

Kraków, 14 czerwca 2021 r.



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Porębskiej zatytułowanej:

„Charakterystyka własności molekularnych i biomineralizacyjnych  
funkcjonalnych fragmentów ludzkiego białka DMP1”

Biomineralizacja jest procesem bardzo rozpowszechnionym w przyrodzie. Dzięki niemu organizmy żywe zyskują nie tylko mocny i trwały materiał budulcowy, ale także bardzo ważne elementy systemów czucia. Należą do nich struktury otokonii występujące w błędniku błoniastym u ssaków, które dzięki przyciąganiu ziemskiemu i bezwładności, umożliwiając określenie położenia i przyspieszenia, służą do utrzymania równowagi ciała.

Proces powstawania tych biominerałów jest złożony i słabo poznany. Wiadomo, że oprócz soli wapnia, struktury te zawierają także szereg białek, które pełnią funkcje nie tylko budulcowe, ale także prawdopodobnie kontrolują wieloetapowy proces ich powstawania.

Pani magister inżynier Aleksandra Porębska podjęła się określenia roli białka DMP1 w procesie biomineralizacji prowadzącym do powstania otokonii. Prace laboratoryjne zostały poprzedzone dogłębną analizą literaturową i bioinformatyczną, której owocem było wskazanie fragmentów białka pełniących funkcje biologiczne (określonych w pracy jako 44K i 56K) i wysunięcie hipotezy, że należą one do grona białek inherentnie (inaczej samoistnie) nieuporządkowanych (IDP, ang. Intrinsically Disordered Proteins). Postulat ten oparty został o szereg typowych narzędzi bioinformatycznych opierających swe przewidywania na sekwencjach aminokwasowych, w szczególności na składzie i rozmieszczeniu w strukturze pierwszorzędowej reszt hydrofobowych i tych obdarzonych ładunkiem elektrycznym.

Wydział Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biochemii Fizycznej

dr hab.

Andrzej Górecki

ul. Gronostajowa 7  
30-387 Kraków  
tel. 12 664 61 51

e-mail: andrzej.gorecki@uj.edu.pl

Ze względu na szereg oczywistych trudności w pozyskiwaniu materiału pochodzenia naturalnego, doktorantka zdecydowała się na podjęcie jedynie słusznej drogi produkcji białek rekombinowanych jako białek modelowych do przeprowadzenia eksperymentów biofizycznych. W tym celu przygotowała wektory ekspresyjne kodujące funkcjonalne fragmenty białek, zaopatrzone w nieodtrawialne metki histydynowe na ich końcach aminowych. Przeprowadziła proces fermentacji bakteryjnej w warunkach standardowych i zoptymalizowała dwuetapowy proces oczyszczania chromatograficznego tychże białek. W wyniku przeprowadzonej preparatyki, doktorantka uzyskała homogenny preparat o czystości doskonale nadającej się do przeprowadzenia wszystkich zaplanowanych badań.

Wykorzystując specyficzne barwienie żeli elektroforetycznych, potwierdzono spodziewany kwaśny charakter uzyskanych białek rekombinowanych, a ich anomalna szybkość wędrówki elektroforetycznej potwierdza zauważony przez doktorantkę skład aminokwasowy odbiegający od składu typowego dla białek globularnych, a będący typowym dla IDP. Metodą spektrometrii mas potwierdzono spodziewaną masę cząsteczkową fragmentu 44K i zidentyfikowano białko o nieco większej masie niż fragment 56K. Uznano, że występująca różnica wynikać może z metylacji pierwszej metioniny. Szkoda, że nie potwierdzono poprawności sekwencji wyprodukowanego białka w inny sposób, na przykład wykonując eksperyment MS/MS, lub sekwencjonowania peptydowego. W mojej opinii, występująca niezgodność może także wynikać z większej niż podano niepewności pomiarowej (+/- 6 Da) lub wystąpienia spontanicznej mutacji punktowej w sekwencji wektorów ekspresyjnych, która zaszła tuż przed produkcją białka.

Parametry hydrodynamiczne białek określone przez doktorantkę przy pomocy sączenia molekularnego (SEC) i analitycznego ultrawiwiania (AUC) pozwoliły jednoznacznie stwierdzić, że preparat jest monodispersyjny i nie posiada tendencji do oligomeryzacji, a badane białka posiadają rozluźnioną strukturę przestrzenną typową dla IDP, klasyfikując je jako białka U-podobne.

Analiza widm dichroizmu kołowego (CD) wykonana w zakresie absorpcji wiązań peptydowych wskazała na niską zawartość typowych struktur drugorzędowych w warunkach standardowych. Zwiększenie temperatury, w której prowadzone były eksperymenty, lub obecność TFE wpływała na wzrost zawartości tych struktur, co jest typowe dla IDP i tym samym potwierdza wcześniejszą klasyfikację.

Wykorzystane wcześniej trzy techniki analityczne (CD, SEC i AUC) pozwoliły doktorantce zbadać wpływ jonów wapnia na strukturę badanych białek. Wykazano, że obecność tych jonów w badanym zakresie stężeń (1 – 100 mM) nie zaburza w zauważalny sposób dystrybucji struktur

drugorzędowych, prowadzi jednak do istotnego kolapsu ich struktury przestrzennej. Eksperymenty AUC przeprowadzone dla wyższych stężeń wykazały tendencję białka 56K do dimeryzacji. Te bardzo interesujące rezultaty, jak zauważa doktorantka, świadczyć mogą o istotnej roli tego białka we wczesnych etapach tworzenia biominerałów. Niestety czytelnik nie ma możliwości weryfikacji tych obserwacji w oparciu o technikę sączenia molekularnego, gdyż nie zamieszczono chromatogramów będących wynikiem przeprowadzonych eksperymentów, choć w pracy pojawia się rycina opracowana na ich podstawie (rys 25 D). Technika ta jednak, będąc nierównowagową, ma mniejsze znaczenie niż AUC.

Po zbadaniu zachowania białek w skali cząsteczkowej, doktorantka przystąpiła do określenia ich funkcji w tworzeniu makroskopowych struktur biominerałów. W tym celu przeprowadziła testy mineralizacji węglanu wapnia w obecności badanych białek oraz w odpowiednio dobranych warunkach referencyjnych.

Wykorzystując skaningową mikroskopię elektronową (SEM) wykazano, że obecność białek 44K i/lub 56K w bardzo istotny sposób wpływa na powstające kryształy, czyniąc je znacznie mniejszymi i nadając im owalny kształt typowy dla waterytu. Występowanie tej odmiany polimorficznej potwierdzono z wykorzystaniem techniki spektroskopii ramanowskiej.

Wisienką na torcie tej rozprawy doktorskiej jest badanie lokalizacji przestrzennej wyznakowanych fluorescencyjnie białek 44K i 56K w strukturze powstałych kryształów. Zastosowanie mikroskopii dwufotonowej pozwoliło na zidentyfikowanie obu białek w środkowej części kryształu, co świadczyć może o nukleacyjnej roli badanych białek.

Warto podkreślić, że zastosowane techniki są bardzo różnorodne i nowoczesne. Znakomicie odpowiadają najwyższym standardom prowadzenia badań naukowych, a ich dobór jest precyzyjny, dzięki czemu pozwala wiarygodnie odpowiedzieć na stawiane pytania.

Oprócz wymienionych eksperymentów, które doktorantka lapidarnie, ale skrupulatnie opisała w pracy, a następnie je dyskutuje, znajdują się także opisy dalszych przeprowadzonych badań, które pojawiają się w rozdziale „Perspektywy Dalszych Badań”. Jest to dosyć nietypowy, ale interesujący i w moim przekonaniu trafny sposób przedstawienia badań wstępnych, które są naturalną konsekwencją uzyskanych rezultatów. W tym przypadku doktorantka koncentruje się na potencjalnym znaczeniu fosforylacji, która może dosyć istotnie wpłynąć na funkcjonowanie badanych białek. Trafnie wskazane są także inne kierunki potencjalnego rozwoju badań, w tym przypadku nie są one jednak osadzone w przeprowadzonych eksperymentach wstępnych.

Powyżej opisane badania przeprowadzone zostały w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod promotorstwem prof. dr hab. Inż. Piotra Dobryszczyckiego i w szeregu innych ośrodków badawczych. Ten ostatni fakt bardzo dobrze świadczy o dobrych zdolnościach doktorantki do prowadzenia badań we współpracy międzypespółowej.

Opis powyższych badań przedstawiony został w rozprawie doktorskiej pani mgr inż. Aleksandry Porębskiej przedstawionej mi do oceny. Rozprawa ta napisana jest w języku polskim i ma formę maszynopisu liczącą 121 stron, o strukturze typowej dla prac doktorskich z obszaru nauk eksperymentalnych. Tworzą ją następujące rozdziały: Spis Skróarów, Streszczenie, Summary (Streszczenie w języku angielskim), Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Perspektywy dalszych Badań, Dorobek Naukowy, Dodatek, Spis Tabel i Rysunków, Literatura. Wielkość poszczególnych rozdziałów i poziom ich szczegółowości jest zazwyczaj bardzo dobry.

Dwudziestorzystronicowy wstęp bardzo dobrze wprowadza czytelnika w większość kluczowych aspektów poruszanych w pracy, poczynając od biomineralizacji, poprzez białka inherentnie nieuporządkowane, białka zaangażowane w proces mineralizacji, opis biominerałów węglanu wapnia, ze szczególnym uwzględnieniem otolitów i otokonii, na opisie białka DMP1 kończąc. W tym ostatnim zagadnieniu doktorantka wskazuje na istotną i dosyć dobrze poznaną rolę funkcjonalnych fragmentów tego białka w procesie mineralizacji zębów i kości. Dodatkowo, białko to zaliczane do otokonin, odgrywa prawdopodobnie kluczową rolę w mineralizacji węglanu wapnia. Zbadanie tego procesu w metodyczny sposób w układzie *in vitro* doktorantka stawia sobie jako cel pracy.

Cel ten skonkretyzowany zostaje w kolejnym rozdziale, gdzie doktorantka ujawnia, że będzie zajmowała się ludzką formą tego białka i skoncentruje się na przeprowadzeniu analizy własności potencjalnych funkcjonalnych fragmentów 44K i 56K. Podaje także cele szczegółowe, jakimi są otrzymanie rekombinowanych białek i scharakteryzowanie ich własności fizykochemicznych oraz określenie ich wpływu na powstanie kryształów węglanu wapnia.

W dalszej kolejności, na dwudziestu czterech stronach znajdujemy skrupulatnie prowadzony opis zastosowanych materiałów i wyczerpujący opis metod badawczych zastosowanych do przeprowadzonych poszczególnych eksperymentów.

Kolejną częścią pracy jest trzydziestojednostronicowy, bardzo przejrzysty zilustrowany i klarowny opis eksperymentów, które skrótowo przedstawiłem w pierwszej części recenzji. Każdy

z metodycznie prowadzonych eksperymentów, jest poprawnie interpretowany i wstępnie dyskutowany w kontekście danych literaturowych. Rozdział ten czyta się z łatwością i przyjemnością. Czasami można jednak odczuwać pewien niedosyt. Na przykład autorka nie zdecydowała się przedstawić – choćby skrótowych informacji na temat optymalizacji procesu oczyszczania białek, a bardzo intrygującą kwestię odwracalności zmian strukturalnych skonkludowano jedynie stwierdzeniem: „Zaobserwowane zmiany związane ze wzrostem temperatury były nieodwracalne”. W rozdziale tym nie znajdziemy także wspomnianych wcześniej chromatogramów uzyskanych dla badanych białek w obecności chlorku wapnia o różnych stężeniach.

Dyskusja uzyskanych rezultatów, która rozpoczyna się już w rozdziale „Wyniki”, jest rozwijana na czterech dalszych stronach rozdziału „Dyskusja”. Jest ona wielopoziomowa, interesująca i ma często charakter konkluzyjny. W znakomitej większości jest ona przekonująca, choć czasami mogłaby być nieco bardziej wnikliwa. Przykładowo, w pracy zastosowano nieodtrawialne metki histydynowe wykorzystane w pierwszym etapie procedury chromatograficznej. Jakkolwiek – zgodnie z tym co pojawia się w pracy – metki takie najczęściej nie mają istotnego znaczenia w funkcjonowaniu białek z którymi są skoniugowane, to nie jest to twierdzenie zawsze słuszne. W szczególności podczas badania białka wiążącego jon wapnia można się spodziewać dyskusji na temat możliwego powinowactwa tego jonu do metki, która skutecznie wiąże jony innych metali takich jak: niklu, cynku, miedzi i kobaltu. Tymczasem w dyskusji pojawia się jedynie stwierdzenie „... dodatkowe reszty aminokwasowe miały minimalny wpływ na strukturę oraz aktywność oczyszczonego białka”. Podobnie, modyfikacja chemiczna białek prowadząca do ich wyznakowania fluorescencyjnego, może mieć pewne znaczenie funkcjonalne. Szkoda, że nie zostało to przedyskutowane. Niestety, nie przekonano także czytelnika do tego, iż zaproponowany podział białka DMP1 na fragmenty 44K i 56K jest odpowiedni. Jak wynika ze wstępu (str. 37), podział ten powstał na podstawie informacji literaturowych, wskazujących miejsca proteolizy szczurzego białka DMP1. Pokazanie uliniwienia sekwencji szczurzej i ludzkiej białka DMP1, byłoby dobrym punktem początkowym do tej dyskusji. Wskazane aspekty, które powodują pewne poczucie niedosytu w lekturze dyskusji rozprawy doktorskiej, nie zmieniają bardzo pozytywnego odbioru rozdziału i całości pracy.

Pełniąc funkcję recenzenta jestem zmuszony wskazać pewne aspekty, które uważam, za niepoprawne, niefortunne lub niezrozumiałe w recenzowanej pracy. Ograniczę się do tych niewymienionych powyżej:

Str. 22. Sformułowanie: „Pomimo wspomnianej wcześniej dużej różnorodności konformacyjnej IDPs, ich formy pośrednie zachowują niektóre elementy natywnej struktury drugorzędowej...” jest dla mnie niezrozumiałe. Można odnieść wrażenie, że autorka twierdzi, że forma natywna białka obligatoryjnie posiada typowe struktury drugorzędowe (helisę alfa, czy kartkę beta), tymczasem powszechnie uważa się, że każdy ze stanów konformacyjnych „kwartetu białkowego” przedstawionego na Rysunku 1 (str 21) może być formą natywną. Dodatkowo, co autorka ma na myśli pisząc o formach pośrednich? W ten sposób określa się najczęściej pewną konformację, którą białko przyjmuje na ścieżce jakiejś reakcji. Z kontekstu można wywnioskować, że chodzi tutaj o jedną wielu konformacji, którą może przyjąć białko inherentnie nieuporządkowane i której to fragment łańcucha polipeptydowego przyjąć może typową strukturę drugorzędową występującą powszechnie w białkach globularnych.

Str. 37. Zamiast Ser2<sup>17</sup> powinno być raczej Ser<sup>217</sup>.

Str. 43. Określenie nazwy faga jest inne w tekście (T4) i w podpisie pod rysunkiem (T5).

Str. 52. Zamiast „wirowano przy 182 rpm” powinno być raczej „wytrząsano przy 182 rpm”.

Str. 54. Dlaczego przed zastosowaniem chromatografii jonowymiennej wymieniano bufor? Czy rozcieńczenie preparatu buforem z mniejszą zawartością soli nie byłoby wystarczającym rozwiązaniem?

Str. 65. Zgodnie z tekstem, rysunek 10 B powinien wskazywać na występowanie większości struktury białka w postaci kłęбка statystycznego, tymczasem opis pod rysunkiem wskazuje na dominowanie struktury beta.

Str. 66. Sformułowanie występujące w podpisie pod rysunkiem „reszty o strukturze nieuporządkowanej” jest niefortunne w odniesieniu do konkretnej reszty aminokwasowej białka. Może lepiej użyć sformułowania „reszty nieposiadające stabilnej struktury przestrzennej”?

Str. 74. Sformułowanie „... IDP, które nie tworzą sztywnych struktur 3D...” użyte w kontekście anomalnej migracji IDP w technice SDS-PAGE jest niefortunne, gdyż wskazują na znaczenie tego aspektu w eksperymencie elektroforetycznym, tymczasem warunki denaturujące występujące podczas elektroforezy niszczą stabilne struktury przestrzenne białek, niezależnie czy są natywnie uporządkowane czy nie.

Str. 95. Czy zamiast „TALON (jony Ca<sup>2+</sup>)” nie powinno być „TALON (jony Co<sup>2+</sup>)”?

Str. 104. Sformułowanie „aminokwasy egzogenne” w odniesieniu do reszt aminokwasowych tworzących metkę histydynową jest niepoprawne. Za egzogenne, uważa się te aminokwasy, które nie są syntetyzowane w organizmie.

Wymienione powyżej zastrzeżenia nie wpływają w żaden sposób, na bardzo pozytywny odbiór przeprowadzonych eksperymentów i sposobu ich opisu w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Z przekonaniem uważam, że opisuje ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Dlatego też stwierdzam, że recenzowana praca spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej pani mgr. inż. Aleksandry Porębskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Górecki