



Lublin, 27.01.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Kalkipt. „*Relacja struktura – funkcja inherentnie nieuporządkowanego białka Starmarker w procesie biomineralizacji węglanu wapnia*”wykonanej w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiejpod kierunkiem **prof. dr. hab. inż. Piotra Dobryczyckiego** (promotor)
oraz **dr inż. Magdaleny Wojas** (promotor pomocniczy)

Mogłoby się wydawać, że biomineralizacja to proces bardzo prosty, w wyniku którego organizmy żywe tworzą różnorodne zmineralizowane struktury, pełniące zwykle ważne funkcje życiowe. Jest to jednak skomplikowany proces, składający się z wielu etapów regulowanych genetycznie, w których kluczową rolę odgrywają bardzo specyficzne białka. Bardzo ciekawym aspektem tych badań jest poznanie relacji pomiędzy strukturą tych białek a ich funkcją na poziomie molekularnym, w kontekście ich udziału w regulacji procesu biomineralizacji oraz oddziaływania z minerałami. Forma krystaliczna, kształt czy też wielkość powstałych struktur mineralnych, zależą od aktywności szczególnego rodzaju białek regulacyjnych, określanych jako białka o inherentnie nieuporządkowanej strukturze tzw. IDP (ang. *intrinsically disordered proteins*). Dzięki nadzwyczajnej plastyczności i konformacji, białka te mogą łatwo przyjmować odmienne stany konformacyjne na skutek oddziaływania z różnymi organicznymi i nieorganicznymi elementami. Duża labilność i ekspozycja łańcucha polipeptydowego w tych białkach sprawia, że mogą one ulegać różnorodnym modyfikacjom potranslacyjnym, co dodatkowo zwiększa ilość możliwych konformacji i umożliwia szybką regulację aktywności białek IDP. Do tej pory zidentyfikowano niektóre białka IDP zaangażowane w tworzenie mineralnych struktur u zwierząt; ich właściwości molekularne oraz mechanizm działania wciąż wymagają badań w kontekście między innymi możliwości zastosowania tych peptydów w inżynierii tkankowej czy też jako potencjalne nośniki leków. Rozprawa doktorska pani mgr inż. Marty Kalki wpisuje się precyzyjnie w te oczekiwania, w związku z czym postrzegana może być nie tylko jako aktualna i interesująca ale również bardzo ważna. Przedmiotem badań w ramach tej rozprawy są białka, należące do białek nieuporządkowanych, kontrolujące proces biomineralizacji otolitów u ryb – dania pręgowanego (*Danio rerio*) i karpia zwyczajnego (*Carpinus carpio*).

Przedstawiona do oceny praca składa się ze 124 stron, 15 tabel i 38 rysunków. Rozprawa zredagowana została według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Po spisie treści, wykazie skrótów i streszczeniu (w języku polskim i angielskim),





zamieszczone zostały główne rozdziały dotyczące bezpośrednio dysertacji: *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja* oraz *Podsumowanie i perspektywy dalszych badań*. Uzupełnieniem tych podstawowych rozdziałów są kolejne części - *Dodatek* (zawierający sekwencje białek oraz nazwy zidentyfikowanych białek), *Spis tabel i rysunków* oraz *Literatura*. Piśmiennictwo obejmuje 179 publikacji, związanych z tematyką rozprawy, w tym 70 pozycji z ostatnich 10 lat. Ponadto, Doktorantka w pracy umieściła swój dorobek naukowy w formie spisu (1) publikacji naukowych, (2) rozdziałów w książkach, (3) doniesień konferencyjnych, (4) odbytych staży, szkoleń i warsztatów oraz (5) projektów badawczych, w których realizacji brała udział.

Na początku dysertacji zamieszczony został *Wstęp* wprowadzający w przystępny sposób w tematykę rozprawy i zakreślający równocześnie obszar badawczy, w ramach którego formułowane mogą być otwarte problemy poznawcze, związane z relacją struktury i potranslacyjnymi modyfikacjami badanych białek a ich rolą w procesie biomineralizacji. *Wstęp* to opisowa część rozprawy, opierająca się na analizie doniesień z piśmiennictwa naukowego, która została zredagowana w oparciu o podstrukturę obejmującą sekcje poświęcone biomineralizacji, ze szczególnym uwzględnieniem biominerałów węglanów wapnia i otolitów - tych fascynujących struktur biomineralnych, dzięki którym kręgowce utrzymują orientację w przestrzeni. Drugim ważnym elementem tej części opisowej są podrozdziały poświęcone białkom inherentnie nieuporządkowanym, które są szczególnie istotne w kontroli biomineralizacji i które ulegają częstym i licznym modyfikacjom potranslacyjnym oraz specyficznemu białku Starmaker oraz jego homologom, które pełnią specyficzne funkcje podczas biomineralizacji otolitów.

Uwagi:

- Tabela 1-1 - warto by było umieścić wzory strukturalne podanych biominerałów tak aby było jednoznaczne o jakich biominerałach jest mowa, np. tlenek krzemu – czy jest to tlenek krzemu (IV) czy tlenek krzemu (II)? Tak samo w przypadku tlenku żelaza – czy jest to tlenek żelaza (II) czy też tlenek żelaza (III)?
- Tabela 1-2 - w kolumnie wymieniającej organizmy, u których występują wymieniane odmiany CaCO_3 , zostały podane przykłady różnych taksonów grup organizmów - są wymienione typy, gromady i klasy. Warto to usystematyzować bo np. mięczaki to typ, który obejmuje głowonogi, małże i ślimaki a w tabelce są wymienione i ślimaki i mięczaki. Kokolitotrofy i otwornice należą do całkiem odrębnego królestwa protistów.
- „dzielą wspólne cechy” (np. str. 19, 62) – bardziej prawidłowym terminem jest „łączą wspólne cechy” czy też „mają wspólne cechy”; czasownik „dzielić się” jest stosowany w kontekście dzielenia się czymś, przekazywania czegoś a nie łączenia czy też posiadania tych samych cech,
- symbole aminokwasów – bardziej czytelne byłoby używanie nazw aminokwasów lub ich symboli trzyliterowych zamiast zastosowanych w pracy symboli jednoliterowych,





- kwas asparaginowy i kwas asparaginianowy (str. 23, str. 31) – czy są to dwa różne aminokwasy?
- str. 26 – „z węglanu wapnia” – a nie „w węglanu wapnia”,
- str. 33 – jaki jest prawidłowy symbol dla określenia stałej dysocjacji?

Część eksperymentalną rozprawy otwiera rozdział 3., poświęcony opisowi materiału badawczego oraz zastosowanych metod badawczych i procedur pomiarowych. Zawarte w tej części opisy są, w moim odczuciu, na tyle precyzyjne, iż umożliwiają powtórzenie analogicznych eksperymentów. W ramach przeprowadzonych badań została opracowana metoda izolacji białek z otolitów danio pręgowanego i karpia zwyczajnego oraz ich identyfikacja. Otrzymano także określone fragmenty rekombinowanego białka Stm, które umożliwiły analizę ich struktury i funkcji. Doktorantka wykorzystwała w pracy bardzo różnorodne i nowoczesne metody biologii molekularnej oraz biospektroskopii co umożliwiło zrealizowanie postawionych celów badawczych. Tak wieloaspektowe podejście do rozwiązywania problemów badawczych otworzyło unikalne możliwości formułowania zaawansowanych oraz złożonych pytań.

Uwagi:

- sekcja 3.2.3.1 – proces rozpuszczania otolitów przebiegał 4 dni – czy nie zaobserwowano zakażenia próbek w ciągu tak długiego czasu?
- sekcja 3.2.3.1 i 3.2.3.3 – czy w czasie 4-godzinnych inkubacji (rozpuszczanie, trawienie) roztwory mieszano? Jeżeli tak to w jakich warunkach?
- str. 48 – ze stałym przepływem 250 nl/min – czy są to prawidłowe jednostki?

Rozdział 4. rozprawy, zatytułowany „Wyniki”, zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą poszczególne zadania badawcze realizowane w ramach tej rozprawy doktorskiej. Zaznaczyć należy przy tym, że zaprezentowany cykl badań stanowi spójnie zaprojektowany szereg eksperymentów, obejmujących problemy badawcze początkowo bardziej ogólne a następnie szczegółowe, w których problemy poznawcze pojawiające się w poszczególnych częściach, stanowią wyzwania w kolejnych. Przeprowadzone badania dotyczyły między innymi izolacji i oczyszczania białek z otolitów danio pręgowanego i karpia zwyczajnego oraz identyfikacji białka Stm oraz jego homologów. Jednym z głównych założeń pracy było poznanie funkcji poszczególnych regionów białka Stm. W tym celu otrzymano charakterystyczne fragmenty końca N i C rekombinowanego białka (rStm). W ramach badań modyfikacji otrzymanych białek przeprowadzono analizę fosforylacji (białko Stm z otolitów danio pręgowanego, fragmenty białka rekombinowanego rStm, białka kStm-1 z otolitów karpia zwyczajnego) i potwierdzono obecność grup fosforanowych, co jest jedną z najczęstszych i najistotniejszych modyfikacji białek zaangażowanych w biomineralizację. W ramach bloku badań mineralizacyjnych przeprowadzono aktywność biomineralizacyjną *in vitro* otrzymanych białek w stosunku do węglanu wapnia. Stwierdzono, że białka te indukują mineralizację kryształów węglanu





wapnia i stabilizują określoną odmianę kryształów. Wykazano, że białko Stm jest obecne w obu odmianach polimorficznych – w rombicznych aragonitach i w heksagonalnych waterytach. W kolejnej sekcji w tym rozdziale zbadano strukturę drugorzędową otrzymanych białek (białka Stm z otolitów danio pręgowanego, fragmentu N i C rekombinowanego białka rStm, różnych izoform białka k-Stm-1 z otolitów karpia zwyczajnego) i stwierdzono obecność struktur charakterystycznych dla białek inherentnie nieuporządkowanych. W ostatniej sekcji tego rozdziału przeprowadzono badania proteomiczne, które pozwoliły na identyfikację szerokiej gamy białek obecnych w otolitach danio pręgowanego i otolitach karpia zwyczajnego. Stwierdzono obecność typowych białek strukturalnych dla macierzy otolitowej (np. kolagen X, otolina-1) zarówno w otolitach aragonitowych jak i waterytowych. Dodatkowo w otolitach z karpia zwyczajnego zidentyfikowano anhidrazę węglanową dostarczającą jonów wodorowęglanowych i kinazę FAM20C, odpowiadającą za fosforylację aminokwasów.

Najważniejsze wyniki z przeprowadzonych badań zostały jeszcze raz uwypuklone w rozdziale „Dyskusja”, który zawiera odniesienia do pozycji piśmienniczych. Ta część pracy powinna zostać rozbudowana o dodatkowe schematy lub tabele, zbierające i podsumowujące otrzymane wyniki dla trzech różnych białek – białka Stm z otolitów danio pręgowanego, białka rekombinowanego rStm oraz białka k-Stm-1 z otolitów karpia zwyczajnego. Szczególnie, że w pracy nie zostały przedstawione krótkie wnioski (np. w formie punktów).

Uwagi:

- Rysunek 4.4, rysunek 4.8 – termin „M-marker wagowy” – bardziej prawidłowy jest termin „wzorce masy cząsteczkowej”; „śląd” – powinno być „kolumna” lub „pas 1”,
- czy próbowano opracować metodykę oczyszczania tak aby oddzielić i scharakteryzować agregaty białkowe o wysokiej masie cząsteczkowej HMWAs? Jakie mogą być powody współoczyszczania białek z agregatami? Czy są jakieś dane literaturowe? Doktorantka próbowała przeanalizować to na stronach 89 i 88 ale prosiłabym o dodatkowe informacje z pozycji piśmiennictwa naukowego.
- Tabela 4-4 – które białka wymienione w tabeli to białka wchodzące w skład agregatów wysokocząsteczkowych?
- str. 67 – zbadano, że tylko białko Stm z otolitów danio pręgowanego było białkiem ufosforylowanym. Czy mogłabym prosić o wyjaśnienie czy rzeczywiście tylko to białko ulega modyfikacji poprzez fosforylację?
- Rysunek 4.24 – w opisie warto dodać, że małe i najmniejsze kryształy to także kryształy waterytowe,
- str. 84 – proszę wyjaśnić skąd kreatyna pośród białek zidentyfikowanych w otolitach danio pręgowanego,
- str. 87 – powinno być *Oreochromis mossambicus*,





- czy zbadano punkty izoelektryczne oczyszczonych białek?
- czy przeprowadzono próby badania fosforylacji oczyszczonych białek z zastosowaniem innej kinazy? Czy są takie plany?
- szkoda, że w ramach pracy nie przeprowadzono analizy stopnia glikozylacji badanych białek; te analizy zostały zaproponowane w dalszych badaniach. Chciałabym zaprosić Doktorantkę do wypowiedzenia się na temat możliwej glikozylacji białek regulujących i wspierających proces biomineralizacji.

Na podkreślenie zasługuje również klarowność języka rozprawy oraz wyjątkowo wysoki poziom edytorski a korekty edytorskie zaproponowane przeze mnie są tylko drobnymi uwagami.

Tak wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pani mgr inż. Marty Kalki, dostarcza wielu nowych i cennych informacji, pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą, wyrazem czego są te przedstawione uwagi i pytania. Bardzo cenną częścią tej pracy jest opis planowanych dalszych badań co wskazuje na świadomość doktorantki, że w ramach tego tematu jest jeszcze bardzo dużo pytań i problemów, które wymagają rozwiązania. Świadczy to o dojrzałości naukowej mgr inż. Marty Kalki oraz o świadomości realizacji takich badań w zespole interdyscyplinarnym.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Marty Kalki pt. „*Relacja struktura – funkcja inherentnie nieuporządkowanego białka Starmarker w procesie biomineralizacji węglanu wapnia*” stanowi oryginalne opracowanie naukowe, poruszające zagadnienia korelacji pomiędzy strukturą cząstek biologicznych a ich funkcją i opierające się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr inż. Martę Kalkę spełnia wymogi formalne i warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595, wraz z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie zwracam się do Komisji do Spraw Stopni Naukowych w dyscyplinie Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z wnioskiem o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr inż. Marty Kalki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

