



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 20 marca 2023 r.

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

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Małgorzaty Krasowskiej
pt. „Badania metodami biofizycznymi procesu przyjmowania struktury
natywnej i właściwości białek z rodziny GFP”**

Według mojej subiektywnej opinii, białko zielonej fluorescencji (GFP, green fluorescence protein, ang.) znajduje się na czołowych miejscach rankingów liczby prac badawczych dedykowanych białkom, relatywnie w stosunku do ich abundancji w biosferze. Ta szczególna pozycja GFP nie wynika, moim zdaniem, z chwilowej mody, ale ze szczególnej roli jaką odgrywa to białko w badaniach z zakresu biologii molekularnej, biologii funkcjonalnej oraz bio-obrazowania, bez względu na umiejscowienie badanych organizmów na osi ewolucji biologicznej. Wobec tak znacznej liczby projektów badawczych związanych bezpośrednio bądź pośrednio z GFP zdumienie budzić może fakt, iż tak wiele podstawowych pytań natury poznawczej związanych z funkcjonowaniem tego białka pozostaje otwartych i oczekuje na wyjaśnienie. Wśród tych zagadnień znajdują się te dotyczące procesu fałdowania się białka do struktury natywnej, przebiegającego przez etapy prowadzące do formowania się aktywnego chromoforu odpowiedzialnego

bezpośrednio za emisję zielonej fluorescencji. Tym właśnie zagadnieniom poświęcona została, między innymi, praca doktorska pani mgr Joanny Krasowskiej. W świetle zarysowanych powyżej rozważań, postrzegam więc przedmiotową rozprawę doktorską nie tylko jako bardzo aktualną, ale również ważną oraz interesującą.

Praca doktorska pani mgr Joanny Małgorzaty Krasowskiej wykonana została w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem pani dr hab. Beaty Wielgus-Kutrowskiej. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 152 stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o typową, optymalną w moim odczuciu strukturę. Po spisie treści, streszczeniu, zestawieniu oryginalnych publikacji Doktorantki oraz wykazie głównych, stosowanych w obrębie rozprawy skrótów, zamieszczony został rozdział I. pt. „Wstęp”. Według koncepcji Autorki, ta część rozprawy stała się miejscem prezentacji wiedzy podstawowej z zakresu stosowania znaczników fluorescencyjnych oraz biofizyki białek. W pełni zrozumiałym jest fakt, iż poczesne miejsce w tych opisach znalazły zagadnienia związane bezpośrednio z białkiem GFP, wśród nich zaś te wskazujące na otwarte problemy poznawcze. Cele pracy doktorskiej, zarówno te strategiczne jak i cząstkowe, sformułowane zostały w ramach krótkiego, jednostronicowego rozdziału II. Rozdział III. pt. „Materiały i metody” poświęcony został szczegółowej prezentacji zagadnień metodycznych związanych z realizacją zadań eksperymentalnych projektu doktorskiego, wśród nich specyfikacji odczynników chemicznych, zagadnieniom związanym z ekspresją oraz oczyszczaniem białek z rodziny EGFP oraz metodom badawczym i technikom instrumentalnym. W tym miejscu swojej analizy, chciałbym zwrócić szczególną uwagę na rozbudowaną metodologię oraz stosowanie wielu zaawansowanych technik badawczych umożliwiających na formułowanie śmiałych wyzwań poznawczych i pozwalających oczekiwać precyzyjnych odpowiedzi. W gronie tych technik wymienić można ultrawirowanie analityczne, spektroskopię fluorescencyjną, metodę zatrzymanego przepływu, badanie bezpromienistego transferu energii

wzbudzenia elektronowego, metodę dichroizmu kołowego oraz metodę znaczników spinowych EPR. Rozdział IV pt. „Wyniki” zredagowany został w oparciu o podstrukturę sekcji, w ramach których przedstawione zostały szczegółowo pełne opisy kolejnych realizowanych zadań badawczych projektu doktorskiego. Każdy z takich podrozdziałów opatrzony został stosownym wprowadzeniem, zawiera obszerną prezentację wyników pomiarów oraz ich interpretację i dyskusję. Cennym, w moim odbiorze, zabiegiem wpływającym na porządkowanie rezultatów cząstkowych oraz pozytywny odbiór całości rozprawy było opatrzenie poszczególnych podrozdziałów paragrafem podsumowującym. Wśród zasadniczych zadań badawczych projektu doktorskiego, opisanych w ramach rozdziału IV, znalazły się: analizy procesu zwijania *de novo* i powtórnego zwijania białka EGFP oraz towarzyszącego zjawiska formowania agregatów białkowych, badania mechanizmu formowania chromoforu, analiza fotoochronnej aktywności białka EGFP oraz aktywność badawcza ukierunkowana na opracowanie mutantów jednocysteinowych białka EGFP. Rozprawę zamyka rozdział V. pt. „Podsumowanie” oraz zestawienie cytowanego piśmiennictwa w ramach rozdziału zatytułowanego „Bibliografia”. W pełni zgadzam się z Doktorantką w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej, zestawionych w ramach rozdziału V. Osobiście, moje zainteresowanie oraz uznanie wzbudziły w szczególności:

1. wyniki wskazujące na szlaki fałdowania białka EGFP, różne w przypadku pierwotnego i wtórnego zwijania,
2. wyniki umożliwiające doprecyzowanie etapów formowania chromoforu,
3. wyniki badań rzucające światło na możliwe funkcje fizjologiczne białka GFP,
4. działania, które doprowadziły do opracowania dwóch nowych mutantów cysteinowych białka EGFP, z uwzględnieniem perspektywy ich wykorzystania badawczego.

Poza bardzo wysoką wartością merytoryczną pracy doktorskiej pani mgr Joanny Krasowskiej chciałbym dodatkowo zwrócić uwagę na jej bardzo wysoki

poziom edytorski, zarówno w aspekcie precyzji tekstu jak i jakości grafik. Analizowana rozprawa doktorska jako opracowanie bardzo obszerne, wieloaspektowe i interesujące, rodzi również pytania natury poznawczej. Niektóre z nich pozwolę sobie sformułować poniżej:

1. Metoda określania struktury drugorzędowej białka EGFP na podstawie analizy widm CD w obszarze dalekiego nadfioletu dostarcza precyzyjnych informacji w zakresie formowania struktur helikalnych, beta-kartki oraz zakrętów i wstążek, na różnych etapach procesu denaturacji oraz fałdowania białka. Jednocześnie, jak wynika z Tabeli II. na str. 77. blisko połowa struktur specyfikowanych w ramach kolumny zatytułowanej „pozostałe” pozostaje nieokreślona. Ciekaw jestem czy w tej puli znajdują się również agregaty białkowe? Ciekaw jestem również, czy dodatkowe zastosowanie analizy pasma amid I w ramach spektroskopii FTIR bądź rozpraszania Ramana mogłoby być źródłem bardziej precyzyjnych informacji dotyczących formowania agregatów białkowych?
2. Jeden ze sposobów monitorowania kinetyki zmiany struktur białkowych bazował na pomiarach rozpraszania światła typu Rayleigha przy 640 nm. Wobec faktu, iż ten rodzaj rozpraszania zależy od długości fali światła w potęgę 4., spodziewać się można bardziej wyrazistego efektu w obszarze bardziej krótkofalowym. Z drugiej strony, spodziewam się, iż przeszkodę stanowić tu może emisja fluorescencji. Ciekaw jestem czy podejmowane były próby analizy sygnału rozpraszania światła w obszarze spektralnym poniżej 600 nm?
3. Bardzo interesujące wydają mi się porównawcze zestawienia zależności kinetycznych opierających się na różnych zjawiskach fizycznych i prezentowane, na przykład, w ramach Rys. IV.8 na str. 91. Bardziej szczegółowa analiza porównawcza wydaje się wskazywać na swoisty „uskok” w intensywności

fluorescencji aminokwasów aromatycznych, obserwowany po ok. 1 godzinie inkubacji, któremu nie odpowiadają zmiany w pozostałych prezentowanych kinetykach. Ciekaw jestem jaki może być mechanizm prowadzący do takiej nietypowej kinetyki zmian?

4. Ciekawymi i ważnymi wydają mi się również wyniki wskazujące na fotoochronną aktywność białka EGFP, polegającą na wymiataniu reaktywnych form tlenu. Efekt ten zaprezentowany został dobitnie w oparciu o wyniki analiz znaczników spinowych EPR. Z drugiej strony, obserwowane obniżenie intensywności sygnału fluorescencji EGFP w warunkach ekspozycji na reaktywne formy tlenu (Rys. IV.19, str. 122) związany być może z fotowygaszaniem fluoroforu ale również z jego wybielaniem na drodze chemicznego utleniania. Ciekaw jestem, czy była podejmowana próba rozróżnienia tych mechanizmów?

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Joanna Krasowska przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz przeprowadzonych z dużą starannością prac eksperymentalnych. Uzyskane wyniki poddane zostały szczegółowej 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 pięciu artykułów naukowych ściśle powiązanych z tematyką rozprawy oraz wyników stanowiących podstawę kolejnego artykułu, będącego na etapie przygotowania.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr Joannę Krasowską rozprawa doktorska zawiera rozwiązania szczególnie aktualnych, wysoce interesujących oraz bardzo 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 Joanny Krasowskiej 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, znaczny zakres warsztatu badawczego, od zagadnień związanych z biologią molekularną do spektroskopii molekularnej oraz ranga uzyskanych wyników pozwalają dodatkowo sądzić o tej pracy jako o wyróżniającej. W związku z powyższym, składam również wniosek o rozważenie możliwości wyróżnienia przedłożonej mi do oceny rozprawy.

M. Linn