Wnioski końcowe (3 str.)) to bez wątpienia najlepiej napisany fragment rozprawy, chociaż trafiają się takie fragmenty jak: „*rozumienie kontrowersyjne na opak*” (str. 207), żargonowe „*niska i wysoka sól*” (str. 212, 215, 216) czy „*obcinanie palca cynkowego*” (str. 220). Co najważniejsze przedstawiono szereg własnych wątpliwości, zwracając uwagę na ograniczenia i przybliżenia stosowanych metod. Autor pokazał, korzystając często z jakościowych wyników, model zmian konformacyjnych YY1 (rys. 66, 67) podczas interakcji z DNA, który broni się wobec wszystkich danych eksperymentalnych i to uważam za największe osiągnięcie pracy, a nie opracowanie warunków specyficznego znakowania fluorescencyjnego, chociaż oczywiście doceniam wkład pracy włożony w te eksperymenty. Po raz pierwszy pokazano bezpośrednio oddziaływanie domen NTF i DBD w oparciu o elektrostatyczne oddziaływania, chociaż nie do końca zgadzam się ze stwierdzeniem ze str. 225 że „*przedyskutowane wyniki ... in vitro...*” otrzymano „*...w warunkach zbliżonych do fizjologicznych*”. Może warto było opisać co wiadomo o warunkach fizjologicznych funkcjonowania YY1. Wydaje się, że eksperymenty nie dają powodu do wyciągnięcia wniosku, że „*sól ekranuje odpychające oddziaływania, powodując jego zwinięcie*” (str. 229), chyba, że „*zwinięcie*” Autor rozumie jako „*zapadanie struktury lub fałdowanie*”. Czy przeprowadzono eksperyment wpływu NaCl, a także pH na widma CD.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

Jako recenzent niezwykle cenię odwagę młodego uczonego w podjęcie trudnego tematu, wiarę w swoje wyniki, jak również umiejętność przyznania się do porażek w odniesieniu do niektórych eksperymentów i krytycznej analizie pozostałych. O profesjonalnym podejściu do badań świadczy końcowy podrozdział dotyczący interpretacji wyników, kierunków dalszych badań w niezwykle interesującej tematyce, jak np. badania roli modyfikacji posttranslacyjnych YY1 w funkcji białka, czy interakcji z innymi białkami aparatu transkrypcyjnego. W pierwszej kolejności proponowałbym immunofiliny.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Adama Górki spełnia wymagania stawiane w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. z 2016 r., poz. 882), stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autora i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, tym samym uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Adama Górki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki