



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 20 grudnia 2022 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Katedra Biofizyki,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Beaty Rysiewicz
pt. „Znaczenie N końcowego fragmentu Gai3 w procesie lokalizacji błonowej
trimerycznego białka G”**

W mojej opinii trudno, przecenić jest znaczenie białka G pośredniczącego w przekazywaniu sygnałów ze środowiska zewnętrznego do wnętrza żywej komórki, przez co stanowiących ważne ogniwo procesów regulacyjnych w organizmach. Polipeptydami wiążącymi białko G są również liczne receptory błonowe, w tym odpowiedzialne za procesy widzenia. Okazuje się również, iż receptory błonowe wiążące białko G są celem farmakologicznym wielu leków, co czyni tematykę badawczą podjętą w ramach pracy doktorskiej pani mgr Beaty Rysiewicz nie tylko bardzo interesującą z powodów poznawczych, ale również bardzo istotną w aspekcie praktycznym. W ramach projektu doktorskiego podjęta została bowiem próba szczegółowego wyjaśnienia roli jaką odgrywa N końcowy fragment podjednostki Gai3 w formowaniu funkcjonalnej struktury supramolekularnej białka G w środowisku

membranowym. Cel ten, jest moim zdaniem bardzo ambitny i doskonale wpisuje się w oczekiwania międzynarodowej społeczności naukowej.

Praca doktorska pani mgr Beaty Rysiewicz wykonana została w Zakładzie Biochemii Fizycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kolektywnym kierunkiem pani prof. dr hab. Marty Dziedzickiej-Wasylewskiej oraz pani dr hab. Agnieszki Polit prof. UJ, pełniącej funkcję promotora pomocniczego. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 110 stronach standardowego maszynopisu, plus dodatkowe stronicę poświęcone zestawieniu cytowanego piśmiennictwa (248 pozycji na 22 stronach) oraz aneksom (przedstawionym na 13 stronach). Po wykazie skrótów, bardzo pomocnym w lekturze pracy, oraz streszczeniach opracowanych w językach polskim jak i angielskim, czyniącym zadość wymaganiom formalnym, Doktorantka zamieściła spis treści, stanowiący niejako przewodnik po dalszych częściach dysertacji. Zapewne w kategoriach „chochlika drukarskiego” skomentować można fakt, iż w spisie treści pozycja „Cel pracy” awansowała o kilkanaście stron w porównaniu z faktyczną treścią rozprawy. Osobiście, bardzo sobie cenię treści zamieszczone w ramach rozdziału zatytułowanego „Wstęp”, w ramach którego dokonano przeglądu najbardziej aktualnej wiedzy oraz poglądów dotyczących aspektów strukturalnych oraz funkcjonalnych białka G oraz receptorów GPCR. W ramach końcowej części tego rozdziału sformułowane zostały te cząstkowe, jak i strategiczny cel pracy doktorskiej, jakim było zbadanie znaczenia lipidacji białka G α 3, roli dimera G $\beta\gamma$ oraz regionu polizasadowego G α 3 na asocjację tego białka z błoną oraz formowanie funkcjonalnego kompleksu trimerycznego białka G. W ramach kolejnego rozdziału, zatytułowanego „Materiały i metody” Doktorantka przedstawiła szczegóły dotyczące uzyskiwania projektowanych polipeptydów oraz metody ich badania, w tym w oparciu o obrazowanie z zastosowaniem techniki FLIM. W moim odczuciu, poziom precyzji tych opisów w pełni odpowiada standardom prac naukowych. Według koncepcji Doktorantki, kolejny rozdział zatytułowany „Wyniki” zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą kolejne etapy projektu doktorskiego. Były to, między innymi,

zadania badawcze związane z uzyskaniem odpowiedniego wektora plazmidowego białka Gai3, obrazowaniem zmodyfikowanych białek fuzyjnych, pomiarami wewnątrzkomórkowego cAMP oraz badaniami oddziaływania białka Gai3 z lipidami *in vitro*. Poziom trudności zadań związanych bezpośrednio z projektowaniem oraz nadekspresją w komórkach odpowiednich konstruktów białkowych budzi mój najwyższy podziw i uznanie. Podkreślić chciałbym jednak również w tym miejscu bardzo wysoki poziom zaawansowania oraz kunszt obrazowania związanego z kolokalizacją oraz podejściem FLIM-FRET, opierającym się na precyzyjnych analizach bezpromienistego transferu energii wzbudzenia elektronowego pomiędzy fluoroforami integralnie związanymi z badanymi białkami w oparciu o analizy czasów zaniku fluorescencji. Uzyskane wyniki zinterpretowane zostały oraz poddane obszernej i wieloaspektowej dyskusji w ramach kolejnego rozdziału zatytułowanego „Dyskusja”. Końcowy fragment tego rozdziału, zatytułowany „Wnioski końcowe” zawiera zestawienie konkluzji z przeprowadzonych analiz, które zdaniem Doktorantki stanowią szczególnie o wartości pracy doktorskiej. Generalnie, w pełni zgadzam się z tym zestawieniem. Szczególnie interesujące oraz ważne z perspektywy poznawczej są w mojej opinii rezultaty wskazujące na kluczowe znaczenie lipidacji podjednostki Gai3 w jej lokalizacji błonowej a pośrednio w formowaniu funkcjonalnego kompleksu trimerycznego białka G. Kolejnym uzyskanym wynikiem podobnie wysokiej rangi jest, w moim odczuciu, ukazanie roli polizasadowego N-końca białka G α oddziałującego efektywnie na drodze sił elektrostatycznych z ujemnie naładowanymi fosfolipidami. Oddziaływania te wpływając w znacznym stopniu na lokalizację membranową białka modulować mogą szybkość całego łańcucha przekazywania sygnałów w komórce, którego element stanowi aktywność białka G.

Poza bardzo wysoką wartością merytoryczną pracy doktorskiej pani mgr Beaty Rysiewicz chciałbym również zwrócić uwagę na jej wysoki poziom edytorski, zarówno w aspekcie precyzji tekstu jak i jakości grafik. Mógłbym zaproponować Autorce nieliczne korekty. Poniżej zamieszczam ich krótką listę:

1. Cele szczegółowe wyliczane są na str. 18 począwszy od pozycji 2. zamiast 1.
2. W moim odczuciu, wzór zamieszczony na str. 38 nie jest poprawny. Składniki po prawej stronie znaku równości zawierają w liczniku dodawanie wielkości różniących się jednostkami (wielkości bezwymiarowe + sekundy).
3. W wielu miejscach pracy odwołania do rysunków w tekście zamieszczane są w mianowniku, np. str. 50: „Na Rysunek 11 przedstawiono...”. Proponuję używanie również innych przypadków.
4. Str. 71., 6. wiersz od góry, proponuję „wykorzystania” w miejsce „wykorzystaniu”.
5. Str. 83., Rysunek 35., grafika jest czarno-biała zaś w podpisie istnieje dodatkowo odwołanie do koloru niebieskiego.
6. Str. 88., 2. wiersz od góry, proponuję „coulumbowskie” w miejsce „kolumbowskie”, chociaż spotykane są powszechnie różne wersje przymiotnika od nazwiska odkrywcy prawa Coulomba.

Praca doktorska pani mgr Beaty Rysiewicz, jako opracowanie bardzo obszerne, wieloaspektowe i interesujące, rodzi również pytania natury poznawczej. Niektóre z nich formułuję poniżej:

1. Wiele ważnych i interesujących informacji dotyczących lokalizacji białek w komórkach oraz oddziaływań pomiędzy białkami uzyskanych być mogło dzięki włączeniu cząsteczek fluoroforów do struktury polipeptydów. Zastanawiam się czy te stosunkowo niewielkie modyfikacje, uwzględniając olbrzymie masy molekularne białek, nie mogą mieć jednak wpływu na ich właściwości, które mogłyby z kolei wpływać na obserwowane efekty? Na przykład oddziaływania między podjednostkami kompleksów. Ciekaw jestem zdania Doktorantki na ten temat.

2. Bardzo wartościowym jest w mojej ocenie podejście FLIM-FRET umożliwiające badanie oddziaływania podjednostek białka w naturalnych układach błonowych. Analizy czasów życia fluorescencji poszczególnych barwników wskazują na zaniki typu dwueksponencjalnego. Zastanawiam się jakie mogą być przyczyny pojawiania się dwóch składowych kinetycznych pojedynczych chromoforów? Ciekawym jest również, w mojej opinii, iż transfer energii wzbudzenia elektronowego skraca jedynie krótszą składową czasu życia fluorescencji donora. Czy może to oznaczać występowanie dwóch frakcji białka Gai3 sprzężonych z barwnikiem citrine?
3. Zastanawiam się, czy fakt, iż do lipidacji podjednostek białka Gai3 natura wykorzystuje jednocześnie dwóch kwasów tłuszczowych o różnej długości (C14 oraz C16), charakteryzujących się różnymi właściwościami dynamicznymi w temperaturach fizjologicznych, można interpretować jako swoistego rodzaju dostosowanie umożliwiające lokalizację białka na granicy faz błony lipidowej charakteryzujących się różną płynnością, na przykład na obrzeżach tratw membranowych?
4. Wiele wyników badań prezentowanych w ramach rozprawy doktorskiej wskazuje na istotę procesów molekularnych prowadzących do formowania agregatów białkowych. O ile zarówno spektroskopia typu CD jak i FTIR wydają się porównywalnie dobre do analizy struktury drugorzędowej białek, wydaje mi się, iż ta druga technika badawcza może okazać się bardziej dostosowana do badania formowania struktur supramolekularnych białek. Ciekaw jestem opinii Doktorantki na ten temat.

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Beata Rysiewicz przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach zaprojektowanych w sposób przemyślany i precyzyjny oraz przeprowadzonych z dużą starannością prac badawczych. Uzyskane wyniki poddane zostały analizie oraz wieloaspektowej dyskusji w oparciu o najbardziej aktualne pozycje piśmiennictwa, co pozwala wnioskować o erudycji Doktorantki i jej doskonałym warsztacie naukowym. Doktorantka jest współautorką trzech artykułów naukowych ściśle powiązanych z tematyką rozprawy.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr Beatę Rysiewicz rozprawa doktorska zawiera rozwiązania niezwykle aktualnych, interesujących oraz ważnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym 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). W związku z powyższym, uprzejmie wnoszę o dopuszczenie pani mgr Beaty Rysiewicz do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

W mojej opinii, bardzo wysoki poziom wyzwań poznawczych przedmiotowej pracy doktorskiej, jakość merytoryczna przeprowadzonych badań oraz ranga uzyskanych wyników pozwalają dodatkowo sądzić o tej pracy jako wyróżniającej. W związku z powyższym, składam również wniosek o rozważenie możliwości wyróżnienia przedłożonej mi do oceny rozprawy.

