



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ
DR HAB. ARTUR OSYCZKA, PROF. UJ

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Filipa Gołębiowskiego:
"Analiza oddziaływania ludzkiego czynnika transkrypcyjnego Yin Yang 1 z DNA"**

Oddziaływania typu białko-białko oraz białko-DNA stanowią istotny element szeregu różnorodnych procesów biologicznych istotnych dla funkcjonowania komórek i organizmów. Dlatego też szczegółowe poznanie i zrozumienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw tego typu oddziaływań stało się jednym z ważnych wyzwań współczesnej biologii molekularnej i komórkowej, biochemii i biofizyki. W nurt tych badań wpisuje się przedstawiona mi do recenzji praca Pana mgr Filipa Gołębiowskiego pt "Analiza oddziaływania ludzkiego czynnika transkrypcyjnego Yin Yang 1 z DNA"

Ludzkie białko Yin yang 1 (YY1) jako czynnik transkrypcyjny odpowiadający za specyficzną regulację ekspresji genów, może pełnić dwie przeciwstawne funkcje represora lub aktywatora transkrypcji. Ma przy tym zdolność do oddziaływania różnymi sekwencjami na wielu promotorach, a ciekawym elementem budowy białka jest obecność fragmentów nieustrukturalizowanych. Jest to zatem interesujący układ do badań oddziaływań typu białko-DNA w kontekście rozpoznawania molekularnego i możliwych dynamicznych zmian konformacyjnych jakie temu mogą towarzyszyć. Doktorant postawił sobie w pracy trudne zadanie przeanalizowania siły i specyficzności oddziaływania YY1 z wybranymi sekwencjami DNA pochodzącymi z promotorów genów. Badanie oddziaływań tego typu stało się możliwe dzięki użyciu rekombinowanej formy białka uzyskanej w systemie ekspresyjnym *Escherichia coli*. Dlatego też praca obejmuje dwie części. Pierwsza ma charakter metodyczny i opisuje opracowanie samej metody ekspresji i oczyszczania YY1 o pełnej długości białka oraz domeny wiążącej DNA białka YY1 (YY1-DBD). Druga, opisuje analizę oddziaływania białko-DNA z zastosowaniem technik biofizycznych.

Rozprawa doktorska Filipa Gołębiowskiego jest zwięźle i ciekawie napisanym opracowaniem obejmującym typowe rozdziały: Streszczenie, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski końcowe, Bibliografię, Załączniki oraz Dorobek naukowy.

We wprowadzeniu Doktorant szczegółowo omówił obecny stan wiedzy na temat struktury i funkcji białka YY1 ze szczególnym uwzględnieniem tych aspektów molekularnego oddziaływania, które wiążą się bezpośrednio z podjętymi w dalszej części badaniami. Omówił też pokrótce metody produkcji i oczyszczania białek rekombinantowych, a także wprowadził podstawy stosowanych technik badawczych (testu przesunięcia na żelu, anizotropii fluorescencji, oraz pomiaru zmian powierzchniowego rezonansu plazmonów). Rozdział ten został klarownie napisany w sposób warunkujący zrozumienie nawet przez osobę, która nie jest specjalistą w dziedzinie. Rozdział ten świadczy o bardzo dobrej ogólnej znajomości tematu przez doktoranta pokazując jednocześnie, że rozumie problematykę podjętą w części doświadczalnej.

Materiały i metody zawierają opis konstruktów genetycznych użytych w pracy a także opis podstawowych technik genetycznych, biochemicznych i spektroskopowych użytych w pracy.

W rozdziale Wyniki zostały omówione rezultaty badań ekperymentalnych obejmujących: i) otrzymanie konstruktów genetycznych do produkcji białek rekombinowanych, ii) samą produkcję a później oczyszczanie tychże białek, iii) refaldowanie białka YY1-DBD i oczyszczanie na kolumnie z immobilizowanym DNA, iv) analizę wpływu czynnika redukcyjnego i cynku na stabilność białka, vi) pomiary widm dichroizmu kołowego oczyszczonych białek, vii) pomiary anizotropii fluorescencji znacznika zlokalizowanego na końcu zmodyfikowanej nici DNA w oddziaływaniach z formami YY1 co posłużyło wyznaczeniu stałych wiązania do wybranych 20-nukleotydowych fragmentów DNA, viii) analizę wpływu stężenia NaCl na stałą wiązania, ix) oszacowanie siły wiązania niespecyficznego, oraz x) pomiar kinetyki wiązania za pomocą techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów (SRP).

Rozdział Dyskusja stanowi naturalną kontynuację rozważań nad problemami, które zostały wcześniej wprowadzone w poprzednich rozdziałach, a teraz zostają dalej rozwijane i pogłębiane w świetle uzyskanych wyników.

Lektura rozprawy doktorskiej nasuwa szereg interesujących spostrzeżeń i pytań do dyskusji.

1. W materiałach i metodach znajduje się opis pomiarów anizotropii fluorescencji w fazie stacjonarnej. Opis wprawdzie zawiera definicję podstawowych parametrów, jednakże brak jest szczegółowych informacji dotyczących metodologii tego pomiaru. W szczególności średnia anizotropia r_{avg} (wzór 2.4) intuicyjnie wydaje się być liniowo zależna od ilości związanego liganda jednakże nie jest to całkowicie jasne, szczególnie dla osób, które nie specjalizują się w pomiarach anizotropii fluorescencji. Parametr ten wydaje się być czymś w rodzaju całkowania intensywności fluorescencji ulegającej osłabieniu na skutek dynamiki znacznika. Przy okazji rodzi się pytanie, czy można by wykorzystać pomiar kinetyki zaniku anizotropii fluorescencji, który jest procesem dynamicznym i wykorzystać pomiar średniego czasu korelacji rotacyjnej do analizy wiązania się liganda. Wówczas być może założenie o zmianie wydajności kwantowej fluorescencji przy wiązaniu liganda nie byłoby wymagane.
2. Doktorant opisuje w pracy analizę wiązania DNA do białka z wykorzystaniem programu DynaFit do wydobywania danych dotyczących stałej dysocjacji procesu wiązania. Analiza ta opiera się na pomiarach anizotropii fluorescencji w zależności od stężenia liganda (miejsc wiążących) stosując model 1:1. Wyniki eksperymentu wraz z dopasowaniem przedstawione są na wykresach zależności parametru $r/r(0)$ od stężenia białka. Nasuwają się w związku z tym dwie uwagi: 1) Nie jest wytłumaczone czym jest wielkość parametru $r(0)$. Czy jest to parametr anizotropii przy braku rotacji (próbka zamrożona), który opisany jest w materiałach i metodach jako r_0 , czy też może chodzi o wartość dla liganda bez dodatku miejsc wiążących, a więc przy minimalnym czasie rotacyjnej korelacji znacznika? Można się wprawdzie domyśleć, że chodzi o drugi przypadek, jednakże powinno to być wyraźnie zaznaczone. 2) Pojawia się też problem przejścia od ogólnych założeń modelu do realizacji procesu optymalizacji parametrów programem DynaFit. Brakuje w pracy opisu symbolicznego modelu używanego do optymalizacji lub przynajmniej algorytmu, który jest

wprowadzany do programu minimalizacyjnego. W związku z tym pojawia się następująca ogólna uwaga dotycząca analizy. Krzywe wiązania liganda do receptora powinny być przedstawione w przestrzeni zależności stężenia liganda związanego w zależności od całkowitego jego stężenia w roztworze, przy czym przyporządkowanie znaczenia ligand/miejsce wiążące można stosować wymiennie ale konsekwentnie. Natomiast wykresy przedstawione w pracy pokazują zależność parametru spektroskopowego proporcjonalnego do ilości związanego liganda (DNA znakowanego fluoroforem) w zależności od stężenia miejsc wiążących (równych stężeniu białka YY1 w roztworze). Jednakże, zagadnienie jakiej transformacji ulegną dane po przekształceniu danych do przestrzeni ilości białka YY1 obsadzonego DNA od całkowitego stężenia białka YY1 w roztworze nie jest trywialne. W pracy brakuje dyskusji i informacji na ten temat.

3. Czy podczas optymalizacji „jednoczesnej” autor ma na myśli analizę globalną gdzie mamy do czynienia z parametrami optymalizowanymi globalnie (dla wszystkich krzywych) oraz parametrami lokalnymi optymalizowanymi osobno dla każdego zbioru? W materiałach i metodach znów nie jest to wystarczająco opisane.
4. Doktorant opisuje próbę izolacji białka YY1 i YY1-DBD w warunkach natywnych, która się nie powiodła. Niestety nie udało mi się znaleźć informacji jaką metodą było to białko izolowane. Można przypuszczać, że przeprowadzono to oczyszczanie na złożu Ni-NTA (tak jak w przypadku izolacji prowadzonych w warunkach denaturujących). Jeśli tak, to czy brak powodzenia w izolacji spowodowany mógł być brakiem dostępności metki dla złoża w stanie natywnym, a nie brakiem stabilności, jak sugeruje doktorant?
5. Strona 74. „brak wysycenia świadczy o zachodzących dodatkowych procesach..” To bardzo częsty problem i bardzo trudny w analizie i poświęcono mu szereg opracowań (np. Mendel & Mendel 1985, Biochem. J.228 p. 269, Van Zoelen, Biochem. J.262 p 549). Można było poświęcić więcej uwagi temu zagadnieniu zwłaszcza w kontekście pytania czemu brak wysycenia wydaje się być obecny jedynie w pomiarach SRP (a nie w pomiarach anizotropii fluorescencji).
6. Dyskusja str. 75 - „Wykonane pomiary ...by zapewnić wymaganą specyficzność oddziaływania ” oraz Wnioski końcowe, str 92 – „Wykonane pomiary wskazują na względnie niską siłę oddziaływania ze specyficznym DNA, która.... dała niskie współczynniki specyficzności. Sugeruje to konieczność zaangażowania się dodatkowych czynników, korelatorów, które oddziałując z białkiem YY1 lub DNA pomogły by zapewnić mu siłę wiązania konieczną do wydajnej regulacji transkrypcji” W domyśle odczytuję ten wniosek w następujący sposób: dodatkowe czynniki pomagają zapewnić wymaganą specyficzność rozpoznania docelowej sekwencji DNA, tak by zagwarantować siłę wiązania konieczną do wydajnej regulacji transkrypcji. W moim odczuciu specyficzność i siła oddziaływania są tutaj stosowane wymiennie, jednakże terminy te nie oznaczają tego samego.

Mam również parę uwag edytorsko-stylistycznych:

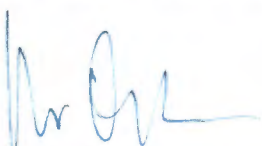
1. W wielu miejscach w pracy brakuje opisu niektórych skrótów (np. TFA – kwas trifluorooctowy? RU – czy to są jednostki rezonansowe?) lub też opis pojawia się z

opóźnieniem w odniesieniu do miejsca kiedy dany skrót się pojawił po raz pierwszy. Przykładowo YY1-DBD – opis znajduje się dopiero na stronie 48 podczas gdy skrót używany był wielokrotnie wcześniej, pierwszy raz 30 stron wcześniej.

2. Opis typu fluoroforu jakiego używano w pomiarach pojawił się dopiero na stronie 64.
3. Rysunek 2.2 brak opisu co oznacza kolor czerwony
4. Tabela 5.7 str. 66 – brak opisu co to jest współczynnik specyficzności?
5. Tabela 5.9 str. 73 – brak opisu co to jest $t_{1/2}$?
6. Wprowadzenie, str. 11, nie pojmuję logiki sformułowania „Poniższy rozdział ma za zadanie przedstawić mechanizmy regulacji genów przez białko YY1 które były wykorzystane w pomiarach biofizycznych w niniejszej pracy. Pochodzą one z elementów regulacyjnych genów komórkowych lub wirusowych”
7. Cel pracy, str 24 : „dokładniejsze poznanie” i „lepsze zrozumienie” to w moim odczuciu niezbyt trafne sformułowania, lepiej byłoby w tym miejscu wyjaśnić co kryją w sobie słowa „dokładniejsze” i „lepsze”
8. Na stronie 58 pojawia się wartość odpowiedzi końcowej r_{CS} - czy jest to wartość anizotropii przy maksymalnym wysyceniu miejsc wiążących?
9. Wyniki, str 63: „Aby dodatkowo potwierdzić... nieuporządkowaną strukturę ...wykonano analizę z użyciem programu PENDOR” Analiza taka może jedynie sugerować, ale na pewno nie potwierdza.

Powyższe uwagi w żaden sposób nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej Pana Gołębiowskiego. Praca opisuje cały szereg rzetelnych i solidnie wykonanych eksperymentów wymagających umiejętnego stosowania różnorodnych technik badawczych zarówno z zakresu genetyki jak i biochemii i biofizyki. Całość świadczy o dojrzałości Doktoranta pod względem naukowym przy planowaniu, wykonywaniu, interpretowaniu i dyskusowaniu wyników badań naukowych. Prezentowane doświadczenia i wyniki mają charakter nowatorski dostarczając ciekawych i konkretnych informacji dotyczących oddziaływania YY1-DNA w kontekście poznawania molekularnych mechanizmów oddziaływania typu białko-DNA leżących u podstaw fundamentalnych procesów biologicznych. Należy przy tym podkreślić że wyniki te stały się podstawą dwóch publikacji naukowych (w *FEBS Journal* oraz *Protein Expression and Purification*), w których Pan Gołębiowski jest pierwszym autorem.

Mając na względzie przedstawioną powyżej opinię, uważam że prezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi niezbędne do uzyskania stopnia doktora nauk przyrodniczych. Dlatego też zwracam się z prośbą do Rady Naukowej Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Filipa Gołębiowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/Artur Osyczka/

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UJ
ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ