Uniwersytet Wrocławski

Wydział Biotechnologii
Zakład Inżynierii Białka

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
fax +48 71 375 26 08
www.biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 25 września 2018 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr. Adama Górki zatytułowanej:

„Analiza wewnątrzcząsteczkowych interakcji pomiędzy domenami ludzkiego czynnika transkrypcyjnego Yin Yang w układzie *in vitro*"

Podobnie jak w wielu obszarach współczesnej biologii, tak i w biologii strukturalnej doczekaliśmy się zmiany paradygmatu dotyczącego struktury białek. Do klasycznego podziału Linderstroma-Langa, na strukturę I-, II-, III- i IV-rzędową dołączyły białka w stanie stopionej globuły oraz białka inherentnie nieuporządkowane (ang. *intrinsically disordered proteins*, IDPs). Te ostatnie wzbudzają w ostatnich latach duże zainteresowanie, gdyż obejmują od kilku do nawet około 60 procent białek, w zależności od badanego organizmu i przyjętej definicji tego stanu. Wśród białek IDP znajdują się cząsteczki o kluczowych dla funkcjonowania komórki funkcjach. Do białek typu IDP należy czynnik transkrypcyjny Yin Yang 1 (YY1), pełniący funkcje w tak ważnych procesach, jak embriogeneza, remodelowanie chromatyny czy różnicowanie i proliferacja komórek, wykazując zdolność do aktywowania i represji transkrypcji.

Mgr Adam Górka w swojej rozprawie doktorskiej podjął się zbadania wewnatrzcząsteczkowych oddziaływań w tym białku w celu odpowiedzi na pytanie, jak mogą one wpływać na wiązanie do DNA, a więc na zdolność do represji i aktywacji transkrypcji przez YY1. Badanie białek w stanie nieuporządkowanym jest bardzo trudne ze względu na niemożność zastosowania krystalografii, a badania z użyciem NMR wymagają znakowania izotopowego i są drogie, żmudne, i dostarczają tylko fragmentarycznych danych strukturalnych. W tej sytuacji doktorant zdecydował się na zastosowanie technik spektroskopowych: dichroizmu kołowego (CD), fluorescencji (anizotropii i anizotropii rozdzielczej w czasie, FRET) wraz z trawieniem proteolitycznym, sączeniem molekularnym oraz analizą sekwencji białka YY1.

Praca doktorska mgr. Górki to napisany po polsku maszynopis liczący 269 stron, o strukturze typowej dla prac doktorskich i publikacji z obszaru nauk eksperymentalnych (Streszczenie, *Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski końcowe, Bibliografia, Suplement*). Rozprawa zredagowana i zilustrowana jest starannie, ale zawiera znaczną ilość błędów interpunkcyjnych, typograficznych, syntaktycznych i, niestety, także trochę błędów ortograficznych. Tekst nie jest też wolny od żargonu laboratoryjnego. Błędy te zaznaczyłem w moim egzemplarzu pracy doktorskiej, na wypadek, gdyby doktorant był zainteresowany.

Rozprawa jest bardzo obszerna i trudna w lekturze, gdyż zawiera ogromną liczbę eksperymentalnych danych liczbowych, wynikających z licznych równań, w tym równań bardzo skomplikowanych, nawet jak na pracę z zakresu biofizyki czy chemii biofizycznej.

Rozdział *Wprowadzenie* jest bardzo obszerny, gdyż liczy 42 strony. Doktorant szeroko przedstawia teorię polimerów Florego (a nie Fluorego, jak w tytule rozdziału 1.1), wprowadzając aż 34 równania. Z jednej strony dobrze, że doktoranta interesuje ta teoria, za którą Paul Flory otrzymał nagrodę Nobla z dziedziny chemii w 1974 r., z drugiej myślę, że rozdział mógłby być znacznie krótszy, gdyż nie jest on wprost związany z treścią dalszej części pracy i nie jest w takim zakresie konieczny dla zrozumienia doktoratu. Na przykład, szerszy opis dynamiki konformacji białek, z podaniem skal czasu, na których występuje, byłby być może bardziej przydatny. W dalszej części *Wprowadzenia* autor wnikliwie przedstawia białka, które określa jako samoistnie nieuporządkowane. W tym celu opisuje pewne cechy konformacji białek w różnych stanach i przedstawia metody badania konformacji nieuporządkowanych. Ta część jest adekwatna do dalszej części rozprawy i napisana jest bardzo dobrze. Duży zasób wiedzy zawarty jest też w rozdziale opisującym czynnik transkrypcyjny YY1, począwszy od jego znaczenia i funkcji, poprzez proponowane mechanizmy aktywacji i represji transkrypcji, na opisie sekwencji i struktury kończąc.

Rozdziały *Wyniki* zestawia osiągnięcia uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Najważniejszym osiągnięciem doktoratu jest dostarczenie dowodów eksperymentalnych na istnienie oddziaływania pomiędzy odmiennie naładowanym N- a C-końcowym obszarem białka YY1. Doktorant uzyskał szereg przekonujących danych, przy użyciu odmiennych technik (stacjonarne i rozdzielcze w czasie pomiary anizotropii fluorescencji, pomiary promienia hydrodynamicznego cząsteczki metodą sączenia molekularnego, pomiary widm CD oraz fluorescencyjnych, pomiary FRET). Potwierdzeniem istnienia

wewnątrzcząsteczkowego oddziaływania jest jego wrażliwość na stężenie soli oraz pH. Postulowane oddziaływanie elektrostatyczne dobrze tłumaczy dostępne dane literaturowe. Analizując stabilność mutantów A198C oraz S226C w buforze o wysokiej i niskiej sile jonowej doktorant zaproponował istnienie dodatkowego oddziaływania w środkowej części cząsteczki YY1, o charakterze innym niż elektrostatyczny, które obejmuje także domenę palców cynkowych. Dużą część rozdziału *Wyniki* stanowi optymalizacja selektywnego znakowania białka sondą fluorescencyjną, maleimidem fluoresceiny i maleimidem MIANSu. Uzyskane wyniki są również wartościowe, gdyż mogą być pomocne w znakowaniu cystein w białkach nieuporządkowanych.

Rozdział *Dyskusja* jest także bardzo obszerny; liczy aż 34 strony. Napisany jest w dojrzały sposób, gdyż nie jest prostym podsumowaniem wyników, ale raczej ich interpretacją w świetle danych literaturowych. Jego lektura także nie była czynnością prostą ze względu na wnikliwość i dużą ilość cytowanych danych eksperymentalnych.

Moje uwagi do tekstu rozprawy:

- termin *folding* poprawniej jest tłumaczyć jako zwijanie niż fałdowanie,
- tworząc dopełniacz niektórych nazwisk autor zamiennie stosuje apostrof i myślnik. Prawidłowe jest użycie apostrofu. W innych przypadkach doktorant niepotrzebnie stosuje myślnik (np. Stokes-a),
- str. 35 i str. 43: czy białka naprawdę syntetyzowane są na rybosomie w postaci kłębka statystycznego? Prosiłbym o krótkie uzasadnienie w czasie publicznej obrony,

str. 49: chodzi o stosunek wagowy czy molowy enzymu do substratu?

- rozdział 1.3.2: brakuje cytowań do omawianych modeli aktywacji i represji transkrypcji,
- str. 63: niefortunne określenie „marker masowy",

str. 76: metoda Bradforda, a nie Bradford,

- str. 79: nazwy trypsyna i proteaza V8 należy pisać z małej litery,
- str. 96: limitowana proteoliza to ograniczona proteoliza,
- str. „...uzyskano nie fizyczne wartości jego parametrów.". Prosiłbym o wytłumaczenie tego sformułowania.
- str. 201: „Albo wynika on z zastosowania ...lub może świadczyć o interakcji" – błąd logiczny.
- Tabela 14: „...w kompleksie... lub poza nim". Lepiej w kompleksie lub w stanie wolnym (ewentualnie niezwiązanym).

Str. 207: „...należy rozumieć kontrowersyjnie na opak." Nie rozumiem sformułowania.

Str.208: „...obie reszty TRP leżą na tyle blisko w sekwencji (w odległości 20 reszt aminokwasowych), że przy założeniu, że leżą blisko siebie można przyjąć...". 20 reszt aminokwasowych, nie oznacza, że można przyjąć „bliską" odległość w przestrzeni.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Górki to staranne opracowanie naukowe. W jego realizację doktorant zaangażował cała gamę wspomnianych wyżej technik. Mimo zauważonych błędów, pracę cechuje dojrzałość naukowa i głęboka analiza wyników.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr. Adama Górki zatytułowanej: „Analiza wewnątrzcząsteczkowych interakcji pomiędzy domenami ludzkiego czynnika transkrypcyjnego Yin Yang w układzie *in vitro*" jest pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami, zawartymi w art. 13 *ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym* z 2003 r. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego mgr. Górki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jacek Otlewski