

Lublin, 2 stycznia 2018 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki  
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Rafała Hołubowicza pt. „Domena C1q otoliny-1 człowieka i danio pręgowanego – relacje struktura-funkcja”**

Białka należą do klasy cząsteczek chemicznych, których funkcje biologiczne, w tym te związane bezpośrednio ze stabilizacją strukturalną, wiążą się nierozzerwalnie z istnieniem życia na naszej planecie. Ta klasa biomolekuł jest niezwykle różnorodna, tak pod względem wielkości jak i funkcji fizjologicznych. Okazuje się, że białka pełnią również istotną rolę w formowaniu oraz stabilizacji elementów strukturalnych odpowiedzialnych za zmysł równowagi kręgowców, w szczególności zaangażowanych w odczuwanie przyspieszenia liniowego otolitów rybich oraz otokoniów kręgowców lądowych. Rozprawa doktorska mgr. Rafała Hołubowicza związana jest z tą interesującą tematyką a dotyczy bezpośrednio badania domeny C1q białka otoliny-1 człowieka oraz ryby modelowej danio pręgowanego, podejrzewanej o pełnienie kluczowej roli w procesie formowania otokoniów oraz otolitów na drodze procesu biomineralizacji węgla wapnia. Wobec faktu, iż wiedza w tym zakresie jest daleka od kompletnej, tematykę rozprawy doktorskiej postrzegam nie tylko jako aktualną oraz interesującą ale również bardzo ważną.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki  
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1  
20-031 Lublin  
tel. (81) 537 62 50  
fax (81) 537 61 91  
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



Praca doktorska mgr. Rafała Hołubowicza przygotowana została w renomowanym Zakładzie Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem Profesora Piotra Dobryszkyckiego. Rozprawa zredagowana została na 138 stronach standardowego maszynopisu, w języku polskim, według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Rozprawę otwiera rozdział zatytułowany Wstęp, zredagowany w formie zestawienia podrozdziałów zawierających, między innymi, przegląd aktualnej wiedzy dotyczącej biominerałów kręgowców oraz udziału białek globularnych i inherentnie nieuporządkowanych w biomineralizacji. Treści zawarte w tej części rozprawy stanowią, moim zdaniem, doskonale zredagowane oraz ważne dla całości prezentacji wprowadzenie w tematykę badań prowadzonych w ramach projektu doktorskiego. Cele rozprawy sformułowane zostały w ramach krótkiego rozdziału drugiego. Rozdział trzeci zawiera opis użytych materiałów oraz zastosowanych metod, zarówno eksperymentalnych jak i w zakresie podejścia bioinformatycznego. Kompletność dostarczonych informacji (w większości w formie tabelarycznej), ich elegancja oraz, przede wszystkim, precyzja czynią te opisy wyjątkowymi, jak na tego typu opracowania, umożliwiając powtórzenie analogicznych eksperymentów w innych laboratoriach. Przy tej okazji zwrócić chciałbym również uwagę na znaczną liczbę zaawansowanych i komplementarnych technik badawczych, zaangażowanych w badania w ramach projektu doktorskiego, między innymi: techniki elektroforetyczne i western blotting, analityczna filtracja żelowa, ultrawierowanie analityczne, dichroizm kołowy, spektrofotometria absorpcyjna i fluorescencyjna, spektrometria mas (MALDI-TOF) oraz małokątowe rozpraszanie promieniowania X (SAXS). Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej bardzo wysokim poziomie jest rozdział 4. „Wyniki”, prezentujący rezultaty przeprowadzonych badań. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą wykonywane zadania badawcze, zarówno eksperymentalne oraz bioinformatyczne. Uwagę zwraca ogromny blok wyników, odzwierciedlający proces twórczy prowadzący do opracowania wydajnego systemu eksperyjnego domeny C1q otoliny-1 oraz pomysłowe eksperymenty na drodze których prowadzono badania samoorganizacji białka w struktury supramolekularne i wpływu białka na biomineralizację. Uzyskane wyniki poddane zostały dyskusji w ramach rozdziału piątego, po którym zamieszczono dodatkowo rozdział szósty, perspektywy dalszych badań. Rozdział siódmy, zatytułowany „Literatura” zawiera zestawienie cytowanego piśmiennictwa, po którym



zaprezentowane zostały dodatkowo suplementy dotyczące dorobku naukowego doktoranta oraz dodatkowych wyników ultrawiwrowania analitycznego.

Na podkreślenie zasługuje klarowność języka rozprawy oraz jej wyjątkowo wysoki poziom edytorski, w tym również w odniesieniu do jakości prezentowanych grafik. Mógłbym zaproponować Autorowi jedynie dwie drobne korekty formalne:

1. Chociaż stosunkowo łatwo jest rozwiązać tę zagadkę, podpis pod rysunkiem 37. (str. 85) nie zawiera opisu struktur białkowych oznaczonych jednoliterowymi skrótami na osi odciętych (panele c oraz d).
2. Opis osi rzędnych na rys. 45 (str. 104) dotyczy zjawiska fizycznego „Fluorescencja” nie zaś wielkości fizycznej, jak można by oczekiwać „Intensywność fluorescencji”.

Tak wieloaspektowe oraz obszerne opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską mgr. Rafała Hołubowicza, dostarcza wielu ważnych i nowych informacji pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Bardzo interesujące wyniki dotyczą, moim zdaniem, faktu preferencyjnego formowania struktur trimerycznych badanego białka, w szczególności wobec faktu ich stabilizacji przez jony wapnia. Ciekaw jestem, czy jest to jedynie skutek oddziaływania z wiązаныmi jonami czy może taka forma przestrzenna białka pełni specyficzną funkcję fizjologiczną, bardziej efektywnie niż w przypadku struktur monomerycznych?
2. Precyzyjne badania stabilności termicznej białka przeprowadzone zostały w oparciu o analizy wiązania się znacznika fluorescencyjnego SYPRO ze obszarami hydrofobowymi (rys. 44, str. 102). Jak pokazuje porównanie z analizami przeprowadzonymi w oparciu o zastosowanie techniki CD, uzyskujemy w ten sposób wiarygodne informacje. Jednocześnie, oczekiwać należy, iż wydajność kwantowa fluorescencji zastosowanych fluoroforów, a więc i poziom fluorescencji, również zależec będzie od temperatury, czyniąc analizy bardziej złożone z metodologicznego punktu widzenia. Ciekaw jestem, czy zdaniem doktoranta zastosowanie podejścia opierającego się, na przykład, na



analizie czasów życia fluorescencji znaczników stanowić może bardziej bezpośrednie podejście w analizach termostabilności?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Rafał Hołubowicz przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Znaczna część wyników tych badań ogłoszona została już równolegle w cyklu pięciu artykułów, opublikowanych w opiniotwórczych czasopismach specjalistycznych, o międzynarodowym zasięgu. Ponadto, w dorobku publikacyjnym doktoranta znajduje się bardzo wartościowy przeglądowy artykuł monograficzny związany bezpośrednio z tematyką rozprawy. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Rafała Hołubowicza spełnia w pełni warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, w moim odczuciu, walory samej rozprawy, w szczególności zaś bardzo ambitne wyzwanie badawcze oraz znaczna liczba uzyskanych rezultatów sprawiają, iż rozprawę doktorską postrzegam jako wyróżniającą. Gratulując tak wartościowych rezultatów uprzejmie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr. Rafała Hołubowicza do dalszych etapów postępowania doktorskiego.