

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ
MGR INŻ. MONIKI POZNAR
p.t. „CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI MOLEKULARNYCH I
BIOMINERALIZACYJNYCH BIAŁKA OMM-64”

W Zakładzie Biochemii Wydziału Chemicznego PWr w ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad strukturą i funkcją białek zaangażowanych w procesy biomineralizacji, których wiele, ze względu na swoje właściwości strukturalne, należy do grupy białek noszących nazwę białek inherentnie nieuporządkowanych lub białek inherentnie nieustrukturyzowanych (IDPs). Istnienie IDPs, które mimo braku stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej pełnią określone/specyficzne funkcje biologiczne, zostało udowodnione około 30 lat temu, ale ciągle wśród wielu biochemików budzą one wątpliwości, co do ich rzeczywistego funkcjonowania. Przeczą bowiem one jednemu z fundamentalnych paradygmatów Biochemii, mówiącemu, że właściwa, stabilna konformacja decyduje o właściwościach biologicznych białek. Tym niemniej, IDPs właśnie ze względu na swoje właściwości strukturalne i związane z nimi funkcje biologiczne, w ostatnich latach budzą coraz większe zainteresowanie badaczy i są obecnie jednym z „gorących” tematów współczesnej Biochemii. Prowadzone w Zakładzie Biochemii badania koncentrują się na roli białek inherentnie nieuporządkowanych w procesach biomineralizacji zachodzących w organizmach ryb kostnoszkieletowych, a konkretnie procesach biomineralizacji prowadzących do powstawania otolitów. Biorąc pod uwagę złożoność tego procesu, badania te mają dużo szerszy aspekt i powinny być również pomocne w zrozumieniu procesów biomineralizacji zachodzących u ludzi, co obok walorów poznawczych, może mieć ogromne znaczenie w badaniach nad etiopatogenezą takich schorzeń jak otoskleroza, czy arterioskleroza, a także wspomagać badania o charakterze praktycznym, np. nad tworzeniem biomateriałów wykorzystywanych jako implanty. Stąd, zajęcie się przez Doktorantkę badaniem właściwości strukturalnych białka OMM-2 i jego rolą w procesie biomineralizacji otolitów, biokompozytów utworzonych z węglanu wapnia i specyficznych białek, obecnych w uchu wewnętrznym pstrąga tęczowego, uważam za jak najbardziej trafne i uzasadnione.

Od razu, na początku mojej recenzji chciałbym pokreślić, że praca jest napisana jasno i przystępnie, dobrą polszczyzną. Dużą w tym zasługą bardzo dobrze opracowanych rycin i tabel. Generalnie, od strony edytorskiej praca została przygotowana bardzo starannie, czym zresztą wyróżniają się, spośród ocenianych przeze mnie prac doktorskich, dysertacje

pochodzące z Zakładu Biochemii PWr. Przedłożona mi do recenzji praca ma generalnie układ typowy dla tego typu opracowań. Czego mi nieco brakuje, to osobnego rozdziału z najważniejszymi wnioskami podsumowującymi uzyskane wyniki badań, co jest w przypadku prac doktorskich powszechną praktyką.

Wstęp, napisany w sposób zwięzły, tym niemniej zawierający wszystkie potrzebne, najbardziej aktualne informacje, doskonale wprowadza czytelnika w problematykę naukową, której dotyczy dysertacja. Rozpoczyna go rozdział poświęcony procesowi biomineralizacji, po którym w następnych rozdziałach omówiono podstawowe zasady rządzące powstawaniem kryształów oraz rolę tzw. macierzy organicznej, a więc przede wszystkim białek, w tworzeniu biokompozytów. Jako, że w procesach biomineralizacji ważną rolę odgrywają białka IDP, które są przedmiotem zainteresowania Doktorantki, kolejny rozdział poświęca ona omówieniu podstawowych właściwości tych białek. Teraz, ze względu na temat pracy doktorskiej w kolejnym rozdziale opisuje ona narząd słuchu i równowagi u ryb kostnoszkieletowych, skupiając się przede wszystkim na budowie i właściwościach otolitów. Wstęp kończy rozdział poświęcony białku macierzy otolitów-64 (OMM-64), którego właściwości i funkcje są przedmiotem jej badań. W podsumowaniu tej części dysertacji, chciałbym jeszcze raz zwrócić uwagę na aktualność zawartych w niej informacji, popartych dobrze dobranym, najnowszym piśmiennictwem i bogaty materiał ilustracyjny, który znakomicie uzupełnia tekst, ułatwiając jego zrozumienie. Nieliczne, podkreślam, uwagi redakcyjne zaznaczyłem na marginesach egzemplarza pracy, który dostałem do recenzji. To samo dotyczy i pozostałych części pracy doktorskiej.

O bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy badawczej świadczy rozdział „Materiały i Metody”. Jestem pod ogromnym wrażeniem różnorodności technik badawczych wykorzystywanych przez Doktorantkę podczas wykonywania części eksperymentalnej pracy. Po pierwsze, opanowała ona większość metod stosowanych w biologii molekularnej, które wykorzystywane są przy otrzymywaniu rekombinowanych białek. Po drugie, co obecnie jest rzadkością, w swoich badaniach posługiwała się klasycznymi metodami wykorzystywanymi w biochemii przy oczyszczaniu białek (frakcjonowanie siarczanem amonu, chromatografia kolumnowa) oraz ich charakterystyce fizyko-chemicznej, że wymienię spektroskopię dichroizmu kołowego, ultrawiarowanie analityczne typu szybkościowego, czy spektroskopię mas ESI i MALDI-TOF. Po trzecie, opanowała najnowocześniejsze techniki mikroskopowe, jak mikroskopia Ramana, mikroskopia dwufotonowa, czy mikroskopia sił atomowych, które wykorzystywała do charakteryzowania kryształów węgla wapnia samych lub z dodatkiem badanego białka. Z innych, bardzo wysublimowanych technik stosowanych przez mgr

Monikę Poznar w celu poznania właściwości strukturalnych i zmienności konformacyjnej białka OMM-64, należy wymienić małokątowe rozpraszanie neutronów, czy dynamiczne rozpraszanie światła. Rozdział ten dowodzi, że Doktorantka posiadała bardzo cenną cechę, która powinna charakteryzować, szczególnie w obecnych czasach, pracownika naukowego, a mianowicie umiejętność współpracy i nawiązywania kontaktów naukowych, co na pewno przyda jej się również w przyszłości. I jeszcze jedna rzecz godna uwagi. Rozdział ten został napisany zrozumiale, dobrą polszczyzną, niewiele w nim wyrażen żargonowych i zapożyczeń z języka angielskiego, co niestety często zdarza się w wielu pracach doktorskich.

Oczywiście najważniejszym rozdziałem każdej pracy doktorskiej, zwłaszcza eksperymentalnej, są „Wyniki”. W przypadku dysertacji mgr Moniki Poznar, oryginalne dokonania Doktorantki można podzielić na kilka, łączących się w jedną spójną całość, etapów.

W wyniku realizacji etapu pierwszego, stosując frakcjonowanie siarczanem amonu, chromatografię oddziaływań hydrofobowych, chromatografię powinowactwa na złożu hydroksyapatytowym i filtrację żelową uzyskano czysty preparat rekombinowanego białka OMM-64.

W etapie drugim przeprowadzono charakterystykę strukturalną OMM-64, która jednoznacznie wykazała, że białko to należy do białek inherentnie nieuporządkowanych. I tak posługując się metodą małokątowego rozpraszania neutronów stwierdzono, że OMM-64 przybiera w roztworach luźną, wydłużoną strukturę kłębka natywnego, a więc konformacji charakterystycznej dla IDPs. Właściwości hydrodynamiczne OMM-64, które analizowano w obecności naturalnego liganda (jony Ca^{2+}) i czynnika denaturującego (chlorowodoru guanidyny), wykorzystując sączenie molekularne, spektroskopię korelacji fluorescencji i ultrawiarowanie analityczne potwierdziły przynależność tego białka do grupy IDP. Tą ostatnią metodą pokazano również, że OMM-64 występuje w roztworze w postaci monomeru, a także że w obecności CaCl_2 jego cząsteczka staje się bardziej upakowana, sugerując pojawianie się struktur II-rzędowych. Stąd, wykorzystując dichroizm kołowy, zajęto się oceną zawartości struktur drugorzędowych w cząsteczce OMM-64 w obecności liganda - jonów Ca^{2+} , denaturanta - chlorowodoru guanidyny, osmolitu indukującego fałdowanie niektórych białek IDP – TMAO i induktora struktur α -helikalnych – trifluoroetanolu. Wyniki pomiarów CD dostarczyły kolejnych dowodów, że jest to białko z grupy IDP o wydłużonym kształcie cząsteczki i konformacji odpowiadającej natywnemu kłębkowi z niską zawartością struktur II-rzędowych.

W etapie trzecim zajęto się aktywnościami biologicznymi białka OMM_64, wykazując, że jedna cząsteczka tego białka jest zdolna do przyłączenia aż 61 ± 7 jonów CaCl_2 z pozorną stałą wiązania $K_d = 0,933 \pm 0,14$ mM. Zastosowano tutaj metodę analizy konkurencji białka z fluorescencyjnym chelatorem (sonda Rhod 5N).

Wreszcie etap czwarty obejmował eksperymenty, których celem było określenie roli białka OMM-64 w tworzeniu kryształów węglanu wapnia, co Doktorantka określa mianem aktywności biomineralizacyjnej. Zmiany w morfologii kryształów pod wpływem białka OMM-64 analizowano posługując się technikami mikroskopowymi wykorzystującymi mikroskop optyczny, skaningowy mikroskop elektronowy (SEM), mikroskop dwufotonowy, mikroskop sił atomowych (AFM) i mikroskop z rejestracją widm Ramana. Obserwacje poczynione za pomocą SEM wskazują, że obecność białka OMM-64 wpływa znacząco na morfologię kryształów węglanu wapnia, generalnie powodując zmianę ich kształtu i wyglądu oraz zmniejszenie rozmiarów, co świadczy, że hamuje ono wzrost kryształów. Z drugiej strony pokazano, że białko OMM-64 przyczynia się do znacznego wzrostu ilości powstających kryształów, co tłumaczone jest pozytywnym wpływem na zarodkowanie węglanu wapnia. Z kolei, mikroskopia sił atomowych pozwoliła stwierdzić, że powierzchnia kryształów powstających w nieobecności białka jest bardziej gładka w porównaniu z kryształami powstającymi w obecności OMM-64, które powoduje ich chropowatość i tworzenie struktury schodkowej. Natomiast zastosowanie spektroskopii sił pokazało, że białko OMM-64 nadaje kryształom większą elastyczność. Jeżeli chodzi o odmianę polimorficzną kryształów węglanu wapnia, to w obecności białka OMM-64 jest nią głównie kalcyt, co wykazano stosując spektroskopię Ramana. Wreszcie, wyniki uzyskane przy pomocy mikroskopii dwufotonowej pokazały, że białko to występuje w obrębie całego kryształu, z pewną jego kumulacją w centralnej części kryształu. W obrębie kryształu, cząsteczki białka OMM-64 przybierają bardziej upakowaną konformację w porównaniu z białkiem w roztworze. Stwierdzono również, że fosforylowana forma białka silniej hamuje wzrost kryształów, a także bardziej zmienia ich morfologię w porównaniu białkiem natywnym. Podsumowując, Doktorantka pokazała, że białko OMM-64 bierze bezpośredni udział w zarodkowaniu, a następnie tworzeniu kryształów węglanu wapnia, kontrolując ich rozmiar i kształt.

Eksperymenty, na podstawie których uzyskano powyższe wyniki, zostały zaplanowane w sposób prawidłowy, z wykorzystaniem odpowiednio dobranych metod. Merytorycznie, nie budzą żadnych zastrzeżeń. Tym niemniej, prosiłbym Doktorantkę do

ustosunkowanie się do następujących uwag i zapytań, które nasunęły mi się podczas analizy opisanych w dysertacji wyników.

W jakim celu lub z jakiego powodu rekombinowane białko OMM-64 posiada na N-końcu dipeptyd GS? Skąd bierze się założenie, że białko pozbawione jest N-terminalnej formylometioniny? (str. 66). W tekście nie wyjaśniono co to jest wartość R_s stosowana przy opisie osi y na rycinach 4.7, 4.8 i 4.10. W rozdziale „4.5.1.2 Wpływ jonów Mg^{2+} na krystalizację $Ca CO_3$ ”, ale również i w Dyskusji nie wyjaśniono wyczerpująco, przynajmniej dla mnie, jaki związek z tematem pracy mają badania poświęcone wpływowi chlorku magnezu na tworzenie kryształów przez węglan wapnia. Brak mi również wyjaśnienia, z jakich powodów w badaniach, w których wykorzystano mikroskopię dwufotonową, stosowano mutantu Ala442-Cys OMM-64. Nie podano również jak taka mutacja wpływa na właściwości białka. W związku z badaniami nad funkcją biologiczną OMM-64 mam jeszcze jedno pytanie. Czy w eksperymentach, w których analizowano wpływ tego białka na proces tworzenia kryształów węglanu wapnia, próbowano stosować jako kontrolę specyficzności procesu i inne białka? Na przykład BSA, czy jakiegokolwiek inne białko?

I jeszcze dwie uwagi redakcyjne. W przypadku wyników otrzymanych przy pomocy małokątowego rozpraszania neutronów, część opisu łącznie z rys. 4.5 można było z powodzeniem przenieść do metod. Informacje dotyczące ultrawierowania, które zamieszczono w rozdziale „4.3.2. Właściwości hydrodynamiczne OMM-64 – pomiary SEC i FCS” nie pokrywają się z jego tytułem, więc powinny znaleźć się we właściwym rozdziale.

Rozdział „Dyskusja” świadczy, podobnie jak pozostałe rozdziały dysertacji, o bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę problematyki, której dotyczy praca doktorska. Uważam jednak, że jest ona momentami zbyt obszerna i niektóre jej fragmenty nie odnoszą się bezpośrednio do tematu dysertacji. Również niektóre fragmenty dyskusji są bardziej omówieniem wyników, niż rzeczywistą dyskusją, w której wyniki własne są konfrontowane z danymi literaturowymi. Na przykład w rozdziale zatytułowanym „5.1 Struktura OMM-64”, fragment zaczynający się na str. 108 od słów „Jedną z najbardziej...”, a kończący się na str. 109 słowami „... że R_g/R_h osiąga wartość powyżej 1.” (13 wiersz od dołu) to rozważania dotyczące metodyki, które ewentualnie można było włączyć do odpowiedniego rozdziału w części poświęconej wynikom. Szkoda, że w rozdziale „5.1. Struktura OMM-64” nie nawiązała Doktorantka do wcześniejszych prac Tohse i wsp. dotyczących tego białka, podkreślając tym samym oryginalność własnych wyników, w których pokazała po raz pierwszy i to jednoznacznie, że białko OMM-64 należy do białek inherentnie nieuporządkowanych. Nie widzę również potrzeby wyodrębniania jako osobnego, rozdziału „Zmienność konformacyjna

OMM-64". Zwłaszcza, że w większości dane w nim prezentowane uzyskano w eksperymentach prowadzonych w warunkach dalekich od fizjologicznych, które nie nawiązują bezpośrednio do tematu pracy dotyczącego roli biologicznej tego białka. Również nie widzę potrzeby wyodrębniania rozdziału dotyczącego wiązania jonów wapnia przez OMM-64. Tak więc, podzieliłbym dyskusję na następujące dwa rozdziały: „Struktura i właściwości białka OMM-64” i „Aktywność biomineralizacyjna białka OMM-64”. W rozdziale pod tym tytułem na szczególną uwagę zasługuje sformułowana, w oparciu o uzyskane wyniki, hipoteza dotycząca roli OMM-64 w biomineralizacji węgla wapnia, poparta bardzo starannie przygotowaną ryciną. Dowodzi to, że Doktorantka jest nie tylko dobrym eksperymentatorem, ale również kreatywnym naukowcem zdolnym do formułowania oryginalnych hipotez. Należy podkreślić, że takich własnych propozycji dotyczących roli biologicznej OMM-64 jest w tej dyskusji więcej.

Zamieszczone uwagi, głównie redakcyjne, i pytania skierowane do Autorki nie zmieniają mojej wysokiej oceny końcowej recenzowanej pracy. Przedstawiona mi do recenzji dysertacja, tak ze względu na prezentowaną problematykę, uzyskane wyniki, jak i warsztat badawczy w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Stąd wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie magister inż. Moniki Poznar do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie niniejszej pracy stosowną nagrodą.

Wrocław, 14.08.2018 r.


Prof. dr hab. Maciej Ugorski