



Gdańsk, dnia 2 grudzień 2015 r.

**Ocena pracy doktorskiej mgr Anny Hałabis zatytułowanej:
„Wpływ temperatury na strukturę przestrzenną białek - badania na modelowym
układzie mini-białka klatka tryptofanowa i jego wariantach”**

Praca doktorska mgr Anny Hałabis dotyczy kluczowego zagadnienia biologii molekularnej – charakterystyki procesu fałdowania się białek. Pomimo wielu badań i postępu w modelowaniu proces ten nie został do końca poznany i wymaga prowadzenia dalszych badań zarówno teoretycznych jak i doświadczalnych. Bardzo istotne są doświadczenia wykonywane na krótkich modelowych fragmentach białek, dzięki którym możliwe jest poznanie dalszego rozwoju teorii fałdowania. Istotną poznawczą jest nie tylko końcowa konformacja polipeptydów, ale również „ścieżka”, która umożliwiła osiągnięcie struktury natywnej białka. Zrozumienie zależności pomiędzy sekwencją aminokwasową białek, a przyjmowaną strukturą przestrzenną umożliwia nie tylko zrozumienie pełnionych przez te białka funkcji, pozwala ono również na modyfikowanie istniejących białek i projektowanie struktur o założonych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Otwiera to drogę do projektowania nowych leków biologicznych, które w przyszłości zastąpią obecnie stosowane związki niskocząsteczkowe. W swojej pracy doktorantka zajęła się właśnie opisem teoretycznym i doświadczalnym procesu fałdowania oraz charakterystyką konformacyjną mini-białka Trp-cage. Jest to opisany w 2001 roku polipeptyd będący fragmentem eksendyny-4. Fragment tworzy charakterystyczną klatkę wokół reszty tryptofanu i w temperaturze pokojowej, pomimo niewielkiej długości przyjmuje ściśle zdefiniowaną strukturę przestrzenną. Składa się ona z krótkiej N-końcowej alfa-helisy,

struktury zwrotu, oraz C-końca bogatego w proliny. Peptyd ten fałduje się w czasie kilku nanosekund. W swojej pracy doktorantka zajęła się badaniem 4 modyfikacji trp-cage z punktowo zmienionymi aminokwasami. Przy pomocy magnetycznego rezonansu jądrowego wykonała ona badania strukturalne wybranych peptydów, określiła ich stabilność oraz scharakteryzowała proces topnienia struktury w funkcji temperatury. Wszystkie peptydy użyte do badań zostały zsyntetyzowane przez doktorantkę na nośniku stałym przy wykorzystaniu standardowych technik syntezy peptydów. Następnie były one oczyszczane przy wykorzystaniu ogólnie stosowanych technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej i kolumnie odwróconej fazy C18. Pomimo długiego czasu pojedynczej analizy – powyżej jednej godziny, okazało się konieczne wprowadzenie nieznacznych modyfikacji gradientu (o kilka procent) dla różnych peptydów. Prosiłbym o wyjaśnienie: dlaczego niezbędne było wprowadzenie takich modyfikacji, czy podczas rozdziału nie nastąpił problem nakładania się szczytów? Jest to o tyle istotne, że w dalszych badaniach NMR stwierdzono obecność dwóch zestawów sygnałów dla niektórych aminokwasów. Po oczyszczeniu otrzymane związki zostały scharakteryzowane przy pomocy spektrometrii mas. Prosiłbym o podanie stopnia czystości uzyskanych preparatów. Pierwszym z analizowanych peptydów techniką NMR było mini białko Trp-cage. Doktorantka zarejestrowała dla niego widma 2D ^1H - ^1H NMR: DQF-COSY, TOCSY, ROESY oraz NOESY w różnych temperaturach w celu określenia wpływu temperatury na strukturę związku. W peptydzie zostały zidentyfikowane sygnały średniozasięgowe i dalekozasięgowe definiujące jego strukturę. W wyższych temperaturach, ilość sygnałów oddziaływań malała, wskazując na wzrost ruchliwości peptydu Trp-cage. Jednak nadal obecne były dalekozasięgowe kontakty, wskazujące na obecność struktury natywnej. Nawet po przekroczeniu temperatury „topnienia” jego struktura nie ulegała całkowitemu rozwinięciu i peptyd pozostawał w strukturze zbliżonej do natywnej. Uzyskane wyniki techniką NMR zostały przez doktorantkę porównane z innymi badaniami dostępnymi w literaturze, w szczególności z profilem denaturacyjnym uzyskanym z pomiarów metodą mikrokalorymetrii skaningowej, dichroizmu kołowego, widm Ramana. Wykonana analiza widm TOCSY w temperaturze 305 i 313 K wykazała dwa zestawy sygnałów dla kilku reszt aminokwasowych. Sygnały te były dość intensywne – do kilkudziesięciu procent sygnału głównego. Na obecność takich sygnałów w wybranych peptydach wskazywały również wcześniejsze doniesienia literaturowe innych autorów. Obecność

sygnałów w niższych temperaturach zostało zinterpretowane jako obecność alternatywnej struktury Trp-cage. W rozprawie doktorantka przedstawiła kilka możliwych interpretacji obecności dodatkowych sygnałów, które uzyskała w podwyższonych temperaturach. Prosiłbym o przedyskutowanie możliwych do wykonania doświadczeń, które jednoznacznie wyjaśniłyby przyczynę powstawania drugiego zestawu sygnałów. Po wykonaniu i przeanalizowaniu widm NMR przeprowadzono symulację dynamiki molekularnej Trp-Cage uzyskując informacje na temat konformacji, stabilności i struktury minipeptydu. W dalszej części pracy w analogiczny sposób zostały wykonane badania i analizy pozostałych wariantów mini peptydu Trp-cage. W podsumowaniu wykonanych badań i analiz doktorantka przedstawia charakterystykę konformacyjną mini-białka Trp-cage oraz jego wariantów w zależności od temperatury, opisuje zmiany konformacyjne łańcuchów polipeptydowych w procesie ich przejścia fazowego (temperatura topnienia). W niskich temperaturach zespoły struktur natywnych są stabilizowane poprzez dużą liczbę kontaktów dalekozasięgowych. W wyższych temperaturach, nawet powyżej temperatury topnienia, część oddziaływań nie ulega zerwaniu stabilizując strukturę białka. Nie jest to jednak model dwustanowy zwiniętych i rozwiniętych peptydów, tylko jednolity zestaw konformacji o cechach struktury natywnej. Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka przedstawia również najbardziej prawdopodobny model fałdowania mini białka. Dyskutuje ona również wpływ zamiany pojedynczych aminokwasów na stabilność badanych mini białek.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wraz z załącznikami zawiera 226 stron, w tym 39 tabel, 40 rycin i 258 odnośników literaturowych. Praca składa się z siedmiu rozdziałów: wstępu teoretycznego, celów pracy, materiałów i metod, wyników badań i dyskusji, podsumowania i wniosków końcowych, dorobku naukowego oraz spisu literatury. W dalszej części dołączone zostały cztery załączniki: załącznik 1 – wariant TRP-P19A, załącznik 2 – tabela przesunięć chemicznych w badanych peptydach, załącznik 3 – kopia publikacji z uzyskanych wyników, załącznik 4 – płyta z widmami NMR oraz uzyskanymi strukturami peptydów.

W liczącym 14 stron wstępie teoretycznym przedstawiono modele fałdowania się białek oraz metody badania procesu. Opisano również termodynamikę i kinetykę procesu fałdowania. Wstęp kończy się informacją o wybranym do badań mini białku Trp-cage. W kolejnym rozdziale przedstawiono cele pracy i zakres planowanych

doświadczeń. Materiały i metody zostały przedstawione w dość zwięzły sposób na 5 stronach. Dotyczą one syntezy i oczyszczania peptydów, wykonania widm NMR oraz modelowania. W kolejnym rozdziale zostały połączone wyniki badań i dyskusja. Przedstawiono w nim i omówiono wyniki analiz kolejnym wariantów Trp-cage. Na końcu pracy w rozdziale podsumowanie i wnioski zostały porównane i omówione wyniki uzyskane dla różnych wariantów peptydu. W pracy trochę zabrakło mi przedstawionych w punktach w syntetyczny i zwięzły sposób głównych wniosków wynikających z pracy. W dalszej części w załączniku 1 przedstawione zostały wyniki analiz wariantu Trp-119A. Ponieważ są to również wyniki doświadczalne mogły one znaleźć się w rozdziale Wyniki badań i dyskusja.

Przedstawiona praca nie uniknęła pewnych nielicznych błędów w zakresie słownictwa i niedociągnięć edytorskich. W pracy nie zachowano jednolitej konwencji nazewnictwa. Tak na przykład w tytule rozdziału 1.1 do opisanie procesu użyto zwrotu „zwijanie białek”. Natomiast w samym tekście rozdziału używano zwrotu fałdowanie białek. Co więcej w kolejnym podrozdziale 1.1.1 sytuacja jest akurat odwrotna. Można dyskutować, które z wyrażen - fałdowanie, czy zwijanie się białek jest prawidłowe, ale w pracy należało przyjąć jednolite nazewnictwo. W tabeli 1.1 na stronie 21 przedstawiono najpopularniejsze techniki doświadczalne stosowane w badaniu mechanizmu fałdowania białek. Pomimo wymienienia aż 15 technik, zabrakło w niej tak istotnej techniki kinetycznej, jak metoda zatrzymanego przepływu (stopped-flow). Jest to technika dość często stosowana przy badaniu szczególnie większych polipeptydów lub białek. W całej pracy do opisu figur używane jest pojęcie rysunek. Właściwszy i bardziej powszechnie używany jest tu zwrot rycina. Na rycinie 1.5 brak referencji skąd została zaczerpnięta.

Powyższe uwagi i pytania w żaden sposób nie obniżają wartości merytorycznej pracy. Głównym celem pracy była charakterystyka konformacyjna wybranych wariantów mini-białka Trp-cage w temperaturze bliskiej temperatury topnienia białka. Cel niewątpliwie został osiągnięty. W pracy umiejętnie połączono i zinterpretowano wyniki metod teoretycznych oraz doświadczalnych.

Moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Anny Hałabis zatytułowanej: „Wpływ temperatury na strukturę przestrzenną białek-badania na modelowym układzie mini-białka klatka tryptofanowa i jego wariantach” jest wysoka. Wnoszę więc o dopuszczenie przez Wysoką Radę Międzyuczelnianego Wydziału

Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego mgr
Annę Hałabis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. UG, dr hab. Bogdan Banecki

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego