

Dr hab. Stanisław Oldziej, prof. UG  
Pracownia Struktury Biopolimerów  
Międzyuczelniany  
Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

15.06.2023r. Gdańsk

### **Recenzja rozprawy doktorskiej „Otolina-1 – białko biomineralizacji ludzkich otokoniów i rybich otolitów” autorstwa mgr inż. Klaudii Bielak**

Recenzowana praca doktorska powstała w dwu jednostkach naukowych pod opieką dwu promotorów: Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej - promotor prof. dr hab. Inż. Piotr Dobroszycki oraz Instytucie Paleobiologii im. Romana Kozłowskiego Polskiej Akademii Nauk – promotor prof. dr hab. Jarosław Stolarski. Głównym celem pracy było poznanie właściwości biochemicznych i strukturalnych białka otolina-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*. Autorka rozprawy zainteresowała się tytułowym białkiem ze względu na jego znaczenie w tworzenie biominerałów węglanu wapnia występujących w uchu wewnętrznym większości kręgowców. Pomijając aspekt fizjologiczny jaki mają produkty biomineralizacji opisywane w tej pracy (otolity i otokonia), autorka rozprawy zwraca uwagę na potencjalne znaczenie biomineralizacji w aspekcie wykorzystania tego procesu w biotechnologii/medycynie/materiałoznawstwie itp. Należy docenić Autorkę rozprawy za rozpatrywanie problemu badawczego w nieco szerszym kontekście. Stosując bardzo szeroką gamę technik badawczych autorka wykazała, że oba badane w pracy białka mają tendencję do oligomeryzacji, na którą to oligomeryzację ma wpływ stężenie jonów wapnia oraz potencjał oksydacyjno/redukcyjny środowiska. W mojej opinii najważniejszym wynikiem zaprezentowanym w pracy jest wykazanie roli badanych otolin w formowaniu się kryształów węglanu wapnia zawierających komponent białkowy (biominerałów). Można mieć jedynie niedosyt, że Autorka w podsumowaniu swojej pracy nie sugeruje, ani nawet nie wspomina o szerszych badaniach dotyczących właściwości fizykochemicznych biominerałów powstających z udziałem otolin i być może praktycznego zastosowania tego rodzaju materiałów.

Praca napisana jest w języku polskim i ma klasyczny układ dla tego rodzaju opracowań: wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki dyskusja i podsumowanie połączone z perspektywami dalszych badań w podobnej tematyce, spis literatury, dorobek naukowy autorki oraz dodatki. Cała praca wraz z dodatkami to 128 strony maszynopisu i zawiera prawie 230 odnośników literaturowych przywoływanych w pracy w systemie harwardzkim. Liczba przywoływanych źródeł jest trochę przytłaczająca, ale jest to związane z mnogością metod i technik badawczych stosowanych w pracy. Nie jest to bezpośrednio uwypuklone w tekście, ale materiał zawarty w rozprawie doktorskiej został opublikowanych w trzech publikacjach oryginalnych w których mgr inż. Klaudia Bielak jest pierwszym autorem (pozycje 1,2,4 w rozdziale 9. Dorobek naukowy strona 111). Praca napisana jest fachowym, ale przystępnym językiem, dobrze opracowana pod

względem technicznym i edytorskim. Oczywiście można się dopatrzeć, różnych drobnych uchybień językowych, edytorskich czy redakcyjnych, ale nie ma to wpływu na ogólny odbiór pracy. Co prawda nieco mnie zaskoczyło rozwinięcie skrótu RMSD jako średnia kwadratowa błędu (patrz strona 10), co na język polski tłumaczy się jako odchylenie średniokwadratowe. Ten przykład pokazuje pewną niekonsekwencję Autorki. Większość skrótów pochodzi bezpośrednio z języka angielskiego i w wielu przypadkach Doktorantka podaje rozwinięcie z języka angielskiego, a w niektórych przypadkach takiego rozwinięcia brakuje jak w podanym przykładzie ze skrótem RMSD.

Wstęp pracy jest generalnie dość dobrze przemyślany, być może trochę zbyt mocno rozbudowany. Zawiera i przedstawia w sposób uporządkowany wszystkie informacje niezbędne do zrozumienia materiału zawartego w pracy. Autorka przechodzi płynnie od ogółu (czyli biominerałów i procesów biomineralizacji) do interesujących ją zagadnień związanych z białkami z rodziny otolin. W tym całym dobrze przemyślanym schemacie tego rozdziału jest w mojej opinii słaby punkt, a mianowicie w opisie samej otoliny-1 (rozdział 1.4), Autorka najpierw porównuje otoliny z różnych organizmów (Rysunek 6), a potem przedstawia informacje, że otoliny należą do białek z nadrodziny C1q (Rysunek 7). Zdecydowanie bardziej czytelne byłoby rozpoczęcie opisu od nadrodziny C1q a potem przedstawienie zestawienia sekwencji otolin z różnych organizmów. Druga uwaga dotyczy doboru sekwencji przedstawionych na Rysunku 6. Autorka przestawiła porównanie sekwencji otoliny-1 z czterech gatunków saków i jednego gatunku ryby. Przy wykazywaniu podobieństwa czy różnic sekwencyjnych trzeba zachować balans przy doborze sekwencji (mamy w zestawieniu dominację sekwencji pochodzących z ssaków). Wynik zestawienia sekwencji będzie zależał od użytego zbioru danych, tak więc w pierwszej kolejności trzeba mieć to na uwadze przy doborze sekwencji do wykonywania zestawień, szczególnie z zastosowaniem algorytmu Clustal. Po drugie nie wszystkie sekwencje aminokwasowe w bazie UniProt mają jednakową wiarygodność. Te sekwencje o najwyższej wiarygodności zawarte są w podzbiorze bazy UniProt o nazwie SWISS-PROT. W przedstawionym zestawieniu autorka użyła trzech sekwencji, które znajdują się w zbiorze SWISS-PROT (*Homo sapiens*, *Danio rerio* i *Mus musculus*), pozostałe dwie sekwencje z taksonów *Bos taurus* i *Sus scrofa* nie należą do zbioru SWISS-PROT i należy je traktować z pewną ostrożnością. Ponadto dobrą praktyką jest podawanie identyfikatorów sekwencji z baz danych (UniProt ID w tym przypadku), co znacznie ułatwia jednoznaczna identyfikację analizowanych sekwencji. Bardzo cenne w mojej opinii jest zakończenie wstępu rozdziałem 1.5 *Interdyscyplinarność badań biomineralizacyjnych*. Autorka w tym rozdziale bardzo zwięźle i zwięźle podsumowuje wielowątkowość prowadzonych badań i potencjalne ich znaczenie w tym również znaczenie praktyczne.

Rozdziały Materiały i rozdział Metody są bardzo rozbudowane, ale wynika to z niezwykłego bogactwa i różnorodności metod i technik stosowanych przez Autorkę w trakcie realizacji projektu doktorskiego. Szerokie spektrum stosowanych w pracy metod badawczych może nieco deprymować recenzenta, bo muszę przyznać, że nie wszystkie metody są mi dogłębnie znane, tak abym mógł rzetelnie z punktu widzenia eksperta wszystko ocenić. Mogę jedynie stwierdzić, że te opisy które dotyczą znanych recenzentowi dobrze metod i technik badawczych (chromatografia, spektrometria mas, techniki mikroskopowe w tym kriomikroskopia, widma dichroizmu kołowego, metody bioinformatyczne) są

generalnie opracowane rzetelnie z dostateczną liczbą szczegółów technicznych umożliwiającymi odtworzenie przeprowadzanych eksperymentów. Czytając opisy stosowanych metod, eksperymentów, a w następnej kolejności otrzymane wyniki, mam nieodparte wrażenie, że Doktorantka również tak jak Recenzent zna niektóre techniki lepiej inne trochę gorzej, a w niektórych sytuacjach musi opierać się na wiedzy i doświadczeniu innych osób, które te metody stosowały. Doktorantka przy części opisów podaje nazwiska osób, które pomagały jej w wykonywaniu eksperymentów co jest oczywiście bardzo dobrą praktyką, aby uhonorować wkład innych osób w pracę zespołową. Nie wiem, jak przyjmować do wiadomości fakt, że w niektórych przypadkach podana jest jedynie nazwa instytucji, w której wykonywano doświadczenia, czy oznacza to, że dana analiza wykonywana na zasadach usługowo-komercyjnych (chodzi o pomiary z zastosowaniem spektrometrii mas)? Do tych dwu rozdziałów mam następujące uwagi, pytania i komentarze. W opisie analiz bioinformatycznych (rozdział 4.3) znajduje się lista identyfikatorów UniProt kilkudziesięciu sekwencji aminokwasowych. Z przedstawionego opisu nie jestem w stanie stwierdzić na jakiej podstawie wybrano te sekwencje. W opisie jest odwołanie do tajemniczego określenia „Swiss-Prot 51”, które nic mi nie mówi, a podana przed listą sekwencji referencja (Vacic et al., 2007) odnosi się do programu Composition Profiler, ale nie ma związku z podanymi sekwencjami. Czy można uzyskać informacje na jakiej podstawie wybrano te a nie inne sekwencje aminokwasowe? W częściach, gdzie mowa jest o technikach chromatograficznych opisy stosowanych gradientów są niepełne. Rozdział 4.4 cytuje „...gradientem liniowym buforu RPC B w buforze RCP A w czasie ..”. Taki opis jest niepełny bo należy podać jaki był początkowy i końcowy ( w procentach) udział buforu RPC B w eluencie. W rozdziale 4.12.2. jest mowa o gradiencie, ale nie ma informacji o składnikach tego gradientu (opisany jest tylko jeden bufor). Na koniec komentarz techniczny. Na Rysunku 10 przedstawiono schemat skomplikowanego i kłopotliwego w konstrukcji i obsłudze urządzenia do hodowli biominerałów. Można było przeprowadzić ten eksperyment w tanich i prostych w użyciu naczyń do hodowli kryształów metodą siedzącej kropli (ang. sitting drop). Być może ta uwaga przyda się przy kolejnych eksperymentach.

Na zakończenie łącznie omówię materiał zawarty w obszerny rozdział Wyniki (prawie 50 stron) oraz w rozdziałach Dyskusja i Podsumowanie. Przy omawianiu tych rozdziałów pracy skupię się głównie na uwagach lub pytaniach do Doktorantki.

1. Niezwykle interesujący jest rozdział poświęcony oligomeryzacji (5.2.1) badanych białek. Autorka wykazała, że oba badane ortologi mają skłonność do tworzenia oligomerów i agregatów, podobnie jak ich homologi zawierające domenę C1q. Jeśli badane białka są tak podatne na agregacje (co było wiadomo przed rozpoczęciem badań), to można mieć wątpliwości, co do stosowanej procedury oczyszczania i izolacji preparatów. W rozdziale 4.2.3.2 opisano stosowano filtrowania w celu pozbycia się oligomerów i agregatów, tak więc można zakładać, że przy dużej skłonności do oligomeryzacji/agregacji badanego białka pozbywano się znacznych jego ilości. Czy autorka widzi jakąś alternatywę dla stosowanej obecnie procedury oczyszczania, tak aby nie tracić nadprodukowanych białek?
2. W tym samym rozdziale (5.2.1.) opisywany jest wpływ czynnika redukującego (2-merkaptoetanolu) na stopień oligomeryzacji. Dla warunków redukujących i nieredukujących autorka dla obu badanych białek widzi całe spektrum oligomerów (w różnych proporcjach dla obu badanych sekwencji). W pracy

Deans i inni 2010 autorzy obserwują jednak odmienne zachowanie badanego przez nich preparatu. W cytowanej pracy obserwowane są oligomery w warunkach nieredukujących i praktycznie jedynie monomer w warunkach redukujących, czym można wyjaśnić różnice przedstawionych w obu pracach obserwacji?

3. Bardzo doceniam przedstawione przez autorkę wyniki dotyczące bioinspirowanej mineralizacji. Jednak mam do tej części trzy uwagi/komentarze/pytania. Po pierwsze do szerszego zrozumienia procesu powstawania kryształów brakuje mi dwu eksperymentów. Pierwszy jest dość prosty, bo polegałby na początkowej hodowli kryształów bez obecności białek, a następnie dodanie do hodowli preparatu białkowego i sprawdzenie różnic w morfologii, tempie wzrostu tak powstałych kryształów. Czytając pracę doktorską oraz kilka publikacji z nią związanych odnoszę wrażenie, że wszyscy autorzy tych prac uznali za dogmat, że białka otolitu są inicjatorem biomineralizacji, a nikt nie pokusił się o sprawdzenie innego scenariusza, czyli wiązania się białek otolitu do wcześniej ukształtowanych kryształów węglanu wapnia. Drugi eksperyment wart rozważenia to hodowla kryształów w warunkach redukujących, co mogłoby ewentualnie pokazać rolę oligomeryzacji badanych białek na tempo i morfologię wzrostu kryształów. Druga uwaga dotyczy składu biominerałów, czy Autorka widzi techniczną możliwość zbadania kompozycji powstających biominerałów? Innymi słowy, czy technicznie można sprawdzić jaką część masy kryształu stanowi komponent białkowy. Trzecia uwaga dotyczy dyskusji wyników. W pracy Moreland i inn., 2014 pokazano, że morfologia powstających kryształów jest bardzo mocno zależna od tego, czy do ich hodowli użyto jedynie otoliny czy mieszaniny otoliny z białkiem oktonina-90. Niestety w pracy brakuje odniesienia do złożoności środowiska, w którym wzrastają biominerały. Autorka w pewien sposób odnosi się do kwestii wpływu innych niż otolina białek (białko OMM-64) na proces biomineralizacji (str. 107-108). Nie rozumiem jednak uporu Doktorantki w forsowaniu tezy, że białka OMM-64 musi oddziaływać bezpośrednio z otoliną. Z lektury tego fragmentu rozumiem, że autorka wykonała szereg eksperymentów (ale ich wyników nie pokazała w pracy) wykazujących brak oddziaływania otoliny z białkiem OMM-64. Jednak czy bezpośrednie oddziaływanie tych białek jest konieczne do procesu biomineralizacji? To może być oddziaływanie indukowane współwiązaniem do powierzchni mineralnej. Nawet brak powinowactwa (może wręcz odpychania) obu białek może wyjaśniać wzrost kryształów o nietypowej strukturze argonitu.
4. Autorka wykazała, że obecność jonów wapnia stabilizuje termodynamicznie strukturę białka (5.3.4.1) szczególnie dotyczy to otoliny z *Danio rerio*. Można zadać pytanie, dlaczego w pomiarach z użyciem kriomikroskopii elektronowej nie zastosowano tej wiedzy, czyli nie wykonano pomiarów w buforze zawierającym jony wapnia. Stabilizacja struktury powinna wpłynąć znacząco na jakość uzyskiwanych obrazów. W tekście opisującym wyniki badań kriomikroskopowych pokazano model struktury dla otoliny z *Danio rerio* (Rysunek 19), czy dla ludzkiego ortologa nie udało się uzyskać danych pozwalających na budowę modelu?
5. Otolina jest białkiem, w którym występuje znaczna liczba modyfikacji posttranslacyjnych (hydroksylacja reszt proliny i lizyny, glikozylacja reszt glutaminy i asparaginy). Modyfikacje te prawdopodobnie (tylko nie wiadomo w jakim stopniu) wpływają na właściwości biochemiczne i biofizyczne. Większość prac dotyczących otolin bazuje na preparatach otrzymanych w systemach eukariotycznych, które w przynajmniej w pewnym stopniu odwzorowują naturalnie występujące

modyfikacje posttranslacyjne. Można zadać pytanie, dlaczego Autorka nie zdecydowała się na nadprodukcję w systemach eukariotycznych? Mogę zrozumieć, że macierzysta grupa badawcza nie posiada zaplecza i ekspertyzy to tego rodzaju prac. Jednak daje się łatwo zauważyć, że rozprawa powstała w wyniku funkcjonowania sieci współpracujących laboratoriów/grup badawczych. Wciąż pozostaje nieco retorycznym pytanie, dlaczego Autorka nie nawiązała współpracy z grupą doświadczoną w pracy z systemami eukariotycznymi i trwała przy nadprodukcji w systemie bakteryjnym mając na uwadze związane z tym podejściem problemy dotyczącymi późniejszej interpretacji uzyskanych wyników.

Największe zastrzeżenia odnoszą się do rozdziału 5.5 zatytułowanego „Badania proteomiczne otolitów *Cyprinus carpio* oraz *Gadiculus argenteus*. I związanego z nim rozdziału w 6.5 w części Dyskusja. Wcześniejsze rozdziały były spójne tematycznie i dotyczyły charakterystyki strukturalnej i funkcjonalnej otolin z *Danio rerio* i *Homo Sapiens* to omawiany rozdział jest dość luźno związany z pozostałą częścią pracy. O ile wybór badania preparatów z *Cyprinus carpio* jest jak najbardziej racjonalny (dostępność preparatów, dość dobrze scharakteryzowany proteom), to próba badania preparatów kopalnych z *Gadiculus argenteus* było dość ekstremalnym posunięciem z wielu powodów (o czym poniżej). Wydaje się, że Autorka rozprawy nie ma dużego doświadczenia w przeprowadzaniu badań i analizie danych proteomicznych. Przy analizie danych pochodzących z pomiarów preparatów z *Cyprinus carpio* i *Gadiculus argenteus* zastosowano bazę danych sekwencji aminokwasowych NCBI. Niestety baza NCBI Proteins nie jest najlepszym źródłem informacji na temat sekwencji aminokwasowych. Zdecydowanie lepiej korzystać z bazy UniProt, która jest obszerniejsza, a przez to daje lepszy ogólny obraz sytuacji. O różnicy w zawartości niech świadczy fakt, że zgodnie z tym co zostało napisane w pracy w bazie NCBI jest dostępnych 118333 sekwencje białkowe (patrz strona 57) dla *Cyprinus carpio*, a liczba dostępnych sekwencji w bazie UniProt dla tego taksonu to 417783 rekordów(sekwencji). Przy przeszukaniu bazy NCBI ze słowami kluczowymi „otolin” i taksonu *Cyprinus carpio* otrzymujemy 6 sekwencji aminokwasowych, to samo przeszukanie w bazie UniProt daje 26 sekwencji (otolin-1A i otolin-1B i izoformy tych białek). Jestem pewien, że powtórne przeanalizowanie danych z użyciem bazy UniProt dałoby zdecydowanie większy katalog zidentyfikowanych białek, a identyfikacja miałaby o wiele wyższą wiarygodność. Ten sam problem wyboru bazy danych do opracowania wyników z pomiarów preparatów z *Gadiculus argenteus*. Tym bardziej, że jest to gatunek stojący gdzieś na uboczu nauki i dane dostępne nawet w bazie UniProt są znikome (52 sekwencje aminokwasowe). W przypadku tego organizmu dodatkową trudność stanowi praca z materiałem kopalnym co stanowi problem samym w sobie. Po drugie, dlaczego analizowano jedynie próbki kopalne, skoro nie jest to gatunek wymarły i przynajmniej można było zdobyć próbki porównawcze zapewne lepszej jakości (mniej zdegradowany materiał biologiczny). Dodatkowo białka z otolitów zawierają znaczną liczbę fragmentów sekwencji podobna do kolagenu. Rutynowe zastosowanie trypsyny jako enzymu użytego do trawienia nie jest w tym przypadku najlepszym wyborem i znacznie lepsze efekty można osiągnąć używając do tego chymotrypsyny, albo kombinacji trypsyny i chymotrypsyny. Reasumując cały rozdział 5.5 zawiera wyniki, które są bardzo słabo opracowane i w aktualnej postaci mało wiarygodne. Jak napisałem na wstępie tego paragrafu jest to raczej dodatek do pozostałego materiału i nie będę uwzględniał zawartości tego rozdziału w mojej ocenie rozprawy doktorskiej.

Treść recenzji zazwyczaj jest bardziej krytyczna niż ogólna opinia recenzenta dotycząca recenzowanej pracy. Doktorantka zrealizowała w praktycznie w całości postawione przed sobą cele. Opracowała z niemałym trudem procedury nadekspresji w systemach bakteryjnych białek otolina-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*. Oczyszczone preparaty białkowe poddała badaniom z zastosowaniem budzącego podziw arsenału technik i metod badawczych. Autorka wykazała, że pomimo znacznego podobieństwa sekwencyjnego badanych ortologów, oba białka wykazują różniące je właściwości biochemiczne/biofizyczne. Oba białka wykazują tendencje do oligomeryzacji, która to oligomeryzacja jest w pewnym stopniu związana z właściwościami utleniająco/redukującymi środowiska. Stabilność termodynamiczna obu białek (tylko w różnym stopniu) jest związana z obecnością jonów wapnia w roztworze. Najważniejszym w mojej opinii osiągnięciem przedstawionym przez Autorkę jest wykazanie wpływu badanych białek na wzrost i morfologię kryształów węglanu wapnia. Ponadto przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują, że w całej objętości kryształu znajduje się komponent białkowy (kompozytowa struktura kryształów). Rozprawa doktorska jak też przedstawione w niej wyniki badań spełniają warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 poz. 478 z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuje do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Klaudii Bielak do dalszych etapów postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Stanisław Ołdziej, prof. UG

