



prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar
andrzej.ozyhar@pwr.edu.pl

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny
Wydziałowy Zakład Biochemii
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50 370 Wrocław

Wrocław, 27 lutego, 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Szymona Żerki

Wysokowymiarowe metody spektroskopii NMR dedykowane do badań białek nieustrukturyzowanych

Rozprawa została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Wiktora Koźmiskiego

Rozprawa doktorska mgr Szymona Żerki, przygotowana w języku polskim, liczy 101 stron i podzielona jest na dwie, opatrzone numerami rzymskimi, części: *Stan wiedzy i Badania własne*. Na *Stan wiedzy* składają się dwa rozdziały, *Spektroskopia NMR* i *Spektroskopia NMR białek nieustrukturyzowanych*, natomiast *Badania własne* obejmują rozdziały zatytułowane: *Spektroskopia projekcyjna z próbkowaniem losowym*, *Sekwencje z mieszaniem izotropowym C'-C'*, *Uwagi techniczne*, *Podsumowanie*. Pracę rozpoczyna streszczenie w języku angielskim (*Abstract*) a kończy *Bibliografia*.

Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, ang. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*), to jedna z kluczowych technik stosowanych do analizy struktury i właściwości związków chemicznych, w tym również makrocząsteczek jakimi są białka. Technika ta pozwala nie tylko na opisanie struktury przestrzennej białek, ale także na uzyskanie szeregu informacji dotyczących jej dynamiki a także jej zmian będących np. skutkiem oddziaływania białek z innymi cząsteczkami. Tego rodzaju kompleksowe informacje, trudnodostępne przy wykorzystaniu innych technik eksperymentalnych, pozyskano dla wielu białek globularnych – szczególnie po wprowadzeniu metod ich selektywnego znakowania izotopowego oraz korelacyjnych widm wielowymiarowych. Synergiczne zastosowanie obu metod pozwoliło na wykorzystanie spektroskopii NMR do badania białek globularnych o względnie dużych masach cząsteczkowych, do 50-70 kDa.

W ostatnich latach obiektami analiz NMR stały się także białka, w odróżnieniu od białek globularnych, nieposiadające stabilnej struktury trzeciorzędowej a pełniące



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

T: +48 71 320 24 25
T/F: +48 71 320 21 52

www.wch.pwr.edu.pl
www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434

zdefiniowane funkcje w komórkach, głównie eukariotycznych. Białka te zwane białkami inherentnie nieuporządkowanymi (IDPs, ang. *intrinsically disordered proteins*), a przez autora rozprawy określone jako nieustrukturyzowane, charakteryzują się zmiennością i niespotykaną dynamiką struktury. Uniemożliwia to uzyskanie ich kryształów a zatem wyklucza użycie dyfraktometrii rentgenowskiej, podstawowego narzędzia do badania struktury białek. Zatem, wynikająca z natury IDPs konieczność prowadzenia analiz strukturalnych w roztworze czyni ze spektroskopii NMR techniką z wyboru. Jednak, analizy IDPs tą techniką dalekie są od rutynowych. Wielość stanów konformacyjnych cząsteczki, dynamika konformacyjna łańcucha głównego, nietypowy skład aminokwasowy, np. wzbogacony w reszty proliny, obecność powtarzających się krótkich fragmentów w strukturze pierwszorzędowej to tylko niektóre z przyczyn trudności w pozyskiwaniu danych NMR dla IDPs i ich interpretacji. Znaczące, pionierskie, osiągnięcia w pokonywaniu tych trudności posiada Pan Profesor Wiktor Koźmiński i jego zespół. Przedstawiona do oceny rozprawa przygotowana przez Pana Szymona Żerkę wpisuje się w ten bardzo aktualny nurt badawczy. Ogólnym celem rozprawy było rozwinięcie metodologii prowadzenia pomiarów spektroskopii NMR dla IDPs z wykorzystaniem widm wielowymiarowych, o czterech i więcej wymiarach. Szczególny nacisk doktorant położył na rozwiązanie problemu nakładania się sygnałów w widmach i dostarczenie wystarczającej informacji, aby było możliwe przypisanie sygnałów także w przypadku sekwencji bogatych w proliny. Rozwiązania problemu doktorant poszukiwał realizując dwa cele. Celem pierwszym było opracowanie alternatywnej metody dostępu do informacji wielowymiarowej z widm sześć- i siedmiowymiarowych z wykorzystaniem spektroskopii projekcyjnej. Celem drugim było zaprojektowanie i sprawdzenie użyteczności pięciowymiarowych eksperymentów wykorzystujących mieszanie izotropowe pomiędzy jądrami węgla karbonylowych.

Najważniejszymi wynikami, uzyskanymi w trakcie badań składających się na rozprawę, są moim zdaniem:

- opisanie sposobu realizacji widm dostarczających sześciu i siedmiu niezależnych częstości rezonansowych w oparciu o schemat przetwarzania i inspekcji widm pięciowymiarowych; zaproponowane rozwiązanie łączy dwa różne rodzaje próbkowania niejednorodnego: radialne i losowe;
- zaprojektowanie nowych technik cztero- i pięciowymiarowych wykorzystujących izotropowe mieszanie magnetyzacji pomiędzy jądrami węgla karbonylowych (C'), za pośrednictwem stałych sprzężenia skalarnego przez trzy wiązania chemiczne;
- eksperymentalne wykazanie skuteczności zaproponowanych technik poprzez przeprowadzenie odpowiednich pomiarów dla białka testowego, α -synukleiny, białka powszechnie wykorzystywanego do testowania użyteczności nowych metod NMR dla analizy struktury IDPs.

Uważam, że zawarte w rozprawie wyniki są oryginalne i znacząco poszerzają wiedzę dotyczącą wielowymiarowych metod spektroskopii NMR dedykowanych do badań IDPs. Fakt ten został też doceniony przez niezależnych ekspertów, gdyż wiele z

prezentowanych w pracy wyników opublikowanych jest w pracach, które ukazały się renomowanym periodyku *Journal of Biomolecular NMR* (Impact Factor = 2,534).

Nie mam zatem wątpliwości, że praca wypełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami). Z recenzenckiego obowiązku pragnę jednak przedstawić kilka uwag, komentarzy, które przyporządkowałem wybranym rozdziałom rozprawy.

Stan wiedzy

Zgodnie z art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) *rozprawa doktorska (...) powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego (...) oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej (...)*. Zwyczajowo głównym fragmentem rozprawy doktorskiej, w którym kandydat prezentuje wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej, w której prowadzony jest przewód doktorski, jest fragment poprzedzający opis przeprowadzonych badań. W rozprawie przedłożonej do recenzji rolę taką spełnia *Stan wiedzy*, na który składają się dwa rozdziały: 1. *Spektroskopia NMR* i 2. *Spektroskopia NMR białek nieustrukturyzowanych*. Tytuł pierwszego okazuje się być bardzo mylący. Wbrew temu co sugeruje tytuł rozdział nie jest poświęcony przedstawieniu ogólnych informacji dotyczących spektroskopii NMR, np. podstaw fizycznych zjawiska, rodzajów widm itp. Zamiast tego kandydat omawia kolejno: *Spektroskopię NMR białek* (2 strony), *Budowę białek* (ok. 3 stron) i *Spektroskopię NMR białek globularnych* (4½ strony). Podczas lektury uderzyła mnie nierównocенność w sposobie prezentacji i zakresie wiedzy prezentowanej przez kandydata w tym fragmencie rozprawy. *Spektroskopia NMR białek*, *Spektroskopia NMR białek globularnych* a szczególnie omawiana dalej *Spektroskopia NMR białek nieustrukturyzowanych* są prezentowane w sposób nie budzący wątpliwości co do specjalistycznej wiedzy kandydata. Natomiast *Budowa białek* zawiera, w większości, podręcznikowe informacje, jak na przykład wzory aminokwasów, które każda osoba kończąca studia chemiczne powinna znać. Co gorsza, wzory te nie są, jak to zwyczajowo przyjęto, pokazane w formie jonów obojnych, lecz w formie niezjonizowanej, która nie odpowiada stanowi faktycznemu, tj. warunkom w jakich zwykle aminokwasy występują.

Badania własne

Z przyjemnością przeczytałem ten fragment rozprawy. Znalazłem w nim szczegółowy opis systematycznych badań, które miały na celu rozwinięcie metodologii prowadzenia pomiarów spektroskopii NMR dla IDPs z wykorzystaniem widm wielowymiarowych, o czterech i więcej wymiarach. Szczególny nacisk doktorant położył na rozwiązanie problemu nakładania się sygnałów w widmach i dostarczenia wystarczającej informacji, aby było możliwe przypisanie sygnałów także w przypadku sekwencji bogatych w proliny. Jak zaznaczyłem to już powyżej do celu kandydat zmierzał na dwa sposoby – wykorzystując spektroskopię projekcyjną z próbkowaniem losowym i izotropowe mieszanie magnetyzacji pomiędzy jądrami

węgla karbonylowych, za pośrednictwem stałych sprężenia skalarnego przez trzy wiązania chemiczne. Przedstawione w pracy dane eksperymentalne wskazują, że cel został w dużej mierze osiągnięty a sposób jego realizacji został oceniony przez niezależnych ekspertów.

Inne bardziej szczegółowe uwagi dotyczące pracy:

- str. 3; słowo biomolekuły zawiera błąd ortograficzny (...*struktury biomolekół* ...);
- str. 3; ... *pozwalają na rutynowe wyznaczanie białek o masach nie przekraczających 30 kDA*; w tekście wielokrotnie pojawia się termin *masa białka* gdy jest mowa o *masie cząsteczkowej białka* – jest to poważny błąd;
- str. 15; *Kompozycja aminokwasowa białka* – co to takiego?
- str. 16; *numer aminokwasu w sekwencji białka*; powinno być: *pozycja reszt aminokwasowej*; nawisem mówiąc – w pracy używane jest rutynowo pojęcie *aminokwasu* zamiast *reszty aminokwasowej* w odniesieniu do aminokwasów występujących w strukturze białek;
- str. 11, Rys. 1.7 i Rys. 1.8; brak podania źródła;
- str. 21; *populowanie wielu stanów*; jak wydaje się czasownik *populować* nie występuje w języku polskim?
- w pracy używanych jest wiele skrótów, co samo w sobie nie stanowi problemu; jednak brak *Spisu skrótów* a także fakt, iż większość z nich nie jest zdefiniowanych (wprowadzonych) bardzo utrudnia lekturę.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną, jakość wykonanych doświadczeń przedstawioną do recenzji rozprawę oceniam bardzo pozytywnie, a uwagi krytyczne nie umniejszają tej oceny. Uważam, że mgr Szymon Żerko przedstawił rozprawę doktorską, której wyniki są oryginalne i znacząco poszerzają wiedzę w zakresie metod spektroskopii NMR do badań IDPs. Z pełnym przekonaniem stwierdzam zatem, że rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.