

Prof. UAM dr hab. Maciej Kozak
Zakład Fizyki Makromolekularnej UAM
ul. Umultowska 85
61-614 Poznań
mkozak@amu.edu.pl

Poznań, 10 października 2015 r

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Mirosławy Różyckiej
“Analiza właściwości molekularnych Starmaker-like jako białka inherentnie
nieuporządkowanego”

Proces biomineralizacji jest jednym z kluczowych procesów umożliwiającym szerokiej grupie organizmów wytwarzanie sztywnych struktur niezbędnych do formowania elementów strukturalnych oraz towarzyszy licznym procesom metabolicznym. Z uwagi na dobrze poznaną strukturę przestrzenną materiałów nieorganicznych, tworzących wspomniane elementy strukturalne, wydawałoby się z pozoru, że procesy biomineralizacji powinny być stosunkowo łatwe do opisanie. Okazuje się jednak, że mechanizmy tworzenia określonych form polimorficznych minerałów przy udziale organizmów żywych wymagają znacznie pogłębionej analizy. Jedną z ważnych do określenia funkcji jest rola, jaką pełnią białka swoicie (inherentnie) nieuporządkowane w tych procesach.

W pracy doktorskiej, którą otrzymałem do oceny, zatytułowanej „*Analiza właściwości molekularnych Starmaker-like jako białka inherentnie nieuporządkowanego*” mgr Mirosława Różycka podjęła trudny a zarazem bardzo ciekawy problem określenia roli jakie w procesach biomineralizacji pełni tytułowe białko Starmaker-like. Białko to występuje u słodkowodnej ryby ryzanki japońskiej (*Oryzias latipes*) i wykazuje zbliżone parametry strukturalne oraz wzór ekspresyjny w stosunku do białka Starmaker (Stm) kontrolującego biomineralizację otolitów u danio przęgowanego (*Danio rerio*). Przypuszczać więc należy, że białko to powinno cechować się zbliżonymi właściwościami funkcjonalnymi i strukturalnymi.

Rozprawa doktorska przygotowana została w Zakładzie Biochemii, na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem uznanego specjalisty w zakresie badań funkcji białek inherentnie nieuporządkowanych Prof. dr. hab. Andrzeja Ożyhara. W tym miejscu chciałbym pogratulować promotorowi ciekawej tematyki wybranej przez doktorantkę.

Praca zredagowana została w postaci monografii o objętości 124 stron, opatrzonej 11 tabelami i 33 rysunkami. Warto podkreślić, że bardzo pozytywne wrażenie robi staranna szata graficzna rozprawy. Rozprawa napisana jest w układzie

standardowym i podzielona na 7 rozdziałów, opatrzonych na początku streszczeniem i wykazem stosowanych w pracy skrótów. Dodatkowo do pracy dołączony jest załącznik zawierający sekwencję białka i dokumentację fotograficzną analizy morfologii kryształów węglanu wapnia podczas procesu biomineralizacji.

Wstęp teoretyczny przedstawiony w rozdziale trzecim (24 strony) obejmuje opis procesu biomineralizacji, Warto podkreślić, że część ta została bardzo dobrze zredagowana, treściwie i bez zbędnych powtórzeń. Oprócz procesu biomineralizacji, Autorka poruszyła w nim wszystkie istotne aspekty strukturalne powiązane z białkami nieuporządkowanymi, w tym także ich rolę w genezie procesów neurodegeneracyjnych.

W rozdziale czwartym Autorka wskazała cel swoich badań, którym jest analiza właściwości molekularnych białka Stm-I w celu określenia czy białko to jest inherentnie nieuporządkowane. Jako cele etapowe założyła sobie stworzenie systemu do bakteryjnej ekspresji Stm-I oraz oczyszczenie tak wyprodukowanego białka. Następnie zaplanowała przeprowadzenie charakterystyki właściwości fizykochemicznych białka Stm-I oraz jego potencjalnych zdolności do kontroli procesu krystalizacji węglanu wapnia.

Rozdział piąty (22 strony) poświęcony został precyzyjnym opisom wszystkich procedur badawczych, zastosowanym metodom pomiarowym oraz podany został szczegółowy wykaz odczynników. Na uwagę zasługuje skrupulatność Autorki, która nie tylko dokładnie opisała warsztat badawczy, ale wyszczególniła nawet numery katalogowe stosowanych odczynników.

Przechodząc do najciekawszej z punktu widzenia recenzenta części, w rozdziale szóstym, liczącym 28 stron, omówione zostały uzyskane przez Autorkę wyniki. Rozdział ten podzielony został na kilka logicznych części ilustrujących postęp badań począwszy od ekspresji i oczyszczania białka, poprzez jego charakterystykę bioinformatyczną i biofizyczną, skończywszy na badaniach aktywności biomineralizacyjnej Stm-I.

W rozdziale siódmym (13 stron) Autorka przeprowadziła krytyczną dyskusję uzyskanych wyników zachowując podobną konwencję tematyczną jak w rozdziale szóstym. Porównuje uzyskane wyniki z danymi dotyczącymi innych białek zaangażowanych w biomineralizację i białek inherentnie nieuporządkowanych. Przeprowadzona przez nią dyskusja jest bogata, dogłębna i wyważona w odniesieniu do zaobserwowanych różnic strukturalnych.

Następnie Autorka podsumowała swoje badania oraz przedstawiła perspektywy możliwych dalszych badań białka Stm-I. Warto podkreślić, że przedstawione plany badań są bardzo ambitne i zakładają między innymi określenie wpływu zatłoczenia molekularnego oraz wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych jak FRET czy przeciwciał anty-Stm-I.

W końcowych rozdziałach rozprawy autorka zaprezentowała także swój dotychczasowy dorobek naukowy (rozdział 9) i wspomniany wcześniej dodatek (rozdział 10) zawierający wyniki wspierające opisane w pracy badania oraz spis tabel i rysunków. Pracę zamyka bogaty wykaz zacytowanej literatury obejmujący 178 pozycji.

Ocena strony merytorycznej pracy.

Ten fragment recenzji, chciałbym poświęcić ocenie realizacji postawionego w rozprawie celu badań. W tym miejscu chciałbym raz jeszcze podkreślić, że mgr Różycka zdecydowała się podjąć niezwykle interesujący, ambitny i aktualny temat badań. W mojej ocenie dobrała właściwy warsztat badawczy aby zrealizować wcześniej przytoczony główny cel pracy, oraz etapowe cele badań.

Autorka przygotowała efektywny system ekspresyjny oraz oczyściła do homogenności białko Stm-I. Przeprowadziła szczegółową analizę biochemiczną badanego białka wspartą też technikami bioinformatycznymi, które potwierdziły, że białko to występuje w roztworze w postaci monomerycznej oraz wykazuje cechy białka swoiście nieuporządkowanego. Przeprowadziła eksperymenty pozwalające określić wpływ czynników denaturujących, jonów metali, temperatury czy odczynu na strukturyzację badanego białka. Na koniec wykonała serię eksperymentów biomineralizacyjnych wskazujących wpływ białka na morfologię mikrokryształów węglanu wapnia formujących się w jego obecności. Założony cel pracy został więc osiągnięty.

Wobec tego jako najważniejsze osiągnięcia pracy uważam:

- wykazanie, że białko ma charakter białka inherentnie nieuporządkowanego,
- określenie warunków sprzyjających jego cząstkowej strukturyzacji,
- określenie wpływu Stm-I na proces biomineralizacji węglanu wapnia.

Z obowiązku recenzenta chciałbym także podzielić się uwagami krytycznymi, które nasunęły mi się podczas lektury dysertacji. Muszę jednak podkreślić, że z perspektywy prac, które miałem okazję dotychczas recenzować jest ich stosunkowo niewiele.

- Na stronie 13 w tabeli 3.1 znalazłem pewne nieścisłości. Autorka wymienia w tabeli siarczki, jako jedną z grup minerałów tworzących struktury wewnątrzkomórkowe. Przypisuje im funkcję: „redukcja siarczanów, usuwanie jonów (?)”. Jedną z istotnych i od dłuższego czasu znanych funkcji siarczków (żelaza) jest też magnetotaksja. Rolę materiału magnetycznego pełni tu

sulfospinel greigit. Informacja ta jest o tyle istotna, że Autorka wymieniła wcześniej udział tlenków żelaza w magnetotaksji.

- Na stronie 16 autorka wymienia aminokwasy o łańcuchu hydrofobowym promujące strukturę uporządkowaną. Wśród nich pojawiła się także asparagina (N), co do której przyporządkowania jako aminokwasu hydrofobowego mam poważne zastrzeżenie. Zgodnie z klasycznymi regułami podziału aminokwasów jest ona niewątpliwie aminokwasem polarnym.
- Nieco niezręcznym sformułowaniem jest siatka kryształu zamiast sięć krystaliczna pojawiające się na stronie 20.
- W przedstawionym na stronie opisie badań z wykorzystaniem spektrometrii mas, poza informacją o odsoleniu próbki, nie znalazłem informacji na temat środowiska, w którym rozpuszczone było białko Stm-I.
- W przypadku przedstawionej na stronie 60 masy cząsteczkowej wyznaczony na podstawie ruchliwości elektroforetycznej, moim zdaniem podany jest z nadmierną precyzją (podawany z dokładnością do dziesiątych części atomowej jednostki masy).
- Wzmiankowana powyżej niezręczność w zaokrągleniu wyników powtarza się także często w kolejnych częściach pracy. Mam więc wrażenie, że Doktorantka nie stosowała jednolitych reguł zaokrąglenia uzyskanych wyników do odpowiedniej ilości cyfr znaczących w odniesieniu do niepewności pomiaru. Warto więc aby przed publikacją kolejnych wyników zweryfikowała te wartości w oparciu o zalecane reguły ISO lub dostępną literaturę (np. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISO, Switzerland 1995 lub H. Szydłowski *Niepewności w pomiarach – międzynarodowe standardy w praktyce*).
- W nawiązaniu do powyższych błędów, w pracy razi też zamienne stosowanie jako separatora dziesiętnego kropek (czyli separatora dziesiętnego wg. notacji anglosaskiej) zamiast przecinków (separator dziesiętny w języku polskim). Przykładowo, często ten problem edytorski pojawiał się na stronach 69-71.
- W odniesieniu do obserwowanych różnic w oszacowaniu zawartości elementów struktury drugorzędowej przy użyciu zastosowanych przez Autorkę kilku programów oczekiwałbym szerszej analizy obserwowanych różnic (str. 70-72, tabela 6.3), a w szczególności uwypuklenia ograniczeń stosowanych metod dekonwolucji widm dichroizmu kołowego (CD). Mam nadzieję, że podczas obrony mgr Różycka ustosunkuje się do tej uwagi.
- W przypadku zaprezentowanych wyników badań CD w obecności chlorowodoru guanidyny Autorka wspomina, że napotkała problem z rejestracją widma w okolicy 200 nm. Czy próbowała wykorzystać w eksperymencie kuwety o zredukowanej drodze optycznej (0,1 lub nawet 0,01 mm) dostosowanej do pomiarów tego typu próbek lub ewentualnie manipulując dostępnymi w systemie pomiarowym parametrami optyki?
- Analizując zmiany morfologiczne kryształów węglanu wapnia zaprezentowanych na rysunku 6.17 wsparte danymi ze spektroskopii Ramana

nasuwa się pytanie czy nie warto jednoznacznie zweryfikować formy polimorficznej dodatkowo o dyfrakcję elektronów o ile Autorka ma dostęp do mikroskopu TEM dysponującego taką opcją. Wskazane byłoby to w odniesieniu do mikrokryształów o morfologii sferycznej.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

W tym miejscu chciałbym po raz kolejny podkreślić, że praca zawiera nie tylko bardzo interesujący materiał badawczy, ale także uzyskane przez mgr Różycką wyniki zostały zaprezentowane bardzo starannie zarówno od strony graficznej jak i redakcyjnej. W treści manuskryptu bardzo rzadko pojawiają się błędy edytorskie tzw. literówki. Bardzo mocną stroną rozprawy jest wspomniana na wstępie szata edytorska.

Podsumowanie

Podsumowując całokształt przemyśleń dotyczących ocenianej rozprawy stwierdzam, że praca doktorska przygotowana przez mgr Mirosławę Różycką, potwierdziła, że autorka jest dobrze przygotowana do samodzielnej pracy badawczej.

Podjęta przez mgr Różycką tematyka badawcza dotycząca właściwości białek inherentnie nieuporządkowanych jest w mojej ocenie bardzo interesująca i aktualna. Założone cele badawcze zostały przez nią zrealizowane, a uzyskane wyniki badań zostały zaprezentowane w sposób jasny i przejrzysty. Rezultaty badań zostały w mojej subiektywnej ocenie precyzyjnie omówione, a przeprowadzona dyskusja jest dogłębna i wyczerpująca. Co więcej, wyniki zostały już opublikowane przez mgr Różycką w renomowanym czasopiśmie naukowym (*PLoS One*).

Wyartykułowane wcześniej uwagi krytyczne nie umniejszają pozytywnego odbioru rozprawy i ze względu na ciekawe wyniki uzyskane przez Autorkę, pracę doktorską przedstawioną przez mgr Mirosławę Różycką uważam za wyróżniającą. Jednakże chcę w pełni upewnić się co do mojej pozytywnej opinii podczas publicznej obrony dysertacji.

Rozprawa doktorska mgr Mirosławy Różyckiej w pełni spełnia zwyczajowe oraz formalne wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm. Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365). Wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie mgr Mirosławy Różyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

