

Prof. dr hab. Zofia Gdaniec

Zakład Biomolekularnego NMR

Email: zgdan@ibch.poznan.pl

Poznań, 25 lutego 2019 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pana magistra Szymona Żerko zatytułowanej **„Wysokowymiarowe metody spektroskopii NMR dedykowane do badań białek nieustrukturyzowanych”**

W badaniach strukturalnych białek nieustrukturyzowanych coraz większą rolę odkrywa spektroskopia NMR. Jednakże z uwagi na nieuporządkowany i dynamiczny charakter tych białek analiza widm NMR jest niezwykle skomplikowana. Chociaż metody przypisywania sygnałów w widmach białek globularnych są już bardzo dobrze opracowane, to niezwykle silne nakładanie się sygnałów w widmach białek nieustrukturyzowanych jest ogromnym wyzwaniem dla badaczy i wymaga zastosowania nowych, niestandardowych technik. Oprócz niewielkiego zróżnicowania przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od protonów, inną niekorzystną właściwością białek nieustrukturyzowanych w stosunku do białek globularnych jest często obserwowana szybka wymiana tych protonów z protonami rozpuszczalnika oraz stosunkowo duża zawartość procentowa reszt proliny w sekwencji. Oprócz tych niekorzystnych cech charakteryzujących białka nieustrukturyzowane, posiadają one jedną właściwość wpływającą korzystnie na czułość eksperymentów NMR a mianowicie relaksację poprzeczną, która jest znacznie wolniejsza niż w przypadku białek globularnych. Dzięki tej właściwości możliwe jest stosowanie długich sekwencji impulsów zawierających wieloetapowe transfery magnetyzacji, co pozwala na uzyskanie sygnałów korelacyjnych pomiędzy jądrami znajdującymi się w odległości wielu wiązań chemicznych. Jest to istotny element w przypadku planowania i rejestracji widm wielowymiarowych. Właśnie w tym obszarze lokuje się recenzowana rozprawa doktorska mgr Szymona Żerko wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Wiktora Koźmińskiego, a więc w grupie, której osiągnięcia w tej dziedzinie są powszechnie znane.

Recenzowana rozprawa napisana jest w języku polskim i ma zasadniczo tradycyjny układ. Składa się z dwóch części zatytułowanych „Stan wiedzy” i „Badania własne”. W pierwszej części, po krótkim wstępie, w którym omówione są najważniejsze fakty dotyczące badań białek globularnych metodami

spektroskopii NMR, Doktorant skupia się na opisie zagadnień typowych dla badań białek nieustrukturyzowanych, wskazując na problemy związane z interpretacją widm oraz technicznymi aspektami ich rejestracji. Mgr Żerko pokrótce omawia także różne strategie stosowane do przypisania sygnałów rezonansowych białek, opierające się zazwyczaj na zestawie różnych eksperymentów wielowymiarowych. Należy podkreślić, że pierwsza część rozprawy stanowi doskonale wprowadzenie do badań własnych Doktoranta i znakomicie ułatwia czytelnikowi zrozumienie poruszanych tam problemów.

W swojej rozprawie Doktorant skoncentrował się na opracowaniu metodologii przypisywania sygnałów w widmach NMR dużych białek nieustrukturyzowanych a także białek bogatych w reszty proliny. Przedstawione w niej eksperymenty NMR podzielone są na dwie grupy. W pierwszej grupie eksperymentów mgr Żerko skupia się na opracowaniu wielowymiarowych technik wykorzystujących spektroskopię projekcyjną z próbkowaniem losowym, służących sekwencyjnemu przypisaniu sygnałów łańcucha głównego białek nieustrukturyzowanych. W drugiej grupie eksperymentów stosowane jest odmienne podejście, w którym do uzyskania połączeń sekwencyjnych wykorzystywane jest izotropowe mieszanie magnetyzacji pomiędzy jądrami karbonylowych atomów węgla.

Mgr Żerko opis swoich badań rozpoczyna od zaprezentowania dwóch nowych sześciu- i siedmiowymiarowych technik, kolejno HNCO(NCA)CONH i HNCO(N)CACONH , służących do przypisania sygnałów łańcucha głównego białek nieustrukturyzowanych. Techniki te wykorzystują dwa typy próbkowania niejednorodnego w obrębie jednego eksperymentu – próbkowanie losowe w czterech wymiarach pośrednich i próbkowanie radialne w jednym lub dwóch wymiarach, które są współwzajemne wraz z jednym z czterech wymiarów pośrednich. Doktorant pokazał, że wykorzystując dostępne oprogramowanie widma te mogą być przetwarzane jak widma pięciowymiarowe.

W widmie HNCO(NCA)CONH , korelowane jest aż sześć przesunięć chemicznych: $H(i)$, $N(i)$, $C'(i-1)$, $H(i-1)$, $N(i-1)$, $C'(i-2)$. Ograniczeniem tej metody jest niemożność przypisania sygnałów pochodzących od reszt proliny oraz reszt bezpośrednio ich poprzedzających w sekwencji białka. Niezbędne dla czułości tego eksperymentu jest znalezienie takich warunków, w których wymiana protonów amidowych z rozpuszczalnikiem jest wystarczająco wolna. Liczba możliwych do zarejestrowania w jednym eksperymencie częstości rezonansowych limitowana jest głównie jego czułością. Kolejnym krokiem Doktoranta było więc sprawdzenie, czy możliwe jest uzyskanie dostatecznej informacji z widm siedmiowymiarowych. Mgr Żerko zaprojektował w tym celu eksperyment HNCO(N)CACONH dostarczający informacji o siedmiu niezależnych częstościach rezonansowych będący rozszerzeniem eksperymentu HNCO(NCA)CONH . W porównaniu do widma sześciowymiarowego eksperyment siedmiowymiarowy dostarcza dodatkowo informacji o przesunięciu chemicznym atomów węgla $C\alpha(i-1)$. W celu przetestowania zaprojektowanych przez siebie technik NMR

Doktorant zarejestrował widma dla ludzkiej α -synukleiny, białka zbudowanego ze 140 reszt aminokwasowych, w tym pięciu reszt proliny. Porównanie wyników uzyskanych z analizy widm sześci- i siedmiowymiarowych z wynikami otrzymanymi z analizy trzech odpowiednio dobranych widm pięciowymiarowych potwierdziło ich poprawność. Należy podkreślić, że widma zostały zarejestrowane na różnych spektrometrach (o częstościach rezonansowych dla ^1H 800 MHz i 600 MHz) stosując tradycyjne sondy trójkanałowe. Czułość nowych eksperymentów jest na tyle duża, że bez użycia sondy kriogenicznej, w obu przypadkach otrzymano jedynie jedno połączanie sekwencyjne mniej, co pokazuje, że nawet dla bardzo skomplikowanych widm możliwe jest nie tylko znaczne skrócenie czasu pomiaru ale nawet wykorzystanie łatwiej dostępnych spektrometrów o niższej częstości rezonansowej (np. 600 MHz dla ^1H).

Następną grupą eksperymentów zaprojektowanych przez Doktoranta były techniki pięciowymiarowe, (H)NCOCONH oraz (HACA)CON(CO)CONH, które dzięki wykorzystaniu izotropowego mieszania magnetyzacji pomiędzy jądrami karbonylowych atomów węgla, za pośrednictwem stałych sprzężenia skalarnego przez trzy wiązania chemiczne, pozwalają na uzyskanie połączeń sekwencyjnych zarówno do poprzedzającej jak i kolejnej reszty aminokwasowej w sekwencji białka. Zaletą eksperymentu (HACA)CON(CO)CONH jest to, że dzięki rozpoczęciu transferu magnetyzacji z protonów H_α reszt proliny możliwe jest uzyskanie nieprzerwanej informacji sekwencyjnej już za pomocą pojedynczego transferu $\text{C}'\text{-C}'$. Ponadto zabieg ten prowadzi do lepszej tolerancji wymiany chemicznej protonów amidowych. Z kolei wadą opracowanych eksperymentów jest duży zakres dynamiczny otrzymywanych widm, co przy zastosowaniu niejednorodnego próbkowania jest źródłem silnego szumu utrudniającego identyfikację słabszych sygnałów. Z problemem tym mgr Żerko poradził sobie dzięki zastosowaniu rekonstrukcji widm z wykorzystaniem algorytmu separacji sygnałów (SSA). Pokazał, że zastosowanie rekonstrukcji algorytmem SSA prowadzi do znacznej poprawy jakości widma i pozwala na identyfikację większej liczby oczekiwanych sygnałów. Autor podkreśla, jest to obecnie jedyna metoda dostępna do usuwania szumu próbkowania dostępna dla widm pięciowymiarowych. Gdy Doktorant rozpoczął pracę nad eksperymentami wykorzystującymi transfer typu $\text{C}'\text{-C}'$ oprogramowanie do usuwania szumów w widmach pięciowymiarowych nie było jeszcze dostępne. Zamiast widma pięciowymiarowego (HNCA)CON(CO)CONH opracował więc dwa eksperymenty czterowymiarowe (HACA)CO(NCO)CONH i (HACACO)N(CO)CONH i następnie przetestował je na białku Tau3x. Białko to zbudowane jest z 354 reszt i zawiera 34 proliny a aż 25 z nich jest zgrupowana we fragmencie sekwencji mniejszym niż 100 reszt. Dla przypisania sygnałów w widmach NMR takie białko stanowi więc niezwykle duże wyzwanie. Doktorant pokazał, że dzięki zastosowaniu pary tych widm możliwe było uniknięcie nakładania się sygnałów, co w efekcie doprowadziło do pełnego przypisania sygnałów C' , N i H łańcucha głównego. Dla białka Tau3x Doktorant przetestował również

alternatywne podejście w którym zamiast dwóch widm czterowymiarowych zaprojektował i zarejestrował widmo pięciowymiarowe (HACA)CON(CO)CONH. Jego analiza pokazała, że dla tego typu eksperymentu zastosowanie rekonstrukcji SSA jest kluczowe i dopiero poprzez eliminację szumu próbkowania możliwe było pełne przypisanie sygnałów pochodzących od łańcucha głównego badanego białka.

Rozprawa kończy się obszernym, czterostronicowym podsumowaniem, które według mnie świadczy o dojrzałości naukowej doktoranta. Jest ono nie tyle skróconym opisem wyników, ale ich krytyczną dyskusją. Najbardziej podoba mi się część poświęcona próbie porównania efektywności proponowanych przez Doktoranta nowych technik NMR z wynikami eksperymentów zaproponowanych w innych laboratoriach. Mgr Żerko wskazuje, że obecnie porównanie takie jest bardzo trudne, gdyż na jakość widma NMR ma wpływ wiele czynników, jak na przykład typ użytego spektrometru i sonda pomiarowa. Znajomość stężenia badanego białka oraz warunków roztworu, w jakich były wykonywane widma, jest również istotna dla dokonania poprawnych porównań. Mając na uwadze te ograniczenia Doktorant wykazał, że czułość omawianych w pracy eksperymentów jest porównywalna do tych stosowanych do tej pory dla przypisywania sygnałów w widmach NMR białek nieustrukturyzowanych. Szkoda tylko, że we fragmencie rozprawy, gdzie porównuje swoje wyniki uzyskane z widm sześciu- i siedmiowymiarowych, z tymi otrzymanymi z analizy widm pięciowymiarowych Doktorant zapomniał wspomnieć, że do wszystkich eksperymentów używał dokładnie tej samej próbki. Informacja taka co prawda znajduje się w publikacji dotyczącej opisu tych eksperymentów, natomiast w rozprawie nie znalazłam o tym wzmianki.

Z obowiązku recenzenta muszę wymienić również usterki przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. Na wstępie chciałabym jednak zaznaczyć, że doceniam fakt iż mgr Żerko zdecydował się na napisanie rozprawy w formie tradycyjnej, chociaż z pewnością mniej czasu zajęłoby mu przygotowanie jej w formie krótkiego komentarza do opublikowanych prac. Chociaż układ dzieła uważam w zasadzie za poprawny, to zabrakło mi zdefiniowania, gdzieś na początku rozprawy, celu badań podjętych przez Doktoranta. Taką informację można co prawda znaleźć w podrozdziałach 3.2.1 i 4.2.1, jednak podanie celu pracy na początku rozprawy pozwoliłoby czytelnikowi łatwiej zrozumieć choćby dobór materiału dokonany przez Autora w części dotyczącej stanu wiedzy.

Przy całym moim podziwieniu dla naukowych osiągnięć Doktoranta, spory zawód stanowi edytorska strona jego rozprawy. Duża liczba błędów gramatycznych i edytorskich rozpraszała mnie podczas jej czytania. Na przykład podpis po rysunku 4.2 jest identyczny jak pod rysunkiem 4.1, pomimo że dotyczy innej sekwencji impulsów. Nie brak w rozprawie również błędów ortograficznych – na przykład wyrażenie „relaksacja podłużna” udało się napisać Doktorantowi na dwa różne sposoby, poprawny i niepoprawny, na dwóch sąsiadujących ze sobą stronach (18 i 19). Nie zamierzam wymienić wszystkich

napotkanych w rozprawie usterek a chcę jedynie zasygnalizować Doktorantowi, że edytorska strona ma również wpływ na całkowity odbiór dzieła naukowego. Być może pomogło by tutaj zastąpienie użytego przez Doktoranta systemu LaTeX2e na któryś z powszechnie dostępnych edytorów tekstu.

Według mnie, zamiast „*wysokowymiarowe metody spektroskopii NMR*” powinno się używać „*wielowymiarowe metody spektroskopii NMR*”. Uważam, że zwrot „*wysokowymiarowe metody*” jest niefortunnym tłumaczeniem z języka angielskiego (*ang. highdimensional NMR methods*”). Niestety w rozprawie Autor używa obu tych wyrażen zamiennie, choć to właśnie specjaliści z danej dziedziny powinni zadbać o znalezienie poprawnych odpowiedników w języku polskim dla zwrotów z języka angielskiego.

Wymienione powyżej usterki nie mają wpływu na moją ocenę recenzowanej rozprawy. Zrealizowanie założeń pracy wymagało od mgr Żerko szerokich umiejętności badawczych, obejmujących zaprojektowanie i wykonanie różnych eksperymentów, wnikliwą i krytyczną analizę wyników tych pomiarów. W każdym z tych obszarów Doktorant potwierdził swoje kompetencje. Należy również podkreślić, że zaproponowane przez mgr Żerko metody mają potencjał aplikacyjny i mogą stać się istotnym krokiem na drodze do opracowania uniwersalnych metod w analizie dużych białek nieustrukturyzowanych. Według mnie, unikatową zaletą omawianych w pracy eksperymentów jest opracowanie metody przypisywania sygnałów pochodzących od reszt proliny a także możliwość uzyskania korelacji sygnałów pomiędzy kilkoma resztami aminokwasów. Należy podkreślić, że opisane w rozprawie badania stały się podstawą trzech publikacji w czasopiśmie *Journal of Biomolecular NMR*.

Na moją prośbę Doktorant dostarczył mi informację o swoim dotychczasowym dorobku. Dorobek mgr Żerko jest imponujący, jak na tak młodego badacza i obejmuje 21 publikacji współautorskich, z czego w trzech pracach jest on pierwszym autorem. Mgr Żerko kierował również projektem NCN Preludium oraz trzykrotnie otrzymał Dotację Statutową Młodych.

W oparciu o wyrażoną powyżej opinię stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska z nawiązką spełnia wymogi określone w ar. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Szymona Żerko do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorski charakter pracy, szeroko udokumentowane tezy i podstawowe znaczenie wyników dla analizy białek nieustrukturyzowanych metodami spektroskopii NMR wnioskuję również o wyróżnienie tej rozprawy zgodnie ze zwyczajami Wydziału Chemii UW.

Zofia Idanec