



Politechnika Wrocławska

Wydział Chemiczny | Wydziałowy Zakład Biochemii

Prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar
andrzej.ozyhar@pwr.wroc.pl

Wrocław, 12 listopada, 2012

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Filipa Gołębiewskiego

Analiza oddziaływania ludzkiego czynnika transkrypcyjnego

Ying Yang 1 z DNA

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Zakładzie Biochemii Fizycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Promotorem pracy jest prof. dr hab. Marta Dziedzicka-Wasylewska

Przedstawiona do recenzji i przygotowana w języku polskim rozprawa mgr. Filipa Gołębiewskiego liczy 103 strony i ilustrowana jest 24 rysunkami, 11 tabelami. Praca zbudowana jest w sposób klasyczny i obejmuje: *Spis części używanych skrótów, Streszczenie, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki i Dyskusję*. Całość zamykają *Wnioski końcowe, Bibliografia, Załączniki i Dorobek naukowy*.

Ekspresja genu, to złożony wieloetapowy proces, który z reguły podlega precyzyjnej regulacji, najczęściej już podczas inicjacji transkrypcji, której efektywność zależy od różnorodnych białek formujących specyficzne kompleksy z DNA. Jednym z tego rodzaju białek jest ludzki czynnik transkrypcyjny Ying Yang 1 (YY1). YY1, jak wskazuje jego nazwa, może pełnić dwie przeciwstawne funkcje – represora lub aktywatora transkrypcji genów, których promotory zawierają sekwencje specyficznie wiążące YY1. Co ciekawe, sekwencje te są znacznie zróżnicowane a sekwencja zgodna jest określona dla krótkiej sekwencji rdzeniowej CCAT. Naturalnym stało się zatem obranie za cel pracy doktorskiej poznanie mechanizmu oraz siły i specyficzności oddziaływania YY1 ze zróżnicowanymi sekwencjami rozpoznawanymi przez to białko w promotorach różnych genów. Cel ten został zrealizowany a przedstawione w rozprawie wyniki są nie tylko oryginalne, ale też ważne i nietrywialne. Na uznanie zasługuje fakt, swobodnego posługiwania się przez doktoranta bardzo szeroką paletą technik. W celu otrzymania i scharakteryzowania badanych rekombinowanych białek stosował on z powodzeniem nie tylko techniki inżynierii genetycznej, ale również szereg metod właściwych badaniom biochemicznym/biofizycznym białek, w tym wiążących specyficznie DNA.

Politechnika Wrocławska
Wydział Chemiczny
Wydziałowy Zakład Biochemii
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50 370 Wrocław

tel. +48 71 320 63 33
fax. +48 71 320 63 37

Za najważniejsze wyniki, uzyskane w trakcie badań składających się na rozprawę doktorską, uważam:

- opracowanie oryginalnej metody pozwalającej na prowadzenie efektywnej nadekspresji YY1 oraz jego fragmentu zawierającego domenę wiążącą DNA (YY1-DBD) w komórkach *Escherichia coli*;
- opracowanie nowej wydajnej procedury fałdowania i oczyszczania aktywnych YY1 i YY1-DBD, zdolnych do wiązania specyficznych sekwencji DNA;
- uzyskanie danych eksperymentalnych wskazujących na to, że rekombinowane YY1 posiada fragment o inherentnie nieuporządkowanej strukturze;
- stwierdzenie, że pełnej długości YY1 i YY1-DBD wiążą specyficzne sekwencje DNA ze zróżnicowaną siłą (różne stałe K_D dla różnych sekwencji) – jednak, wartości stałych K_D wyznaczone dla danej sekwencji nie różniły się istotnie dla YY1 i YY1-DBD; sugeruje to, że przynajmniej w warunkach prowadzonych eksperymentów N-końcowa inherentnie nieuporządkowana domena obecna w pełnej długości YY1 nie wpływa na rozpoznanie DNA;
- zaobserwowanie, że wyznaczone stałe K_D są względnie duże (0,2-12 μM) i tylko niewiele się różnią od stałych wyznaczonych dla oddziaływania z niespecyficznym DNA (30-40 μM), co skutkuje małymi wartościami współczynników specyficzności - zatem, jak słusznie konkluduje doktorant, YY1 wiąże specyficzne sekwencje DNA z *niską siłą i specyficznością*. Sugeruje to, zdaniem doktoranta, iż w komórce skuteczne rozpoznanie właściwej, specyficznej sekwencji przez YY1 musi być wspomagane przez inne białka. Jest to wartościowy, wynik, który moim zdaniem tłumaczy dualność funkcji YY1, zależną najprawdopodobniej od partnerów białkowych. Wynik ten jest też cenną wskazówką co do kierunku dalszych badań, które powinny zmierzać do identyfikacji partnerów białkowych modulujących interakcję YY1 z DNA.

Nie mam wątpliwości, że praca wypełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie o Stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami). Z recenzenckiego obowiązku pragnę jednak przedstawić kilka uwag, komentarzy, które przyporządkowałem wybranym rozdziałom rozprawy.

Wprowadzenie

Wprowadzenie, będące wstępem do pracy, zajmuje 23 strony. Doktorant podzielił je na 11 podrozdziałów, z których pierwszych 8 numerowanych jest konsekwentnie od 2.1.1 do 2.1.8, co sugeruje ich przynależność do fragmentu 2.1 noszącego tytuł *Struktura i funkcja białka YY1*. Siedem pierwszych podrozdziałów to zbiór informacji ważnych dla wyjaśnienia celowości podjęcia badań, które złożyły się na pracę. Zaskakujące, w tym kontekście, jest umieszczenie w tej części *Wprowadzenia* podrozdziału 2.1.8 *Metody produkcji białek rekombinowanych*, który, jak sam jego tytuł wskazuje, poświęcony jest ogólnej prezentacji technik nadekspresji białek rekombinowanych. W podrozdziale tym brak jakichkolwiek informacji literaturowych

dotyczących nadekspresji rekombinowanego YY1 – zatem nie wnosi on nic do wiedzy o *Strukturze i funkcji YY1*. Szkoda, natomiast, że zamiast tego podrozdziału w pracy nie znalazł się inny, poświęcony krytycznemu przedstawieniu metod nadekspresji i oczyszczania rekombinowanego YY1.

Trzy ostatnie podrozdziały (numeracja: 2.2.1-2.2.3) omawiają metody, użyte przez doktoranta do biochemicznej/biofizycznej analizy oddziaływania YY1 i YY1-DBD z DNA. Jednak, chociaż numeracja sugeruje, że podrozdziały te należą do innego rozdziału niż 2.1 *Struktura i funkcja białka YY1*, rozdział taki nie istnieje.

Inne uwagi dot. *Wprowadzenia*:

- str. 11, rozdz. 2.1.3; *c-myc*, *ERBB2*, *c-fos* to protoonkogeny, a nie onkogeny.
- rozdz. 2.2.3, *Pomiary oddziaływania w czasie rzeczywistym za pomocą techniki pomiaru zmian powierzchniowego rezonansu plazmonów* – brak jakichkolwiek odnośników literaturowych.

Cel pracy

Podstawowy cel naukowy rozprawy (*Głównym celem tej pracy było dokładniejsze poznanie mechanizmu oraz siły i specyficzności oddziaływania ludzkiego czynnika transkrypcyjnego Ying Yang 1 z wybranymi sekwencjami DNA pochodzącymi z promotorów genów*) sformułowany na stronie 24 jest klarowny. Został on zrealizowany i odpowiada tytułowi rozprawy.

Materiały i metody

Przedstawione w tej części pracy informacje z reguły pozwalają na analizę i odtworzenie istotnych szczegółów przeprowadzonych doświadczeń. Jednak, niektóre z informacji są mało precyzyjne lub niedostateczne. Parę przykładów:

- str. 32, rozdz. 4.2.4, *Typowo do 100 µl komórek kompetentnych dodawano 0,5 – 5 µl DNA*. O jakim stężeniu???
- str. 40, rozdz. 4.2.18 *Przed każdym rozdziałem kolumna z immobilizowanym DNA była podłączana do układu chromatograficznego Äkta explorer i przemywana dużą ilością ddH₂O aby odmyć bufor z detergentem w którym przechowywano złoże. To znaczy jaką ilość???* W tym przypadku objętość wody użytej do usunięcia detergentu może mieć krytyczne znaczenie dla powodzenia eksperymentu, gdyby ktoś chciał go powtórzyć.
- rozdz. 4.1.4 A) *Elektroforeza* i B) *Western blot*, rozdz. 4.2.1 *Przygotowanie pożywki LB*, rozdz. 4.2.4 *Transformacja plazmidowego DNA do komórek chemicznie kompetentnych* – brak odnośników literaturowych.
- co oznacza sformułowanie *na powietrzu* w zdaniu *Oligonukleotydy były hybrydyzowane poprzez ogrzanie przez 5-10 minut w temperaturze 95°C a następnie powolne chłodzenie w termobloku na powietrzu, przez co najmniej kilka godzin.* (str. 42, ostatnie dwie linie).
- co oznaczają sformułowania *średnia siła* i *duża siła* w zdaniu *Sonikację prowadzono przez 1 minutę przy średniej sile i 2 razy po 2 minuty przy dużej sile.* (str. 43, linie 5 i 6)?

Wyniki

W tej części pracy przedstawione zostały dane dokumentujące dwie grupy eksperymentów. Pierwsza to te, których celem było otrzymanie aktywnego preparatu YY, jego pochodnej (YY1-DBD) oraz ich scharakteryzowanie. Nie mam najmniejszej wątpliwości, że eksperymenty zakończyły się sukcesem. Doktorantowi udało się pokonać szereg trudności związanych ze słabą ekspresją/rozpuszczalnością rekombinowanych pochodnych YY. Po opracowaniu warunków zwijania zdenaturowanego białka oraz włączeniu do procedury oczyszczania chromatografii powinowactwa, otrzymane zostały preparaty zawierające aktywne, tj. zdolne do specyficznej interakcji z DNA, białka o czym świadczą analizy EMSA oraz pomiary anizotropii fluorescencji. Jest to znaczące osiągnięcie o czym świadczy fakt opublikowania większości prezentowanych w rozprawie danych dotyczących nadekspresji i oczyszczania przez *Protein Expression and Purification* (Gołębiowski i wsp. (2011) *Protein Expr Purif* 77: 198-206). Co ciekawe publikacja, która ukazała się w 2011 roku była już cytowana przez autorów artykułu poświęconego otrzymywaniu rekombinowanych białek zawierających motyw palca cynkowego wiążących DNA (Belak ZR, Nair, Ovsenek, N (2011) *Biotechnol Appl Biochem* 58(3), 166-174). Bardzo interesującym wynikiem prezentowanym w tej części pracy jest widmo CD YY1, charakterystyczne dla białek zawierających fragmenty o nieuporządkowanej strukturze drugorzędowej. Biorąc powyższe dane pod uwagę oraz posiłkując się analizami bioinformatycznymi doktorant wyciąga prawidłowy wniosek, zgodnie z którym N-końcowa domena YY1 jest, przynajmniej częściowo, nieuporządkowana. Druga grupa eksperymentów, to szczegółowa analiza interakcji YY1 z DNA, która pokazała, że białko to wiąże specyficzne sekwencje DNA z małą siłą i specyficznością, co sugeruje że rozpoznawanie tych sekwencji musi być zależne od interakcji z innymi białkami. Wyniki te są nietrywialne i ich waga została niewątpliwie doceniona przez recenzentów *FEBS Journal*, w którym zostały opublikowane (Gołębiowski i wsp. (2012) *FEBS J*, w druku)).

Inne bardziej, bardziej szczegółowe, uwagi dotyczące *Wyników*:

- w pracy brak jest wyników standardowej i bardzo ważnej analizy SDS/PAGE, które pozwoliłyby na oszacowanie czystości/homogenności otrzymanych preparatów białek. Co ciekawe, wynik takiej analizy jest prezentowany w publikacji (Gołębiowski i wsp. (2011) *Protein Expr Purif* 77: 198-206), której doktorant jest pierwszym autorem.
- w Tabelach 5.7 i 5.8 zebrane są wartości stałych dysocjacji (K_D) – jednak doktorant w tekście (np. str. 71, linia 26 ... *w zależności od porównywanych stałych wiązania* (Tabela 5.7).) używa pojęcia stałych wiązania (K_a), które nie są przecież identyczne ze stałymi dysocjacji, chociaż od nich zależne.
- W *Wynikach* pojawiają się nierzadko zwroty, które mają charakter żargonu laboratoryjnego, jak na przykład: *białko było wymywane podwyższonym stężeniem soli*.... (str. 54 linia 22, 23), powinno być: białko było wymywane buforem zawierającym podwyższone stężenie soli.

Dyskusja

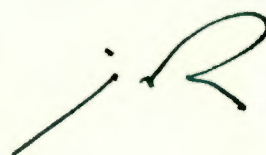
Obszerna *Dyskusja* otrzymanych wyników przedstawiona jest na 17 stronach. Doktorant systematycznie omawia znaczenie poczynionych obserwacji, zarówno tych podczas opracowania procedury nadekspresji/izolacji YY1 i YY1-DBD, jak również podczas analizy ich właściwości. Zwraca uwagę swoboda dyskusji, dbałość o rozważanie różnych aspektów analizowanych problemów a także dobra znajomość literatury. W *Dyskusji* znalazłem też fragmenty, które nawiasem mówiąc, są dyskusyjne.

Na stronie 84 doktorant pisze *Wyniki uzyskane w teście EMSA potwierdzają, że zakładana stechiometria oddziaływania YY1-DNA wynosi 1:1*. Otóż analizy EMSA tylko w szczególnych warunkach, po uzyskaniu krzywej kalibracyjnej, pozwalają wyznaczyć, przybliżoną wartość masy cząsteczkowej kompleksu. W pracy jednak takich eksperymentów nie opisano. Przedstawione wyniki pozwalają sądzić, co najwyżej, że obserwowany jest jeden rodzaj kompleksów, nic jednak nie mówią o stechiometrii oddziaływania. Skąd wiadomo, na przykład, że YY-1 nie występuje, szczególnie w warunkach testu EMSA, w postaci stabilnego dimeru? Wyniki filtracji żelowej nie wykluczają w żadnym razie takiego scenariusza. Wprawdzie doktorant twierdzi (str. 83, linia 7), że *przeciwko możliwości występowania białka jako multimeru przemawia fakt, iż podczas sączenia nie obserwowano innych pików (o wyższym lub niższym stopniu złożoności) w zakresie stężeń od ok. 0,3 do 1 mg/ml*. Jednak, wnioskowanie to jest pochopne, gdyż znane są kompleksy stabilne w dużym zakresie stężeń, które w trakcie filtracji żelowej obserwowane mogą być jako pojedynczy pik. Zatem wyznaczona dla YY1 pozorna masa cząsteczkowa może być też interpretowana jako odpowiadająca dimerowi, w którym końce N monomerów są nieuporządkowane. Z tego samego powodu twierdzenia, że *preparat był monomeryczny* (Streszczenie, str. 1, linia 17) oraz, że *uzyskane białka były monomeryczne* (Wnioski końcowe, str. 92, linia 10) są nieuprawnione. Byłyby one uprawnione, gdyby doktorant wyznaczył masę cząsteczkową, przy pomocy innych niż sączenie molekularne technik (np. ultrawirowanie analityczne, analiza Fergussona).

Na koniec parę słów odnośnie zmagania doktoranta z terminologią, które to zmagania bardzo dobrze rozumiem, a które są skutkiem tego, że jest on jednym z pionierów wkraczających na jeszcze nieopisany obszar badawczy – białek pozbawionych stabilnej struktury drugo- a często też trzeciorzędowej. W literaturze anglojęzycznej spotkać można kilka terminów, przy pomocy których próbowano oddać naturę nieuporządkowanych białek/regionów: *rheomorphic*, *intrinsically disordered*, *natively denatured*, *natively unfolded*, *intrinsically unstructured*, *mostly unstructured* czy też *natively disordered*. Każdy z wymienionych terminów posiada jakieś ograniczenia, jednak, by uniknąć znaczeniowego chaosu, zaproponowano określenie aby przyjąć określenie *intrinsically disordered* jak najlepiej opisujące stan rzeczy. Doktorant w swej pracy pisze, na przykład, że *domena N-końcowa YY1 jest nieuporządkowana* (str. 63, linia 5) lub też, że *ma nieuporządkowaną strukturę* (str. 63, linia 8/9) co jest w pełni prawidłowe. Jednak radziłbym nie używać w języku polskim, w odniesieniu do struktury białka, terminu *wewnętrznie nieuporządkowana* (str. 83, linia 11). Jest to moim zdaniem nieprawidłowe i uproszczone tłumaczenie terminu *intrinsically disordered*. Bardziej właściwy, moim zdaniem, w

odniesieniu do struktury jest termin *inherentnie nieuporządkowana*.¹ Pojęcie *inherentny* oznacza: tkwiący w czymś w istocie, strukturze, zasadniczym charakterze czegoś, w naturze czegoś; nieodłączny, nieodzowny (za Słownikiem Języka Polskiego PWN, 2007 r.). Określenie to wydaje się najtrafniej oddawać znaczenie angielskiego słowa *intrinsic* (nieodłączny, tkwiący w czymś). Brak stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej, określane jako nieuporządkowanie (*disorder*), jest nieodłączną właściwością białek/regionów nieuporządkowanych tkwi w ich naturze, tj. w sekwencji aminokwasowej łańcucha polipeptydowego.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną, jakość wykonanych doświadczeń przedstawioną do recenzji rozprawę oceniam bardzo pozytywnie, a uwagi krytyczne nie umniejszają tej oceny. Uważam, że mgr Filip Gołębiowski zrealizował cel badawczy a uzyskane przez niego wyniki są oryginalne i znacząco poszerzają wiedzę o ludzkim czynniku transkrypcyjnym. Ponadto stanowią one solidną podstawę do dalszych badań zmierzających do poznania roli inherentnego nieuporządkowania białek. Z pełnym przekonaniem stwierdzam zatem, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie mgr. Filipa Gołębiowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



¹ Dziedzic-Letka A, Ożyhar A (2012) *Postępy Biochemii* 58(1), 100-109.