



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

Warszawa, 2 lipca 2023

dr hab. Joanna Sułkowska, prof. UW
Centrum Nowych Technologii
Uniwersytetu Warszawskiego
E: jsulkowska@cent.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej pani magister Klaudii Białek

pt. „Otulina-1 – białko biomineralizacji ludzkich otokoniów i rybich otolinów”

Biomineralizacja jest procesem podlegającym ścisłej kontroli fizjologicznej, w wyniku której organizmy żywe wytwarzają struktury mineralne pełniące różne funkcje. Wśród kręgowców strukturami biomineralnymi są otolity i otokonia zbudowane z biogenicznego węgla wapnia, które pełnią np. rolę sensorów grawitacji. Otolity i otokonia posiadają 10% macierzy organicznej, w której składniki białkowe odgrywają kluczową rolę w ich powstawaniu. W przypadku ludzkich otokoniów i rybich otolitów w skład macierzy organicznej wchodzi białko otulina-1, białko z rodziny białek C1q. Zrozumienie mechanizmów potencjalnych różnic w funkcjonowaniu tych białek w organizmach ludzkich i rybich ma znacznie nie tylko dla poszerzenia wiedzy podstawowej na temat własności biochemicznych determinujących mechanizm ich działania, ale też może mieć wpływ na poprawę jakości naszego życia. Otulina-1 jest otokonią specyficzną dla ucha wewnętrznego, poznanie molekularnych podstaw działania poszczególnych składników macierzy organicznej otolitów i otokoniów jest niezbędne do zrozumienia mechanizmów ich mineralizacji i np. chorób związanych z uchem wewnętrznym. Podstawowe mechanizmy działania otoliny-1 w pewnym stopniu zostały scharakteryzowane na podstawie badań nad *Danio rerio*, ryby słodkowodnej, która jest organizmem modelowym do badania m.in. chorób ucha człowieka. W rozprawie doktorskiej Autorka dokonuje analizy porównawczej otoliny-1 z *Danio rerio* oraz *Homo sapiens* w obecności naturalnego liganda – jonów wapnia oraz bada w jaki sposób różnice w sekwencji aminokwasowej wpływają na ich podstawową funkcję - mineralizacji węgla wapnia in vitro. Temu zagadnieniu jest poświęcona rozprawa doktorska magister inż. K. Białek, która została wykonana w dwóch laboratoriach pod kierunkiem specjalistów w tej dziedzinie – profesora dr. hab. Piotr Dobryszczyckiego oraz profesora dr. hab. Jarosława Stolarskiego.

Główną część rozprawy stanowi 7 rozdziałów (96 stron). Każdy z rozdziałów jest napisany w sposób jasny i klarowny. Wstęp zawiera wszechstronny i aktualny przegląd literatury uwzględniający różne aspekty związane z tematyką rozważaną w rozprawie. Kolejna część określa cele pracy. W kolejnym rozdziale są szczegółowo wypisane użyte materiały doświadczalne wraz z adnotacją, które są dostępne komercyjnie a które zostały wytworzone na potrzeby prac przeprowadzonych w doktoracie. W następnym czwartym rozdziale (20 stron) są omówione najważniejsze metody zarówno teoretyczne i doświadczalne stosowane w pracy wraz z komentarzem o ich możliwościach i ograniczeniach. Kolejny piąty rozdział charakteryzuje otrzymane wyniki, a rozdział szósty to obszernie podsumowanie. Ostatni rozdział to krótka dyskusja oraz zaprezentowania możliwych dalszych badań. Główna część pracy jest poprzedzona podziękowaniami, wykazem najważniejszych skrótów, streszczeniem w języku polskim oraz angielskim. Praca jest zakończona spisem rysunków i tabel, następnie zaprezentowaniem dorobku naukowego, który zawiera wykaz publikacji Autorki, na których oparta jest rozprawa (4 pozycje główne, jedna praca w recenzji oraz wpisu do internetowej encyklopedii). Cztery prac stanowiące podstawę rozprawy zostały opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach z listy ISI (Biochemica et Biophysica Acta, Biomolecules, International Journal of Biological Macromolecules, Crystal Growth Design). W trzech publikacjach pani Klaudia Białek jest pierwszym autorem. Dorobek autorki zawiera też wykaz prezentacji konferencyjnych, staży naukowych (realizacje ważnych elementów badań wchodzących w skład zaprezentowanych wyników) oraz otrzymanych stypendiów. Na końcu tekstu rozprawy znajdują się dodatek (zawierający użyte wyniki analizy bioinformatycznej, modele struktury otrzymane z danych CryoEM, zdjęcia kontrolnych kryształów wapna), spis literatury (około 261 pozycji, pozycje nie są numerowane). Językiem rozprawy jest język polski.

Przedstawione w rozprawie wyniki są praktycznie w całości zawarte w opublikowanych już publikacjach. Implikuje to, że zostały pozytywnie recenzowane przez anonimowych ekspertów z danej dziedziny. Oznacza to, że moja rola jako recenzenta sprowadza się głównie do stwierdzenia, czy waga przeprowadzonych prac jest wystarczająca do nadania Autorce stopnia doktora nauk chemicznych. Uważam, że przedstawiony materiał jest w pełni wystarczający do nadania tego stopnia. Niemniej jednak pozwolę sobie wypisać poniżej kilka uwag oraz pytań merytorycznych dotyczących zagadnień teoretycznych, na których znam się lepiej niż prace doświadczalne.

W rozdziale pierwszym Autorka w sposób bardzo dokładny i wszechstronny opisuje aspekty biochemiczne oraz chemiczne potrzebne do zrozumienia podstaw biomineralizacji, wyjaśnia co to biomateriały. Opisuje zasady działania ucha wewnętrznego i jego biomateriały, które są podstawą przeprowadzonych badań – otolity oraz otokoniu. Następnie Autorka skupia się na omówieniu białka otuliny-1 z punktu widzenia różnorodności sekwencji w wybranych organizmach saków (3 organizmy) i ryby (jeden). Można się domyślać, iż ten wybór jest podyktowany dalszą analizą porównawczą tylko dwóch organizmów. Niemniej jednak analiza różnorodności sekwencji z punktu widzenia innych organizmów mogła by pomóc w dokładniejszym zrozumieniu roli poszczególnych aminokwasów ich wpływu na strukturę przestrzenną czy wiązanie jonów wapna. Autorka przytacza też przykłady zastosowań

biomateriałów w przemyśle oraz przedstawia interdyscyplinarne aspekty projektu. Właśnie tej tematyce jest poświęcona ostatnia część wstępu. W rozdziale drugim zostały sformułowane cele pracy. W kolejnych rozdziałach o tytułach materiały i metody Autorka po pierwsze skrupulatnie wypisuje materiały użyte do przeprowadzenia szeregu eksperymentów oraz ich pochodzenie (komercyjne lub wytworzone na potrzeby przeprowadzanych badań). Po drugie opisuje bardzo dokładnie prawie wszystkie metody zastosowane w badaniach. Uważam, że rozdziały są bardzo istotne, gdyż przedstawiają wszystkie potrzebne do zrozumienia wyników metody (a jest ich bardzo dużo) wraz z podstawą teoretyczną, na której bazują zastosowane techniki doświadczalne. Zawartość tych rozdziałów pozwala wyodrębnić znane techniki od metod opracowanych na potrzeby badania białek oraz jawnie przedstawia, które pomiary zostały wykonane samodzielnie, z pomocą ekspertów albo zlecone (zakładam, że tak jest w przypadku podania tylko instytucji). Ta część została także moim zdaniem bardzo dobrze skonstruowana, niemniej jednak może warto byłoby też skomentować ograniczenia używanych metod. W piątym i szóstym rozdziale, w sposób bardzo obszerny są omówione wyniki oraz główne osiągnięcia wraz z dyskusją. Moim zdaniem wyniki doświadczalne są rzetelnie opisane i dowodzą, iż badane białka, mimo że sekwencyjnie podobne wykazują różne własności biochemiczne/biofizyczne. Wydaje mi się, że tutaj jednak nie został w pełni wykorzystany potencjał podejścia bioinformatycznego, badań proteomicznych czy modelowania kompleksów białkowych uwzględniając np. metody ko-ewolucji. Widoczna jest też pewna niekonsekwencja w dobrze sekwencji i organizmów modelowych. Może to wynikać, z faktu, iż trudno być ekspertem w dwóch bardzo różnych tematach: badania doświadczalne i zaawansowane metody bioinformatyczne. Autorka mogła by doprecyzować w jaki sposób dobrała sekwencje, czy weryfikowała teoretycznie oddziaływania między białkiem OMM-64 a otuliną (czy da się zadokować te dwie struktury do siebie, utworzyć kompleks), czy na podstawie otrzymanej struktury otoliny z *Danio rerio* nie można by przewidzieć struktury ludzkiego białka (zakładam, że nie udało się wyznaczyć struktury doświadczalnie)? W pracy można znaleźć kilka przejęzyczeń. Niemniej te niuanse nie wpływają na moją bardzo dobrą ocenę pracy.

Podsumowując, rozprawę doktorską p. magister Klaudii Białek uważam za bardzo dobrą. W celu zrealizowania postawionych sobie celów Autorka wykazała się nie tylko zaawansowaną wiedzą z zakresu chemii, biochemii, metod ekspresji i oczyszczania białek, ale też bioinformatyki i biologii strukturalnej. Ta wiedza i umiejętności pozwoliły na opracowanie metod nadekspresji bakteryjnych białek otololina-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* a w konsekwencji wykazanie, iż pomimo dużego podobieństwa sekwencyjnego analizowane ortologii charakteryzują różne własności biochemiczne/biofizyczne. Oba białka mają tendencje do oligomeryzacji, jednakże jej zakres zależy od stężenia jonów wapnia oraz potencjału oksydacyjno/redukcyjnego środowiska. Wykonana przez Autorkę charakterystyka porównawcza jest wszechstronna, dokładna i moim zdaniem krytyczna. Należy tutaj nadmienić, iż podejście hybrydowe łączące analizę bioinformatyczną z badaniami doświadczalnymi pozwoliło autorce na tworzenia własnych rozwiązań, indywidualnego doboru metod i testowania wyników. Wymienione powyżej uwagi krytyczne nie umniejszają wartości pracy. Rozprawa i opisane w niej wyniki otrzymane przez Panią Klaudię Białek spełniają wymagania ustawowe określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2021 poz. 478), jak również zwyczajowe standardy stawiane

rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk chemicznych. Dlatego z przekonaniem zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie p. mgr inż. Klaudii Białek do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Joanna Sułkowska, prof. UW