

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

MGR. INŻ. ALEKSANDRY PORĘBSKIEJ

PT. „CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI MOLEKULARNYCH I BIOMINERALIZACYJNYCH FRAGMENTÓW LUDZKIEGO BIAŁKA DMP1

Praca doktorska mgr. inż. Aleksandry Porębskiej doskonale wpisuje się w główny nurt badań prowadzonych od kilku lat w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Koncentrują się one na roli białek inherentnie nieuporządkowanych w procesach biomineralizacyjnych prowadzących do powstawania otolitów umiejscowionych w uchu wewnętrznym ryb. Biorąc pod uwagę złożoność procesów biomineralizacyjnych w ogólności, badania te mają dużo szerszy aspekt i mogą w znaczący sposób rozszerzyć naszą wiedzę dotyczącą takich procesów zachodzących u ludzi. Stąd nie dziwi, że kolejne badania z tego obszaru zostały poszerzone o procesy biomineralizacyjne z udziałem białek ludzkich, a konkretnie białka macierzy zębiny 1 (DMP1). Wybór tego właśnie białka, jako przedmiotu badań, został po pierwsze podyktowany faktem, że jego obecność została stwierdzona w otokoniach, które zlokalizowane w uchu wewnętrznym człowieka, są w ogromnej mierze odpowiednikiem otolitów u ryb. Po drugie, wiedza o roli biologicznej tego białka dotyczyła procesów mineralizacyjnych z udziałem fosforanu wapnia zachodzących w tkance kostnej i pochodziła wyłącznie z badań nad białkiem DMP1 szczura. Po trzecie, otokonia w odróżnieniu od kości i zębów, zbudowane są z węglanu wapnia, co sugerowało, że białko DMP1 może brać również udział w procesach biomineralizacyjnych z jego udziałem. Biorąc to wszystko pod uwagę, uważam, że podjęcie przez Doktorantkę badań mających na celu charakterystykę strukturalną i funkcjonalną białka DMP1 było jak najbardziej trafne i w pełni uzasadnione. Tak zasadniczy cel pracy, jak i jej cele szczegółowe zostały sformułowane jasno i zwięźle. Nie budzą moich zastrzeżeń.

Przedłożona mi do recenzji dysertacja ma w zasadzie układ typowy dla tego typu opracowań, do czego jeszcze wrócę pod jej koniec. Generalnie, napisana jest jasno i przystępnie, na co składa się zarówno dobra polszczyzna, jak i bogaty materiał ilustracyjny. Obszerny i z rozmachem napisany wstęp doskonale wprowadza czytelników, nawet tych, których wiedza dotycząca procesów biomineralizacji jest niewielka, w problematykę naukową, której dotyczy praca doktorska. Dowiadujemy się z niego, czym jest i na czym polega biomineralizacja i jakie kluczowe etapy obejmuje, a także, co to są i z czego są zbudowane biomateriały wchodzące w skład bakterii, grzybów, roślin oraz tkanek i narządów zwierząt bezkręgowych i kręgowych. Wiele miejsca we wstępie poświęcono budowie i właściwościom białek inherentnie nieuporządkowanym, które odgrywają bardzo istotną rolę w procesach

biomineralizacyjnych, szczególnie dużo uwagi poświęcając białku macierzy zębiny 1 (DMP1), które było przedmiotem badań Doktorantki. W związku z tym rozdziałem mam dla Doktorantki pewne propozycje, myślę warte zastanowienia, gdyby miał być on wykorzystany przy pisaniu np. artykułu przeglądowego. Rozdział „1.4 Węglan wapnia” można by z powodzeniem włączyć do rozdziału „1.1 Biomineralizacja”, jako że zawarte w nim treści są częściowo powtórzeniem informacji z innych części wstępu. Na przykład (str. 29, ostatni wiersz od góry), informacja dotycząca odmian krystalicznych węglanu wapnia została już podana na stronie 19. Podobnie, wiadomości dotyczące budowy muszli mięczaków częściowo pokrywają się z rozdziałem „1.3 Tkanki zmineralizowane i białka zaangażowane w mineralizację”. Również rozdział „1.5 Otokonia i otolity”, w mojej opinii, mógłby być włączony do rozdziału „1.3 Tkanki zmineralizowane i białka zaangażowane w mineralizację”, w którym należałoby skrócić opisy dotyczące kości, zębów, a szczególnie muszli mięczaków (łącznie z usunięciem rycin 3, 4 i 5), których przecież nie dotyczy bezpośrednio tematyka dysertacji. Natomiast, czego mi brakuje, to ryciny ze schematami genów, mRNA i białek DMP1 szczura i człowieka, a także jego aktywnych białkowych fragmentów.

Rozdział „Materiały i Metody” jest dowodem na to, że Doktorantka w czasie realizowania doświadczalnej części dysertacji miała możliwość zapoznania się z imponującym spektrum metod i technik badawczych i świadczy o jej bardzo dobrym przygotowaniu do pracy eksperymentalnej. I tak, opanowanie technik rekombinowanego DNA w połączeniu z metodami biochemicznymi wykorzystywanymi podczas oczyszczania białek pozwoliło jej na zrealizowanie pierwszego ze szczegółowych celów pracy, polegającego na uzyskaniu wysokooczyszczonych preparatów rekombinowanych fragmentów ludzkiego białka DMP1. Kolejną grupę technik wykorzystywanych przez doktorantkę stanowiły metody fizykochemiczne, takie jak spektroskopia mas, dichroizm kołowy, ultrawiorowanie analityczne, które z kolei pozwoliły na zrealizowanie drugiego z celów szczegółowych i wykazanie, że fragmenty 44K i 57K posiadają właściwości białek inherentnie nieuporządkowanych. Wreszcie, trzecia grupa technik zastosowana w pracy doktorskiej, takich jak test aktywności biomineralizacyjnej *in vitro*, mikroskopia Ramana, mikroskopia fluorescencyjna jedno- i dwufotonowa oraz mikroskopia świetlna pozwoliła na wykazanie, że rekombinowane fragmenty białka DMP1 są funkcjonalnie aktywne. I tu, w kontekście tego co napisałem, nasuwa mi się pytanie, czy przy podawaniu w rozdziale „Cel pracy” celów szczegółowych nie należało wyodrębnić jak celu osobnego, właśnie badań dotyczących właściwości biologicznych fragmentów 44K i 57K? Pisząc o metodach stosowanych przez Doktorantkę należałoby jeszcze podkreślić jej umiejętności w zakresie posługiwania się narzędziami bioinformatycznymi, czego wyrazem jest stosowanie licznych programów komputerowych. Rozdział ten pokazuje również, że Doktorantka posiadała cenną zdolność nawiązywania współprac naukowych w celu realizacji swoich planów badawczych. Chciałbym jeszcze

dodać, że w tym trudnym do napisania rozdziale nie znalazłem wielu potknięć językowych i wyrażeń żargonowych, co często niestety spotyka się w pracach doktorskich. Wystarczy powiedzieć, że jedyna uwaga, która nasunęła mi się podczas czytania tego rozdziału, dotyczy opisu wirowań, czy in. metod, gdzie zamiast angielskiego skrót rpm, użyłbym polskiego obr./min. I jeszcze jedno pytanie dotyczące tego rozdziału. Dlaczego przy zagęszczaniu roztworów fragmentów 44K (ok. 26 kDa) i 56K (ok. 34 kDa) za pomocą mikrokoncentratora stosowano tak różne punkty odcięcia, odpowiednio, 3 kDa i 10 kDa?

Przechodząc do omawiania uzyskanych przez Doktorantkę wyników, trzeba od razu powiedzieć, że pozwoliły one na pełną realizację zarówno celu podstawowego pracy, jak i wszystkich jego celów szczegółowych, a eksperymenty, na podstawie których je uzyskano zostały prawidłowo zaplanowane, z wykorzystaniem odpowiednich metod. Merytorycznie nie budzą one zastrzeżeń. Swoje badania nad ludzkim białkiem DMP1, a właściwie nad jego dwoma fragmentami nazwanymi 44K i 56K, rozpoczęła Doktorantka od analiz *in silico*. Wykorzystując narzędzia bioinformatyczne w postaci szeregu programów komputerowych wykazała na wstępie, że zgodnie z założeniami zarówno fragment 44K, jak i fragment 56K posiadają wszystkie cechy strukturalne, które pozwalają na zaliczenie ich do białek inherentnie nieuporządkowanych. W pierwszym etapie badań składających się na część eksperymentalną dysertacji, w celu uzyskania odpowiednich ilości fragmentów 44K i 56K pozwalających na ich charakterystykę strukturalną otrzymywano je w postaci białek rekombinowanych. Oba białka, do których produkcji z powodzeniem wykorzystywano bakterie *E. coli* szczepu BL21(DE3)pLysS, oczyszczano z lizatu bakteryjnego za pomocą chromatografii powinowactwa, wykorzystując obecność metki histydylowej na ich N-końcach. Ponieważ preparaty białek uzyskane w ten sposób były mocno zanieczyszczone innymi białkami, Doktorantka zmuszona była do poszukiwania dodatkowych sposobów ich dalszego oczyszczania, które zakończyły się sukcesem w postaci uzyskania homogennych preparatów białek poprzez chromatografię jonowymienną na kolumnie MonoQ.

Drugi etap badań eksperymentalnych obejmował charakterystykę fragmentów 44K i 56K pod kątem ich właściwości fizyko-chemicznych. Te badania rozpoczęto od określenia masy cząsteczkowej za pomocą spektrometrii mas typu ESI-MS, które okazały się zgodne z wyznaczonymi wartościami teoretycznymi. W tym miejscu, pozostając przy określaniu masy cząsteczkowej, prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie, skąd wzięły się wartości mas cząsteczkowych zamieszczone w tabeli 6, do których brak odniesień w tekście. Wyznaczone wartości promienia Stokesa i współczynnika tarcia, składające się na właściwości hydrodynamiczne cząsteczek, wykazały, że oba fragmenty białek mają wydłużony kształt i wysoki stopień swobody konformacyjnej, potwierdzając w ten sposób analizę *in silico*, że fragmenty 44K i 56K są typowymi białkami IDP. Te analizy wykazały również, że oba fragmenty występują w roztworze w postaci monomerów. Kolejnych dowodów eksperymentalnych wskazujących, że białka 44K i 56K należą do białek inherentnie nieuporządkowanych dostarczyły pomiary dichroizmu

kołowego. Analiza widm CD wykazała, że zarówno fragment 44K jak i 56K są w większości pozbawione regularnych struktur II-rzędowych, a zawartość struktur nieuporządkowanych wynosi, odpowiednio, ok. 71% i 79%. Pomiary widm CD prowadzone w różnych temperaturach pokazały, że podobnie jak w przypadku innych białek IDP, wzrost temperatury powodował wzrost zawartości regularnych struktur II-rzędowych w obu fragmentach. Podobne zjawisko obserwowano również, kiedy rejestrację widm CD prowadzono w obecności 2,2,2-trifluoroetanolu. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę, że ze względu na kolejność prezentowanych rycin oraz jasność wyводу, byłoby korzystniej najpierw omówić wpływy temperatury, a dopiero później TFE, co zresztą sugeruje tytuł rozdziału.

Wstępem do trzeciego etapu badań eksperymentalnych mających na celu przybliżenie roli biologicznej fragmentów 44K i 56K, a konkretnie ich roli w biomineralizacji z udziałem węglanu wapnia, była analiza wpływu jonów wapnia na ich strukturę. Wykorzystując dichroizm kołowy wykazano, że jony wapnia nie wpływają w znaczący sposób na zawartość regularnych struktur II-rzędowych w obu białkowych fragmentach (przy okazji uwaga, dlaczego nie pokazano odpowiednich widm dla białka 56K?) Natomiast ich obecność zmniejsza promień hydrodynamiczny i współczynnik tarcia tych cząsteczek, co wskazuje, że jony wapnia indukują zmiany konformacyjne, czyniąc ich strukturę bardziej zwartą. Również wyższe stężenia jonów wapnia wydają się sprzyjać tworzeniu dimerów i tetramerów białka 56K. Ponieważ powyższe badania pokazały, że fragmenty białka DMP1 są zdolne do wiązania jonów wapnia, w kolejnym eksperymencie sprawdzono, czy fragmenty 44K i 56K biorą bezpośredni udział w tworzeniu kryształów węglanu wapnia. Wykorzystując test biomineralizacji *in vitro* wykazano, że obecność, tak fragmentu 44K jak i 56K w sposób swoisty wpływała zarówno na zmianę kształtu (morfologię) tworzących się kryształów węglanu wapnia, jak i ich wielkość i liczbę. Jak rozumiem z opisu na stronie 90, w obecności tych białek zawsze powstawał kalcyt. Natomiast nie bardzo rozumiem, co oznacza, że „Podobne wyniki otrzymano dla kryształów kontrolnych.” oraz co to są „sferyczne formy kryształów” w kontekście omawianych wyników? Wreszcie, ostatni z przeprowadzonych eksperymentów, w którym pokazano, że fragmenty 44K i 56K lokalizują się przede wszystkim w środkowej części powstających kryształów, wskazuje, że oba białka biorą bezpośredni udział w procesie nukleacji kryształu. Podsumowując, uzyskane wyniki pokazały, że oba fragmenty białka DMP1 posiadają aktywność biologiczną polegającą na ich udziale w zarodkowaniu i tworzeniu kryształów węglanu wapnia, wpływając na ich kształt, rozmiary i ilości.

Kolejny rozdział „Dyskusja” dowodzi, podobnie zresztą jak pozostałe rozdziały pracy doktorskiej, bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę problematyki, której dotyczy dysertacja. Trzeba jednak zaznaczyć, że niektóre jej fragmenty są bardziej streszczeniem uzyskanych wyników, niż rzeczywistą dyskusją. Przykładem może być akapit drugi, w którym głównie opisano oczyszczanie białkowych fragmentów 44K i 56K.

Nowością dla mnie, w tego typu opracowaniach jakimi są prace doktorskie, jest odrębny rozdział zatytułowany „Perspektywy dalszych badań”, gdzie obok rozważań na temat kolejnych badań związanych z tematem dysertacji, zamieszczono również wyniki konkretnych eksperymentów dotyczących fosforylacji fragmentów 44K i 56K. Zadaję sobie pytanie, które chciałbym również zadać Doktorantce. Czy nie byłoby lepiej włączyć te wyniki do rozdziału o tej samej nazwie, a Dyskusję wzbogacić o rozważania dotyczące „perspektyw”. Natomiast, czego mi brakuje, to osobnego rozdziału z najważniejszymi wnioskami podsumowującymi uzyskane wyniki badań, co w przypadku prac doktorskich jest powszechną praktyką.

Na zakończenie proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do poniższych uwag i zapytań, które nasunęły mi się podczas czytania jej pracy doktorskiej. Brak mi klarownego wyjaśnienia nazw fragmentów 44K i 56K? Domyślam się, że zostały one najprawdopodobniej tak nazwane przez analogię z fragmentami 37K i 57K, opisanymi wcześniej dla białka DMP1 szczura. Biorąc pod uwagę fakt, że oba fragmenty, 44K i 56K, białka DMP1 mogą być glikozylowane, o czym pisze Doktorantka w Dyskusji (str. 97), a uzyskane rekombinowane białka bakteryjne nie posiadają tej modyfikacji potranslacyjnej, czy nie mogło to rzutować na uzyskane wyniki? Chciałbym również usłyszeć coś więcej na temat fragmentu proteoglikanowego-PG, o którym wspomniano we Wstępie (str. 37). Gdzie jest on zlokalizowany i jak się ma do fragmentów 44K i 56K?

Jak już napisałem praca została generalnie napisana jasno, dobrą polszczyzną, co jednak nie oznacza, że nie pojawiają się w niej pewne nieścisłości, wyrażenia żargonowe i zapożyczenia z języka angielskiego, które zaznaczyłem na marginesach egzemplarza recenzowanej pracy. Dla przykładu parę bardziej rzucających się w oczy błędów redakcyjnych.

W tabeli 1, gdzie zamieszczono przykłady biominerałów, podano również miejsca ich lokalizacji, czyniąc to momentami mało precyzyjnie. Dla przykładu, co oznacza, że miejscem lokalizacji tlenków żelaza jest głowa, a fosforanu wapnia żołądek? Niezręczną rzeczą jest również podanie, że tlenki żelaza z jednej strony występują w ferrytynie, z drugiej w „głowie”.

Str. 36: mózg, wątroba, trzustka, nerki, ślinianki to nie są tkanki tylko narządy!

Str. 44: i 70: nie można w tych przypadkach mówić o amplifikacji genów, tylko o „amplifikacji cDNA”.

Str. 83: „refoldacja białek” i str. 86: „jony wapnia indukują kompaktowanie się fragmentów DMP1” to nieudane przykłady zapożyczeń z języka angielskiego.

Str. 95: sformułowanie: „stąd głównym celem pracy było zbadanie właściwości fizykochemicznych funkcjonalnych fragmentów ludzkiego DMP1 44K i 56K w kontekście biomineralizacji otokoniów –

kryształów węgla wapnia.” wskazuje, że otokonia są utworzone wyłącznie z kryształów wapnia, co jest oczywistą nieprawdą.

Zamieszczone uwagi, głównie redakcyjne, i pytania skierowane do Doktorantki nie umniejszają mojej wysokiej oceny końcowej recenzowanej pracy. Przedstawiona mi do recenzji dysertacja, tak ze względu na prezentowaną problematykę, uzyskane wyniki, jak i warsztat badawczy **w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki**. Stąd wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Porębskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 10 czerwca, 2021 r.


Prof. dr hab. Maciej Ugorski