

Prof. dr hab. Wojciech Rypniewski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Centrum Badań Biokryystalograficznych
Zespół Struktury i Funkcji Biomolekuł
e-mail: wojtekr@ibch.poznan.pl
tel: 61-8528503
fax: 61-8520532

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Kamili Kowalskiej
pt. „Badania strukturalne białek p27 i p25
wchodzących w skład kompleksu dynaktyny”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotorskim prof. Grzegorza Bujacza z Politechniki Łódzkiej i prof. Zygmunta Derewendy z Uniwersytetu Virginia w USA. Tematem rozprawy są badania strukturalne dwóch podjednostek dynaktyny, która jest aktywatorem dyneiny – jednego z głównych białek motorycznych w cytoplazmie. Dynaktyna jest dużym kompleksem białkowym w komórkach eukariotycznych, składa się z około dwudziestu podjednostek o łącznej masie ponad milion daltonów. Dynaktyna aktywuje dyneinę i pośredniczy w wiązaniu ładunku (*cargo*, zazwyczaj są to endosomy), który następnie jest transportowany wzdłuż mikrotubul. Dynaktyna bierze również udział w procesie segregacji chromosomów w podziale mitotycznym komórki. Białka p27 i p25 są najmniejszymi podjednostkami dynaktyny, znajdują się w tzw. wystającym końcu kompleksu (*pointed end*). Wykazano, że ta część dynaktyny bierze udział w selektywnym wiązaniu ładunku. Struktura i funkcja dynaktyny badana była różnymi metodami biochemicznymi i biofizycznymi. Przełomowe znaczenie ma rozwiązanie jej struktury metodą mikroskopii elektronowej w niskiej temperaturze (*cryo-electron microscopy*, *cryo-EM*), co pozwoliło na zlokalizowanie podjednostek i zbudowanie niskorozdzielczego atomowego modelu całego kompleksu. Doktorantka przeprowadziła bardziej szczegółowe strukturalne badania wyżej wymienionych podjednostek p27 i p25.

Cel badań został zdefiniowany na stronie 58, za wstępem. Został podany jako określenie struktury przestrzennej białka p27 oraz struktury heterodimeru p25/p27 i zbadanie oddziaływań między jego podjednostkami. Oznacza to przygotowanie odpowiednich konstruktów, ekspresję, oczyszczenie białek, krystalizację, zebranie danych dyfrakcyjnych, rozwiązanie i analizę struktur. Doktorantka zaznacza, że udało się tego dokonać dla p27, natomiast nie udało się otrzymać dostatecznie stabilnych kryształów dimeru p25/p27, więc analizę tego dupleksu przeprowadzono za pomocą metod biochemicznych i informatycznych. Uważam, że problem jaki doktorantka podjęła się rozwiązać, jest ambitny i interesujący z poznawczego punktu widzenia. Zatem teza naukowa postawiona przez doktorantkę jest wartościowym tematem rozprawy doktorskiej.

Układ i edycja rozprawy. Rozprawa liczy 180 stron wraz z bibliografią i jest podzielona na rozdziały w sposób tradycyjny. Po części literaturowej przedstawione są cele, metodyka badań, wyniki, dyskusja, a następnie podsumowanie. Za bibliografią załączony jest wydruk publikacji, której współautorką jest doktorantka, oraz opublikowany abstrakt wystąpienia konferencyjnego. Rozprawa napisana jest w języku polskim w sposób klarowny i przystępny, stylistycznie na dobrym poziomie. Jako nieistotne pomijam drobne błędy językowe. Tekst jest starannie ilustrowany, chociaż zauważyłem, że ilustracja 93 jest kopią ilustracji 91. Podsumowując stwierdzam, że doktorantka wykazuje umiejętność właściwego przedstawienia

uzyskanych wyników. Dobrze oceniam styl i przejrzystość rozprawy oraz jej poziom edytorski.

Część literaturowa. Wstęp jest dość obszernym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Najpierw przedstawione są główne białka motoryczne, potem nieco dokładniej dyneina i jej aktywatory, wśród których głównym jest badana dynaktyna. Druga część wstępu poświęcona jest podstawowym pojęciom i problemom krystalografii rentgenowskiej, szczególnie tym aspektom, które miały zastosowanie w niniejszej pracy. Tym samym doktorantka pokazała, że rozumie metody, które zastosowała. Jest to szczególnie ważne w dobie, kiedy oprogramowanie pozwala na stosowanie zaawansowanych metod bez ich zrozumienia. Bibliografia liczy jedenaście stron odnośników literaturowych i obejmuje prace zarówno badawcze jak i metodologiczne w zakresie stosownym do tematyki rozprawy. Po zapoznaniu się z częścią literaturową dobrze oceniam teoretyczną wiedzę doktorantki w zakresie dyscypliny naukowej, której dotyczy temat rozprawy.

Metodyka badań jest przedstawiona dość szczegółowo. Po kolei opisane są konstrukty i szczepy bakteryjne wykorzystane do ekspresji białek, etapy ich oczyszczania, krystalizacji, rozwiązania struktur krystalicznych, udokładniania i analizy modelu a także metody biofizyczne (statyczne rozpraszanie światła, test temperatury topnienia białka) i biochemiczne (pull-down, immunoprecypitacja), których użyła w swoich badaniach. Stwierdzam, że opis prac laboratoryjnych jest dostatecznie dokładny, aby wyniki eksperymentalne doktorantki uznać za wiarygodne. Wolałbym, żeby doktorantka użyła formy osobowej do opisu własnej pracy, aby odróżnić swój wkład od osiągnięć współpracowników (np. początkowe konstrukty). Można to wywnioskować z tekstu, ale nie jest to całkiem oczywiste. W rozprawie doktorskiej, inaczej niż w publikacji, forma osobowa jest moim zdaniem całkiem na miejscu.

Przechodzę do omówienia wyników badań mgr Anny Kowalskiej. Doktorantka ekspymowała i oczyściła wariant białka p27, a także dokonała koekspresji obu podjednostek, p27 i p25, i oczyściła je jako dimer. Podjęła liczne próby krystalizacyjne, szczególnie w przypadku heterodimeru p25/p27, który sprawiał wiele trudności w badaniach krystalograficznych. Doktorantka dokonała licznych zmian w samej sekwencji aminokwasowej w nadziei, że dzięki mutacjom uda się polepszyć jakość kryształów. Zastosowała też różne metody krystalizacji, które czasami się sprawdzają, na przykład krystalizację po olejami, aby spowolnić proces krystalizacji i otrzymać większe kryształy, jak również proteolizę *in situ*, aby strawić nieuporządkowane części białka i otrzymać kryształy lepszej jakości. Wskutek tych zabiegów udało się jej otrzymać kryształy kompleksu p25/p27, które rozpraszały promienie Rentgena z rozdzielczością na pograniczu użyteczności, nie udało się jej jednak przeprowadzić kompletnego pomiaru dyfrakcyjnego, gdyż kryształy okazały się zbyt nietrwałe w wiązce promieniowania.

Więcej sukcesu doktorantka odniosła ze strukturą p27. Udało jej się wyhodować kryształy, które nadawały się do badań dyfrakcyjnych, uzyskała dane do rozdzielczości ok. 2 Å i rozwiązała strukturę przez podstawienie cząsteczkowe, używając pokrewnego białka jako model początkowy. Następnie udokładniła model p27, otrzymując całkiem rozsądne końcowe parametry i statystyki. Uwagę moją zwraca niska kompletność danych. Z czego to wynika?

Białko ma regularną formę solenoidu złożonego z łańcuchów β , po trzy krótkie łańcuchy na każdy z siedmiu zwojów. Struktura jest niezwykle regularna – kolejne zwoje układają się precyzyjnie jeden nad drugim. Wewnątrz upakowane są hydrofobowe łańcuchy leucyny,

izoleucyny, waliny bądź fenyloalaniny. Z jednego boku solenoidu wystają dwie dłuższe pętle. Struktura stabilizowana jest wiązaniami wodorowymi łączącymi łańcuchy β . Wiązania te są dwojakie: NH...O, między grupami aminową i karbonylową łańcucha głównego, oraz CH...O, między atomami C_{α} a grupą karbonylową. Doktorantka powołuje się na publikację i stwierdza, że oba typy wiązania dostarczają tyle samo energii stabilizującej strukturę. Jest to dość zaskakujące z uwagi na to, że węgiel jest z reguły słabszym donorem wiązań wodorowych niż azot. Ma to odbicie w długości wiązań, które dla silnych wiązań wodorowych zwykle są krótsze niż dla wiązań słabych. Także w strukturze białka p27 odległości NH...O wynoszą poniżej 3 Å, a odległości CH...O mają powyżej 3 Å. Proszę o komentarz.

Doktorantka skróciła w konstrukcie białko p27 o kilkanaście reszt na C-końcu, spodziewając się, że będzie to część niestrukturalizowana. Tymczasem w modelu cryo-EM p25 i p27 mają na tym końcu helisę α . Proszę o komentarz.

Na koniec doktorantka posłużyła się modelem krystalograficznym białka p27, żeby wygenerować hipotetyczny model łańcucha p25. Porównując zmienność sekwencji białek pokrewnych do p27 doktorantka typuje te części, które mogą brać udział w wiązaniu ładunków przenoszonych przez dyneinę. Przypuszczalnie są to regiony, które wykazują zmienność ewolucyjną. Doktorantka pisze dalej, że model białka p27 posłużył następnie do wygenerowania modelu heterodimeru p25/p27 i że zarówno budowa p27 jak i architektura dimeru p25/p27 zostały potwierdzone przez strukturę dynaktyny wyznaczoną ostatnio metodą cryo-EM. Brakuje mi tu bardziej konkretnego porównania krystalograficznej struktury p27 z odpowiednim łańcuchem w strukturze cryo-EM, a także porównania modeli heterodimerów p25/p27. Te struktury można przecież nałożyć bezpośrednio na siebie. Jest to o tyle ciekawe, że w ostatnich latach cryo-EM pojawiła się jako technika uzupełniająca bądź wręcz konkurencyjna wobec krystalografii.

Końcowa dyskusja obejmuje całą rodzinę lewoskrętnych β -helis i innych β -solenoidów, jako że białka tego typu mają istotne znaczenie fizjologiczne; bywają też czynnikami chorobotwórczymi, jak w przypadku chorób prionowych.

Część wyników badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy została opublikowana w *EMBO Journal*. Jest to, jak dobrze wiadomo, bardzo wysoko notowane czasopismo naukowe. Doktorantka jest współautorem tej pracy.

Podsumowując, stwierdzam, że niniejszą rozprawę oceniam wysoko. Doktorantka bardzo dobrze sprostała wyzwaniom. Mgr Anna Kowalska dysponuje pogłębioną wiedzą w obszarze krystalografii, a także biologii molekularnej, preparatyki białek i technik biofizycznych i biochemicznych współcześnie stosowanych do określania właściwości białek. Rozwiązała postawiony problem samodzielnie i przy użyciu właściwej do danego zadania metody. Wykazała się dużą starannością i konsekwencją w dążeniu do naukowego celu. Widać dużo pracy i różnorodność podejść w dążeniu do trudnego celu jakim było otrzymanie użytecznych kryształów. Rozprawa w pełni spełnia wymogi formalne stawiane w tej mierze pracom doktorskim, dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności o dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu.

Wojciech Gryniewicz

Poznań, 6 grudnia 2015 roku