

Dr hab. Magdalena Łuczak, prof. ICHB PAN

Poznań, 24.01.2022

Zakład Proteomiki Biomedycznej

E-mail: magdalul@ibch.poznan.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Konrada Husa zatytułowanej „Proteomiczna analiza jadu kobry plującej z gatunku *Naja ashei*”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Bioinformatyki Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Jaroslava Legáth oraz promotora pomocniczego dr Aleksandry Bocian.

Głównym celem pracy była analiza składu białkowego jadu afrykańskiej kobry plującej z gatunku *Naja ashei* oraz badania aktywności katalitycznych fosfolipaz A2 obecnych w jadzie. Aby osiągnąć zamierzony cel, Doktorant przeanalizował proteom uzyskanego jadu pod względem jakościowym oraz ilościowym z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii MALDI-ToF/ToF oraz podejścia typu „shotgun” z użyciem techniki LC-MS/MS. Badano jad surowy oraz podjęto próby rozfrakcjonowania białek jadu z wykorzystaniem ultrafiltracji na filtrach wirówkowych i dwóch niezależnych technik chromatograficznych w celu wzbogacenia informacji o białkowych składowych jadu, a także celem oczyszczenia frakcji zawierających fosfolipazy A2. W ostatniej części pracy analizowano aktywność enzymatyczną oczyszczonych chromatograficznie fosfolipaz oraz porównano ich potencjał katalityczny z fosfolipazami stosowanymi w przemyśle spożywczym.

Rozprawa ma formę monografii, jednakże wyniki zamieszczone w pracy zostały częściowo opublikowane w postaci trzech artykułów naukowych, w tym dwóch oryginalnych artykułów badawczych oraz recenzowanego komunikatu. Praca liczy 184 strony, zawiera dodatkowo materiały uzupełniające, w których znajdujemy szczegółowe informacje dotyczące zidentyfikowanych peptydów oraz białek, widma MS/MS oraz wyniki pomiarów aktywności enzymatycznej. Układ pracy jest typowy dla tego typu prac: rozprawa podzielona jest na pięć głównych części: przegląd literatury, cel pracy, materiały i metody, wyniki oraz dyskusja. Na końcu umieszczono również krótkie podsumowanie oraz wnioski, które ułatwiają zrozumienie osiągniętych dokonań. Praca napisana jest dość poprawnym językiem, aczkolwiek autor nie ustrzegł się błędów redakcyjnych oraz, w szczególności, interpunkcyjnych. Nie uważam jednak za konieczne ich wymienianie, gdyż nie wpływają one na merytoryczną ocenę pracy.

W przeglądzie literaturowym Doktorant zawarł informacje na temat systematyki węży, oraz ich charakterystyki, ze szczególnym uwzględnieniem węży z rodzaju *Naja*. Następnie autor skupił się na przedstawieniu obecnego stanu wiedzy na temat biochemicznego składu jadu oraz różnorodności białek występujących w jadzie. Otrzymujemy dokładne informacje o poszczególnych grupach białkowych oraz ich potencjalnych funkcjach, jednak Autor zaznacza, że proteom jadu kobry plującej *Naja ashei* nie został do tej pory poznany. W kolejnych rozdziałach

przedstawione zostały typowe techniki analityczne stosowane w badaniach jadów węży. Same metody zostały bardzo starannie opisane, jednak zwraca uwagę brak jednak konkretnych przykładów z piśmiennictwa naukowego sugerujących ich rzeczywiste wykorzystanie w badaniach jadów, na co wskazywałby tytuł rozdziału. Całość przeglądu literaturowego stanowi jednak dość wnikliwe wprowadzenie w tematykę badawczą, napisane jest przyjaznym i w pełni zrozumiałym językiem, może w niektórych fragmentach jest odrobinę zbyt rozwlekłe.

Cel pracy poprawnie i precyzyjnie przedstawia główne koncepcje pracy. Uważam, że jest on ważny poznawczo i jak najbardziej odpowiada badaniom prowadzonym podczas pracy doktorskiej. Należy tu podkreślić, że sformułowane zamierzenia i przede wszystkim obiekt badawczy, jakim jest jad węży stanowią poważne wyzwanie badawcze. Jad jest materiałem biologicznym o bardzo dużym zakresie dynamicznym stężeń jego składników. Występują w nim tzw. białka wysokokopijne, syntezowane i wydzielane do jadu w bardzo dużych stężeniach, które często maskują białka produkowane w stężeniach 100, a nawet 1000-krotnie niższych, co utrudnia ich separację i identyfikację. Ponadto białka węży nie posiadają 100% anotacji sekwencyjnych w bazach danych, co sprawia dodatkowe trudności analityczne. Z tego względu na uznanie zasługuje, że Doktorant zdecydował się podjąć tego niełatwego zadania.

Sekcja metodyczna jest również dość starannie przygotowana, wszystkie metody zostały dokładnie opisane, a skład poszczególnych buforów i odczynników czytelnie zebrany w załączniku. Na docenienie zasługuje również fakt, że część danych proteomicznych została dodatkowo zdeponowana w publicznym repozytorium danych proteomicznych PRIDE i jest dostępna dla społeczności naukowej. Prosiłabym jednak o wyjaśnienie paru kwestii. Dlaczego próbki surowego jadu wykorzystane do badań zostały pobrane tylko od dwóch dorosłych osobników? Domyślam się, że zebranie takiego materiału nie jest rzeczą łatwą, jednak wydaje mi się, że to odrobinę mało aby wnioskować o składnikach biochemicznych jadu w kontekście całego gatunku *Naja ashei*. Zaznaczono, że analizowana próbka jadu stanowiła mieszaninę próbek pobranej od samca i od samicy. Czy występują różnice w składzie i właściwościach jadu związane z płcią? Czy są dostępne dane literaturowe na ten temat? Myślę, że takie informacje byłyby interesujące. Chciałabym także zwrócić uwagę Autorowi, że na stronie 60 oraz 61 nie podano stężenia acetonitrylu w buforze do przemywania fragmentów żelu, („25 mM wodorowęglanu amonu w acetonitrylu”), które, jak się domyślam, wynosiło 50%.

Wyniki stanowią w recenzowanej pracy jej najobszerniejszą część (44 strony). Rezultaty przeprowadzonych analiz przedstawiono na 31 rysunkach oraz w formie 10 tabel. Część wyników została również umieszczona w licznych materiałach dodatkowych. Liczba wykonanych analiz jest imponująca. Na szczególną uwagę zwraca liczba różnych podejść optymalizacyjnych technik separacji na złożach jonowymiennych.

Pierwszą część wyników stanowi analiza proteomu jadu *Naja ashei* z użyciem techniki 2DE-MS/MS. Elektroforeza 2D jest skomplikowaną i czasochłonną techniką, nawet w przypadku prostych mieszanin, cechuje ją mnogość etapów, co podwyższa ryzyko popełnienia błędu, skutkującego uzyskaniem nieczytelnych map 2DE. Zaprezentowana w pracy mapa białkowa charakteryzuje się bardzo dobrą jakością, szczególnie biorąc pod uwagę problematyczny charakter analizowanych próbek. Ponadto Doktorant przeanalizował z użyciem spektrometrii mas łącznie ponad 200 próbek wyciętych z żelu. To bardzo dużo żmudnej pracy zasługującej to na uznanie. Doktorant pokazuje na przedstawionym żelu, że zdecydowana większość białek w jadzie wyróżnia się niską masą cząsteczkową

i wyraźnie zasadowym charakterem. Podkreśla również, że rozdzielczość zastosowanej techniki okazała się niewystarczająca, aby w satysfakcjonujący sposób odseparować od siebie najbardziej liczne białka.

Fakt ten jest niewątpliwy. Dlaczego jednak Autor, po otrzymaniu takiego wyniku, nie podjął próby separacji białek jadu z wykorzystaniem pasków o innym zakresie pH. Na przedstawionym żelu widać wyraźnie, że najbardziej liczne białka charakteryzują się punktem izoelektrycznym powyżej 6, a na rynku dostępne są paski o zakresie PH 6-9, 6-10, a nawet 6-12. Ponadto, skoro większość białek w jądzie charakteryzuje się masą cząsteczkową poniżej 20 kDa, co Autor bardzo ładnie pokazał w pracy, dlaczego nie podjęto próby separacji elektroforetycznej w bardziej skoncentrowanych żelach poliakrylamidowych np. 15 czy nawet 18%. Myślę, że tego typu eksperymenty poprawiłyby rozdzielczość uzyskanych map 2DE, ułatwiłyby pracę Doktorantowi przy wycinaniu plamek z żelu oraz znacznie zwiększyłyby liczbę identyfikacji białek jadu. A tak, bez tych zabiegów, powiodła się identyfikacja jedynie 19 unikalnych białek na 196 wyciętych plamek.

W kolejnym etapie wykonano bezżelową analizę jadu *Naja ashei* z wykorzystaniem separacji LC sprzężonej ze spektrometrią mas. Dzięki temu poszerzono katalog zidentyfikowanych białek jadu do 39, szczególnie w kontekście słabiej poznanych białek niskokopijnych, których nie udało się zidentyfikować metodą 2DE. Doceniam fakt, że Autor zdecydował się na identyfikację białek z wykorzystaniem dwóch różnych oprogramowań: MaxQuant (wykorzystujący algorytm Andromeda) oraz PeptideShaker (z zaimplementowanymi algorytmami X! Tandem i MS-GF+). Jest to bardzo istotne ponieważ algorytmy stosowane w programach do analizy widm MS/MS różnią się, co często skutkuje uzyskaniem nieco odmiennych wyników. Możliwość ich walidacji z użyciem innego algorytmu weryfikuje uzyskane dane i obniża liczbę fałszywie pozytywnych wyników. Proszę jednak o wyjaśnienie, dlaczego Autor zastosował nieco inne parametry identyfikacji białek w obu programach. Różnice te dotyczą właściwości trypsyny (w MQ Autor wybrał specyficzną, a w PS jako tnącą pół-specyficzną), zmiennych modyfikacji, a w szczególności tolerancji błęd pomiaru masy w trybie MS (10 ppm lub 20ppm) oraz MS/MS (20 ppm lub 0,02Da). W tym ostatnim przypadku zastosowano nawet odmienną jednostkę. Uważam, że mogło to w sposób istotny wpłynąć na otrzymane wyniki i, przynajmniej częściowo, wyjaśniać dlaczego porównanie liczby białek zidentyfikowanych przy użyciu różnych podejść badawczych, co widzimy m.in. na rysunku I 1, dostarczyło odmiennych danych.

Aby zwiększyć liczbę identyfikacji białek, w kolejnym etapie Doktorant próbował rozseparować składniki jadu z użyciem filtrów wirówkowych. Dobrze oceniam wybór tej strategii, jako prostą i szybką metodę frakcjonowania, jednak proszę o wytłumaczenie dlaczego zdecydowano się na wybór filtrów o punkcie odcięcia 30kDa? Zgodnie z tym co napisano w przeglądzie literatury większość białek występujących w jądzie zdradnicowatych stanowią białka PLA2s o masie 13-15kDa oraz 3FTxs w zakresie 7-12kDa. Również na zaprezentowanym w recenzowanej pracy żelu, dobrze widać, że przeważają tu jednak białka niskocząsteczkowe. Czy podjęto próby zastosowania filtrów o innym punkcie odcięcia? Doktorant przeanalizował zarówno frakcję górną jak i dolną uzyskaną po frakcjonowaniu i zaobserwował dużą zawartość białek niskocząsteczkowych w górnej frakcji. To typowy problem obserwowany przy próbie frakcjonowania mieszaniny różniącej się znacznie zakresem dynamicznym stężeń jej poszczególnych składników. W takich warunkach, białka o niskiej masie mają tendencję do niespecyficznego oddziaływania z białkami o wysokich masach, co mogło być przyczyną obniżenia skuteczności separacji. Widać jednak, że Doktorant był świadomy tej możliwości o czym świadczy fragment zaprezentowany w Dyskusji na stronie 132. Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być dodanie niewielkiej ilości (15-18%) acetonitrylu do rozbicia agregatów białkowych w

rozdzielanej mieszaninie. Jednak taki zabieg wyklucza późniejsze zastosowanie otrzymanych frakcji do analiz aktywności enzymatycznych. Inną potencjalną przyczyną otrzymania ww. opisanych wyników, może być adhezja separowanych białek z membraną stosowanego filtra, co również Autor przedyskutował w części zawierającej dyskusję otrzymanych wyników. W takiej sytuacji, Doktorant mógł zastosować zabieg polegający na zmniejszeniu prędkości wirowania w celu zminimalizowania interakcji z membraną.

W kolejnym etapie Doktorant zastosował chromatografię wykluczania oraz chromatografię jonowymienną do separacji składników białkowych jadu. Rozdział ten stanowi doskonałe opracowanie i wynik dużej pracy włożonej przez Doktoranta, potrafiącego wykorzystywać własną wiedzę i szeroki wachlarz narzędzi do rozwiązywania postawionych przed nim problemów. Autor dużo pracy poświęcił procesowi optymalizacji parametrów układu chromatograficznego w celu uzyskania zadowalającej rozdzielczości procesu. Przeanalizowano wpływ szeregu czynników, takich jak: rodzaj buforu, typ i objętość/długość kolumny, program elucji, objętość próbki czy temperatura. W efekcie zidentyfikowano sześć nowych rodzin białkowych, niewykrytych poprzednimi metodami. Uzyskano również frakcje o bardzo wysokiej czystości białek PLA2, które następnie użyto do badań aktywności enzymatycznych.

Testy enzymatyczne wykorzystano do porównania aktywności uzyskanych frakcji z aktywnością enzymów stosowanych komercyjnie, badania wpływu PH na szybkość reakcji i określenia parametrów kinetycznych badanych enzymów, a uzyskane wyniki przeanalizowano statystycznie. Doktorant wykazał wyraźnie wyższą aktywność enzymatyczną oczyszczonych frakcji fosfolipaz A2 uzyskanych z jadu *N. ashei* w porównaniu do dwóch enzymów stosowanych komercyjnie (Lecitase@IOL i Lecitase@Ultra). Wyznaczono również m.in. szybkość maksymalną reakcji dla poszczególnych frakcji jadu, jednak nie mamy w tym przypadku żadnego odniesienia do enzymów komercyjnych, trudno więc ocenić uzyskane wyniki.

Licząca 20 stron Dyskusja jest dobrze napisana i świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta. Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane w świetle dostępnych danych literaturowych. Doktorant interpretuje uzyskane wyniki i zwraca uwagę zarówno na silne jak i na słabsze strony pracy oraz ewentualne niejasności związane z uzyskanymi danymi. Podkreśla również wysoki potencjał katalityczny fosfolipaz z jadu i w związku z tym na ich możliwe wykorzystanie w procesach przemysłowych i biotechnologicznych, jako alternatywę dla obecnie stosowanych katalizatorów. Na zakończenie rozprawy sformułowano podsumowanie oraz 7 wniosków, które ułatwiają zrozumienie pracy i pozwalają na przypomnienie najważniejszych osiągnięć.

Podsumowując, chciałabym podkreślić zróżnicowaną metodykę badawczą zastosowaną przez Doktoranta i staranność wykonania prac eksperymentalnych. Jak wspominałam wcześniej, obiekt badawczy, wybrany do pracy nie należy do najłatwiejszych. Świadczy o tym choćby brak w literaturze dostępnych opracowań naukowych na temat składu jadu *Naja ashei*. Wyniki przedstawione w rozprawie zostały częściowo opublikowane w trzech pracach. Chciałabym jednak również zaznaczyć, że Doktorant jest także współautorem 14 innych artykułów, z czego 9 dotyczy tematyki węży, a także autorem 15 doniesień konferencyjnych. Baza Pubmed pokazuje, że na dzień powstania niniejszej recenzji mgr inż. Konrad Hus jest współautorem 8 artykułów naukowych w czasopiśmie z tzw. listy filadelfijskiej, a jego indeks Hirsha wynosi 6, co z pewnością jest ponadprzeciętne jak na ten etap kariery naukowej. Co więcej, Doktorant był wykonawcą w projekcie naukowym B+R oraz jest kierownikiem projektu NCN Preludium.

Moje uwagi zawarte w recenzji nie umniejszają wysokiej oceny przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Doktorant postawił przed sobą ambitne cele badawcze i je zrealizował. Wykazał się wiedzą teoretyczną oraz praktyczną z zakresu prowadzonych przez siebie prac. Uzyskane w pracy wyniki są interesujące i w znaczącym stopniu poszerzają naszą wiedzę na temat jadu węży *Naja ashei* oraz zwracają uwagę na ich potencjalne zastosowanie. Z pełnym, przekonaniem i w świetle powyższych danych stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja zawiera istotne elementy oryginalności i nowości naukowej, spełnia zwyczajowe oraz ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim sformułowane w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza o dopuszczenie mgr. inż. Konrada Husa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Magdalena Łuczak, prof. IChB PAN

**DOCUMENT
CREATED
WITH**



**PDF
COMBINER**

PDF Combiner is a free application that you can use to combine multiple PDF documents into one.

Three simple steps are needed to merge several PDF documents. First, we must add files to the program. This can be done using the Add files button or by dragging files to the list via the Drag and Drop mechanism. Then you need to adjust the order of files if list order is not suitable. The last step is joining files. To do this, click button Combine PDFs.

Main features:

- secure PDF merging - everything is done on your computer and documents are not sent anywhere
- simplicity - you need to follow three steps to merge documents
- possibility to rearrange document - change the order of merged documents and page selection
- reliability application is not modifying a content of merged documents.

Visit the homepage to download the application,

www.jankowskimichal.pl/pdf-combiner

To remove this page from your document please donate a project.