



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Wiktor Koźmiński,

Wydział Chemii UW

kozmin@chem.uw.edu.pl,

tel: 22 5526519

Warszawa, 12 czerwca 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Skorupskiej-Stasiak

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Skorupskiej-Stasiak pod tytułem: „*Analiza molekularna Nukleobindyny-2 z Gallus gallus*”, w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, została wykonana w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej, a także na Wydziale Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca została wykonana w ramach „BioTechNan” – Programu Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii. Promotorami przedstawionej rozprawy doktorskiej byli: prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar, z Politechniki Wrocławskiej oraz prof. dr hab. Maciej Kozak, reprezentujący Uniwersytet imienia Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Praca zawiera 142 strony i została podzielona na pięć głównych rozdziałów, które zostały poprzedzone dwujęzycznym streszczeniem i (co pomocne w lekturze) spisem używanych skrótów. Na koniec następują: „Podsumowanie i perspektywy dalszych badań”, szczegółowy opis dorobku naukowego Autorki, spisy tabel oraz rysunków oraz, zawierający 271 pozycji spis cytowanej literatury. Uważam, że

praca napisana jest bardzo dobrze i klarownie, dając możliwość zrozumienia także czytelnikom reprezentującym inne specjalności. Nie dostrzegam także istotnych uchybień redakcyjnych i stylistycznych. Na pochwałę zasługuje czytelny podział na część literaturową i wyniki własne Doktorantki. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w czterech artykułach (Doktorantka jest pierwszym autorem trzech z tych prac) w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (indeksowanymi w bazie Web of Science), a także prezentowane były w szeregu wystąpieniach na konferencjach naukowych.

Tematem pracy Anny Skorupskiej-Stasiuk jest charakterystyka białka nukleobindyny-2 oraz jego podjednostki nesfatyny-3 z *Gallus gallus* (Kura bankiwy) na poziomie molekularnym. Temat ten jest bardzo ciekawy ze względu na wiele funkcji biologicznych, w których bierze udział badane białko.

W wyczerpującym i interesująco napisanym wstępie Autorka podaje krótki przegląd znanych właściwości i funkcji biologicznych nukleobindyny-2. W dalszym ciągu wstępu omawiane są szczegółowo znane informacje na temat wiązania przez to białko jonów metali, oddziaływań z DNA, udziału w procesach nowotworowych i biomineralizacji, na przykład w skorupkach jaj ptasich. Pytanie: czy to to ostatnie zagadnienie było przyczyną wyboru białka pochodzącego z *Gallus Gallus*, a nie ludzkiego?

Wstęp zawiera także omówienie ważnego zagadnienia białek inherentnie nieuporządkowanych (ang. IDP), lub zawierających takie fragmenty (IDR). Ich natywne nieuporządkowanie i plastyczność są obecnie przyjmowane jako kluczowe własności dla ich funkcji biologicznych. IDP nie mają stabilnej struktury trzeciorzędowej, a ich zmienność konformacyjna stanowi wyzwanie dla obowiązującego dotychczas paradygmatu łączącego strukturę z funkcją. Obecnie wiadomo, że IDP odgrywają kluczową rolę w wielu ważnych procesach komórkowych organizmów eukariotycznych. Strukturalna zmienność IDP wymaga zastosowania odpowiednich metod eksperymentalnych. Podstawowym problemem

opisu cząsteczek IDP jest zdefiniowanie przestrzeni konformacyjnej próbkowanej przez łańcuch polipeptydowy, a także charakterystyka jego równowag konformacyjnych opisywanych często jako „preferencje konformacyjne”.

Po dającym Czytelnikowi rozeznanie w problemach dotyczących tematyki pracy wstępie, Autorka sformułowała cele pracy, którym jest przede wszystkim charakterystyka nukleobindyny-2 na poziomie molekularnym. Szczegółowe cele obejmowały: opracowanie niezbędnej do dalszych prac procedury ekspresji i oczyszczania badanych białek, ich biochemiczną charakteryzację obejmującą oddziaływania z jonami metali, a także próbę zbadania udziału nukleobindyny-2 w procesie biomineralizacji. Uważam, że cele te były ambitne i zostały z powodzeniem zrealizowane.

W rozdziale 3 „Materiały i metody”, Autorka szczegółowo opisuje techniki zastosowane w pracy. Opis jest kompletny i kompetentny, nie wymaga więc dalszego komentarza.

Największą część pracy (rozdział 4) zajmuje opis wyników. Rozpoczyna się on od szczegółowego opisu procedur prowadzących do ekspresji w bakteriach *E.coli* i oczyszczania próbek wybranych białek. Na kolejnych stronach opisana jest analiza bioinformatyczna nukleobindyny-2 i nesfatyny-3 wskazująca na obecność nieuporządkowanych fragmentów tych białek. Wniosek ten potwierdzają opisane następnie badania za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego, wskazując ponad to na zmiany strukturalne pod wpływem jonów metali. W dalszej kolejności opisane są eksperymenty pomiarów fluoroscencyjnych, proteolizy badanych białek, wymiany H-D za pomocą spektroskopii mas (pokazującej dostępność protonów amidowych dla rozpuszczalnika), wirowania analitycznego, którego wyniki świadczą o anomalnie dużym promieniu hydrodynamicznym powodowanym przez nieuporządkowane fragmenty, wyniki te zostały uzupełnione za pomocą niskokątowego rozpraszania promieni rentgenowskich. Do analizy oddziaływań badanych białek z jonami metali użyto także metod kalorymetrycznych, co

pozwoiliło oszacować parametry termodynamiczne tych oddziaływań. Ostatnią część opisu uzyskanych wyników stanowi badanie morfologii oligomerów nukleobindyny-2 za pomocą mikroskopii elektronowej oraz opis badań biomineralizacji wapnia in-vitro w obecności nukleobindyny-2. Tu okazało się, że obecność nukleobindyny znacząco wpływa na tworzenie się kryształów poprzez zmianę ich wielkości i zaokrąglenie krawędzi. Na koniec zostały opisane eksperymenty mapowania za pomocą spektroskopii Ramana odmian polimorficznych powstających kryształów. Pytanie: czy miałyby znaczenie dodatki jonów fosforanowych, wprawdzie niezbyt obecnych w skorupkach jaj, ale w dużych ilości występujących w kościach?

W rozdziale 5 Autorka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników. Badane białka okazały się być w istotnym stopniu białkami nieuporządkowanymi, a charakter ich oddziaływań z jonami metali dość złożony. Rozdział 6 przedstawia perspektywy dalszych badań, w szczególności ciekawy wydaje się kierunek badań fosforylacji, co możliwe jest także in-vitro.

W pracy używano białka kurzego, pytanie: czy byłoby istotne porównanie z białkiem ludzkim? Może warto sprawdzić czy rzeczywiście niewielkie zmiany w sekwencji białka kurzego wpływają na biomineralizację wapnia?

Uzyskane wyniki pokazały, że oddziaływania z jonami wapnia, magnezu i cynku różnią się, w szczególności jony cynku powodują wytrącanie się nukleobindyny-2 z roztworu. Czy we wszystkich eksperymentach aniony były takie same? Czy były brane pod uwagę tak zwane „serie Hofmeistera”, które pokazują wpływ różnych jonów na rozpuszczalność białek?

Choć doktorantka wykonała wielką pracę eksperymentalną stosując bardzo wiele różnych technik biochemicznych i biofizycznych, nie mogę powstrzymać się od komentarza, (niczym nie umniejszającego jakości niniejszej pracy), że bardzo ciekawym mogłoby okazać się użycie spektroskopii NMR (choć zapewne mogłoby to stać się podstawą kolejnego doktoratu). Z opisu wynika, że możliwe jest

uzyskanie kilku miligramów białek z ½ litra hodowli, po dalszej optymalizacji mogłoby być możliwe otrzymanie istotnych ilości białek znaczonej izotopowo. Wielkość nesfatyny-3 powinna pozwolić na użycie klasycznych eksperymentów NMR i schematów znakowania, choć być może konieczne byłoby deuterowanie reszt bocznych. Białka wielkości nukleodindyny-2 o całej długości (i większe) także można badać za pomocą NMR, z pewnością wymagałoby deuterowania reszt bocznych a także wprowadzenia ^{13}C jedynie w grupach metylowych niektórych aminokwasów (ILVM). Spektroskopia NMR umożliwia badania białek na poziomie atomowym, na przykład przypisać szybkość wymiany protonów amidowych do konkretnego aminokwasu czy ustalić miejsca wiązania jonów metali i innych cząsteczek.

Podsumowując, chciałbym z pełnym przekonaniem stwierdzić, że przedłożona praca spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2021 r. poz. 478 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr Anny Skorupskiej-Stasiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam także, że znaczenie prowadzonych badań, uzyskane nowe wyniki i wkład pracy Doktorantki uzasadniają wniosek o wyróżnienie rozprawy.

