



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 20 luty 2020 r.

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

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. inż. Krzysztofa Wyciska pt. „Analiza roli N-terminalnej domeny jako czynnika modulującego funkcję domen globularnych receptora *Ultraspiracle*”

Rozprawa doktorska mgr. inż. Krzysztofa Wyciska jest opracowaniem, w którym krzyżują się dwa ważne z poznawczego punktu widzenia i jednocześnie bardzo interesujące oraz aktualne problemy współczesnej biologii molekularnej. Z jednej strony, rozprawa dotyczy bowiem bezpośrednio zagadnień związanych z poznaniem mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za funkcjonowanie receptorów jądrowych oraz regulację ich aktywności. Z drugiej strony, wobec faktu, iż badane receptory okazują się posiadać znaczne fragmenty łańcucha polipeptydowego w formie inherentnie nieuporządkowanej, praca doktorska dotyczy bezpośrednio tej klasy białek, stosunkowo niedawno poznanej i ciągle intrygującej. W moim odczuciu,

tak zarysowana tematyka pracy doktorskiej jest nie tylko interesująca ale również bardzo ważna i z pewnością warta podjęcia wyzwania w formie dedykowanego projektu badawczego.

Praca doktorska przygotowana została pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Andrzeja Ożyhara, z udziałem dr Anety Tarczewskiej, w charakterze promotora pomocniczego, w Wydziałowym Zakładzie Biochemii na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, w renomowanym ośrodku badawczym, wiodącym w obszarze badania białek inherentnie nieuporządkowanych. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 147 stronach standardowego maszynopisu. Po „Podziękowaniach” oraz „Spisie treści” zamieszczony został przez Autora „Spis skrótów” stosowanych w obrębie rozprawy, ale również powszechnie w piśmiennictwie specjalistycznym. Wobec znacznej liczby stosowanych skrótów, zabieg formalny związany z zamieszczeniem obszernego i przejrzystego zestawienia akronimów, w tym miejscu rozprawy, wydaje się bardzo cenny. Prezentację rozprawy otwiera „Streszczenie”, jako rozdział 1., po którym następuje wprowadzenie w tematykę badawczą, w ramach rozdziału 2. pt. „Wstęp”. Rozdział ten zredagowany został na zasadzie przeglądu literaturowego najważniejszych zagadnień związanych z receptorami jądrowymi, mechanizmami ich działania, powiązaniem mechanizmów aktywności receptorów z ich strukturą przestrzenną, w szczególności z domeną N-terminalną podejrzewaną o przynależność do klasy regionów białka inherentnie nieuporządkowanych. W ramach rozdziału wstępnego przedstawiona została również obszerna charakterystyka białka *Ultraspiracle*, receptora jądrowego występującego u stawonogów, stanowiącego bezpośredni obiekt badawczy w ramach realizowanej pracy doktorskiej. Cel pracy doktorskiej sformułowany został w sposób zwięzły a zarazem rzeczowy, w ramach krótkiego akapitu na str. 41, któremu nadano rangę rozdziału 3. Rozdział 4. poświęcony został szczegółowej prezentacji materiałów i odczynników, używanych w trakcie prowadzonych badań, a także materiału biologicznego w postaci szczepów bakteryjnych i plazmidów używanych w procesie nadekspresji białek HaUsp jak również białek receptorów pozbawionych domeny N-

terminalnej (HaUsp_ΔNTD). W ramach rozdziału tego, dokonano również szczegółowej prezentacji protokołów eksperymentalnych licznych procedur biochemicznych związanych z izolacją i oczyszczaniem białka jak i dotyczących stosowania technik instrumentalnych wykorzystanych w realizacji badań. Wszelkie opisy zamieszczone w ramach rozdziału 4. są, w moim odczuciu, nie tylko na poziomie precyzji umożliwiającym przeprowadzenie analogicznych eksperymentów ale również zaprezentowane w sposób pomysłowy i elegancki, często w postaci tabelarycznej. Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej wysokim poziomie merytorycznym, jest rozdział 5. pt. „Wyniki”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o schemat, według którego poszczególne sekcje prezentują kolejne zadania badawcze, realizowane w ramach projektu doktorskiego. Zaznaczyć chciałbym, iż opisy te układają się logiczną sekwencję, w której prezentowane w ramach jednej sekcji wyniki analiz prowadzą do formułowania problemów poznawczych, rozwiązywanych w badaniach prezentowanych w ramach kolejnej sekcji. Taki sposób prezentacji wyników sprawia, iż rozprawę doktorską pana mgr. Krzysztofa Wyciska czyta się jak ciekawą powieść. W tym miejscu swojej oceny chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na wyjątkowo bogaty arsenał technik badawczych, dobieranych z uwzględnieniem specyfiki poszczególnych problemów poznawczych. Wśród stosowanych metod znalazły się: podejścia z obszaru bioinformatyki, spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), metoda bazująca na wymianie proton-deuter, sprzężona ze spektrometrią masową, technika EMSA (ang. electrophoretic mobility shift assay), ultrawierowanie analityczne, technika SEC-MALS (ang. size-exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering), technika SAXS (ang. small-angle X-ray scattering), której wyniki analizowane były w oparciu o modelowanie molekularne. Uzyskane wyniki badań poddane zostały krótkiej chociaż wieloaspektowej dyskusji w ramach rozdziału 6. pt. „Dyskusja” oraz podsumowane w ramach rozdziału 7. pt. „Podsumowanie”. Uzyskane w ramach projektu doktorskiego pana mgr. inż. Krzysztofa Wyciska rezultaty wskazują jednoznacznie, na to iż domena N-końcowa receptora jądrowego *Ultraspiracle*, licząca 58 reszt aminokwasowych, zaklasyfikowana być może do grupy

fragmentów białek inherentnie nieuporządkowanych oraz, iż odgrywa ona istotną z punktu widzenia regulacji aktywności receptora rolę, poprzez modulację oddziaływania ze specyficzną sekwencją DNA oraz wpływając na dimeryzację białka HaUsp. Ponadto, wyniki analiz strukturalnych pozwoliły na przedstawienie modelu przestrzennego badanego receptora oraz jego form dimerycznych. Z modelu tego wynika, iż domena N-końcowa stabilizować może struktury dimeryczne białka na drodze bezpośredniego oddziaływania z domeną wiążącą ligand, tworząc strukturę określaną mianem „scorpion-like”. Moim zdaniem, z poznawczego punktu widzenia, rezultaty te są bardzo cenne oraz interesujące! Prezentację rozprawy doktorskiej dopełniają materiały dodatkowe, zamieszczone w ramach rozdziału 8. a zawierające, między innymi, szczegółowe wyniki modelowania molekularnego prowadzonego z zastosowaniem metody EOM. Rozdział 9. stanowi „Spis rysunków i tabel” zaś rozdział 10. zestawienie pozycji dorobku naukowego Doktoranta. Rozprawę zamyka zestawienie cytowanego piśmiennictwa, liczące 214 pozycji, w ramach nienumerowanego rozdziału pt. „Literatura”.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Krzysztofa Wyciska jest, moim zdaniem, opracowaniem bardzo wartościowym w aspekcie walorów merytorycznych, odpowiadając jednocześnie wysokim standardom, zarówno w aspekcie klarowności języka jak i edycji tekstu. Na podkreślenie zasługują również walory estetyczne przygotowanych grafik oraz wykresów prezentujących wyniki badań. Mógłbym zaproponować Autorowi drobne korekty tekstu. Oto ich krótka lista:

1. Str. 22., 7. wiersz od dołu, powinno być raczej „5 do 6 regionów” zamiast „5 to 6 regionów”,
2. Str. 36., nazwa podrozdziału oraz jeden wiersz poniżej, „*Ultraspiracle*” zamiast „*Ultraspriacle*”,
3. Str. 70., równanie 4.4, niepotrzebny jest, moim zdaniem, znak mnożenia „x” przed nawiasem w wykładniku: czyli $\exp ($ w miejsce $\exp x ($,
4. Str. 83., Rys. 5.9 panel A, w podpisie osi X pogubiły się polskie czcionki,

5. Str. 97., 12. wiersz od dołu, „*coupled*” w miejsce „*couple*”,
6. Str. 103., 11. wiersz od góry, proponuję log I(s) w miejsce I(s).

Tak jak wspomniałem już powyżej, rozprawę doktorską mgr. Krzysztofa Wyciska czyta się bardzo dobrze, jak powieść, podążając za tokiem rozumowania Autora oraz próbując zrozumieć napotykaną w trakcie realizacji projektu doktorskiego problematykę. Jeden z takich problemów związany był bezpośrednio z rejestracją widm CD w układach silnie rozpraszających promieniowanie z zakresu krótkofalowego (str. 88, Rys. 5.12). W pełni podzielam zdanie Doktoranta, iż jakość zarejestrowanych widm uniemożliwia praktycznie ich dekonwolucję, która mogłaby być podstawą analizy występowania różnych struktur drugorzędowych białka. Zastanawiam się, czy w takim przypadku, zastosowanie spektroskopii absorpcyjnej w zakresie podczerwieni, w szczególności w oparciu o dekonwolucję pasma Amid I, mogłoby okazać się lepszą alternatywą uzyskania informacji strukturalnych? Być może, podejście to umożliwiłoby również identyfikację występowania form oligomerycznych białka HaUsp, diskutowanych na str. 109. Rozprawy? Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktoranta na ten temat.

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr inż. Krzysztof Wycisk przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach pieczołowicie zaplanowanych oraz precyzyjnie przeprowadzonych badań. Badania te wymagały biegłości w obszarach związanych zarówno z modelowaniem molekularnym jak i preparatyką biochemiczną oraz licznymi technikami instrumentalnymi. Znaczna część wyników uzyskanych w ramach realizacji projektu doktorskiego włączona została do publikacji, która ukazała się w renomowanym czasopiśmie specjalistycznym *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.

Moim zdaniem, oceniana rozprawa doktorska zawiera rozwiązania ważnych i interesujących problemów naukowych, spełniając tym samym podstawowe wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich. Praca doktorska opiera się na hipotezie badawczej dotyczącej istotnego fizjologicznego znaczenia domeny N-terminalnej białka HaUsp i zawiera szereg wyników w pełni uwiarygadniających prawidłowość obranych kierunków oraz założeń. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. inż. Krzysztofa Wyciska spełnia w zupełności warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym, uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. inż. Krzysztofa Wyciska do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'W. Wyciska'. The signature is written in a cursive, somewhat stylized script.