



Dr hab. Maciej Kubicki, prof. UAM

Poznań, 20 kwietnia 2013

Zakład Krystalografii

Wydział Chemii UAM

Recenzja

rozprawy doktorskiej przedstawionej przez

p. mgr Agnieszkę Wojtkowiak

Pani mgr Agnieszka Wojtkowiak przedstawiła rozprawę doktorską zatytułowaną „Badania krystalograficzne 1,3- β -glukanazy z *Solanum tuberosum*”.

Praca składa się z czterech głównych części (część literaturowa, metodyka badań, część doświadczalna i dyskusja wyników), celu pracy, podsumowania i spisu literatury. Dodatkowo na początku pracy Autorka podaje wykaz stosowanych skrótów. W sumie są to 122 strony porządnie zredagowanego tekstu i starannie wykonanych rysunków.

Na wstępie Autorka sformułowała dwa cele swojej pracy: określenie struktury enzymu 1,3- β -glukanazy z *Solanum tuberosum* oraz – na tej podstawie - identyfikacja i charakterystyka miejsc wiążących substrat w tym enzymie.

Zwłaszcza ten drugi cel był bardzo ambitny, bo o ile struktury kilku enzymów z grupy GH17 – do której należy badane białko – były już znane, to zamierzano określić po raz pierwszy struktury kompleksów enzymu endo hydrolizującego (1 \rightarrow 3)- β -D-glukanazy z sacharydami.

Część literaturowa rozpoczyna się dość chaotycznym wprowadzeniem w chemię węglowodanów, które rozwija się w przejrzysty i dla mnie bardzo pouczający opis

konformacji i konfiguracji monosacharydów, i dalej węglowodanów złożonych, hydrolaz glikozydowych (włącznie z ich skomplikowaną nomenklaturą). Następnie Autorka interesująco opisuje dwa główne mechanizmy działania hydrolaz oraz wymagania steryczne, które muszą być spełnione aby mogło dojść do hydrolizy wiązania glikozydowego.

Dokładniej scharakteryzowany został przedmiot badań p. mgr Wojtkowiak, 1,3- β -glukanazy, ich aktywność biologiczna oraz znane struktury.

Po tym trzydziestostronicowym wstępie przychodzi pora na metodykę badań. Bardzo podobał mi się opis technik krystalizacji i procedury pomiaru intensywności oraz metody rozwiązywania struktur białek. Widać, że Autorce nie brakuje wiedzy i doświadczenia w tym zakresie.

Opis udokładniania struktury zachęcił mnie do zadania kilku pytań:

- gdzie jest granica rozdzielczości poniżej której „można zaobserwować piki pochodzące nie tylko od cząsteczek białka”? Jak to zdanie w ogóle, pomijając dosyć żargonowe sformułowania, zrozumieć?

- chętnie dowiedziałbym się więcej o zwiększeniu liczby obserwacji w przypadku użycia więzów miękkich,

- co oprócz czynników temperaturowych opisują ADP's?

- co oznacza pojęcie „macierze anizotropowe”?

- wzór na R opisuje ważony wskaźnik rozbieżności

- co oznacza stwierdzenie (przy opisie procedury R_{free}), że „refleksy (...) nie powinny być skorelowane z refleksami uczestniczącymi w udokładnianiu”? co z czym ma nie korelować?

- może warto byłoby – dla laików – zdefiniować kąty φ i ψ , o których mowa (chyba po raz pierwszy) na str. 40?

Wreszcie zaczyna się część pracy, opisująca wyniki.

P. Wojtkowiak bardzo precyzyjnie i szczegółowo opisuje swoje doświadczenia; widać tu dobrą szkołę, w której żadnego szczegółu procedury doświadczalnej się nie pomija. Piękne zdjęcia uzyskanych kryształów białek dopełniają wrażenia kompetencji.

Opis krystalizacji, pomiarów, rozwiązywania i udokładniania struktur czyta się znakomicie i bardzo mi się te fragmenty pracy podobały.

Czy wykonano jakieś próby rozwiązania struktury mutantu E259A? Z danych krystalograficznych można wnosić, że powinny tam być cztery cząsteczki białka w niezależnej symetrycznie części komórki elementarnej.

Chciałbym się dowiedzieć, dlaczego pomiar dyfrakcji mutantu E259A inkubowanego (piękne słowo) z 3-molowym nadmiarem heksasacharydu zakończono na rozdzielczości 1.68? Porównując statystyki pomiaru tego kryształu z odpowiednimi wartościami dla kryształu inkubowanego z 6-molowym nadmiarem heksasacharydu miałem wrażenie, że w tych pierwszych kryształach był większy „potencjał”: w porównywalnych zakresach wysokich rozdzielczości mamy średnie $I/\sigma(I)$ 5.1 dla pierwszego, 3.4 dla drugiego, a odpowiednie wartości R_{merge} to 26.4% i 43.4%. Czy trochę nie zmarnowano tu okazji na naprawdę wysokorozdzielczy pomiar?

Autorka wykorzystwała metodę TLS do podziału białka na sektory, czy fragmenty, które można traktować jak bryły sztywne. Sama metoda jest doskonale znana z badań małych cząsteczek, ale tam zazwyczaj nie ma problemu podziału cząsteczki na sztywne fragmenty. Wykresy prezentowane w pracy nie dają żadnych (może prawie żadnych) podstaw do wyboru szczególnej formy tego podziału, R_{TLS} dość monotonicznie maleje w funkcji ilości fragmentów, dlaczego więc wybrano akurat podział na trzy takie fragmenty? Czy można pokusić się o głębszą analizę tego podziału?

Intersująca dyskusja wyników koronuje doskonałą pracę. O jej jakości może świadczyć fakt, że wyniki zostały niedawno opublikowane w Acta Cryst. Part D – czasopismo to może pochwalić się czynnikiem wpływu 12.6, chociaż po doświadczeniach z Acta A mamy większą świadomość niedoskonałości tego parametru scjentometrycznego. Ważniejsze jest z pewnością to, że czasopisma Międzynarodowej Unii Krystalograficznej cieszą się zasłużoną reputacją bardzo wysokich wymagań formalnych, jakie trzeba spełnić, żeby tam publikować.

Autorka wykazała się swobodą w analizowaniu złożonych aspektów struktur białek, dla mnie najbardziej było to widoczne w opisie dwóch polimorficznych form białka natywnego, a zwłaszcza w pokazaniu, jak w zmutowanym białku cząsteczka wody wpasowuje się w strukturę i przejmuje rolę nukleofila.

Mam kilka uwag dotyczących dyskusji na temat „odmian polimorficznych” w badanych kryształach. Po pierwsze, jest to chyba jedno z pojęć, które trudno bezpośrednio przenieść ze świata małych cząsteczek do makromolekuł... W zasadzie każde określenie struktury kryształu cząsteczki białka prowadzi chyba do formy polimorficznej w ścisłym rozumieniu. Po drugie, Autorka wspomina o różnicy w objętości komórki (rzędu 4%) jako o większej niż błąd pomiarowy, ale nigdzie w pracy nie znalazłem szacunków tego błędu – a bardzo by się przydały. To moja niewiedza powoduje, że chętnie dowiem się podczas obrony jak definiuje się polimorfizm w kryształach białek.

Piękna jest struktura określona w dużej mierze znacznikiem histydynowym – bo można odnieść wrażenie, że jeżeli mówimy o strukturze kryształu to jest to właśnie czynnik determinujący strukturę. Jak to odnieść do białka niezmodyfikowanego? Jak ono będzie krystalizowało, jakie oddziaływania tam mogą decydować o strukturze?

Drobiazg: na str. 82 p. Wojtkowiak pisze, że „cząsteczki A i B są obrócone względem siebie o kąt 1.2° ” itd. Czy dotyczy to kąta między długimi osiami eliptycznych cząsteczek? I jak osie elipsoidy mają do osi krystalograficznych?

Wydaje mi się również, że kontakty między monomerami (ta sama s.82) są konsekwencją głównego czynnika determinującego strukturę, a więc zachowania znacznika histydynowego (który, jak Autorka przyznaje na s. 84, ma „decydujący wpływ na uporządkowanie cząsteczek w sieci krystalicznej”). Można więc przyjąć, że reszta cząsteczki dopasowuje się do ułożenia zdeterminowanego przez ten znacznik.

Tabela 30: czy w porównywanych strukturach białek 1GHS, 2CYG i 3EM5 również były dwie cząsteczki białka w symetrycznie niezależnej części komórki elementarnej?

Te może nie uwagi, a głos w dyskusji w żaden sposób nie zmniejszają wartości naukowej przedstawionej mi do recenzji pracy. Widzę tu wielką pracę doświadczalną, popartą wiedzą i intuicją, która doprowadziła do naprawdę wartościowych wyników. Z wielką przyjemnością czytałem tę dobrze napisaną pracę, jasno określającą cele, jakie Autorka chciała uzyskać, drogi (niełatwe) do ich osiągnięcia i piękną analizę uzyskanych wyników.

Muszę też podkreślić staranność edytorską pracy. Jestem niewygodnym czytelnikiem i z perwersyjną przyjemnością znajduję błędy redakcyjne: pisowni,

gramatyki itd. P. Wojtkowiak mnie tej satysfakcji pozbawiła – i chwała Jej za to. Pomyłki, które znalazłem, można policzyć na palcach rąk, więc nie będę ich tutaj wymieniał.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszystkie wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie Pani magister Agnieszki Wojtkowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na znaczenie naukowe wyników oraz jakość analizy składam wnioszek, aby Rada Wydziału Chemii UAM w określony przez siebie sposób rozpatrzyła wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy.

Maay KWC

