

*(Strona pierwsza dokumentu)*

Prof. dr hab. Zofia Gdaniec

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

ul. Z. Noskowskiego 12/14

61-714 Poznań

Poznań, 7 listopada 2016 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Saurabha Saxena

zatytułowanej

**„Nowe eksperymenty NMR w badaniu kwasów nukleinowych i białek samoistnie nieustrukturyzowanych (IDP)”**

Głównym problemem przy określaniu struktury białek i kwasów nukleinowych na podstawie danych uzyskanych w wyniku analizy NMR jest niejednoznaczne przypisanie widm, co jest kwestią skomplikowaną ze względu na silne nakładanie się sygnałów. Jednym z głównych celów badawczych prof. Wiktora Koźmińskiego i jego zespołu na Wydziale Chemii, w Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego, jest rozwój nowych metod uzyskiwania wielowymiarowych spektrów NMR w celu złagodzenia tego problemu. Projektowanie nowych sekwencji impulsów w celu szybszego lub dokładniejszego określenia parametrów spektralnych NMR oraz metod szybkiego uzyskiwania widm wielowymiarowych może istotnie przyspieszyć i ułatwić przypisywanie przesunięć chemicznych, nawet w szczególnie trudnych przypadkach, takich jak białka nieustrukturyzowane (IDP).

Rozprawa doktorska Pana Saurabha Saxena została przygotowana pod kierunkiem prof. Koźmińskiego. Dwoma głównymi zagadnieniami tej pracy są wykorzystanie wysokowymiarowej spektroskopii NMR z zastosowaniem nierównomiernego próbkowania (NUS) do analizy wartości przesunięć chemicznych w nieustrukturyzowanych białkach oraz opracowanie nowych wysokowymiarowych eksperymentów do badania kwasów nukleinowych.

Rozprawa doktorska Pana Saxena nie ma typowej struktury. Zaczyna się 4,5 stronicowym streszczeniem (w języku angielskim i polskim), po którym następuje pięć rozdziałów oraz wykaz 80 odnośników literaturowych. Trzy z tych rozdziałów (2, 3 i 4) zawierają 10 prac, których współautorem jest pan Saxena, opublikowanych w bardzo dobrych, recenzowanych czasopismach. Zasadniczo oczekiwałam, że w rozprawie przedstawiającej cykl publikacji zamieszczony zostanie wykaz tych prac. Jednakże, nigdzie w niniejszej dysertacji takiej listy nie znalazłam. Na moją prośbę dostarczone zostały dokumenty, na podstawie których można było ocenić wkład pracy pana Saxena w przygotowanie prac.

*(Strona druga dokumentu)*

Pierwszy rozdział (4,5 strony) zatytułowany "Biomolekularny NMR" wskazuje problemy z wyznaczaniem struktury biomolekuł za pomocą spektroskopii NMR. Drugi rozdział (9 stron) nosi tytuł "Wielowymiarowe NMR" i pokrótce przedstawia ideę niejednorodnego próbkowania i jego



zastosowania w eksperymentach wysokowymiarowego (3-5 D) NMR poświęconych przypisywaniu sygnałów w łańcuchu głównym i bocznym w nieustrukturyzowanych białkach. Na końcu tego rozdziału załączone są kopie sześciu publikacji. Tylko jeden z tych artykułów jest wspomniany w tekście. Niestety, brak jest komentarza, który powiązałby tekst w rozdziale 2 z załączonymi publikacjami.

Pierwszy artykuł z serii to doskonała praca przeglądowa na temat „Zastosowania wielowymiarowych eksperymentów w biomolekularnym NMR” opublikowana w 2015 roku w *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* Przegląd ten obejmuje wszystkie tematy, o których krótko wspomniano w rozdziale 2 niniejszej rozprawy. Zgodnie z oświadczeniem pana Saxena, kilka podrozdziałów niniejszego artykułu, w tym: „Szybkie metody NMR”, „Ukierunkowana akwizycja”, Hiperwymiarowy NMR” i „Przypisywanie przesunięć chemicznych w kwasach nukleinowych” zostało napisanych przez niego. Pozostałych sześć publikacji jest poświęconych zastosowaniu opracowanych w laboratorium zaawansowanych metod wielowymiarowej spektroskopii NMR w badaniach białek nieustrukturyzowanych (IDP). Artykuł opublikowany w 2015 roku w *Angew. Chem. Int. Ed.* przedstawia nowatorski, krzyżowo skorelowany eksperyment 4D NMR dotyczący badania struktury łańcucha głównego w nieustrukturyzowanych białkach. Druga z publikacji ukazała się w *Protein Sci.* w roku 2013 i jest ona poświęcona badaniom nad zależną od protonowania zmiennością konformacyjną nieustrukturyzowanych białek. Ostatnie cztery artykuły zostały opublikowane w *Biomol. NMR Assign.* w roku 2013, 2014 i 2015 i są poświęcone przypisywaniu przesunięć chemicznych w czterech nieustrukturyzowanych białkach: w ludzkim białku BASP1, ludzkiej osteopontynie, domenie MAP1B wiążącej mikrotubule i domenie bHLHZip w v-Myc. Zespół prof. Koźmińskiego opracował szereg metod wielowymiarowego NMR stosowanych do badania tych wymagających cząsteczek. Aby możliwe było sprawdzenie skuteczności wspomnianych nowych metod oraz nowych strategii przypisywania przesunięć chemicznych, w pierwszej kolejności konieczne było wykonanie żmudnej pracy i przeanalizowanie złożonego widma. Zgodnie z załączonym oświadczeniem pana Saxena i pozostałych współautorów, jego udział w powstawaniu tych artykułów polegał na przypisywaniu sygnałów. Po przeczytaniu niniejszego rozdziału rozprawy doktorskiej, miałam wrażenie, że pan Saxena nie docenia swojego wysiłku włożonego w przypisywanie sygnałów w tych bardzo wymagających układach. Rozdział ten nie zawiera żadnej dyskusji dotyczącej zalet i wad nowych eksperymentów ani strategii przypisywania przesunięć wykorzystywanych do analizy widm NMR nieustrukturyzowanych białek.

W kolejnym 3 rozdziale (4 strony) została opisana w skrócie rola symulacji efektów sekwencji impulsów wielowymiarowych w optymalizacji skomplikowanych eksperymentów NMR.

*(Strona trzecia dokumentu)*

Pod koniec rozdziału znajduje się informacja, że takie podejście zostało zastosowane do zaprojektowania nowych eksperymentów  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -edited 4D NOESY alifatyczno-aromatycznych bez elementów diagonalnych z wykorzystaniem niejednorodnego próbkowania. I rzeczywiście, załączony artykuł (*J. Biol. NMR*, 2013) pokazuje przydatność tej metody na przykładzie zmutowanego białka ludzkiego S100A1 (E32Q).

Końcowa część rozprawy doktorskiej jest związana z problemami spektroskopii NMR w badaniach RNA. Z mojego punktu widzenia, rozdział 4 (9 stron) jest najbardziej interesującą, ważną i



**Tłumaczenie uwierzytelnione dokumentu z języka angielskiego**

Nr w repertorium: 271/2/2016

14 listopada 2016 roku

Str. 4 z 4

„metoda ta nie działa dobrze, gdy rośnie długość RNA”; moje pytanie dotyczy więc tego, jak wiele cząstek RNA i jakie ich rodzaje zostały przebadane?

Inne komentarze

• Moim zdaniem, tytuł rozprawy doktorskiej "Nowe eksperymenty NMR w badaniu kwasów nukleinowych i nieustrukturalizowanych białek" jest niefortunny, ponieważ tylko w dwóch z dziesięciu załączonych artykułów autor przyczynił się do zaprojektowania nowych eksperymentów NMR.

• Lista odnośników literaturowych, z edytorskiego punktu widzenia, jest słabo przygotowana, gdyż nie ma jednoznacznego formatu ich przedstawienia. Dodatkowo, w odnośniku 67 brak jest podanego tomu i numerów stron. Podano "S.żerko" zamiast "S. Żerko " jako autora odnośnika [70]. Należy pamiętać, że oprogramowanie wykorzystywane do automatycznego tworzenia listy odnośników nie musi być zawsze idealne.

Pomimo pewnej ogólnej krytyki, wspomniana powyżej rozprawa doktorska pana Saxena porusza bardzo ciekawe i ważne aspekty biomolekularnej spektroskopii NMR. Wyniki przedstawione w pracy otwierają nowe obiecujące kierunki w badaniu RNA metodą spektroskopii NMR. Przygotowanie niniejszej pracy wymagało, by pan Saxena zdobył niezbędną wiedzę teoretyczną oraz wszelkie praktyczne umiejętności potrzebne do zaproponowania tak zaawansowanych eksperymentów. Na podstawie opinii wydanej powyżej, stwierdzam, że rozprawa doktorska przedstawiona przez pana Saurabha Saxena spełnia wszystkie niezbędne wymogi stawiane pracom doktorskim i wnioskuję o nadanie jej autorowi tytułu Doktora.

*(Odręczny podpis: Zofia Gdaniec)*

*Niniejszym potwierdzam zgodność powyższego tłumaczenia z przedłożonym mi w dniu 14 listopada 2016 roku oryginałem dokumentu w języku angielskim.*

*Tłumacz przysięgły języka angielskiego*

*Mgr Maciej Kowasz*

*Nr uprawnień: TP/2604/05*

*Dnia: 14 listopada 2016 roku*

