



Wrocław, 09.06.2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Doroty Anny Kubiak pt. „Synteza oraz badania konformacyjne fragmentów peptydowych tworzących zwroty w wybranych białkach oraz ustalenie sposobu wiązania tych fragmentów białek z jonami Cu(II) i Zn(II)”**

Praca doktorska Pani mgr Doroty Anny Kubiak została wykonana pod kierunkiem dr hab. Joanny Makowskiej prof. U.G. z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematem pracy są badania konformacyjne, stabilnościowe oraz koordynacyjne peptydów pochodzących ze zwrotów wybranych białek. Zrozumienie molekularnych podstaw rządzących procesami tworzenia pętli białkowych, ich wpływu na strukturę białka oraz jego stabilność a także właściwości wiązania jonów metali jest kluczowe z naukowego punktu widzenia co czyni tematykę istotną i interesującą.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska liczy 175 stron i została przygotowana w klasycznym układzie pracy eksperymentalnej zawierającej wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody badań, wyniki badań i dyskusję oraz podsumowanie uzyskanych rezultatów. Do pracy dołączone jest streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Rozprawa zawiera również wykaz używanych skrótów i symboli. Spis literaturowy obejmuje 175 pozycji opublikowanych głównie w ostatnim dwudziestolecu.

Wstęp pracy, liczący 22 strony, został podzielony przez Autorkę na trzy istotne dla pracy tematy dotyczące mechanizmu fałdowania białek, roli miedzi i cynku w organizmie człowieka oraz chorób neurodegeneracyjnych, z czego pierwszy podrozdział najbardziej odpowiada tematyce rozprawy doktorskiej. W rozdziale tym został opisany proces zwijania białek z ciekawą prezentacją hipotez dotyczących tej tematyki w ujęciu chronologicznym. Opis ten byłby bardziej przydatny czytelnikowi pracy doktorskiej Pani

mgr Kubiak gdyby zawierał podstawowe informacje dotyczące tworzenia się struktur drugo- i trzeciorzędowych ze szczególnym naciskiem na opis wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych, które jak się okazuje na dalszych stronach rozprawy, stanowią podstawę interpretacji uzyskanych wyników. W rozdziale tym brakuje mi również opisu tego, w jaki sposób jony metali wpływają lub regulują tworzenie się struktur wielorzędowych w białkach i jak wyglądają mechanizmy fałdowania zależnego lub niezależnego od jonów metali w ujęciu energetycznym, tak ważnym dla struktury i stabilności metaloproteiny. Zamiast tego Doktorantka przedstawia krótki opis poświęcony właściwościom kompleksotwórczym peptydów, który jest mało przydatny w ujęciu tego, co w pracy doktorskiej faktycznie się znajduje. Niedosyt tego nadrabia natomiast rozdział poświęcony roli miedzi i cynku u człowieka, gdzie Autorka przedstawia dość rzetelnie podstawowe informacje na temat roli biologicznej, homeostazy, właściwości chemicznych oraz reaktywności miedzi. Informacje dotyczące cynku zostały jednak potraktowane po macoszemu i ciężko się z tego rozdziału dowiedzieć cokolwiek na temat tego pierwiastka i jego roli. Najbardziej zaskakujący jest rozdział poświęcony buforom biologicznym, w którym opisane są po krótku bufony Gooda ale trudno z treści zrozumieć czemu ma służyć ten opis. Domyślam się, że Autorka chciała przybliżyć dwa istotne dla badań ITC bufony takie jak MES i bufor dimetyloarsenowy. Informacje na ten temat mogły znaleźć się z powodzeniem w części metodologicznej pracy. Rozdział wieńczy krótka charakterystyka i opis znaczenia peptydów poliargininowych przydatny dla całości pracy.

Półstronicowy cel pracy dość jasno opisuje najistotniejsze cele badań dotyczące syntezy peptydów, choć nie jest jasne jakich, ich charakterystyki fizykochemicznej z użyciem wymienionych metod oraz zbadanie oddziaływań wybranych fragmentów peptydowych z jonami Cu(II) i Zn(II) przy zastosowaniu metody ITC. By zapobiec pytaniu: jakich peptydów, z jakich białek? Autorka mogła z powodzeniem przenieść kolejny rozdział dotyczący białek wykorzystywanych w badaniach do części teoretycznej pracy. Tymczasem rozdział ten zawiera minimalne wręcz informacje dotyczące białek FBP28, IgG1 oraz hPin1 i całkowity brak informacji dlaczego Doktorantka wybrała takie, a nie inne obiekty badań. Nie przedstawiła również informacji co było powodem wyboru takich sekwencji a nie innych, ich długości oraz powodów badania peptydów z substytucjami poszczególnych reszt aminokwasowych. Dopiero w ostatnim zdaniu rozdziału

czytelnik dowiadyuje się, że są to peptydy bogate w reszty argininowe i z tego tytułu zostały wybrane za cele molekularne.

Rozdział poświęcony materiałom i metodom nie budzi większych zastrzeżeń i napisany jest dość typowo dla rozpraw doktorskich na kierunku chemicznym. Poza opisem syntezy peptydów Autorka umieściła tu rozdział poświęcony miareczkowaniom potencjometrycznym, skaningowej kalorymetrii DSC, spektroskopii dichroizmu kołowego, spektroskopii NMR wraz z dynamiką molekularną oraz izotermicznej kalorymetrii miareczkującej (ITC). W licznych miejscach rozdziału znajduje się informacja, że Doktorantka zleciła pewne pomiary lub zostały one wykonane przez podane osoby. Dla jasności obrazu proszę o informację, co faktycznie zostało zrealizowane przez Doktorantkę podczas prowadzenia badań i interpretacji wyników. W opisie miareczkowania potencjometrycznego nie znalazłem informacji w jakim zakresie potencjału roboczego lub pH były przeprowadzane badania. Najważniejsze jednak pytanie dotyczy tego, dlaczego mając w ręku tak elegancką metodę Doktorantka nie wykonała badań potencjometrycznych dla poszczególnych peptydów z jonami Cu(II) i Zn(II), a zamiast tego skupiała się jedynie na badaniach samych peptydów? Nie widzę większych problemów z analizą danych takich miareczkowań a Doktorantka dzięki dopasowaniu odpowiednich modeli mogła uzyskać niezależne informacje na temat stechiometrii oraz stabilności tworzących się peptydów w postaci stałych niezależnych od pH, a mogły one posłużyć do obliczeń stałych warunkowych, które zostały przez doktorantkę wyznaczone jedynie metodą ITC. Z lektury pracy nie jest dla mnie jasne dlaczego badania potencjometryczne zostały wykonane w różnych temperaturach skoro Autorka praktycznie nie analizuje tych danych w swojej pracy. Z powodzeniem stałe  $pK_a$  zmierzone w różnych temperaturach mogły posłużyć do obliczeń parametrów termodynamicznych poszczególnych reakcji dysocjacji co mogło być przydatne dla interpretacji innych pomiarów. Ponadto opis poświęcony spektroskopii NMR i dynamice molekularnej budzi pewne formalne zastrzeżenia. Poza podstawowymi informacjami na temat powyższych metod Autorka w rozdziale tym umieszcza również szereg wyników własnej pracy. Podejście takie stosowane jest częściej w publikacjach naukowych niżli w rozprawach. Kolejne moje zastrzeżenie budzi podejście do analizy miareczkowań ITC z jonami Cu(II). Autorka w tekście informuje i to słusznie zresztą, że eliminowała ciepła rozcieńczeń poprzez przeprowadzenie kontrolnych miareczkowań samych buforów jonami Cu(II). Brak jest natomiast informacji

dla czego entalpie protonacji składników buforów nie były wzięte pod uwagę. Przedstawiona na dalszych stronach analiza sposobu wiązania Cu(II) faktycznie sugeruje, że podczas wiązania jonu metalu nie dochodziło do dysocjacji protonów z cząsteczek peptydów i tym samym protonacji składników buforu, jednakże różne wartości entalpii dla buforów MES i CACO wskazują na to, że do takiego procesu jednak mogło dojść. W tym wypadku poza entalpią protonacji składników buforu należy również uwzględnić entalpię dysocjacji protonu z cząsteczki peptydu by uzyskać faktyczną entalpię kompleksowania. W związku z tym oraz dalszymi komentarzami proszę Doktorantkę o wyjaśnienia czy rzeczywiście nie dochodziło do transferu protonów i dlaczego entalpie kompleksowania są różne w różnych buforach jeśli nie dochodzi do transferu protonów.

Opis rezultatów Autorka przedstawia konsekwentnie opisując najpierw wyniki dla peptydów białka FBP28, następnie dla peptydów białka IgG1 oraz hPin1. Każdy z tych rozdziałów zawiera podobny zestaw danych dotyczących wyników miareczkowania potencjometrycznego, skaningowej kalorymetrii różnicowej, dichroizmu kołowego, NMR i dynamiki molekularnej. Wyniki uzyskane tymi metodami dotyczyły badań samych peptydów natomiast ich kompleksowanie jonami Cu(II) i Zn(II) zostało przebadane jedynie techniką ITC. Niemniej bardzo duży bałagan w pracy wprowadza niekonsekwentna prezentacja syntezowanych i badanych peptydów, co zasadniczo wpływa na moją ocenę opisu uzyskanych danych. Autorka dość swobodnie podchodzi do kwestii acetylacji uzyskanych peptydów, które raz pozostają faktycznie zacetylowane, innym razem już nie (Tab. 2, 3, 4, 5 i 8). Jest to na tyle istotne, gdyż ma znaczenie dla opisu procesu dysocjacji grup o charakterze kwasowo-zasadowym. Peptydy mające więcej tych grup traktowane są przez Doktorantkę jakby miały ich mniej i odwrotnie. Tutaj powstaje więc zasadnicze pytanie, jakie peptydy otrzymała i badała Doktorantka oraz dlaczego raz miały być one acetylowane a innym razem nie, skoro pochodzą z pętli wyżej wymienionych białek. Autorka uzyskawszy dane potencjometryczne przypisywała poszczególnej stałej  $pK_a$  grupy funkcyjne bazując raczej na logice i substancjach referencyjnych aniżeli na danych eksperymentalnych. Przykładowo, peptyd U11 zawierający siedem grup o charakterze kwasowo-zasadowym podczas miareczkowań potencjometrycznych i obliczeń został potraktowany jako peptyd czteroprotonowy co oczywiście może mieć miejsce jeśli część grup posiada bardzo kwaśne lub bardzo zasadowe ugrupowania. Tymczasem Tabela 20 prezentuje już pięć stałych  $pK_a$ , które wartości

wynoszą odpowiednio 1,77, 6,60, 9,42, 10,28, 10,30. Autorka w swojej interpretacji tym wartością przypisuje odpowiednio dysocjację grupy karboksylowej C-końca (1,78), N-terminalnej grupy aminowej (6,60) łańcucha bocznego Lys13 (9,43) oraz łańcucha bocznego Tyr23 (10,28). Nie dość, że wartości z tekstu nie odpowiadają w pełni wartościom z Tabeli 20, to nagle wyznaczona i umieszczona w tabeli wartość  $pK_{a5}$  nie posiada już żadnego przypisania. Moje pytanie dotyczy tego dlaczego Doktorantka zastosowała tak mylny opis i czy powodem tego nie jest swobodnie pojawiająca się acetylacja terminalnej grupy aminowej czy może jeszcze inny błąd? Kolejne pytanie dotyczy najistotniejszej kwestii, skąd Doktorantka wie, że te wartości, a także wartości przedstawione w innych tabelach, faktycznie odpowiadają dysocjacjom poszczególnych ugrupowań. W pracy nie ma innych wyników, które wskazywałyby na takie przypisanie. Wykonanie chociażby prostego miareczkowania pH-metrycznego metodą NMR mogłoby sprawę rozwiązać i uspokoić recenzenta. N-terminalna grupa aminowa rzadko miewa tak niską wartość, nie oznacza to jednak, że taka nie jest. Podobne pytania dotyczą niskich wartości grup bocznych Lys oraz Arg, które pojawiają się w licznych innych tabelach potencjometrycznych. Tabela 10 przedstawia wartość  $pK_{a2}$  peptydu Dag1 równą 7,91, która przypisana została reszcie bocznej kwasu asparaginowego. Doktorantka bardzo często odnosi się do wcześniejszych badań, w których nie znalazłem wyników pozwalających jednoznacznie przypisać kwasowość poszczególnej grupie. Interpretacja zmian kwasowości bazująca jedynie na tworzeniu się wiązania wodorowego w łańcuchu głównym peptydu, nie jest w pełni wystarczająca by przekonać recenzenta. Moje kolejne pytanie dotyczy również realnego błędu wyznaczenia wartości  $pK_a$  grup wysoce zasadowych uzyskanych metodą potencjometryczną. Wartości wyznaczone w programie służącym do analizy danych dotyczą błędu dopasowania krzywej teoretycznej do eksperymentalnej. Z mojego doświadczenia wartości  $pK_a$  powyżej 10,5 wyznaczone potencjometrycznie mogą mieć wartości spokojnie wyższe o jednostkę logarytmiczną zwłaszcza gdy w cząsteczce występuje kilka grup tak zasadowych. Dane potencjometryczne posłużyły także Doktorantce do interpretacji procesu denaturacji. Prosiłbym zatem o przedstawienie tych danych na wykresie zależności  $pK_a=f(pH)$  podczas obrony rozprawy i wskazanie, jak faktycznie zmiany w  $pK_a$  wskazują na równowagę lub jej brak pomiędzy dwiema konformacjami peptydu o czym wspomina Autorka.

W badaniach stabilnościowych badanych peptydów Doktorantka zastosowała dwa podejścia mające na celu wyznaczenie temperatury topnienia, mianowicie DSC oraz rejestrację widm CD w funkcji zmieniającej się temperatury. Uzyskane wyniki różnią się od siebie nawet o ponad 10°C. Jak Autorka interpretuje te różnice i z czego one mogą wynikać? Kolejne pytanie dotyczy tego, czy istnieje korelacja pomiędzy zmianami konformacyjnymi peptydów i ich mutantów z danymi stabilnościowymi? Innymi słowy czy da się energetycznie wytłumaczyć zmiany w  $T_m$  pomiędzy tzw. formą dziką a peptydem z substytucjami reszt aminokwasowych?

Badania strukturalne powiązane z dynamiką molekularną to według mnie najsilniejsza część badań Doktorantki. Powiązanie danych uzyskanych z eksperymentów NMR wraz z dynamiką molekularną pozwala na wysokorozdzielcze spojrzenie w strukturę czy poszczególne konformacje badanych peptydów. Ciekawym wynikiem jest to, że uzyskane struktury w większości wypadków dobrze korelują się z wynikami struktur krystalicznych białek. Czy Doktorantka mogłaby tu krótko przedyskutować to, jakie czynniki wpływają na to, że struktura krótkiego peptydu jest dobrym lub złym modelem strukturalnych pętli białkowych w odniesieniu do swoich wyników?

Ostatnia część rezultatowa dotyczy charakterystyki oddziaływania peptydów z jonami metali, głównie z jonami Cu(II) metodą ITC. Jony Zn(II) podobnie jak we wstępie zostały potraktowane tu jako dodatek i zgadzam się z generalnym przekazem Autorki, że właściwości kompleksotwórcze tych konkretnych peptydowych modeli pętli białkowych są znikome a metoda ITC nie pozwala jednoznacznie stwierdzić, czy Zn(II) w ogóle oddziałuje z peptydem. Tu również zastosowanie metody potencjometrycznej mogłoby rzucić nieco więcej światła, gdyż metoda ta z założenia jest znacznie czulsza i dokładniejsza. Mimo, że izotermalna kalorymetria miareczkująca jest powszechnie wykorzystywana w biochemii do badania stałych oddziaływań to w przypadku interakcji krótkich peptydów z jonami metali może być trudna w interpretacji i prowadzić do błędnych wniosków. Doktorantka stosując tą metodę stwierdziła, że w warunkach eksperymentów tworzone są kompleksy Cu(II) z peptydami o dwóch różnych stechiometriach w stosunku molowym Cu(II) do peptydu 1:1 oraz 2:3. Nie jest dla mnie jasne dlaczego peptyd D7 tworzy kompleksy o stechiometrii Cu<sub>2</sub>L<sub>3</sub>. Jakie wyniki potwierdzają tę konkluzję? Jeśli Doktorantka jako punkt wyjścia wzięła jedynie termogramy to powstaje pytanie jaki był stosowany model fitowania danych? Czy Autorka wykonała

jakiegokolwiek inne eksperymenty pozwalające na ogólną konkluzję dotyczącą stechiometrii tworzących się kompleksów? Jony Cu(II) świetnie nadają się do badań spektroskopowych i są powszechnie wykorzystywane w badaniach koordynacyjnych licznych modeli białkowych. Zmiany w intensywności pasm d-d oraz ich energii mogłyby niezależnie zweryfikować konkluzję Autorki. Analiza termogramów ITC wymaga ogromnej pewności stężeń stosowanych peptydów oraz słuszności wyboru danego modelu fitowania. Patrząc na dane przedstawione na Rys. 45 mam spore wątpliwości dlaczego peptyd D7 ma wiązać Cu(II) ze stechiometrią 2:3 podczas gdy jego mutant M-7 już nie. Brak lub obecność grupy karboksylowej może mieć wpływ na ten proces ale w pracy brak jest dowodów by wyciągać takie wnioski.

Doktorantka interpretując właściwości kwasowo-zasadowe poszczególnych peptydów oraz parametry termodynamiczne uzyskane metodą ITC dochodzi do wniosków pozwalających na wyciągnięcie informacji o sposobie wiązania jonu metalu. Dziwi mnie zatem, że nie został przedstawiony choć jeden rysunek, który sugerowałby sposób wiązania peptydów do jonu Cu(II) o czym informuje chociażby tytuł rozprawy. Brak danych spektroskopowych, które dla jaśniejszego obrazu można było wykonać w szerokim zakresie pH oraz brak danych EPR nie pozwala na jakąkolwiek interpretację sposobu wiązania a jedynie domysły odnośnie tego jaka grupa może brać udział w wiązaniu Cu(II). Tu jednak recenzent poddaje się całkowicie czytając we wnioskach, że jon Cu(II) wiąże się do grupy bocznej lizyny, argininy czy seryny. Chciałabym aby Doktorantka przedstawiła swoje rozumowanie w sposób obrazowy podczas obrony, wskazując na wybranych przykładach, co skłoniło ją do takiej, a nie innej interpretacji danych. Sama wiedza na temat właściwości kwasowo-zasadowych liganda (w tym wypadku peptydu) jest niewystarczająca do stwierdzenia tego, jakie reszty biorą udział w wiązaniu się metalu. To, że dane ugrupowanie jest zdeprotonowane w warunkach eksperymentu nie oznacza, że kwasowość innej reszty nie może zostać obniżona przez obecność jonów Cu(II), tak że dochodzi do dysocjacji w warunkach eksperymentu. Jony Cu(II) znane są z tego, że potrafią obniżyć  $pK_a$  protonu amidowego wiązania peptydowego do wartości 4-5, co ma miejsce choćby w przypadku kompleksowania tego metalu przez N-koniec albuminy ludzkiej o czym Doktorantka sama pisze we wstępie. Dysocjacja protonu z tego, czy innego ugrupowania podczas wiązania Cu(II) może tłumaczyć, że dla peptydów U9, U11 czy U11-M obserwowane entalpie kompleksowania były kilkukrotnie większe niż

dla pozostałych peptydów. Proszę zatem Doktorantkę o ustosunkowanie się do mojego wyводу w kontekście swoich wyników.

Pracę doktorską pani Doroty Kubiak wieńczy trójstronicowe posumowanie uzyskanych wyników, w których Autorka przedstawiła dość zgrabnie najważniejsze konkluzje, które wyciągnęła analizując dane, choć do tematu podeszła w podobny sposób jak przy opisie wyników i rezultatów czyli osobno dla każdego z grup peptydowych. W pracy brakuje mi rozdziału, w którym Autorka mogłaby zebrać ze sobą wspólne cechy peptydów poliargininowych i odnieść je do wcześniejszych wyników uzyskanych w laboratorium czy innych grupach badawczych. Osobiście ubolewam nad słabym podejściem do kompleksowania badanych peptydów i całkowitym brakiem dyskusji uzyskanych wyników z niepoliczalną wręcz ilością danych literaturowych w podobnych tematach. Mimo, że praca zapowiadała się poruszać na początku kwestie zwijania i fałdowania białek, słabo poruszona i dyskutowana jest energetyka tego procesu zwłaszcza w ujęciu koordynacji jonów metali.

Co się tyczy samej rozprawy to została ona napisana dość poprawną polszczyzną. Dało się zauważyć pewne błędy językowe. Autorka nie uchroniła się też od dziwnych błędów logicznych i kalek językowych. Oprawa graficzna pracy jest poprawna choć Autorka mogła uniknąć kopiowania kilku rysunków bezpośrednio z literatury i zamienić język angielski na język polski. Brak jest podpisów pod niektórymi tabelami i ilustracjami. Brak jest również zastosowania symboliki typu a), b), c)... lub wykres górny, dolny itp. co utrudnia czytanie i tak wymagającej rozprawy.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Doroty Anny Kubiak dotyczy badań fizykochemicznych, strukturalnych oraz stabilnościowych peptydowych modeli zwrotów białkowych, których formowanie jest kluczowe w fałdowaniu i stabilności białek. Doktorantka podczas realizacji pracy posługiwała się szerokim wachlarzem metodologicznym uzyskując odpowiednią ilość wyników. Jest ona współautorem dziewięciu publikacji naukowych, przy czym jest pierwszym autorem w jednej z nich. Jest również autorem dwóch rozdziałów książkowych. Mimo licznych uchybień, na które spodziewam się wyczerpujących komentarzy i odpowiedzi podczas publicznej obrony, stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wymogi zwyczajowe oraz ustawy o stopniach i tytule naukowym. W związku z



powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Doroty Anny Kubiak do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

