



Politechnika Wroclawska

Wroclaw, 15.03.2021

Prof. Łukasz Berlicki
Katedra Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wroclaw
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Kocyły, pt.: "Charakterystyka oddziaływania międzybiałkowego kompleksu koreceptora CD4 z kinazą tyrozynową LcK zależnego od jonów Zn²⁺"

Pani mgr Anna Kocyła zrealizowała pracę doktorską pod opieką prof. Artura Krężła w Zakładzie Chemii Biologicznej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wroclawskiego. Praca obejmuje analizę oddziaływania białek CD4 i Lck zależnego od jonów cynku.

Analiza oddziaływań pomiędzy białkami jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną biochemii. Ponieważ szacuje się, że ludzki interaktom zawiera setki tysięcy oddziaływań międzybiałkowych, które kontrolują większość procesów komórkowych, wiedza dotycząca tego obszaru jest niezwykle cenna. Co więcej, badania dotyczące oddziaływań białko-białko, które zależne są od kompleksowania jonów metali są relatywnie słabo eksplorowane. W szczególności, przedmiotem badań zawartych w dyskutowanej rozprawie są oddziaływania białek, CD4 i Lck, które jest powiązane z kontrolowaniem układu immunologicznego – aktywacji i dojrzewania limfocytów T. Dlatego też, tematyka podjęta przez Doktorantkę jest ważna i wpisuje się w

najnowsze trendy badań. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania szczegółowej analizy oddziaływania CD4-Lck-Zn²⁺ z zastosowaniem szeregu nowoczesnych technik badawczych.

Rozprawa doktorska mgr Anny Kocyły jest napisana w języku angielskim w układzie klasycznym i zawiera 153 strony. Kolejno otrzymujemy: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp literaturowy (24 strony), cel badań (1 strona), materiały i metody (27 stron), wyniki (43 strony), dyskusję (18 stron) oraz spis literatury zawierający znaczącą liczbę 344 referencji. W opinii recenzenta, rozdzielenie dyskusji od wyników, pomimo tego, że często stosowane jest w artykułach z dziedziny nauk biologicznych, w przypadku obszernych rozpraw doktorskich nie jest korzystne i utrudnia odbiór przedstawianego materiału.

Praca doktorska mgr Anny Kocyły jest napisana poprawnym językiem angielskim i starannie zredagowana wykorzystując jednolita szatę graficzną. Tekst jest zilustrowany dużą liczbą kolorowych, dobrze przemyślanych i wysokiej jakości rysunków. Język rozprawy jest dokładny i adekwatny do poruszanych zagadnień naukowych, a jednocześnie przejrzysty i pozwalający na łatwe podążanie za przedstawianymi analizami.

Błędów edytorskich jest niewiele i chciałbym wskazać jedynie te, które potencjalnie mogą zaburzyć odbiór pracy:

1. Opis koloru punktów na wykresie na Rysunku 21C w tekście jest niezgodny z stanem faktycznym – nie ma punktów w kolorze czerwonym. Podobnie na Rysunku 25 opis kolorów nie odpowiada, tym, które są zastosowane na wykresach.
2. Na Rysunku 24 dobór kolorów jest niefortunny i utrudnia dopasowanie legendy do punktów pomiarowych.
3. Przedstawione na Rysunku 14 odległości do końcowych reszt aminokwasowych nie mają żadnego znaczenia, ponieważ zgodnie ze strukturą NMR (PDB id 1Q68) te fragmenty łańcuchów peptydowych nie mają ustalonej konformacji w roztworze.
4. Nie jest jasne, co oznacza stwierdzenie ‘subtracted holo form’ na Rysunku 19B. Działanie odejmowania powinno mieć dwa składniki.

Wstęp do dyskutowanej pracy doktorskiej jest bardzo dobrym opracowaniem dotyczącym biochemii cynku. W przejrzysty sposób zebrano bardzo wiele informacji na temat sposobów kompleksowania jonów cynku, ich roli w układach biologicznych a w szczególności zaangażowania w oddziaływania międzybiałkowe. Szczegółowo przedyskutowano możliwe sposoby wiązania jonów cynku przez dwa oddziałujące białka. W drugiej części wstępu zostało

opisane oddziaływanie pomiędzy białkami CD4 i Lck oraz jego rola w układzie immunologicznym. Ostatni podrozdział wstępu dotyczy indykatorów jonów metali stosowanych do badań układów biologicznych. Niewątpliwie wstęp pracy doktorskiej mgr Anny Kocyły bardzo dobrze wprowadza czytelnika w obszar zaprezentowanych dalej badań, a jego poziom szczegółowości daje odpowiedni obraz dotychczasowej wiedzy w tym zakresie.

W rozdziale ‘Materiały i metody’ szczegółowo opisano realizację wszystkich eksperymentów diskutowanych w pracy doktorskiej. Warto podkreślić, że Doktorantka zastosowała bardzo szeroki panel metod eksperymentalnych. Dla większości opisów ich poziom szczegółowości jest wystarczający. Zastrzeżenia budzi opis sposobu oczyszczania i charakterystyki białek i peptydów. Nie wskazano gradientów użytych do oczyszczania chromatograficznego tych grup związków chemicznych. Brakuje także potwierdzenia czystości otrzymanych peptydów (np. wynik HPLC analitycznego) oraz białek (np. wynik SDS-PAGE).

W pierwszej części rozdziału ‘Wyniki’ opisane zostały pomiary tworzenia kompleksu CD4-Lck-Zn²⁺ z zastosowaniem spektroskopii UV-Vis, fluorescencyjnej oraz CD. Zbadano wpływ różnych elementów sekwencji i struktury białka CD4 poprzez konstrukcję peptydów o różnej długości i z wybranymi mutacjami. Niestety w rozdziale 4.1 niekonsekwencja w nazewnictwie fragmentu białka CD4 i jego wariantów jest myląca. Fragment sekwencji białka CD4 421-454 jest nazywany zamiennie CD4 i CD4wt, a dodatkowo pochodna CD4-FAM jest opisana na rysunku 19B jako CD4. Nazwa CD4 powinna być zarezerwowana dla natywnego białka o pełnej długości. Niemniej jednak, przedstawione wyniki i ich dyskusja w bardzo przekonujący sposób pokazują, że oddziaływanie CD4 i Lck jest procesem złożonym i zależnym od wielu czynników strukturalnych i obecności wybranych reszt aminokwasowych. Co więcej, w kolejnym podrozdziale wykazano także znaczący wpływ palmitoylacji na tworzenie kompleksu badanych białek.

Kolejna część wyników dotyczy analizy oddziaływania CD4-Lck przyłączonych do modelowych membran i w modelowych liniach komórkowych. Z użyciem technik fluorescencyjnych (FLIM-FRET i FACS-FRET) wykazano oddziaływanie badanych białek zarówno w modelu membranowym jak i komórkowym, co w bardzo ciekawy i wartościowy sposób rozszerza wcześniejsze badania w kierunku układów biologicznych.

Bardzo interesującym pomysłem było zastosowanie układu CD4/Lck do skonstruowania narzędzia do heterodimeryzacji białek, która jest zależna od stężenia jonów cynku. Wybrano do

tego celu mutant fragmentu CD4 — CD4RARH, który wykazywał największą stabilność kompleksu z Lck/Zn²⁺ a jednocześnie kompleksy CD4RARH-Zn²⁺ były znacząco mniej stabilne. Wykazano, że zaproponowany układ jest selektywny względem jonów cynku i pozwala na efektywną heterodimeryzację modelowych białek. Co więcej, immobilizowany peptyd CD4RARH pozwala na selektywne wiązanie białek zawierających metkę Lck. Wykazano eksperymentalnie także możliwość wiązania białek z przyłączonym peptydem CD4RARH do immobilizowanego Lck. Zaproponowana metodologia heterodimeryzacji zależnej od stężenia jonów cynku wydaje się być bardzo ciekawa. Jakie realne problemy naukowe można by rozwiązać stosując opracowaną technikę?

Ostatnia część wyników dotyczy analizy wiązania jonów metali do indykatorów PAR i Zincon. Wyznaczono stałe wiązania i molowe współczynniki ekstynkcji dla dziewięciu jonów metali oraz dla jonów cynku w roztworach o różnych pH. Ta część pracy dostarcza zestawy niezwykle użytecznych parametrów, które niezbędne są w badaniach z zakresu chemii bionieorganicznej.

Podsumowując, chciałbym podkreślić moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kocyły zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym. Doktorantka wykonała ogromną pracę eksperymentalną sprawnie posługując się bardzo szerokim wachlarzem technik. Praca ma charakter interdyscyplinarny, a do jej realizacji konieczna była zarówno znajomość metod syntezy chemicznej, technik spektroskopowych jak i ekspresji białek, czy użycia systemów sztucznych membran oraz modelowych linii komórkowych. Warto także wskazać, że otrzymane wyniki są bardzo wartościowe w kontekście różnych dziedzin nauki od chemii nieorganicznej poprzez biochemię po immunologię.

Stwierdzam z pełnym przekonaniem, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Anny Kocyły spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Anny Kocyły do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Wnioskuje także o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na ponadprzeciętny zakres pracy, niezwykle wartościowe wyniki oraz fakt opublikowania znaczącej ich części w renomowanych czasopismach naukowych.

Julia Bartoś