



Prof. dr hab. Wojciech Bal  
wbal@ibb.waw.pl  
tel. +48225922370

Warszawa, 28.06.2023.

### **Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anny Skorupskiej-Stasiak**

Pani mgr Anna Skorupska-Stasiak przedstawiła do oceny rozprawę doktorską pod tytułem „*Analiza molekularna Nukeobindyny-2 z Gallus gallus*”, wykonaną w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Ozyhara z macierzystej jednostki oraz prof. dr hab. Macieja Kozaka z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Rozprawa oparta jest na materiale badawczym zawartym w czterech artykułach, opublikowanych w latach 2018-2021. Doktorantka jest pierwszą autorką w trzech spośród tych artykułów i równorzędną pierwszą autorką w czwartej. Praca, napisana w języku polskim, ma charakter rozprawy w układzie klasycznym, zawierając kolejno Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Bibliografię, liczącą 271 pozycji i poprzedzoną wykazem dorobku naukowego Doktorantki.

Tytuł rozprawy jest być może zbyt zwięzły, gdyż przedmiotem pracy jest nie tylko nukleobindyna-2, ale też traktowany jako samodzielne białko C-końcowy produkt jej hydrolizy, czyli nesfatyna-3.

20-stronicowy wstęp do rozprawy obejmuje zagadnienia (i) struktury i funkcji biologicznej nukleobindyny-2, (ii) białek inherentnie nieuporządkowanych; (iii) biomineralizacji i (iv) wiązania jonów metali przez białka. Dobór materiału do poszczególnych podrozdziałów był selektywny i podporządkowany ogólnemu celowi rozprawy, co stanowi zdecydowaną zaletę tej części pracy. Na przykład w opisie procesu mineralizacji skoncentrowano się na procesie powstawania skorupki jaja kurzego, który zachodzi z udziałem białka tytułowego rozprawy. Autorka dobrze radzi sobie z opracowanym materiałem, zachowując klarowność wyводу i ilustrując go zasadniczo adekwatnie, z wyjątkiem ostatniego podrozdziału, w którym pomimo obfitości obrazów struktur dostępnych w literaturze, nie zamieszczono ani jednego rysunku.

Na str. 32 Doktorantka zamieściła Cel Pracy, za który obrała charakterystykę molekularną białka Nucb2 z *Gallus gallus*. To bardzo ogólne sformułowanie jest następnie rozszerzone w czterech punktach, dotyczących oczyszczania białek Nucb2 i nesfatyny-3, przeprowadzenia analiz



Prof. dr hab. Wojciech Bał  
wbal@ibb.waw.pl  
tel. +48225922370

biochemicznych tych białek, ich oddziaływania z jonami  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  oraz testów biomineralizacji z udziałem Nucb2 *in vitro*. W tych sformułowaniach, poprawnych technicznie, brakuje mi jednak ogólniejszego uzasadnienia podjęcia omawianych prac badawczych – ich istotnego celu nadrzędnego, odpowiadającego na pytanie „po co?”

Kolejną częścią rozprawy jest opis wykorzystanych przy jej realizacji materiałów i zastosowanych metod badawczych, rozbity na dwie osobne części. Doktorantka przedstawia w formie tabel, niekiedy uzupełnionych o krótkie komentarze, listy odczynników, oligonukleotydów, pożywek i buforów używanych w różnych typach eksperymentów, omawia także plazmidy ekspresyjne. W dziale Metody z drobiazgową dokładnością przedstawiono protokoły doświadczalne dla wszystkich metod fizykochemicznych i biochemicznych, użytych w rozprawie. Wyjątkiem są podstawowe procedury biochemiczne, stosowane w pracy z DNA i białkami, dla których Autorka podała odnośniki literaturowe. Te dwie części rozprawy świetnie spełniają swój cel, czyli umożliwienie powtórzenia opisywanych eksperymentów. Pragnę tu również zwrócić uwagę na bogactwo zastosowanych metod i technik. Oprócz przeprowadzonej od podstaw nadekspresji i oczyszczenia badanych białek, w pracy użyto spektroskopię fluorescencyjną, dichroizm kołowy, spektroskopię Ramana, ultrawiarowanie analityczne, techniki spektrometrii mas, mikroskopię elektronową, SAXS, kalorymetrię oraz pomocnicze obliczenia teoretyczne.

Główny rozdział rozprawy – Wyniki zaczyna się od str. 55 i kończy na str. 100. Doktorantka rozpoczyna ten opis od procedur otrzymania badanych białek i weryfikacji ich poprawności za pomocą elektroforezy żelowej i spektrometrii mas. Nie mam uwag do tych opisów. W następnej części przedstawione są badania struktury drugorzędowej badanych białek i wpływu jonów metali na te struktury. Otrzymano ciekawe wyniki, tylko częściowo przewidywalne na podstawie analizy sekwencji. O ile nie jest zaskakujące potwierdzenie wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  dla białka, zawierającego domeny EF-hand i zwiększenia stopnia strukturyzacji białka, a także brak istotnych oddziaływań z jonami  $\text{Mg}^{2+}$ , to efektywne wiązanie jonów  $\text{Zn}^{2+}$  do obu białek jest ciekawe. Wykonane w tej części pracy eksperymenty CD i fluorescencyjne zostały zinterpretowane poprawnie. Chciałbym jedynie zwrócić uwagę na fakt, że miareczkowania CD i fluorescencyjne, gdyby przeprowadzić je dokładniej dla niskich stężeń jonów  $\text{Zn}^{2+}$ , przypuszczalnie pozwoliłyby na niezależne wyznaczenie



Prof. dr hab. Wojciech Bal  
wbal@ibb.waw.pl  
tel. +48225922370

lub co najmniej oszacowanie stałej wiązania tych jonów do obu białek. Podobne dane można próbować również uzyskać z analizy densytometrycznej żeli, przedstawiających wyniki limitowanej proteolizy, zamieszczonych w kolejnej części Wyników. Z pewnością taką analizę może ułatwić bardzo wysoka jakość rozdziałów produktów hydrolizy. przedstawione następnie eksperymenty HDX potwierdziły i udokładniły wnioski z badań CD, lokalizując fragmenty ustrukturyzowane w sekwencjach badanych białek. Ultrawierowanie analityczne ujawniło jeszcze inny aspekt oddziaływań badanych białek z jonami metali, a mianowicie zwiększenie tendencji do oligomeryzacji. Nieco zaskakuje recenzenta oligomeryzacja pod wpływem jonów  $Mg^{2+}$ , gdyż przedstawione dotychczas badania raczej wskazywały na brak oddziaływań. Zapewne korzystne byłoby niezależne potwierdzenie tego wyniku, np. za pomocą DLS. Sporą zagadką na tle dotychczasowych wyników stanowią natomiast wyniki miareczkowań ITC dla jonów  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ . Po pierwsze zaobserwowano dość silne wiązanie jednego jonu  $Mg^{2+}$  do Nucb2, ale fragment tego białka, czyli nesfatyna-3, wiąże nie jeden, ale dwa jony  $Mg^{2+}$ , i to 100 razy mocniej! Podobnie, choć z bardziej skomplikowaną sekwencją zdarzeń i stechiometrią, mają się sprawy dla jonu  $Zn^{2+}$ . Wiązanie jonów  $Ca^{2+}$  do obu białek jest podobne jakościowo i ilościowo, z lekką kooperatywnością (o czym w tej części rozprawy Doktorantka nie wspomina). Muszę tu zwrócić uwagę na błędny zapis na str. 86, gdzie Doktorantka mylnie przyporządkowuje powinowactwa dla jonów  $Ca^{2+}$  do Nucb2, a także na str. 87, gdzie wspomina o bardzo niskiej stałej wiązania tego jonu do nesfatyny-3. Niewątpliwie w obu przypadkach miała na myśli niską stałą dysocjacji, czyli wysoką stałą wiązania.

Natomiast dane i analiza wyników SAXS nie budzą wątpliwości i zgodnie ze stwierdzeniem Autorki na str. 91, wyniki pomiarów SAXS i ultrawierowania, dotyczące nieuporządkowania poszczególnych białek i kompleksów są zgodne. Agregacja Nucb2 i jego kompleksów była również badana za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej w długiej skali czasowej – do 2 tygodni. Zaobserwowano rozmaite struktury osadzone na podłożu stałym, które trudno odnieść do eksperymentów wykonanych w roztworze bez uczynienia szeregu hipotetycznych założeń. Niemniej jednak, można się zgodzić z obserwacją wyższego stopnia agregacji białka w obecności wyższych stężeń  $Zn^{2+}$ .



Prof. dr hab. Wojciech Bal  
wbal@ibb.waw.pl  
tel. +48225922370

Pozostałe dwie części Wyników dotyczą aktywności biomineralizacyjnej białka Nucb2 w modelu *in vitro*. Wykazano wpływ tego białka na morfologię i formę kryształów. Recenzentowi pozostaje zapytać, dlaczego nie zbadano wpływu jonów metali na tę aktywność Nucb2.

Dyskusję Doktorantka zaczyna od rekapitulacji procedur otrzymania białek i badań ich struktur w formie apo, a w następnych podrozdziałach omawia kolejno wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Opis wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  otrzymanych wieloma technikami jest spójny i zgodny z obecnością w obu badanych białkach dwóch tożsamyh domen EF-hand. Dyskusja konsekwencji biologicznych tego procesu jest jakościowo poprawna, choć wydaje mi się, że jednoznaczne odnośnienie obserwacji poczynionych dla białka uczestniczącego w mineralizacji skorupki jajka do procesów nowotworzenia i apoptozy jest nieco zbyt śmiało. Niestety dyskusja dla wiązania  $\text{Zn}^{2+}$  zasadniczo stanowi powtórzenie opisów z części wyników. Nie pokuszono się niestety nawet o próbę identyfikacji miejsc wiązania tego jonu w nesfatynie-3 pomimo uzyskania znacznej wiedzy na temat struktury formy apo. Bez takiej informacji ta część dyskusji jest zawieszona w próżni. Dyskusja na temat wiązania jonów  $\text{Mg}^{2+}$  przynajmniej zawiera propozycję, że jony te wiążą się do motywu EF-hand. Jest ona co prawda niezgodna z dotychczasową wiedzą na temat tego motywu, ale można było ją potwierdzić lub wykluczyć za pomocą prostego eksperymentu kompetycyjnego z jednoczesnym użyciem jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$ .

W krótkim Podsumowaniu Autorka na pierwszy plan wysuwa potrzebę analogicznych badań dla pozostałych nesfatyn i kwestię fosforylacji Nucb2 w związku z procesem biomineralizacji.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że zamieszczone powyżej uwagi krytyczne i wątpliwości dotyczące niektórych aspektów interpretacyjnych, które będą mogły zostać wyjaśnione podczas publicznej obrony, mają charakter drugorzędny i nie obniżają mojej wysokiej oceny ogólnej rozprawy. Stwierdzam zatem, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska p. mgr Anny Skorupskiej-Stasiak spełnia wymogi, stawiane przed rozprawami doktorskimi przez art. 186 i 187 ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wojciech Bal