



Wrocław, 22.05.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Doroty Mularczyk
pt. „Termodynamiczne i strukturalne następstwa substytucji reszt
aminokwasowych w rejonie kieszeni wiążącej β -laktoglobuliny”**

przygotowanej w Zakładzie Biochemii Fizycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i
Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Praca doktorska pani mgr Doroty Mularczyk pt. „Termodynamiczne i strukturalne następstwa substytucji reszt aminokwasowych w rejonie kieszeni wiążącej β -laktoglobuliny została wykonana w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką naukową pani prof. dr hab. Marty Dziejickiej-Wasylewskiej i pana dr Piotra Bonarka. Rozprawa doktorska dotyczy białka β -laktoglobuliny (BLG) i ma na celu wyjaśnienie znaczenia wybranych pozycji aminokwasowych dla stabilności i wiązania ligandów przez BLG. Ponieważ BLG i zmodyfikowane warianty tego białka mają duży potencjał w medycynie, podjęty temat badawczy jest ciekawy nie tylko pod kątem fundamentalnym, ale ma znaczący potencjał aplikacyjny.

Rozprawa doktorska przygotowana została w języku polskim w formie klasycznej pracy doktorskiej, złożonej z części wstępnej, celu pracy, opisu użytych materiałów i zastosowanej metodyki, przedstawienia wyników badań oraz z dyskusji. Praca została przygotowana bardzo starannie pod kątem merytorycznym (poprawność przedstawionych danych oraz odpowiednia szczegółowość zawartych treści), językowym (praca praktycznie nie zawiera błędów i niedociągnięć językowych) oraz edytorsko-graficznym (niemal doskonała prezentacja uzyskanych danych).

Sekcja „Wstęp” stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki podjętych badań, stopniowo zaznajamiając czytelnika z termodynamiką oddziaływań białka z ligandami oraz z metodyką badań oddziaływań międzycząsteczkowych, a więc z technikami używanymi przez Doktorantkę podczas realizacji pracy badawczej. W rozdziale tym skoncentrowano się następnie na rodzinie lipokalin, w szczególności na BLG, przedstawiając szereg zależności pomiędzy strukturą BLG i funkcją tego białka. Odnośnie tej części chciałem prosić Doktorantkę o przedstawienie informacji czy do istnieją doniesienia o stosowaniu technik opartych o



przypadkową mutagenezę/przygotowanie i przeszukiwanie zrandomizowanych bibliotek BLG w celu modyfikacji właściwości tego białka?

Na podstawie zastanego stanu wiedzy, sugerującego potencjalne duże znaczenie reszty 39 BLG, Doktorantka podjęła się określenia roli pozycji 39 w wiązaniu ligandów. Oprócz pozycji 39 Doktorantka jako swój cel badawczy określiła zbadanie roli leucyny 87 BLG, która pomimo swojej hydrofobowości eksponowana jest do rozpuszczalnika oraz reszt lizyny w pozycjach 60, 69 i 70 w oddziaływaniu BLG z naładowanymi ligandami. Wszystkie te cele naukowe Doktorantka jasno sprecyzowała w sekcji „Cel pracy”. Sekcja „Materiały i metody” przedstawiona została w sposób dokładny, umożliwiający powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów.

W sekcji „Wyniki” przedstawiono przykładowe rezultaty oczyszczania wariantów mutacyjnych BLG oraz ich wielowymiarowe analizy przeprowadzone głównie z zastosowaniem dichroizmu kołowego (CD), izotermalnego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) oraz nanoDSF. Generalnie wyniki przedstawiono bardzo dokładnie, dane są wysokiej jakości a ich interpretacja merytorycznie poprawna. Bardzo pomocne w interpretacji danych są także tabele podsumowujące pomiary (np. Tabela 6). Odnośnie części „Wyniki” mam szereg pytań/uwag do Doktorantki i bardzo proszę o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony:

1. W Rozdziale 4.1 dotyczącym ekspresji i oczyszczania wariantów BLG przedstawiono przykładowe żele SDS-PAGE z procesu oczyszczania (Rys. 4.1, 4.2, 4.3, 4.4). Żele te nie zostały odpowiednio opisane (brakuje podpisu markera mas oraz poszczególnych ścieżek (szczególnie dla Rys. 4.2)). Na Rys. 4.1 strzałka wskazano BLG, gdyż prążek ten pojawia się w lizacie bakteryjnym po dodaniu IPTG. Jednak na podstawie tego żelu można zidentyfikować również prążek kilka kDa mniejszy, wykazujący również odpowiedź na dodatek IPTG. Skąd wiadomo, że wskazany na Rys. 4.1 prążek to BLG? Czy to mniejsze białko to produkt degradacji proteolitycznej BLG? Czy, a jeśli tak, to w jaki sposób potwierdzano tożsamość rekombinowanych białek w trakcie ekspresji i oczyszczania oraz wyizolowanych frakcji (np. western blotting, spektrometria mas)?
2. Jak wyglądała ostateczna czystość wszystkich uzyskanych wariantów BLG? Czy były one analizowane obok siebie na jednym żelu? W mojej opinii takiego wyniku brakuje w niniejszej pracy doktorskiej. Czy wprowadzone mutacje wpłynęły na wydajność produkcji lub na rozpuszczalność BLG?



3. Czy próbowano oczyszczać BLG posiadający odcinalny znacznik (np. SBP, HisTag) w celu zmniejszenia liczby kroków w procesie przygotowania tego białka?
4. Czy na żelu SDS-PAGE po sączeniu molekularnym (Rys 4.3) widać dimer BLG (prążek mniej więcej w środku żelu, którego intensywność wzrasta wraz ze wzrostem intensywności monomeru BLG)? Jeśli tak, to czy wygenerowane mutanty różniły się potencjałem dimeryzacyjnym widocznym w sączeniu molekularnym?
5. W testach CD i ITC, oprócz mutantów wymienionych w celu pracy pojawia się mutant E89A. Czy można prosić o przedstawienie, dlaczego również ta pozycja była badana (nie pojawia się w „Celu pracy”)?
6. Czy pomiary CD/ITC/nanoDSF przeprowadzono na różnych izolatach mutantów BLG? Czy analizowano błędy w testach CD i nanoDSF (błąd pomiaru podano głównie przy pomiarach ITC)? Czy przeprowadzono analizy statystyczne istotności uzyskanych różnic?
7. Która metoda pomiaru denaturacji BLG jest według Doktorantki dokładniejsza: CD czy nanoDSF? Jest to o tyle istotne, że nie tylko sama wartość T_{den} , ale przede wszystkim obserwowana zmiana wywołana mutacjami w stosunku do białka typu dzikiego wydaje się być znacząco różna w zależności od zastosowanej metodyki pomiaru, utrudniając wyciągnięcie wniosku o wpływie mutacji na stabilność białka. Przykładowo, T_{den} dla WT według CD (Tabela I) wynosi $77,5^{\circ}\text{C}$, natomiast według nanoDSF (Tabela VII) $74,4^{\circ}\text{C}$, co jest dość spójnymi wartościami. Natomiast dla mutantu K69A/K70A T_{den} na podstawie CD wynosi $71,6^{\circ}\text{C}$, sugerując jedną z większych obserwowanych zmian w stabilności względem WT (spadek o $5,9^{\circ}\text{C}$), podczas gdy T_{den} według nanoDSF wynosi $74,4^{\circ}\text{C}$ i jest identyczna jak WT. Skąd mogą wynikać takie rozbieżności w obserwowanych wynikach? Czy analizowano temperatury denaturacji mutantów BLG w pozycji 39 czy 89 (np. mutantu L39Y o najbardziej zwiększonej stabilności (wzrost o $5,5^{\circ}\text{C}$ względem białka typu dzikiego) i E89A (wzrost o $6,3^{\circ}\text{C}$ w stosunku do białka typu dzikiego), Tabela I) stosując nanoDSF?

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka we wnikliwy sposób interpretuje uzyskane wyniki i osadza je w kontekście zastanej wiedzy o biochemii BLG. Doktorantka przedstawia



najważniejsze osiągnięcia niniejszej pracy, sugerując: kluczową rolę leucyny w pozycjach 39 i 89 dla pH-zależnego wiązania SDSu oraz roli lizyn 60, 69 i 70 w elektrostatycznym oddziaływaniu z naładowanymi ligandami (przy głównej roli oddziaływań hydrofobowych w wiązaniu ligandów przez BLG). Powyższe wnioski stanowią odpowiedź na zadany cel naukowy i świadczą o udanej realizacji pracy doktorskiej.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę doktorską mgr Doroty Mularczyk oceniam bardzo dobrze. Praca jest naukowo ciekawa, uzyskane wyniki są wysokiej jakości i znacząco poszerzają wiedzę na temat zależności pomiędzy strukturą a funkcją białka BLG. Chciałbym w związku z tym serdecznie pogratulować zarówno Doktorantce jak i Promotorom. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Doroty Mularczyk spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Wnoszę więc do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Doroty Mularczyk oraz o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Łukasz Opaliński, prof. UW