



Dariusz Rakus

Wrocław, 13.08.2015

OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr **Mirostawy Różyckiej**

pt. „**Analiza właściwości molekularnych Starmaker-like jako**

białka inherentnie nieuporządkowanego”

Przez szereg lat uważano, że niemal wszystkie białka posiadają dosyć dobrze zdefiniowaną drugo- i trzeciorzędową strukturę przestrzenną. Obecnie wiemy, że szereg, o ile nie większość białek organizmów żywych, zawiera duże fragmenty nieustrukturyzowane. Istotny wkład w poznanie takich białek, zarówno ich właściwości fizyko-chemicznych, jak i biologicznych miał Zakład Biochemii Wydziału Chemicznego PWr, kierowany przez Pana profesora Andrzeja Ożyhara, a wcześniej przez prof. Mariana Kochmana, którzy rozwinęli szereg technik fizyko-chemicznych przydatnych do analizy białek nieustrukturyzowanych.

Zakład Biochemii Wydziału Chemicznego PWr. szczególnym zainteresowaniem darzy białka nieuporządkowane biorące udział w procesie biomineralizacji.

Nieorganiczne minerały, takie jak węglan wapnia czy też fosforan wapnia stanowią znaczny procent masy ciała wszystkich kręgowców oraz wielu bezkręgowców, tworząc ich szkielet wewnętrzny lub zewnętrzny oraz pełniąc funkcje w narządach. Od niedawna wiadomo, że specyficzne właściwości kryształów wapniowych w organizmach żywych wynikają z udziału specyficznych białek w procesie krystalizacji. W poznaniu tego zjawiska istotny udział mają pracownicy i doktoranci Zakładu Biochemii, którzy to dogłębnie zbadali właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne białka Starmaker (Stm), białka uczestniczącego w tworzeniu otolitów u *Danio rerio*.

Celem badań Doktorantki było sprawdzenie, czy możliwym jest ażeby identyczną funkcję

biologiczną u innego gatunku ryb (u *Oryzias latipes*) pełniło białko Starmaker-like (Stm-I), białko którego podobieństwo struktury pierwszorzędowej do Stm jest niewielkie. Interesującym aspektem tych badań było także sprawdzenie, czy właściwości molekularne białka Stm-I są zbliżone do białka Stm, a więc w szczególności zbadanie, czy białko Stm-I jest białkiem inherentnie nieuporządkowanym oraz, czy warunki środowiskowe, a szczególnie stężenie jonów dwuwartościowych i pH wpływają na kształt i wielkość cząsteczki Stm-1.

Doktorantka z powodzeniem wywiązała się z powierzonego jej zadania, pokazując w serii dobrze zaplanowanych eksperymentów, że białko Stm-1:

- a) jest inherentnie nieuporządkowane,
- b) jego właściwości molekularne zależą od stężenia jonów dwu- jak i jednowartościowych, od pH oraz obecności rozpuszczalników,
- c) że jest nieodzowne do powstawania kryształów węglanu wapnia u *Oryzias latipes*.

Efektom pracy Pani mgr Mirosławy Różyckiej jest publikacja w renomowanym czasopiśmie PLoS One (Intrinsically disordered and pliable Starmaker-like protein from medaka (*Oryzias latipes*) controls the formation of calcium carbonate crystals. 92014) 9(12):e114308.).

W swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała szereg nowoczesnych narzędzi badawczych, ale na szczególne podkreślenie, wg recenzenta, zasługuje rozdział poświęcony elektroforezie denaturującej w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) oraz barwienie białkowych produktów rozdziału. SDS-PAGE jest chyba najpopularniejszą i najpowszechniej stosowaną metodą we współczesnej biologii. Metoda ta jest bowiem pozornie bardzo prosta, a wyniki wydają się być niepodważalne: mamy jakieś białko, albo nie (czyli widzimy, albo nie jakiś prążek); mamy jakąś dosyć dobrze określoną masę molekularną badanego białka, albo nasze białko jest sproteolizowane lub zmodyfikowane. Doświadczenia doktorantki pokazują, że może być zupełnie inaczej: możemy mieć sporo odpowiedniego białka i go nie widzieć po wybarwieniu najpopularniejszą metodą barwienia; możemy mieć też pozornie drastycznie inną masę molekularną badanego białka.

Doktorantka bardzo jasno dyskutuje owe problemy, przypominając zagadnienia z programu studiów biochemicznych, które to powinni znać wszyscy badacze układów biologicznych, ale chyba bardzo często zapominają o nich w swojej pracy badawczej.

Pewien niedosyt recenzenta budzi natomiast bardzo skromna dyskusja, zarówno dotycząca struktury białka, jak i właściwości biologicznych, wpływu jonów sodowych na wielkość promienia hydrodynamicznego białka Stm-I. Otóż, jony te (w stężeniu 150 mM, a więc uważanym za fizjologiczne) powodują znaczne zmniejszenie promienia w stosunku do jego wielkości pod ich nieobecność. Co jest jednak chyba bardziej istotne, w obecności 150 mM roztworu Na^+ wpływ jonów wapniowych na promień hydrodynamiczny Stm-I jest niezbyt duży. Czy ma to znaczenie dla powstawania kryształów węglanu wapnia w obecności Stm-1?

Trochę zaskakującym dla recenzenta była również szczątkowa dyskusja obserwacji zmian fluorescencji tryptofanu w obecności jonów sodowych. Na podstawie przedstawionych widm emisyjnych widać wyraźnie, że Na^+ nie wpływają na kształt widma emisyjnego, natomiast wydaje się, że znacznie zwiększają intensywność fluorescencji.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską Pani Mirosławy Różyckiej jako bardzo dobrą. Badania przedstawione w rozprawie wnoszą nowe istotne informacje dotyczące właściwości białek inherentnie nieuporządkowanych. Badania te pokazują również, że niemal identyczna funkcja biologiczna u gatunków zbliżonych ewolucyjnie może być pełniona przez białko kodowane przez niemal całkowicie odmienną sekwencję nukleotydową.

Na tej podstawie stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Mirosławy Różyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 13.08.2015

KIEROWNIK
Zakładu Fizjologii Molekularnej Zseleraj

prof. dr hab. Dariusz Rakon