

**Prof. dr hab. Zofia Gdaniec**  
**Instytut Chemii Bioorganicznej PAN**  
**ul. Z. Noskowskiego 12/14**  
**61-714 Poznań**

Poznań, 4 listopada 2015 r.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej pani magister Anny Hałabis, zatytułowanej

**„Wpływ temperatury na strukturę przestrzenną białek - badania na modelowym układzie mini-białka klatka tryptofanowa i jego wariantach.”**

Zrozumienie i przewidzenie sposobu zwinięcia się białka na podstawie sekwencji występujących w nim reszt aminokwasowych należy do jednych z najtrudniejszych i najważniejszych problemów współczesnej biologii molekularnej. Pomimo wysiłku wielu grup badawczych wykorzystujących różne metody eksperymentalne i obliczeniowe, świat nauki daleki jest od zrozumienia tego zjawiska. Badania dotyczące tego niezwykle intrygującego zagadnienia prowadzone są w Pracowni Struktury Biopolimerów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed, kierowanej przez prof. Stanisława Ołdzieja. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pani mgr Anny Hałabis pochodzi właśnie z tej Pracowni i jest kolejną, trzecią już rozprawą, z którą miałam przyjemność się zapoznać. Obiektem badań Doktorantki było modelowe mini-białko Trp-cage oraz jego trzy warianty. Trp-cage jest syntetycznym mini-białkiem, które posiada zdolność szybkiej i spontanicznej samoorganizacji do dobrze zdefiniowanej globularnej struktury, typowej dla większych białek. Z uwagi na jego mały rozmiar oraz szybki proces zwijania się, białko to jest dobrym układem modelowym. Jednak pomimo wieloletnich badań, jego mechanizm zwijania się nadal pozostaje niewyjaśniony i stanowi przedmiot dyskusji. Mgr Hałabis jako cel postawiła sobie charakterystykę konformacyjną łańcuchów polipeptydowych tego mini-białka oraz jego wybranych wariantów w temperaturach równych lub bliskich ich temperaturom topnienia. Dla zrealizowania powyższych celów określiła struktury przestrzenne czterech peptydów w

szerokim zakresie temperatur oraz przeanalizowała ich dynamikę, wykorzystując spektroskopię NMR oraz metody symulacji dynamiki molekularnej.

Rozprawa mgr Hałabis ma dość typowy układ. Na początku rozprawy zamieszczone jest streszczenie w języku polskim i angielskim. We wstępie teoretycznym mgr Hałabis kompetentnie opisuje obecny stan wiedzy dotyczący mechanizmu zwijania się białek i przedstawia najważniejsze modele stosowane do jego opisu. W formie tabeli wymienia techniki eksperymentalne stosowane najczęściej do badania mechanizmu zwijania się białek wraz z krótką informacją o ich skali czasowej oraz wskazaniem na typ informacji, jaki można uzyskać wykorzystując poszczególne metody. Rozdział kończy zwięzłe opracowanie literaturowe na temat mechanizmu fałdowania się mini-białka Trp-cage. Wiedza zawarta we wstępie wprowadza czytelnika w złożone zagadnienia stanowiące przedmiot rozprawy. W następnej kolejności Autorka podaje jasno sformułowany cel pracy, który logicznie wynika z poruszonych w części literaturowej zagadnień. Omówienie wyników badań połączone z dyskusją poprzedza rozdział „Materiały i metody”. Podsumowanie wraz z wnioskami końcowymi, w którym mgr Hałabis jasno i precyzyjnie wymienia osiągnięte rezultaty, zawarte zostało na pięciu stronach. Spis cytowanej literatury obejmuje 258 pozycji. Szkoda tylko, że Doktorantka nie zamieściła również tytułów odnośników. Przygotowując rozprawę zapewne korzystała z dostępnych baz danych oraz programów ułatwiających zarządzanie odnośnikami, więc uwzględnienie tytułów w spisie literatury nie powinno stanowić problemu. Na końcu rozprawy, w formie załączników, dołączone są dane eksperymentalne dla jednego z badanych peptydów oraz tabele podające wartości przesunięć chemicznych protonów badanych peptydów oraz względne objętości sygnałów otrzymanych z analizy widm TOCSY. Załączona jest również publikacja, obejmująca część wyników rozprawy, w której Doktorantka jest pierwszym autorem oraz płyta DVD zawierająca współrzędne struktur w formacie pdb i najważniejsze widma NMR w formie elektronicznej. W swojej poprzedniej recenzji zachęcałam do tego, aby w takiej formie dołączać do rozprawy doktorskiej najważniejsze dane eksperymentalne i bardzo mnie cieszy, że sugestie te zostały uwzględnione. Podczas czytania rozprawy niejednokrotnie sięgałam do informacji zamieszczonych na płycie. Możliwość wizualizacji poszczególnych struktur ułatwiła mi czytanie rozprawy, szczególnie gdy omawiane są detale strukturalne. Z kolei możliwość obejrzenia oryginalnych widm, a nie tylko ich małych fragmentów zamieszczonych w tekście, nasunęła mi kilka sugestii dotyczących warunków ich wykonania. To zagadnienie przedyskutuję z Doktorantką osobno, gdyż nie dotyczy bezpośrednio recenzowanej rozprawy.

Podsumowując tę część recenzji uważam, że rozprawa jest przygotowana bardzo starannie i zawiera niewiele błędów edytorskich. Ilustrowana jest dobrze dobranymi i pieczołowicie przygotowanymi rysunkami.

Najważniejszą i najobszerniejszą częścią rozprawy jest oczywiście rozdział poświęcony uzyskanym przez mgr Hałabis wynikom. Doktorantka rozpoczęła swoje badania od wykonania serii eksperymentów NMR dla mini-białka Trp-cage w dwóch różnych temperaturach, 305 K i 313 K. Następnie, wykorzystując więzy NMR, przeprowadziła symulacje dynamiki molekularnej, w wyniku której uzyskała rodziny konformacyjne struktur. Analizując te struktury zauważyła, że procesowi rozplatania białka Trp-cage nie towarzyszą duże zmiany konformacyjne, a zawiązywanie lub zrywanie hydrofobowego oddziaływania dalekiego zasięgu pomiędzy resztami Trp16 a Pro12 wydaje się być kluczowe dla procesu zwijania się tego białka.

Podobną analizę przeprowadziła dla trzech innych mutantów tego białka TRP-S14A, TRP-S13A i TRP-P19A, różniących się znacznie temperaturą topnienia. Wariant TRP-S14A, w którym zmienione zostały cztery reszty aminokwasowe w N-końcowej części (DAYA w miejsce sekwencji NLYI) oraz posiadający mutację polegającą na zastąpieniu w pozycji 14 reszty seryny na resztę alaniny, cechuje mniejsza stabilność termiczna w stosunku do oryginalnego białka ( $T_m = 295,5$  K). Szkoda, że Doktorantka nigdzie nie wyjaśnia, dlaczego postanowiła badać mutanty charakteryzujące się mniejszą temperaturą topnienia niż mini-białko Trp-cage. Domyślam się, że jest to uwarunkowane względami eksperymentalnymi, gdyż podczas pomiarów w podwyższonych temperaturach istnieje niebezpieczeństwo, że sygnały pochodzące od protonów amidowych będą ulegać szybkiej wymianie z wodą, a widma wykonane w takich warunkach nie nadają się do interpretacji. Dodatkowo intensywność sygnałów NOE/ROE maleje ze wzrostem temperatury, co również utrudnia analizę widm NMR w wyższych temperaturach. Mgr Hałabis założyła zapewne, że przebadanie mniej stabilnego białka umożliwi jej zaobserwowanie oddziaływań dalekiego zasięgu w temperaturze odpowiadającej temperaturze topnienia. I rzeczywiście, analiza danych eksperymentalnych otrzymanych w szerokim zakresie temperatur dostarczyła niezwykle ciekawych obserwacji. Okazało się, że także w przypadku tego mini-białka oddziaływanie pomiędzy resztą tryptofanu w pozycji 16 a resztą proliny w pozycji 12 wydaje się być odpowiedzialne za wystąpienie przejścia fazowego. Doktorantka wykazała ponadto, że stabilizacja lub destabilizacja helikalnej części białka TRP-S14A jest silnie skorelowana ze

stabilnością termiczną całego układu – zmniejszenie helikalności całego mini-białka obserwowane jest ze wzrostem temperatury.

Kolejnym przebadanym przez mgr Hałabis wariantem mini białka Trp-cage był peptyd TRP-S13A różniący się od TRP-S14A tym, że reszta seryny w pozycji 13, a nie 14, zastąpiona została przez resztę alaniny. Mutacja ta ma ogromny wpływ na stabilność białka i skutkuje wysoką temperaturę topnienia, wynoszącą 336 K. Niestety z uwagi na te właściwości mutantu TRP-S13A nie udało się przeprowadzić jego analizy konformacyjnej w temperaturze wyższej niż 313 K. Temperatura ta była na tyle wysoka, że w widmach NMR zanotowano już szybką wymianę chemiczną protonów amidowych z wodą.

Innym przebadanym przez Doktorantkę wariantem mini-białka Trp-cage był peptyd TRP-P19A charakteryzujący się z kolei niezwykle niską temperaturą topnienia, szacowaną poniżej 273 K. W przypadku tego białka Doktorantka planowała sprawdzić, czy obecność mutacji DAYA indukuje stabilizację N-końcowej części białka nawet w przypadku braku zdefiniowanej struktury przestrzennej dla całego białka. Analiza widm NMR pokazała, że rzeczywiście struktura bliska strukturze  $\alpha$ -helisy jest obecna w przypadku białka TRP-P19A nawet znacznie powyżej temperatury topnienia, wskazując tym samym, że sama  $\alpha$ -helisa jest bardziej stabilna niż globalna struktura białka.

Dla wszystkich przebadanych peptydów Doktorantka zaobserwowała obecność dodatkowych sygnałów w widmach  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY. Pomimo podjętych prób nie udało jej się z całą pewnością wyjaśnić ich pochodzenia, gdyż drugi zestaw sygnałów był zawsze dużo słabszy i nie można było zidentyfikować oddziaływań średniego i dalekiego zasięgu. W literaturze, dla badanej grupy białek, postulowane jest występowanie izomeryzacji *cis-trans* wiązania peptydowego Xaa-Pro, istniało więc podejrzenie, że właśnie to zjawisko może być powodem pojawienia się dodatkowych sygnałów w widmach NMR. Doktorantka pokazała jednak, że obserwowane w widmach NMR poszczególnych peptydów sygnały korelacyjne wskazywały wyłącznie na obecność izomerów *trans*-Xaa-Pro lub *cis*-Xaa-Pro, a nie obu izomerów jednocześnie. Chociaż nie dla wszystkich reszt proliny udało jej się określić konfigurację *cis* lub *trans*, Doktorantka uważa, że raczej nie to zjawisko jest przyczyną pojawienia się dodatkowych sygnałów. Zaskakującym i dającym do myślenia faktem jest to, że zmiana temperatury nie skutkuje zmianą populacji obu form. Przyznam, że obecność tych dodatkowych sygnałów jest niezwykle intrygująca i jestem bardzo ciekawa, jakie jest ich źródło. Trudno jest mi jednak uwierzyć, że dodatkowe sygnały pochodzą od alternatywnej struktury, która nie byłaby w równowadze z główną formą danego białka. Zaskakujące jest

również to, że w widmach NOESY nie widać pomiędzy tymi dwiema formami charakterystycznych, silnych sygnałów korelacyjnych pochodzących od wymiany chemicznej. Niestety, nie przekonuje mnie analiza ilościowa oparta o pomiar objętości sygnałów korelacyjnych w widmach TOCSY. Analiza ta winna być wprawdzie poparta odpowiednią dyskusją dotyczącą chociażby zależności objętości sygnałów korelacyjnych od wielkości stałych sprzężenia i czasu korelacji poszczególnych cząsteczek. Doktorantka sugeruje, że dodatkowe sygnały pochodzą od innej formy strukturalnej tego samego białka, można więc spodziewać się, że zmiana konformacji wpłynie na wielkość stałych sprzężenia, a tym samym na objętość sygnałów w widmach TOCSY. Nie jestem również przekonana, że obecność tej dodatkowej formy jest rzędu przynajmniej kilkunastu procent, jak wynikałoby to z tabel zamieszczonych w rozprawie. Przypuszczam, że dla białka tej wielkości obecność drugiej formy w ilości kilkunastu procent można by łatwo zauważyć nawet na widmie 1D  $^1\text{H}$ . Zastanawiałam się, czy Doktorantka próbowała stwierdzić innymi metodami obecność dwóch różnych form oraz oszacować ich populację. Oczekuję, że do tych zagadnień mgr Hałabis ustosunkuje się w trakcie publicznej obrony.

Jak już wspomniałam, praca została przygotowana starannie, jednak Doktorantce nie udało się uniknąć błędów edytorskich, których nie będę wymieniać. Z obowiązku recenzenta ustosunkuję się jednak do niektórych sformułowań, które uważam za niepoprawne. Mianowicie, na stronie 7 technikę „*small-angle X-ray scattering*” Autorka tłumaczy jako „*niskokątowe*” rozpraszanie promieni rentgenowskich, zamiast „*małokątowe*”. Z kolei na str. 40 pisze, że „*sekwencje aminokwasowe ...zostały zsyntetyzowane...*” zamiast, na przykład, „*peptydy o wymienionych w tabeli sekwencjach aminokwasowych...*” Na stronie 64 używa wyrażenia „*estymowana temperatura*”, zamiast „*oszacowana temperatura*”.

Za niepoprawne uważam sformułowanie zamieszczone na stronie 88, gdzie Doktorantka wyjaśnia, że „*nie udało jej się wykonać eksperymentu NMR w temperaturze mięknięcia*”, co jest dużym skrótem myślowym. Doktorantce chodziło zapewne o to, że widmo wykonane w tej temperaturze nie nadawało się do interpretacji.

Ponadto na stronie 73 pisze, że „*...wraz ze wzrostem temperatury wzrasta dynamika łańcucha polipeptydowego ze względu na zmniejszenie ilości oddziaływań NOE/ROE.*” Zamiast np. „*...wraz ze wzrostem temperatury wzrasta dynamika łańcucha polipeptydowego na co wskazuje zmniejszenie liczby (nie ilości) oddziaływań typu NOE/ROE.*”

Żargonem jest również wyrażenie: „*wiązania pomiędzy sąsiadującymi węglami*” zamiast „*atomami węgla*”

Powyższe uwagi w żaden sposób nie wpływają na ogólną ocenę merytoryczną rozprawy. Wyniki uzyskane przez mgr Hałabis są oryginalnym i wartościowym wkładem w poznanie mechanizmów rządzących procesem zwijania białek. Wnikliwa i krytyczna analiza otrzymanych wyników pozwoliła Doktorantce na charakterystykę stanów konformacyjnych wybranych peptydów w szerokim zakresie temperatur, dzięki czemu uzyskała informację o strukturach zarówno stanu sfałdowanego jak i niesfałdowanego. Szczególnie istotne są informacje strukturalne, które uzyskała w temperaturach powyżej temperatury topnienia, gdyż wiedza na temat niesfałdowanych bądź częściowo niesfałdowanych struktur białek jest bardzo ograniczona z uwagi na trudność prowadzenia tego typu badań. Za bardzo cenne w tej pracy uważam również pokazanie, że w temperaturze równej temperaturze topnienia dominuje jedna konformacja, która posiada cechy charakterystyczne dla struktury natywnej. Obserwacja ta nie pozwoliła na potwierdzenie powszechnie akceptowanego modelu dwustanowego dla procesu zwijania się mini-białka Trp-cage i sugeruje, że modelem zgodnym z jej eksperymentem jest tzw. *mechanizm downhill*.

W oparciu o wyrażoną powyżej opinię stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska odpowiada warunkom Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o stopniach i tytułach naukowych. Dorobek naukowy mgr Anny Hałabis, na który składają się dwie prace opublikowane w prestiżowych czasopismach, jeden komunikat ustny oraz 18 komunikatów w formie posterów na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych jest wystarczający do nadania jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. W związku z powyższym wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Anny Hałabis do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Zofia /daniec