

Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Imię i nazwisko kandydata: JULIA ŁAKOMSKA

Tytuł rozprawy doktorskiej: Porównanie ludzkich czynników transkrypcyjnych YY1 i YY2: podobieństwa, różnice i ich potencjalne znaczenie w regulacji ekspresji genów.

Promotor/promotorzy: dr hab. Andrzej Górecki, prof. UJ

Promotor pomocniczy (jeżeli powołany):

Recenzent: prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszczycki

1. Tematyka rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Julii Łakomskiej jest monografią przedstawiającą badania niezwykle interesujących białek YY1 i YY2, których nazwa sugeruje dualną naturę zarówno z punktu widzenia funkcji (aktywacja – represja transkrypcji), jak i struktury (wewnętrznie nieuporządkowana domena N-końcowa – C-końcowa domena palców cynkowych). Bez wątplenia tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny nauki biologiczne.

Autorka postanowiła porównać struktury obu białek z punktu widzenia ich zdolności dimeryzacyjnych, wpływu jonów cynku na własności molekularne, a także ewentualnej roli regionów nieuporządkowanych i wreszcie zbadać ich oddziaływanie z modelowymi elementami regulatorowymi DNA.

Praca przygotowana pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Góreckiego, liczy 101 stron, jest bardzo precyzyjna w opisie eksperymentów i ich biofizycznej analizie, co świadczy o znawstwie badanych obiektów, problemów metodycznych, profesjonalnej realizacji eksperymentów, a także krytycznym podejściu do wyników, jest przy tym dobrze napisana z minimalną liczbą potknięć językowych czy nieścisłości. Składa się z czterech głównych, typowych dla rozpraw doktorskich, rozdziałów (*Wstęp teoretyczny*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*), a dodatkowo konieczne w takich pracach - spis skrótów, krótko zdefiniowany cel pracy i odnośniki literaturowe. Może niekonieczne było wprowadzenie rozdziału *Metody wykorzystywane w pracy* po *Wstępie*, a przed *Celem*, po którym dopiero pojawia się rozdział *Materiały i metody*.

We Wstępie, na 15-stu stronach Autorka, w zakresie nawiązującym do dalszej treści, przedstawiła budowę i relacje struktura-funkcja YY1 i YY2, zwracając uwagę na dotychczasowy brak struktury YY2. Następnie, trochę w stylu podręcznikowym (mało odnośników i przykładów) opisała białka inherentnie nieuporządkowane (IDP), mechanizmy transkrypcji u *Eucaryota*, modyfikacje

histonów, oddziaływania białek z kwasami nukleinowymi, rolę stresu oksydacyjnego, nawiązując do stanów patologicznych i regulacji kaskad sygnalizacyjnych, a wszystko to logicznie wprowadziło do tematyki mechanizmów aktywacji lub inaktywacji prowadzonej przez białka niezwykle YY1 i YY2.

2. Wiedza kandydata

Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki w dyscyplinie nauki biologiczne.

Autorka już we Wstępie, w oparciu o bogato cytowaną (124 pozycje) w większości z ostatnich kilku lat), zasygnalizowała bogatą wiedzę poprzez przedstawienie złożoności tematu badawczego wynikającego z relacji struktura-funkcja badanych białek wskazując m.in. na ponad 100 znanych partnerów interakcji YY1, które jest nieco lepiej poznane niż jego paralog tj. YY2. Cytowaną literaturą doktorantka sensownie uzasadnia podział sekwencji na odpowiednie fragmenty związane z N- i C-końcami białek (NTF i DBD). Również prezentacja wiedzy dotyczącej wpływu jonów cynku na YY1 bez wątplenia była inspiracją do badań zmian konformacyjnych YY2 indukowanych cynkiem, a w konsekwencji na regulację transkrypcji i przyczyny wielofunkcjonalności białek. Wreszcie opis roli obu białek w stanach chorobowych takich jak cukrzyca, nowotwory, dysfunkcje układu nerwowego podkreślają wagę prowadzonych badań i bogatą wiedzę doktorantki.

3. Samodzielność kandydata

Praca naukowa z reguły to praca zespołowa i to pokazała doktorantka, wymieniając słusznie osoby, które z nią współpracowały. Bez wątplenia przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pokazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez panią mgr Łakomską, chociaż dobrze byłoby żeby publikacja, w której będzie pierwszą autorką ukazała się w najbliższym czasie. Zwraca uwagę bogaty repertuar technik wykorzystywanych w pracy. Z jednej strony biofizycznych tj. spektropolarymetria, ITC, anizotropia fluorescencji; biologii molekularnej – klonowanie i ekspresja białek i biochemicznych – związanych z oczyszczaniem białek w tym sączenie molekularne, ograniczona proteoliza i wreszcie bioinformatycznych służących do m.in. oceny zawartości struktur drugorzędowych lub ich braku, wyznaczania stałych dysocjacji badanych kompleksów itp. Dobór cytowań, opis stosowanych technik, wykluczający konieczność sięgania do materiałów źródłowych, dobór eksperymentów, wnioski i dyskusja wyników potwierdzają samodzielność doktorantki.

4. Oryginalność rozprawy

W mojej ocenie rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych. Cel pracy, polegający na porównaniu własności molekularnych YY1 i YY2 został zrealizowany. W szczególności wpływ jonów cynku w

kontekście dimeryzacji białek i interakcji białko-DNA. Preparacje białek są dobrze udokumentowane. Np. dobrym pomysłem było oczyszczanie na kolumnie powinowactwa z elementem regulatorowym, a nie przez His-tag. Zwraca uwagę duża wydajność preparacji. Dobrze, że przedstawiono zbiorczy elektroforogram (Rys. 15) dokumentujący homogenność preparatów.

Dyskusja stanowi bardzo mocną część pracy. Przede wszystkim nie powtarza wyników co się często zdarza, nie jest streszczeniem, a wprowadza nowe analizy sekwencji, czy nawet wyników, które świetnie pasują do tej części pracy.

5. Pytania i/lub uwagi krytyczne, na które Recenzent oczekuje odpowiedzi kandydata w czasie obrony:

1. Czy nie uważa Pani, że analizy zawartości struktur II-rzędowych białek z dużą zawartością IDR są obarczone dużym błędem. Baza SP48, z której korzystano grupuje 5 białek zdenaturowanych i 48 natywnych wg dość starych danych, stąd wyniki przedstawione na Rys. 41-45 należy traktować bardzo jakościowo. Proszę o komentarz. Mam wątpliwości co do wniosku, że dimeryzacja wobec jonów cynku powoduje obniżenie zawartości struktur drugorzędowych NTF (na rysunkach brak zakresu błędu pomiarów). W ilu powtórzeniach prowadzono pomiary.
2. Proszę wyjaśnić jak się mają dane z Rys. 34 do wyników przedstawionych w Tabeli. 14 w kontekście modelu dwustanowego.
3. Jak można wyjaśnić, wynik pokazujący, że wobec DBD1 i DBD2 anizotropia fluorescencji wobec IGH bardziej rośnie niż dla YY1 i YY2 (rys. 49 i 50) ?
4. Czy można jakoś strukturalnie wyjaśnić dlaczego wg pomiarów anizotropii fluorescencji DBD wiążą dwie cząsteczki IGH, a białka pełnej długości – jedną
5. Proszę wyjaśnić dlaczego w równaniu 1 eliptyczność molowa wyrażana jest przez ilość wiązań peptydowych, a nie zgodnie z definicją przez stężenie białka.
6. Wobec nieznanej struktury krystalicznej YY2 czy próbowano ją modelować np. przy pomocy programu alfa-Fold. Zaawansowane wersje pozwalają również modelować kompleksy białko-ligand.
7. Czy próbowano zastanowić się nad przyczynami wyższej stałej dysocjacji kompleksu N-końca YY2 - Zn^{2+} w porównaniu do odpowiedniego kompleksu YY1 np. poprzez identyfikację miejsca wiązania jonów. Czy brano np. pod uwagę sekwencję ⁵²GGHNHPP⁵⁸ (YY2), która nieco przypomina miejsce wiązania jonów cynku i miedzi przez glikoproteiny HPRGs.

6. Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy (opcjonalnie):

Podczas czytania rozprawy zauważyłem bardzo niewielką liczbę potknięć językowych, które z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej:

Str. 8 : „*białko YY1 jest retopozonem białka YY2*” - to raczej skrót myślowy, powinno być *retropozonem*, co więcej określenie raczej odnosi się do fragmentów DNA;

Str. 9: „*helatowanie*” zamiast *chelatowanie*

Str. 9: „*słabsza stała oddziaływania*” – oddziaływanie może być słabsze

Str. 9: „*YY1 i YY2 mogą działać antagonistycznie lub przeciwstawnie do siebie*” - antagonistycznie i przeciwstawnie to synonimy

W kilku miejscach nadużywanie anglicyzmów: „*predykcja, suplementowanie*”; „*efekt na zawartość*” (str. 67), „*wysoki poziom konserwacji*”; „*zakonserwowanie ewolucyjne*”

Str. 22 – „*tężenie cynku*”

Str. 23 „*iniciatory*” zamiast *inicyjatory*

Str. 34 „*metoda Bradford*” (Marion Bradford to mężczyzna)

Str. 57 „*kwaśna domena*” – raczej *kwasowa*

Str. 68 „*oddziaływanie jonów Zn^{2+} do N-końcowego fragmentu*”

Str. 85 „*kompetencyjne wypieranie*” –kompetycyjne lub konkurencyjne

Inne uwagi:

W tabelach 15, 16, 17 i na rysunkach 36, 49, 50 brak jednostek

Rys. 37 – w podpisie pojawia się kolor niebieski, którego nie ma na rysunku

Wymienione powyżej, w gruncie rzeczy dość drobne, potknięcia nie wpływają na moją wysoką ocenę pracy. Wobec niezwykłego bogactwa funkcjonalności YY1 i YY2 można oczywiście zaproponować szereg kolejnych eksperymentów. Wydaje się, że w szczególności fragmenty inherentnie nieuporządkowane mogą decydować o roli obu białek, jako swoistych „*hubów*” czy „*moonlight proteins*”. Bardzo interesujące byłoby np. spojrzenie na zmiany strukturalne w obrębie kompleksu białko-DNA poprzez pomiary FRET zginania elementu regulatorowego z punktu widzenia regulacji procesu transkrypcji, pomiary miejsc interakcji z ligandami przy pomocy techniki wymiany deuter-wodór (HDX), zmiany kształtu białka czy stanu oligomerycznego w pomiarach ultrawierowania analitycznego czy wykorzystania tzw. latarni molekularnych do pomiaru stochiometrii i siły interakcji białko-DNA.

7. Ocena końcowa:

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Julii Łakomskiej** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **Julii Łakomskiej** do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

TAK/~~NIE(*)~~

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

TAK/~~NIE(*)~~

Uzasadnienie wniosku (w przypadku zaznaczenia odpowiedzi TAK)

Praca jest świetnie napisana, pokazuje profesjonalizm doktorantki w doborze, opisie i powadzeniu eksperymentów, zawiera niezwykle interesujący materiał naukowy. Jedyną wątpliwość mam wobec braku publikacji z pierwszeństwem doktorantki wśród autorów.

10 marzec 2025
data sporządzenia recenzji

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszczycki
podpis recenzenta



INFORMACJE:

1. Przygotowanie recenzji wg. niniejszego formularza jest opcjonalne i do decyzji recenzenta pozostaje wybór jej ostatecznej formy.
2. Niezależnie od formy sporządzenia recenzji, recenzent proszony jest o jasne wskazanie oceny spełnienia lub niespełnienia przez kandydatkę/kandydata wymogów określonych w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669) z późniejszymi zmianami (obowiązujący od 7.03.2024-30.09.2024 tekst ujednolicony - Dz. U. 2023 poz. 742).
3. Wniosek o wyróżnienie rozprawy (jeżeli zgłaszany) powinien być jasno sformułowany i uzasadniony.
4. Elektroniczną wersję recenzji należy przesłać na adres: nauki.biologiczne@uj.edu.pl
5. Równocześnie recenzent proszony jest o przesłanie podpisanego oryginału recenzji na adres:

Rada Dyscypliny Nauki biologiczne
Dziekanat Wydziału Biologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków

(*) niepotrzebne – skreślić.