



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych

Dr hab. inż. Marta Kepinska, prof. UMW

Wrocław, 01.02.2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr Marty Kalki

Tytuł pracy: *Relacja struktura – funkcja inherentnie nieuporządkowanego białka Starmaker w procesie biomineralizacji węglanu wapnia*

wykonanej w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej

pod kierunkiem

Prof. dr. hab. inż. Piotra Dobryszkyckiego oraz dr inż. Magdaleny Wojtas

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marty Kalki dotyczy istotnego zagadnienia białek o inherentnie nieuporządkowanej strukturze (IDPs). Odkrycie tych białek podważyło tradycyjny paradygmat struktury białek, zgodnie z którym do prawidłowego funkcjonowania białka wymagana była unikalna, dobrze zdefiniowana struktura, a zatem unikalna struktura definiuje unikalną funkcję białka. IDPs pełnią szereg kluczowych funkcji biologicznych, które uzupełniają funkcjonalny repertuar białek ustrukturyzowanych. Są bardzo ważnymi graczami w sygnalizacji komórkowej, sieciach oddziaływań białko-białko i regulacji ekspresji genów. Ich aktywność sygnalizacyjna jest modulowana przez liczne modyfikacje potranslacyjne. IDPs częściej niż białka globularne ulegają procesom błędnego fałdowania i agregacji, dlatego też wiele białek z tej grupy zaangażowanych jest w patogenezę chorób neurodegeneracyjnych. IDPs pełnią również szczególną rolę w regulacji mineralizacji. Macierz organiczna biominerałów składa się ze strukturalnej sieci białek kolagenowych oraz rozpuszczalnych białek niekolagenowych. Te ostatnie to często białka należące do grupy białek IDPs. Badania biofizyczne tych białek stanowią ogromne wyzwanie

badawcze, częściowo ze względu na ich szeroką heterogeniczność konformacyjną i potencjalnie złożone zachowanie zwijania wywołane oddziaływaniami z jonami metali czy innymi białkami. IDPs są strukturalnie i funkcjonalnie bardzo różne od białek uporządkowanych i dlatego wymagają specjalnych narzędzi eksperymentalnych i obliczeniowych do identyfikacji i analiz.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma konstrukcję typową dla dysertacji doktorskich, a jej struktura jest przejrzysta i logiczna. Praca jest napisana poprawnie pod względem językowo-stylistycznym. Autorka zachowała właściwą proporcję poszczególnych jej części, które są spójne i zgodne z ich tytułami oraz napisane w sposób syntetyczny. Praca, której treść odpowiada tytułowi, obejmuje 124 strony wydruku i zawiera 15 tabel oraz 38 rysunków, streszczenie w języku polskim i angielskim.

W rozdziale pt. „Wstęp”, podzielonym na logiczne podrozdziały, mgr Marta Kalka przedstawia zagadnienia dotyczące procesu biomineralizacji wraz z zaangażowanymi w nią białkami, opisuje funkcje i skład otolitów. Wśród kwaśnych białek kontrolujących biomineralizację znajduje się białko Starmaker (Stm) oraz jego homologi, których strukturę i funkcję analizowano w niniejszej pracy.

Doktorantka podjęła następujące cele badawcze: identyfikacja natywnego Stm izolowanego z otolitów dorosłych ryb danio pręgowanego oraz zbadanie fosforylacji białka Stm, opracowanie metody oczyszczania homologu Stm z otolitów karpia zwyczajnego oraz analiza składu macierzy organicznej otolitów zarówno danio pręgowanego jak i karpia zwyczajnego. W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka opisuje metody, które były odpowiednie dla realizacji zaplanowanych celów. Różnorodność zastosowanych metod dowodzi dużej umiejętności prowadzenia badań naukowych z wykorzystaniem nowoczesnego warsztatu badawczego oraz analizy bioinformatycznej. Imponujący jest ogrom włożonej pracy dla realizacji założonych celów. Autorka wykorzystwała liczne metody badawcze, m.in. techniki chromatograficzne, ekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych, analiza fosforylacji białek, testy aktywności biomineralizacyjnej *in vitro*, skaningowa mikroskopia elektronowa, spektroskopia Ramana, spektroskopia dichroizmu kołowego, spektrometria mas.

Rozdział „Wyniki” dokumentuje szeroki zakres pracy włożonej w realizację założonych celów. Wyniki zostały starannie i czytelnie przedstawione oraz zilustrowane 10 tabelami i 28 rysunkami.

W rozdziale „Dyskusja” składającym się z kilku części, Doktorantka omówiła uzyskane wyniki, odnosząc je do wyników badań opublikowanych w ostatnich latach. Rozdział ten pokazuje bardzo dobre przygotowanie Pani mgr Marty Kalki do prowadzenia dyskusji

naukowych. Dowodzi także umiejętności krytycznej oceny wyników własnych badań w świetle współczesnych doniesień naukowych i świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. W ostatniej części Autorka przedstawiła perspektywy dalszych badań, dla których wykonała już badania wstępne, co stanowi istotny element przedłożonej dysertacji.

Na końcu pracy umieszczono wykaz w pełni wykorzystanego i właściwie przytoczonego piśmiennictwa. Znaczna część ze 179 cytowanych prac została opublikowana w ostatnim dziesięcioleciu. Rozprawę dopełniają załączniki, w tym – sekwencje białek rekombinowanych, sekwencje izoform Stm zidentyfikowanych w otolitach danio pręgowanego, sekwencje izoform kStm-1 zidentyfikowanych w otolitach karpia zwyczajnego oraz spis białek zidentyfikowanych w otolitach danio pręgowanego i wykaz publikacji naukowych oraz doniesień zjazdowych Autorki. Dorobek naukowy Doktorantki jest znaczący o łącznej wartości współczynnika oddziaływania impact factor (IF) wynoszącej 8,343, jest również autorką/współautorką 3 rozdziałów w książkach oraz 9 doniesień konferencyjnych w tym 6 o zasięgu międzynarodowym. Doktorantka odbyła również staże i szkolenia, wśród których istotnym dla realizacji założonych celów, na pewno był 3-miesięczny staż naukowy na Uniwersytecie w Toronto, który dotyczył badań otolitów danio pręgowanego.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki wynikających z realizacji badań prowadzonych w pracy, należy zaliczyć:

- opracowanie procedury oczyszczania homologu Stm z otolitów,
- wykazanie znaczenia fosforylacji dla aktywności Stm,
- wykazanie różnic funkcjonalnych N i C końca białka Stm,
- wykazanie, że Stm obecne jest zarówno w otolitach aragonitowych, jak i waterytowych,
- wyizolowanie i identyfikacja homologu białka Stm z otolitów karpia. Dodatkowo, opracowana procedura jego izolacji przez swoją uniwersalność może być zastosowana do oczyszczania innych homologów Stm,
- wykazanie, że kStm-1 posiada również nieuporządkowaną strukturę oraz kontroluje biomineralizację węglanu *in vitro*.

Otrzymane wyniki są wartościowe, mają duże znaczenie poznawcze oraz korespondują z wytyczonymi celami badań. Moim zdaniem jedną z najcenniejszych obserwacji jest wykazanie znaczenia fosforylacji dla aktywności Stm. Doktorantka również jako pierwsza zidentyfikowała i wyizolowała homolog funkcjonalny białka Starmaker z otolitów karpia opracowując metodę oczyszczania, uniwersalną dla tego typu białek.

W trakcie lektury recenzowanej dysertacji można było dostrzec nieliczne nieścisłości, bądź kwestie budzące pewne wątpliwości:

- w Tabeli 1-1. wymieniając „kręgowce, ssaki, ryby” warto dodać „w tym ryby, ssaki” w przeciwnym razie brzmi jakby ryby czy ssaki były na tym samym poziomie klasyfikacyjnym co kręgowce,
- str. 20 jest stwierdzenie „charakterystyczne właściwości NCPs opisano poniżej”. Poniżej znajduje się rozdział „1.2.1 Białka inherentnie nieuporządkowane” czyli IDPs. Stwierdzenie to wskazuje, że NCPs i IDPs to pojęcia tożsame.
- Rysunek 1.3. zarówno punkt A jak i B dotyczy danio pręgowanego więc można to zaznaczyć w tytule i pominąć w pkt A i B,
- str. 28 „i wreszcie niektórych chorób” warto wymienić choroby, których dotyczy stwierdzenie,
- warto doprecyzować tytuł podrozdziału 4.1.2.1 – izolacja jakiego białka z otolitów karpia,
- brakuje określenia ile Stm-1 otrzymano z danej porcji otolitów podczas oczyszczania,
- czy otrzymane agregaty białkowe o wysokiej masie cząsteczkowej, współocyszczające się z kStm-1, mogą również zawierać polimery kStm-1? W Tabeli 4-4 warto dodać przewidywane masy zidentyfikowanych białek,
- str. 90, „oddzielenie agregatów o wysokiej masie cząsteczkowej było niemożliwe” – „niemożliwe” zamieniłabym na „nie powiodło się”.

W pracy znajduje się kilka przejęzyczeń/literówek np.: str. 13 „nieporządkowanej”; str. 16 „regulacje stężania”; str. 17 „przetawia”; str. 26 „zbudowane w węglanu”; str. 61 „ruchliwości”; tabela 4-9 – „aragoniotwymi”; str. 93 „w odróżnieniu do białka”.

Wskazane nieścisłości oraz potknięcia tekstowe nie obniżają wartości rozprawy, która jest znaczącym osiągnięciem badawczym. Należy podkreślić pracowitość Doktorantki, o której – obok bardzo dużej ilości wyników badań – świadczy także precyzja ich opisanie w pracy.

W podsumowaniu oświadczam, że przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska pt. „*Relacja struktura – funkcja inherentnie nieuporządkowanego białka Starmaker w procesie biomineralizacji węglanu wapnia*” jest oryginalnym, samodzielny dorobkiem naukowym Kandydatki i spełnia warunki Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. 2003 Nr 65 poz.595 z późn.zm.). Dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie Pani mgr Marty Kalki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysokie wartości merytoryczne ocenianej przeze mnie dysertacji, w tym nowatorski charakter wyników badań, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek o wyróżnienie pracy Pani mgr Marty Kalki.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
BIOMEDYCZNYCH ANALIZ ŚRODOWISKOWYCH
kierownik
Kepińska
dr hab. inż. Marta Kepińska, prof. uczelni