

Warszawa, 30.06.2023

dr hab. Anna Niedźwiecka, prof. IF PAN
Środowiskowe Laboratorium Fizyki Biologicznej
Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Klaudii Bielak zatytułowanej
„Otolina-1 - białko biomineralizacji ludzkich otokoniów i rybich otolitów”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Klaudii Bielak została wykonana w Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej Katedry Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej oraz w Instytucie Paleobiologii im. Romana Kozłowskiego Polskiej Akademii Nauk. Promotorami pracy są prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki z Politechniki Wrocławskiej i prof. dr hab. Jarosław Stolarski z Instytutu Paleobiologii PAN. Badania białek uczestniczących w biomineralizacji prowadzone są w grupie prof. Piotra Dobryczyckiego od dłuższego czasu i doczekały się już wielu publikacji wielokrotnie cytowanych w literaturze międzynarodowej. Praca doktorska mgr inż. Klaudii Bielak jest więc istotną kontynuacją ogólnego nurtu badań nad białkami w tym zespole, a dotyczy bardzo ważnego zjawiska, jakim jest mechanizm molekularny biomineralizacji otokoniów człowieka i otolitów ryby.

Biominały wyróżniają się spośród materiałów kompozytowych z powodu szczególnych własności mechanicznych i hierarchicznej budowy, wynikających z obecności frakcji organicznej i nieorganicznej w jednej strukturze. Za cel pracy Doktorantka obrała szeroko zakrojoną charakterystykę otoliny-1 z dwóch organizmów: modelowej ryby *Danio rerio* i człowieka. Szczegółowe cele pracy to: opracowanie procedury nadekspresji i oczyszczania tych dwóch białek, ich charakterystyka molekularna metodami biofizycznymi, zbadanie oddziaływania z jonami Ca^{++} , a także procesów biomineralizacji pod wpływem tych białek. Dodatkowo, Doktorantka podjęła się bardzo ryzykownego zadania zbadania proteomu

otolitów kopalnych sprzed 2-5 milionów lat we współpracy z Jeaną Drake z Department of Atmospheric and Oceanic Sciences, University of California w Los Angeles. Tematyka badań stanowiła zatem zagadnienie wyjątkowo wieloaspektowe, obejmujące techniki i metody od biologii molekularnej, poprzez biochemię, aż do biofizyki molekularnej, w tym mikroskopię krioelektronową. Zadanie było tym trudniejsze, że badane białko ma charakter częściowo globularny, częściowo kolagenowy, a badania obejmowały zarówno białka rekombinowane, ekstrahowane z próbek współczesnych i kopalnych.

Formalna ocena rozprawy

Praca doktorska, z której dowiedziałam się wielu ciekawych faktów, jest napisana prostą i poprawną polszczyzną, w formie tradycyjnej rozprawy. Ma układ typowy dla publikacji naukowych: *Wstęp*, *Cel*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja* jako osobny rozdział, *Podsumowanie i perspektywy dalszych badań* oraz *Bibliografia* obejmująca około dwieście czterdzieści nienumerowanych pozycji w układzie alfabetycznym. Praca liczy sto dwadzieścia osiem stron i jest opatrzona *Spisem treści*, *Spisem skrótów*, których nazwy rozwinięte zostały w języku angielskim i polskim, *Streszczeniem* w języku polskim i angielskim, *Spisem rysunków i tabel*, podsumowaniem *Dorobku naukowego* oraz *Dodatkiem* zawierającym szczegóły i surowe dane eksperymentalne. Zawiera wszystkie elementy pozwalające ocenić zakres wykonanych badań i osiągniętych wyników, w tym trzydzieści dziewięć, często wielopanelowych, rysunków i szesnaście tabel, które są odpowiednio zaadresowane i przedyskutowane w tekście.

Poza kilkoma drobnymi potknięciami językowymi, które z obowiązku wymieniam pod koniec recenzji, język pracy jest poprawny gramatycznie i interpunkcyjnie, a jednocześnie logiczny, jasny i precyzyjny. Autorka zapewnia również szerokie tło literaturowe oraz opisy do rysunków.

Wstęp obejmuje wyczerpujący przegląd danych literaturowych, z akcentem na aspekt biomedyczny badanych zjawisk. Cele szczegółowe, nadające pracy charakter

interdyscyplinarne, są jasno sformułowane. Użyte materiały zidentyfikowane są precyzyjnie w praktycznych tabelach. Metody zostały opisane bardzo szczegółowo.

Od strony formalnej byłoby dobrze uzupełnić informację, co znaczy określenie, że badania zostały wykonane „we współpracy”: czy Doktorantka osobiście przeprowadzała eksperymenty pod kierunkiem współpracowników z innych jednostek, czy asystowała przy pomiarach wykonywanych przez inne osoby, czy analizowała dane pomiarowe, czy tylko przekazała próbki do badań i w rozprawie opisała ich wyniki. W kwestii praw autorskich, podczas obrony chciałabym się upewnić, że Autorka posiada zgodę wydawcy na powtórne (po zmianie opisów) wykorzystanie w swojej pracy doktorskiej rysunków opublikowanych uprzednio w artykułach naukowych. Notkę o posiadanej zgodzie można umieścić w podpisie rysunku analogicznie jak w artykułach przeglądowych lub zgodę wydawcy załączyć w postaci ostatnich stron pracy doktorskiej.

Podsumowując aspekty formalne, mimo powyższych uwag, uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Klaudii Bielak została przygotowana skrupulatnie i moja ogólna ocena strony formalnej jest bardzo dobra.

Ocena merytoryczna pracy

Pierwszym osiągnięciem Doktorantki, które umożliwiło przeprowadzenie dalszych badań, było otrzymanie i oczyszczenie dwóch rekombinowanych białek, co wymagało opracowania własnych protokołów. Ostatecznie Doktorantka uzyskała wydajność czystych białek rzędu 1-5 mg/l, co umożliwiło przeprowadzenie dalszych badań.

Doktorantka przeprowadziła analizę bioinformatyczną otoliny-1 wykazując, że ma ona cechy białka kolagenowego. Rozprawa doktorska oparta jest jednak głównie na badaniach doświadczalnych. Jedną z wybranych przez Doktorantkę metod pomiarowych jest spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), oparta na efekcie Cottona, który w tzw. dalekim ultrafiolecie (180-260 nm) dla cząsteczki białka zależy sumarycznie od konfiguracji i konformacji wszystkich wiązań peptydowych a w tzw. bliskim ultrafiolecie niesie pewną

informację o grupach aromatycznych i cysteinyłowych. Doktorantka wykonała szereg czasochłonnych pomiarów i dekonwolucję widm CD za pomocą programu CDNN, które dostarczyły wyników ilościowych. Chciałabym tutaj zwrócić uwagę na pewną nadinterpretację, gdyż immanentnym ograniczeniem CD jest to, że sygnały pochodzące od poszczególnych form struktury drugorzędowej białek - poza regularną helisa alfa - są mało charakterystyczne i niejednoznaczne, a dodatnie oraz ujemne wkłady do widma wypadkowego mogą się wzajemnie niwelować, dlatego rozkład widma CD na składowe ze swej natury obarczony jest dużą niepewnością. Jest tak w szczególności dla spirali poliprolilowej II, której widmo CD może być podobne do kłęбка statystycznego (np. Micsonai A. *et al.*, *Disordered-Ordered Protein Binary Classification by Circular Dichroism Spectroscopy*. **Front Mol Biosci.** 2022; 9:863141), o czym Doktorantka świadomie pisze. Nawet dla białek wzorcowych, wyznaczona z CD zawartość poszczególnych struktur drugorzędowych różni się od danych krystalograficznych lub NMR o co najmniej parę % (np. Greenfield NJ. *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. **Nat Protoc.** 2006; 1(6): 2876-90). Należy zatem z ostrożnością podchodzić do wyników liczbowych i wątpię, aby udział poszczególnych struktur mógł być wyznaczony z dokładnością do 0,1% (jak podaje użyty program). Byłoby ciekawe zobaczyć porównanie wyników liczbowych otrzymanych przez aktualnie najbardziej wiarygodny serwer BeStSel: <https://bestsel.elte.hu/> . Podsumowując, analiza CD przeprowadzona przez Doktorantkę wykazała, że w strukturze drugorzędowej otoliny-1 zarówno z organizmu człowieka, jak i ryby kilkanaście % stanowią helisy alfa, prawie 30% harmonijki beta, prawie 20% zwroty (skręty beta) oraz prawie 40% inne struktury, zawierające również spiralę poliprolilową II.

Kolejnym zadaniem podjętym przez Doktorantkę było zbadanie oligomeryzacji za pomocą metod hydrodynamicznych: elektroforezy żelowej i ultrawierowania analitycznego metodą prędkości sedymentacji, z użyciem stabilizatora w postaci odczynnika BS³ sieciującego kowalencyjnie oraz po zredukowaniu mostków disiarczkowych. Oba podejścia doświadczalne wykazały, że obie otoliny-1 mogą występować jako monomery i jednocześnie wiele wyższych form oligomerycznych, których rodzaj zależy od warunków redukujących.

Jednym z najbardziej ambitnych celów pracy było otrzymanie trójwymiarowego modelu struktury otoliny-1 przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej, najpierw przy użyciu kontrastu, a następnie w warunkach niskotemperaturowych. Wyniki obrazujące oligomery w postaci „wachlarza”, jak również model pojedynczego obiektu w postaci dimeru trimerów uważam za bardzo interesujące.

W kolejnym kroku Autorka zbadała wpływ jonów wapnia na stabilność termiczną otoliny-1, wykazując, iż pod wpływem wapnia pojawia się drugi proces na ścieżce denaturacji przy temperaturach sięgających prawie 100 °C, a pierwszy - zachodzący przy temperaturach około 40 °C wraz ze wzrostem stężenia wapnia zanika. Autorka nie wyznaczyła ze zmierzonych krzywych sigmoidalnych parametrów termodynamicznych (molowej zmiany entalpii i entropii), a tylko temperatury topnienia. W tym miejscu miałabym pytanie, czy rzeczywiście na Rysunku 20. zaprezentowano krzywe opisujące stosunek intensywności emisji fluorescencji mierzonej przy 350 nm do 330 nm, czy odwrotnie. Ponieważ widmo emisyjne fluorescencji pierścienia indolu zależy od stałej dielektrycznej mikrootoczenia, grupy boczne tryptofanu zagrzebane w hydrofobowym wnętrzu cząsteczki białka lub agregatu dają widmo o maksimum przy krótszych długościach fali (ok. 330 nm), a wyeksponowane do wody przy dłuższych (ok. 350 nm), o czym Autorka zresztą pisze. Jeśli więc rzeczywiście widzimy przejście dwustanowe polegające na spadku wartości $I(350)/I(330)$, to znaczy, że na skutek takiego przejścia wzrasta emisja przy 330 nm względem emisji przy 350 nm, co oznaczałoby zagrzebywanie reszt tryptofanów w środowisku hydrofobowym, czyli raczej agregację, niż denaturację, która grupy boczne powinna eksponować do wody. Jeśli tak jest w istocie, to wymagałoby przedyskutowania jako efekt nietrywialny. Spodziewam się jednak, że na wykresach przedstawiony jest omyłkowo sygnał odwrotny, czyli $I(330)/I(350)$, opisujący kolejne stopnie dysocjacji oligomerów lub denaturacji domen.

Podczas gdy w eksperymentach dotyczących wpływu jonów wapnia na strukturę drugo- i trzeciorzędową nie uwidacznia się różnica pomiędzy białkiem człowieka i ryby, wpływ ten jest bardzo widoczny w odniesieniu do struktury czwartorzędowej. Podobnie jak w wynikach otrzymanych metodą ultrawirowania analitycznego, w doświadczeniach filtracji

żelowej białka te różnią się rozkładem oligomerów, a białko człowieka jest stosunkowo odporne na zmianę stężenia wapnia. To kolejny bardzo ważny wniosek z tej pracy.

Kolejnym krokiem było sprawdzenie przez Doktorantkę, jaka jest morfologia i sieć krystaliczna kryształków węglanu wapnia powstających w obecności badanych białek, co zostało sprawdzone za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, mikroskopii fluorescencyjnej, przy użyciu wzbudzenia dwufotonowego, mikroskopii konfokalnej oraz ramanowskiej. Wykazano inkorporację białka do kryształków, powstawanie większej liczby tarasów na powierzchniach ich wzrostu oraz strukturę krystaliczną kalcytu w obecności badanych białek. Nie mogę się natomiast zgodzić ze stwierdzeniem dotyczącym Rysunku 31 (oraz wniosku powtórnego w Dyskusji) o tym, że depozyty dOto1 są widoczne na powierzchni kryształu, podczas gdy nie obserwuje się analogicznych depozytów dla hOto1. Po pierwsze, na poprzednim Rysunku 30. Autorka pokazuje, iż oba białka są jakościowo jednakowo inkorporowane do wnętrza kryształów, a obecne w mniejszym stopniu na powierzchni, a po drugie panele dolne Rysunku 31. dla dOto1 i hOto1 również jakościowo wyglądają identycznie.

Niezwykle cenny jest rozdział poświęcony badaniom białek kopalnych z otolitów ślepiora *Gadiculus argenteus*. Jakkolwiek odkryto tylko pojedyncze peptydy, jest to wielkie osiągnięcie zważywszy na trudność i żmudność procesu ekstrakcji oraz brak adekwatnej bazy danych peptydów organizmów sprzed milionów lat. W opisie celów pracy zabrakło uzasadnienia podjęcia badań akurat na otolitach karpia *Cyprinus carpio*, domyślam się, że był to materiał testowy użyty w celu optymalizacji metody przed sięgnięciem, z powodzeniem, po cenną próbkę kopalną. Dodatkowym wynikiem tych badań jest empiryczne potwierdzenie istnienia izoform białka otoliny-1 karpia przewidzianych dotychczas tylko jako hipotetyczne na podstawie genomu. To również wielki wkład w wiedzę o białkach i ewolucji.

Dyskusja następująca po omówieniu wyników jest wyczerpująca i wyjaśnia wszelkie pytania, które rodziły się podczas czytania wyników. Podsumowanie jest bardzo klarowne, a po nim następuje ambitny plan dalszych badań i wyniki wstępne do nich.

Podsumowując ocenę merytoryczną, uważam, że postawione przez Doktorantkę cele pracy zostały osiągnięte z nawiązką.

Mocne strony pracy

Na podkreślenie zasługują następujące fakty:

1. otrzymanie dwóch trudnych do ekspresji białek na podstawie własnych protokołów,
2. interdyscyplinarność pracy, imponujące spektrum komplementarnych metod badawczych, które Doktorantka używa ze zrozumieniem,
3. wyznaczenie struktury przestrzennej i najbardziej prawdopodobnego stanu oligomerycznego otoliny-1 jako dimeru trimerów na podstawie cryoTEM, udowodnienie stabilizującej roli jonów wapnia dla wyższych form oligomerycznych;
4. identyfikacja dwóch białek kopalnych zaangażowanych w biomineralizację otolitów; potwierdzenie istnienia białek karpia przewidzianych wcześniej jako hipotetyczne na podstawie sekwencjonowania genomu;
5. krytyczne myślenie, staranność wykonania pomiarów i opisu eksperymentów,
6. czytelne rysunki, ciekawie i prosto napisany tekst, dyskutowanie wyników pod różnymi aspektami, odniesienia do literatury biomedycznej, szerokie horyzonty wiedzy w swojej dyscyplinie,
7. ogromny wkład pracy w wiele różnorodnych tematycznie i metodologicznie zadań.

Słabe strony pracy

Praca jest merytorycznie bardzo dobra zarówno pod względem koncepcji i wykonania, jak i opisu językowego. Nie znalazłam żadnych poważnych błędów merytorycznych. Moje uwagi mają charakter wyłącznie uzupełniający i nie kwestionują wyników. Poza wcześniejszymi pytaniami, pewien niedosyt pozostawia:

1. pewien brak krytycyzmu w przytaczaniu koncepcji występujących w literaturze: ani PILP (*polymer induced liquid precursor*), ani PNC (*prenucleation cluster*) nie są dobrze zdefiniowanymi i udowodnionymi stanami czy procesami. Koncept PILP wprowadzony przez L. Gower jest forsowany głównie przez jej grupę, podczas gdy koncept PCN wprowadzony przez D. Gebauera jest forsowany głównie przez to środowisko. Nie ma jasności, czy jest to ten sam stan, czy inne (kolejne) stany na współrzędnej reakcji na drodze niekanonicznej krystalizacji z ACC. Publikacje stwierdzające ich „istnienie” pokazują *de facto* tylko obiekty już „po fakcie” interpretowane w kategoriach PILP lub w PNC symulacjach komputerowych. Osobiście myślę, że mogą to być konkurencyjne pomysły na opis pewnego stanu przejściowego, którego natura jest jeszcze dość słabo poznana;
2. Mówiąc o odmianach polimorficznych węgla wapnia byłoby dobrze pokazać ich sieć krystaliczną;
3. Byłoby dobrze również zobaczyć wyniki EDS SEM;
4. Drobnym błędem merytorycznym jest określenie „sferyczne kryształy kalcytu”. Sferulity są mezokryształami, czyli obiektami polikrystalicznymi, złożonymi z wielu mikrokryształków ułożonych w postaci sferycznej, nie jest to jeden „kryształ sferyczny”;
5. Stechiometrię wyznakowania białka jest trudno oznaczyć, gdyż barwnik przyłączony do białka i swobodny ma jednakowe widmo absorpcji; jaką metodą usuwano pozostałość barwnika: SEC na Superdexie 200 10/30, SEC na kolumnkach wirówkowych, czy dializą?
6. Z obowiązku recenzenckiego poniżej wymieniam pojedyncze, drobne błędy językowe:
 - str. 21. osteopontyna, powinno być osteopontyna;
 - str. 26. knockout, powinno być kursywą, w cudzysłowie albo polski odpowiednik;
 - str. 32. „znaczący wpływ” trzykrotnie w jednym akapicie;
 - str. 47. elektrospray, albo elektrosprej albo *electrospray*;
 - str. 63. ujemne maksimum - to minimum, a dodatnie maksimum to po prostu maksimum;
 - str. 64. Tabela 10. i dalej 11. w j. polskim miejsca dziesiąte oddzielamy przecinkiem;
 - str. 68. tekst o Nagrodzie Nobla za cryoEM lepszy do Wstępu, nie do Wyników;
 - str. 97. za powodzeniem;
 - str. 107. nie „płaszczyzny oddziaływania”, gdyż jest to pojęcie geometryczne, lecz powierzchni oddziaływania;

Podsumowanie

Pracę doktorską oceniam jako bardzo dobrą. Konsekwentne użycie zastosowanych metod doprowadziło Doktorantkę do otrzymania wartościowych wyników. Zostały one opublikowane w czterech artykułach w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Na szczególne podkreślenie zasługują artykuły w BBA General Subjects 2023, Int. J. Biological Macromolecules 2022 i Cryst. Growth Design 2021. Cele pracy doktorskiej zostały osiągnięte w krótkim czasie, uwzględniając pandemię. Doktorantka prezentowała wyniki na wielu międzynarodowych konferencjach, w tym dwa razy na FEBS Congress i na sympozjum biomineralizacyjnym w Monachium oraz odbyła trzymiesięczny zagraniczny staż naukowy na Uniwersytecie Kalifornijskim w Los Angeles.

Podsumowując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) oraz regulamin nadawania stopni naukowych i kryteria zwyczajowe, wobec czego wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej *Nauki Chemiczne* Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Klaudii Bielak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie podkreślając szeroki wachlarz podjętych zagadnień od biotechnologii, biologii molekularnej i biochemii, poprzez biologię strukturalną i biofizykę do paleoproteomiki, oraz różnorodność podejść metodologicznych i opublikowanie wyników w wysoko punktowanych czasopismach naukowych wnoszę również o wyróżnienie rozprawy.



Anna Niedźwiecka