

Warszawa, 24.08.2022

dr hab. Anna Niedźwiecka, prof. IF PAN  
Środowiskowe Laboratorium Fizyki Biologicznej

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Anny Julii Więch-Walów zatytułowanej  
„Analiza molekularna regionu F receptora ekdyteroidowego z *Aedes aegypti*”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Anny Julii Więch-Walów została wykonana w Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej Katedry Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Promotorem pracy jest prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar, a promotorem pomocniczym dr inż. Marek Orłowski. Badania białek inherentnie nieuporządkowanych (lub też samoistnie lub wewnątrznie nieuporządkowanych, ang. *intrinsically disordered proteins*, IDPs), które uczestniczą w przekazywaniu sygnałów oraz w biomineralizacji prowadzone są w grupie prof. Andrzeja Ożyhara od dłuższego czasu i doczekały się już wielu publikacji docenionych w literaturze międzynarodowej. Praca doktorska mgr inż. Anny Julii Więch-Walów wpisuje się więc w ogólny nurt badań nad IDPs w tym zespole, a dotyczy bardzo ważnego zjawiska, jakim jest mechanizm molekularny regulacji aktywności receptorów jądrowych.

Receptory jądrowe stanowią podgrupę czynników transkrypcyjnych, które wiążąc się z DNA regulują ekspresję genów pod wpływem oddziaływania z cząsteczkami sygnałowymi, którymi mogą być m. in. hormony. Omawiany w pracy receptor ekdyzonu (EcR), czyli hormonu steroidowego odpowiedzialnego za metamorfozę owadów, ma sekwencję o budowie domenowej, charakterystycznej dla receptorów jądrowych, z tym że występuje w nim wyjątkowo długi C-końcowy region F. Fragment ten nie jest ewolucyjnie zachowany. Na podstawie jego sekwencji można się spodziewać, że ma charakter strukturalnie nieuporządkowany, może podlegać modyfikacjom potranslacyjnym, w szczególności

glikozylacji i potencjalnie fosforylacji. Badania przeprowadzone na regionie F EcR ssaków wykazały, że może on odgrywać znaczącą rolę regulatorową dla aktywności receptora.

*Aedes aegypti* to komar egipski będący roznosicielem wirusów m. in. żółtej febry, dengi i Zika. Jego EcR odpowiada za funkcjonowanie kluczowego dla rozwoju szlaku sygnałowego kontrolowanego przez 20-hydroksyekdyzon, który prowadzi do biosyntezy białek wczesnego żółtka w jajku komara. Za cel pracy Doktorantka obrała charakterystykę molekularną regionu F receptora ekdyzonu tego komara (dalej oznaczonego jako AaFEcR). Szczegółowe cele pracy, to opracowanie procedury nadekspresji i oczyszczania AaFEcR, charakterystyka hydrodynamiczna i charakterystyka struktury drugorzędowej AaFEcR w zależności od oddziaływania z kationami cynku i miedzi, a także identyfikacja reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za te oddziaływania oraz uzyskanie widma HSQC NMR fragmentu AaFEcR. Tematyka badań stanowiła zatem zagadnienie wieloaspektowe, obejmujące techniki i metody od biologii molekularnej, poprzez biochemię, aż do biofizyki molekularnej, tym trudniejsze, że region F receptora ekdyteroidowego *Aedes aegypti* nie został wcześniej przez nikogo otrzymany w postaci czystego białka ani badany.

### **Formalna ocena rozprawy**

Praca doktorska, którą przeczytałam z zainteresowaniem i przyjemnością, jest napisana poprawną i stylistycznie ładną polszczyzną, w formie tradycyjnej rozprawy i ma układ typowy dla publikacji naukowych: *Wstęp*, *Cel*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Perspektywy dalszych badań* i *Bibliografia* obejmująca dwieście czterdzieści trzy pozycje. Praca liczy sześćdziesiąt sześć stron esencjonalnego tekstu - wydrukowanego z pojedynczym odstępem - i jest opatrzona *Spisem treści*, bardzo wygodnym *Spisem skrótów*, których nazwy rozwinięte zostały w języku angielskim i polskim, *Streszczeniem* w języku polskim, *Spisem rysunków i tabel*, *Podsumowaniem dorobku naukowego* oraz *Dodatkiem* zawierającym szczegóły techniczne. Zawiera wszystkie elementy pozwalające rozemnać się w zakresie wykonanych badań i osiągniętych wyników, w tym dwadzieścia dziewięć, często wielopanelowych, rysunków i siedemnaście tabel, które są odpowiednio zaadresowane

i przedyskutowane w tekście. W samej rozprawie brak jest wymaganego regulaminem streszczenia w języku angielskim, znajduje się ono natomiast na stronie internetowej Politechniki Wrocławskiej w osobnym pliku.

W *Streszczeniu* Doktorantka konsekwentnie posługuje się pełną nazwą danego obiektu przy pierwszym jej użyciu, a następnie używa skrótów. Niestety, w tekście dalszych rozdziałów Autorka posługuje się już wyłącznie skrótami, co bywa trudne w odbiorze. W szczególności, pierwsze zdanie całej rozprawy zaczyna się od hermetycznego sformułowania: „NRs stanowią szczególną grupę TFs...”. Występuje tu dodatkowo kolizja oznaczeń, gdyż przywołane „TFs” to czynniki transkrypcyjne, podczas gdy „TF” użyte w liczbie pojedynczej oznacza białko fuzyjne będące tylko biotechnologicznym elementem ułatwiającym nadekspresję w bakteriach. Myślę, że lepiej byłoby przy okazji nowo wprowadzanych wątków (np. w tytułach) używać czasem w tekście pełnych nazw obiektów. Tym niemniej, poza jeszcze kilkoma drobnymi potknięciami językowymi, które z obowiązku wymieniam pod koniec recenzji, język pracy jest wyjątkowo staranny stylistycznie, gramatycznie i interpunkcyjnie, a jednocześnie logiczny, jasny i precyzyjny. Autorka zapewnia również w większości adekwatne odnośniki do literatury, do rysunków zaczerpniętych z prac własnych oraz do użytego oprogramowania i materiałów graficznych.

*Wstęp* obejmuje wyczerpujący przegląd danych literaturowych, ma charakter dobrze i żywo napisanego artykułu przeglądowego na temat receptorów jądrowych, w szczególności receptora EcR. Zapewnia szeroki kontekst uzasadniający znaczenie poznawcze i społeczne podjętych badań nad AaFEcR. Nieco brakuje natomiast biofizycznego kontekstu wprowadzającego w zagadnienia dynamiki strukturalnej białek, skoro cała praca odnosi się do białka inherentnie nieuporządkowanego. O naturze IDPs przeczytamy dopiero w *Dyskusji* na str. 60/61.

Cele szczegółowe, nadający pracy charakter interdyscyplinarny, są jasno sformułowane. Użyte materiały zidentyfikowane są w praktycznych tabelach. Metody biochemiczne zostały opisane bardzo szczegółowo. Z opisów tych widać wielką staranność na każdym kroku opracowywania nowych protokołów oraz ogrom czasu i pracy włożonych

w otrzymanie nowego, czystego konstrukt białkowego o charakterze IDP. Metody biofizyczne zostały natomiast opisane skrótowo, tak jak w artykułach naukowych, ograniczając się do podania użytych parametrów, danych o aparaturze i jej ustawień. W opisie metod biofizycznych zabrakło mi chociaż skrótowej informacji na temat idei danej metody, jej zasady fizycznej, czyli tego, co „widzi” dana metoda, jakie są jej możliwości i ograniczenia; brak nawet pełnej nazwy spektroskopii dichroizmu kołowego, spektroskopii wielowymiarowego magnetycznego rezonansu jądrowego, sączenia molekularnego i ultrawiwrowania analitycznego metodą prędkości sedymentacji. Niektóre z tych nazw pojawiają się tylko w streszczeniu, niektórych brakuje w tabeli skrótów, a są w tekście często używane, np. „CD”, ponieważ część głównych tez pracy opartych jest na wnioskach otrzymanych właśnie tą metodą. To nieco zbyt instrumentalne podejście do stosowanych metod biofizycznych znalazło swoje konsekwencje w analizie i interpretacji wyników.

Zabrakło mi również nieco dokładniejszej informacji, co znaczy określenie „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. Taka informacja pozwoliłaby lepiej ocenić wkład pracy Doktorantki w uzyskane wyniki.

W kwestii praw autorskich, podczas obrony chciałabym się upewnić, że Autorka posiada zgodę na powtórne (po zmianie opisów) wykorzystanie w swojej pracy doktorskiej rysunków opublikowanych wcześniej w artykułach naukowych. Rozprawa doktorska jest obecnie traktowana jako dzieło, które zostaje udostępnione publicznie, więc prawa autorskie muszą być zachowane. Polityka w tym zakresie zależy od konkretnego wydawcy: niektóre redakcje zamieszczają *explicite* na swoich stronach internetowych zgodę na użycie opublikowanych materiałów przez ich autora we własnych pracach dyplomowych, a od innych redakcji należy ją uzyskać indywidualnie. Taką notkę o posiadanej zgodzie można by umieszczać w podpisie rysunku (np. „za zgodą redakcji **J Steroid Biochem Mol Biol**”), analogicznie jak w artykułach przeglądowych.

Podsumowując aspekty formalne, mimo powyższych uwag, uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Anny Julii Więch-Walów została przygotowana skrupulatnie i moja ogólna ocena strony formalnej jest bardzo dobra.

### **Ocena merytoryczna pracy**

Pierwszym kamieniem milowym osiągniętym przez Doktorantkę, który umożliwił przeprowadzenie dalszych badań, było otrzymanie rekombinowanego białka w fuzji z białkiem czaperoninowym TF, a następnie otrzymanie właściwego konstruktów po enzymatycznym odcięciu TF i ponownym oczyszczeniu. Chociaż w rozprawie doktorskiej zwięzły opis zajmuje zaledwie dwie strony, za imponującym wynikiem zaprezentowanym na żelu na Rys. 6.1. kryje się zapewne wiele miesięcy pracy. Ostatecznie Doktorantka uzyskała stosunkowo wysoką wydajność czystego AaFEcR, > 5 mg/l, co umożliwiło przeprowadzenie pomiarów spektroskopowych i hydrodynamicznych. Warto podkreślić, że oczyszczony fragment F receptora ekdysteroidowego z *Aedes aegypti* otrzymano po raz pierwszy. W tym miejscu miałabym pytanie techniczne do Doktorantki, jakie argumenty stały za tym, aby używać cDNA zamiast sekwencji nukleotydowej zoptymalizowanej pod kątem linii komórkowej bakterii używanych do nadekspresji (BL21).

Mając do dyspozycji obiekt badań, Doktorantka przeprowadziła analizę bioinformatyczną AaFEcR wykazując, że jego sekwencja ma wszelkie cechy białka inherentnie nieuporządkowanego. Po szczegółowym omówieniu pozornie rozbieżnych wyników liczbowych dostarczonych przez różne serwery przewidujące zakres nieuporządkowania (brak informacji o serwerach w metodach) zabrakło zdania podsumowania. Każdy z serwerów opiera się na innym algorytmie i dlatego ich wyniki liczbowe mają prawo się różnić, podczas gdy zasadniczy wniosek płynący z nich wszystkich jest spójny: fragment F EcR z *Aedes aegypti* jest IDP, z nieco mniejszym prawdopodobieństwem nieuporządkowania w zakresie reszt 15-30 i na końcu C. Polemizowałabym natomiast z niefortunnymi sformułowaniami pojawiającymi się w tym rozdziale i w innych miejscach: "Porównanie... umożliwiło przewidzenie jego potencjalnej

struktury przestrzennej”, „Potencjalną strukturę trzeciorzędową białek nieuporządkowanych można również przewidzieć...”, ponieważ IDPs to właśnie obiekty pozbawione stałej struktury przestrzennej, a będące w równowadze termodynamicznej pomiędzy wieloma stanami konformacyjnymi, jak zresztą Autorka sama słusznie zauważa w rozdziale 6.2.4.

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. Doktorantka wykonała szereg czasochłonnych pomiarów i dekonwolucję widma CD dla AaFEcR natywnego, która dostarczyła wyników ilościowych. Tutaj napotkałam pewną nadinterpretację. Otóż, immanentnym ograniczeniem CD jest to, że sygnały pochodzące od poszczególnych form struktury drugorzędowej białek - poza regularną helisa alfa - są mało charakterystyczne i niejednoznaczne. Co więcej, ich dodatnie oraz ujemne wkłady do widma wypadkowego mogą się wzajemnie niwelować, dlatego rozkład widma CD na składowe (podobnie jak rozkład wektora na składowe bez jednoznacznych warunków dodatkowych) ze swej natury obarczony jest dużą niepewnością. Jest tak w szczególności dla IDPs (np. Micsonai A. *et al.*, *Disordered-Ordered Protein Binary Classification by Circular Dichroism Spectroscopy*. **Front Mol Biosci.** 2022; 9:863141). W efekcie, nawet w testach wykonywanych dla białek wzorcowych, identyfikowana przez 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). Tym bardziej, wiedząc że białko jest IDP, należy z ostrożnością podchodzić do wyników liczbowych. Druga zasada, o której należy pamiętać, to fakt, że już pierwsza cyfra znacząca błędu wskazuje nam poziom niepewności pomiarowej, a więc kolejne rzędy wielkości są nieistotne. Wyniki ostateczne podaje się zatem zazwyczaj z dokładnością do pierwszej cyfry znaczącej błędu (lub drugiej, jeśli pierwsza jest „1”). Odpowiednia prezentacja błędu i zaokrąglenie wyniku natychmiast skutkuje prostszym wnioskowaniem:  $56 \pm 13\%$  reszt aminokwasowych AaFEcR występuje w konformacji nieuporządkowanej,  $15 \pm 5\%$  jako



regularne  $\beta$ -kartki,  $15 \pm 7\%$  - zwroty,  $9 \pm 3\%$  - zaburzone  $\beta$ -kartki, a udział konformacji  $\alpha$ -helikalnych jest niewielki, rzędu 5%. W szczególności, udział regularnych helis  $\alpha$ , czyli jedynej struktury, która jest stosunkowo dobrze oznaczana przez CD, obarczony jest tutaj  $>100\%$  błędem względnym ( $1,1 \pm 1,3\%$ ). W odniesieniu do struktur typu  $\beta$  należy pamiętać, że CD dostarcza informacji tylko o tym, że ok. 40 % wiązań peptydowych AaFEcR występuje w takich konformacjach, co nie oznacza, że ok. 40% białka ma formę zwiniętą (np. w długozasięgowe równoległe  $\beta$ -kartki), gdyż pojedyncze residua o konformacji zbliżonej do  $\beta$ -wstęg i zwrotów mogą być przeplatane residuami całkowicie nieregularnymi. Podsumowując, analiza CD przeprowadzona przez Doktorantkę wykazała eksperymentalnie, że w strukturze drugorzędowej AaFEcR występuje znikomy udział konformacji  $\alpha$ -helikalnych łańcucha głównego, a dominuje konformacja nieuporządkowana, z pewnym udziałem form typu  $\beta$ . W zgodzie z powyższym, Autorka zauważyła, że punktowe parametry widma CD świadczą też o tym, że AaFEcR ma charakter obiektu nazywanego prawie stopioną globulą (ang. *pre-molten globule*, PMG). Jakkolwiek skrót PMG jest przez Autorkę często eksploatowany, wyjaśnienie istoty tej – nieoczywistej skądinąd – koncepcji jest w tekście skrajnie lakoniczne, jako białka „posiadającego szczątkowe struktury drugorzędowe”. Prawie stopiona globula jest uważana za skondensowany, lecz nie całkiem ściśle upakowany stan, odpowiadający zespołowi konformacji będących w szybkiej równowadze i obejmujących zarówno natywne, jak i nienatywne struktury drugorzędowe, a bez oddziaływań długozasięgowych (co wyklucza m. in. równoległe  $\beta$ -kartki). Wnioski o naturze PMG białka AaFEcR zostały potwierdzone przez pomiary CD w obecności GdmCl. Co ciekawe, Doktorantka pokazała również, że sekwencja AaFEcR ma tendencje  $\alpha$ -helikalne w obecności TFE. Chciałabym zapytać Doktorantkę, czy pokusiłaby się o ilościową analizę zmian widm CD (Rys. 6.4. C) pod wpływem warunków środowiskowych, aby wyznaczyć energię swobodną Gibbsa procesu denaturacji resztkowej i zwijania AaFEcR (np. wg Greenfield NJ. *Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism*. **Nat Protoc.** 2006; 1(6): 2733-41).

Kolejnym zadaniem podjętym przez Doktorantkę było zbadanie własności hydrodynamicznych AaFEcR za pomocą chromatografii sączenia molekularnego

i ultrawirowania analitycznego metodą prędkości sedymentacji. Oba skrupulatnie przeprowadzone podejścia doświadczalne wykazały, że AaFEcR jest monomerem o nieuporządkowanej strukturze. W ujęciu doświadczalnym (inaczej niż w teorii polimerów) promień Stokesa  $R_S$  jest tożsamy z promieniem hydrodynamicznym  $R_H$ , natomiast ze względu na konieczność użycia wysokich stężeń oraz obecność ośrodka porowatego w SEC żadna z tych metod nie mierzy samodyfuzji w ścisłym sensie i wyniki liczbowe mają prawo się różnić także z przyczyn uwarunkowanych charakterem tych metod. Dodatkowo w analizie SEC można by uwzględnić niepewność wynikającą chociażby z numerycznego dopasowania krzywej kalibracyjnej współczynnika podziału na białkach standardowych, których znane wartości  $R_S$  zostały niegdyś wyznaczone eksperymentalnie w innych laboratoriach w różnych warunkach (nb. brak odnośników do źródeł wartości  $R_S$ ). Tak spropagowany błąd wartości  $R_S$  AaFEcR zapewne pozwoliłby na stwierdzenie, że wyniki SEC i AUC są zgodne w granicy  $3\sigma$ . Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza wartości  $R_S$  na tle danych literaturowych SEC potwierdziła wcześniejszy wniosek, iż AaFEcR występuje w formie PMG.

Dalsze badania przeprowadzone przez Doktorantkę w obecności GdmCl potwierdziły wnioski z analizy CD, że denaturacji mogą ulegać szczątkowe struktury drugorzędowe, a jednocześnie wykazały, że promień hydrodynamiczny rośnie bardzo znacznie, od 2,7 do 3,6 nm, czego nie da się wytłumaczyć ową denaturacją. Wyniki pomiarów można by uzupełnić o ich analizę ilościową oraz komentarz o potencjalnych procesach fizykochemicznych zachodzących na poziomie molekularnym, np. wiązaniu GdmCl przez białko (np. Müller-Späth S. *et al.*, *From the Cover: Charge interactions can dominate the dimensions of intrinsically disordered proteins. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(33): 14609-14.).

Jednym z celów pracy było otrzymanie dwuwymiarowego widma korelacyjnego przesunięć chemicznych jąder  $N^{15}$  i związanych z nimi protonów (ang. *heteronuclear single quantum coherence*, HSQC) dla białka AaFEcR. Doktorantka otrzymała znakowane izotopowo białko w fuzji z czaperoniną TF. Zmierzone widmo wykazało niewielką dyspersję protonowych przesunięć chemicznych, co sugeruje, że pod nieobecność czaperoniny białko to miałoby tym bardziej cechy IDP. Na przedstawionych widmach HSQC trudno jednak



zauważyć postulowaną zmianę przesunięcia chemicznego dla G74 w obecności kationów cynku (brak również danych liczbowych w tekście).

Aby zbadać oddziaływania AaFEcR z kationami wybranych metali bloku *d* oraz wapnia, Doktorantka posłużyła się zatem metodą spektrometrii mas, SEC i CD oraz AUC. Opis otrzymanych widm mas i ich szczegółowa analiza w oparciu o symulacje komputerowe rozkładów izotopowych sygnałów udowodniły powinowactwo AaFEcR zwłaszcza do kationów miedzi. Jest to bardzo ważne odkrycie; znaczenie biologiczne analogicznych oddziaływań alzheimerowskiego peptydu A $\beta$  z kationami miedzi jest obecnie przedmiotem gorącej dyskusji. AaFEcR tworzy z Cu<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup> kompleksy mono- i polimetaliczne, podczas gdy z Ca<sup>2+</sup> tylko w niewielkiej populacji monometaliczne. Wydaje mi się jednak, że fakt detekcji przez MS kompleksów niekowalencyjnych o określonej stechiometrii metal:białko niekoniecznie oznacza, że taka sama stechiometria istnieje również w roztworze. Jest to raczej dolne ograniczenie, gdyż część kationów związanych z białkiem mogła oddysocjować w czasie procesu jonizacji w spektrometrze - jakie jest Pani zdanie na ten temat?

Selektywność wiązania kationów metali przez AaFEcR została również przetestowana w systematyczny sposób na kolumnie SEC, gdzie zaobserwowano najsilniejszy spadek promienia hydrodynamicznego białka pod wpływem wzrastającego stężenia Cu<sup>2+</sup>, nieco słabszy dla Zn<sup>2+</sup>, a prawie brak efektu dla Ca<sup>2+</sup>. Myślę, że do wyników pomiarów R<sub>S</sub> udałoby się dopasować krzywe analityczne w celu otrzymania równowagowych stałych wiązania kationów do badanego fragmentu F oraz odpowiadających im  $\Delta G^\circ$ , aby bardziej ilościowo przeanalizować proces tego oddziaływania. Na marginesie, chciałabym zapytać, z czego może wynikać początkowy silny wzrost R<sub>S</sub> AaFEcR dla najniższego niezerowego stężenia każdego kationu (Rys. 6.5. E)? Tekst o tym milczy, chociaż jest to zmiana istotna - czy to może być efekt kalibracji, zmiany pH, inny artefakt, czy coś innego dzieje się w tych warunkach?

Co ciekawe, Doktorantka pokazała, że podczas tworzenia kompleksów AaFEcR z Cu<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>, mimo znacznej zmiany wartości promienia hydrodynamicznego, struktura drugorzędowa białka pozostaje bez zmian. Zachodzi zatem kurczenie się cząsteczki bez globalnego zwijania. Jest to często obserwowany efekt dla IDPs (np. Müller-Späh S. *et al.*,

j.w.). Aby zidentyfikować miejsca wiązania kationów metali i przyjrzeć się bliżej możliwym lokalnym zmianom konformacyjnym, Doktorantka przeprowadziła serię pomiarów CD dla peptydów pochodzących z regionu F o sekwencjach bogatych w powtórzenia PH (Ac-HGPHPHPHG-NH<sub>2</sub>) lub Q (Ac-QQLTPNQQQHQQQHSQLQQVHANG-NH<sub>2</sub>). Wyniki otrzymane dla tych peptydów stanowią jeden z najciekawszych rozdziałów pracy. Okazało się bowiem, że peptyd bogaty w PH, pod wpływem oddziaływania z kationami Cu<sup>2+</sup> ulega wyraźnej zmianie konformacyjnej prowadzącej do powstania krótkiej lewoskrętnej helisy poliprolinowej typu II (PPII), a w obecności TFE ulega również wyraźnym, choć niezidentyfikowanym co do charakteru zmianom strukturalnym. Peptyd bogaty w Q natomiast ulega znacznemu zwinięciu w struktury  $\alpha$ -helikalne pod wpływem TFE, podczas gdy wykazuje znikome zmiany strukturalne w obecności Cu<sup>2+</sup>. Powstawanie PPII zostało potwierdzone obliczeniami z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości.

Trudno mi się jednak zgodzić ze stwierdzeniem „na oko” o  $\alpha$ -helikalnych cechach peptydu PH i cechach struktury nieuporządkowanej peptydu bogatego w Q, ponieważ ich widma są jakościowo dość podobne, z głębokim minimum w okolicach 200-205 nm i słabszym w okolicach 225-230 nm, oba zatem zawierają większy lub mniejszy udział zarówno form nieuporządkowanych, jak i  $\alpha$ -helikalnych. Co zatem stało na przeszkodzie ilościowego wyznaczenia zawartości procentowej struktur drugorzędowych tych peptydów w różnych warunkach, analogicznie jak to pracownicy przeprowadzono – skądinąd niepotrzebnie - dla całego regionu F, dla którego akurat zmiany były zaniedbywalne? Po wykonaniu tak wielu czasochłonnych pomiarów CD i zaobserwowaniu spektakularnych zmian konformacyjnych, wyekstrahowanie z nich ilościowej analizy tworzenia spirali poliprolinowej typu II przez peptyd bogaty w PH pod wpływem wiązania Cu<sup>2+</sup> oraz fałdowania obu peptydów w obecności TFE byłoby dodatkową nagrodą.

Do tego rozdziału miałabym kilka pytań technicznych:

Jaką metodą wyznaczano stężenia peptydów (z analizy aminokwasowej, ze spektroskopii IR, czy z naważki), jaka była ich czystość?

Jakie były powody, aby do kompleksów AaFEcR z jonami metali używać silnych utleniaczy: nadchloranu miedzi i podchlorynu wapnia, a nie chlorków, a jednocześnie  $ZnCl_2$ ?

W jaki sposób było kontrolowane pH roztworów peptydów, skoro po ich rozpuszczeniu w dejonizowanej wodzie dodawano do nich wodne roztwory  $ZnCl_2$  i  $CuCl_2$ , a wiadomo, że wodne roztwory chlorków są kwaśne?

Wielką satysfakcję sprawiło mi przeczytanie dojrzałej *Dyskusji*, która rzeczowo podsumowuje i komentuje otrzymane przez Doktorantkę wyniki na tle wiedzy literaturowej, zachowując realizm. Jest to równocześnie rozdział, w którym dowiadujemy się o trudnościach, które należało pokonać - lub pozostały jeszcze do pokonania - związanych z naturą badanych obiektów, a które stanęły na przeszkodzie otrzymania widma HSQC samego badanego konstruktu AaFEcR. Niezwykle cenne jest zauważenie dodatkowej możliwości regulacji aktywności EcR przez oddziaływanie jego regionu F z jonami metali w odkrytych przez Doktorantkę fragmentach sekwencji.

W ostatnim rozdziale, napisanym z równym zaangażowaniem i swadą jak opis dotychczasowych wyników, Doktorantka zaprezentowała dodatkowo serię pomysłów na eksperymenty biochemiczne stanowiące rozszerzenie badań nad regionem F receptorów jądrowych. Z owych *Perspektyw dalszych badań* widać zaangażowanie naukowe i kreatywne myślenie koncepcyjne Doktorantki. Zastanawiam się, czy można by również zaproponować eksperymenty *in vivo*, np. na komórkach lub jajach *Drosophila melanogaster*, stransformowanych genem AaEcR i z wyciszonym własnym EcR (który jest pozbawiony sekwencji bogatej w PH, a ma fragment bogaty w Q), z których wynikałoby, że AaFEcR jest regulowany jonami  $Cu^{2+}$  dzięki sekwencji PH w regionie F. Byłoby to potwierdzenie regulatorowej funkcji biologicznej AaFEcR, zapostulowanej na podstawie niniejszych badań.

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

### **Mocne strony pracy**

Na podkreślenie zasługują następujące fakty:

1. pionierskie otrzymanie AaFEcR,
2. interdyscyplinarność pracy, charakteryzacja własności molekularnych AaFEcR jako białka samoistnie nieuporządkowanego w formie prawie stopionej globuli za pomocą szerokiego spektrum komplementarnych metod z zakresu biologii molekularnej, biochemii i biofizyki, zgodnie z zasadami sztuki,
3. odkrycie zmian promienia dyfuzji AaFEcR pod wpływem oddziaływania z kationami metali bloku *d*, identyfikacja sekwencji wiążącej  $\text{Cu}^{2+}$  oraz procesu tworzenia przez nią PPII, co daje przyczynek do regulatorowej funkcji F,
4. potwierdzanie wyników różnymi metodami, staranność wykonania pomiarów i determinacja w przewyżnianiu trudności wynikających z natury badanego obiektu,
5. czytelne rysunki, jasno, logicznie i żywo napisany tekst, przedyskutowanie wyników pod różnymi aspektami, odniesienia do literatury biochemicznej, szerokie horyzonty wiedzy w swojej dyscyplinie,
6. ogromny wkład pracy w starannie wykonane, czasochłonne eksperymenty.

### **Słabe strony pracy**

Praca jest w ogólności merytorycznie poprawna zarówno pod względem koncepcji, wykonania, analizy, jak i opisu językowego. W pracy nie znalazłam żadnych poważnych błędów merytorycznych. Jej słabsze strony dotyczą używania pewnych pojęć, przedstawiania wyników oraz dyskusji. Moje uwagi krytyczne mają charakter polemiczny lub uzupełniający i nie kwestionują ostatecznych wniosków, które zostały wyciągnięte prawidłowo.

Poza wcześniejszymi uwagami, pewien niedosyt pozostawia:

1. Brak odniesienia do modelu polimerowego dyfuzji białek (wykładnik od wartości 1/3 dla formy idealnie globularnej, poprzez wartość 0,5-0,7 dla IDPs, aż do 1 dla formy

hipotetycznego sztywnego pręta) w analizie ścieśniania struktury białka przez jony  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  oraz ekspansji pod wpływem  $\text{GdmCl}$  - jest obszerna literatura na ten temat;

2. Brak ilościowych analiz (równowagowych stałych wiązania i energii swobodnej Gibbsa) zmian  $R_s$  i widm CD w funkcji aktywności  $\text{GdmCl}$ , TFE i jonów metali;

3. Brak pogłębionej - z punktu widzenia chemii bionieorganicznej - dyskusji o tym, jak konfiguracja elektronowa kationów metali wpływa na oddziaływania z grupami bocznymi reszt aminokwasowych.

4. Z obowiązku recenzenckiego poniżej wymieniam również znalezione błędy językowe, edytorskie i interpunkcyjne. W większości bowiem – poza fragmentami dotyczącymi dynamiki strukturalnej IDPs - język tej pracy jest wyjątkowo staranny.

- str. 9. paradoksalnie, w tabeli skrótów brakuje „bohatera dramatu”, czyli AaFEcR i AaEcR;
- str. 10. niepotrzebny apostrof w „promień Stokesa” (nazwiska obce zakończone na spółgłoskę odmieniamy jak polskie); zamiast „proteaza katepsyno-B podobna” powinno być „podobna do katepsyny-B”;
- str. 11. i in. określenia będące antropomorfizacją, sprawiające pozór celowego działania białek np. „rekrutacja”, czy „werbowanie”. W literaturze anglojęzycznej spotyka się „recruitment”; natomiast w języku polskim słowo to ma kontekst intencjonalny. Z fizykochemicznego punktu widzenia, który nas obowiązuje, tworzenie się kompleksów podlega równowagom termodynamicznym ustalającym się na skutek dyfuzji i niekwalencyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych - żadne białko nie może innego w określonym momencie celowo „rekrutować”; brak przecinka po „Aby go zrealizować”; „eksperyment... szybkościowego ultrawierowania analitycznego”, raczej powinno być „eksperyment... ultrawierowania analitycznego metodą prędkości sedymentacji”;
- str. 12. niezrozumiałe sformułowanie: „koordynacja jonów przez AaFEcR powinna odbywać się na poziomie pojedynczych reszt aminokwasowych, skutkująca kompensacją jego cząsteczki”; domyślam się, że powinno być: „koordynacja jonów przez AaFEcR zapewne zachodzi na poziomie pojedynczych reszt aminokwasowych, skutkując kondensacją jego cząsteczki”;
- str. 16. niepotrzebny przecinek po „zachowana została”;
- str. 17., Rys. 3.5.: brak opisu jednej sekwencji aminokwasowej, najprawdopodobniej Hs\_ER $\alpha$  omawianego w tekście;
- str. 19. błąd gramatyczny: „Kilka przedstawicieli NRs... jest zdolne do wiązania DNA jako homodimer”, powinno być „Kilku przedstawicieli NRs... jest zdolnych do wiązania DNA w postaci homodimeru”;
- str. 23. brak „s” w „responsive”;
- str. 27. błąd gramatyczny: „znajduje się w Dodatek”;
- str. 33. brak „wirówki” w „z wykorzystaniem *Eppendorf 5810R*”;
- str. 39. zamiast „większej ilości reszt aminokwasowych” powinno być „większej liczby reszt” (rzeczownik policzalny); „Przypisanie sygnałów do konkretnym resztom aminokwasowym” – „do konkretnych reszt aminokwasowych”;
- str. 40. nadmiar słów w „w niskiej (16°C) obniżonej temperaturze);

- str. 45. brak „e” w „Przekształcenie”;
- str. 46. Rys. 6.5. E powinien znaleźć się w odpowiednim rozdziale na str. 52/53 adekwatnie do tematyki tekstu;
- str. 47. „teoretyczne białko globularne...”, raczej „hipotetyczne...” lub „modelowe...”;
- str. 48. nadmiar słów w „Zarejestrowane widmo... zarejestrowane w obecności jonów”;
- str. 49. „spowodowały narodziny”;
- str. 51. pomyłka edytorska, jednakże zmieniająca znaczenie: „Dla  $nCu^{2+}/nAaFEcR=1$ ”, powinno być „Dla  $nCa^{2+}/nAaFEcR=1$ ”;
- str. 53. jest „Niewielkie przesunięcie chemiczne”, powinno być „Niewielka zmiana przesunięcia chemicznego”;
- str. 55. pomyłka edytorska „imidazolowych”; str. 55. niezrozumiałe sformułowanie „koordynacja jonu  $Zn^{2+}$  przez peptyd odbywa się poprzez formowanie takiego samego typu, jak w przypadku  $Cu^{2+}$ , kompleksów”, a jeśli tu chodzi o „tworzenie kompleksów takiego samego typu”, to jest to stwierdzenie nieuzasadnione, bo koordynacja kationów metali przez grupy boczne reszt aminokwasowych zależy od konfiguracji elektronowej, miedź jest bardziej elektroujemna i ma mniejszy promień walencyjny niż cynk.
- str. 57. jest „Oddziaływanie te”, powinno być „Oddziaływania te”; „Oddziaływania dzieją się”, raczej „zachodzą” itd. w tym zdaniu również przydałaby się wzmianka o konfiguracji elektronowej. Cały ten akapit przynależy raczej do dyskusji, niż do wyników;
- str. 58. pomyłka edytorska „aminokwasowych”;
- str. 61. algorytmy analizujące skłonność białek do fałdowania z pewnością nie są „precyzyjne”, wręcz przeciwnie, każdy algorytm ma własne kryteria, a rozrzut otrzymywanych wyników liczbowych jest spory, różne algorytmy dają natomiast całkiem spójne wnioski jakościowe; „Co w konsekwencji pozwoliło ustalić, że strukturą... jest PMG” – po pierwsze, trudno powiedzieć, że PMG jest jedną „strukturą”, po drugie, gdyby na Rys. 6.6. (str. 47) uwzględnić 99% lub nawet tylko 95% CI narysowanych tam prostych, mogłoby się okazać, że analiza ta nie wyklucza formy NU lub również MG. Analiza ta niewątpliwie sugeruje formę PMG, a ustalić można by to tylko za pomocą NMR.
- str. 62. pomyłka edytorska „Równoległe”;
- str. 63. „na całkowitą konformację” powinno być „globalną konformację/konformację całej cząsteczki”; pomyłka edytorska „ze sobą”; „płaszczyzna” – w języku naukowym jest to określenie geometryczne, tutaj powinno być: „powierzchnia molekularna odpowiedzialna za/ zaangażowana w oddziaływanie” lub „miejsce oddziaływania/ interakcji/ wiązania/ wiążące”;
- str. 65. niepotrzebne „s” w „Rola AaFEcR, stanowiącego IDR na końcu C”.

## Podsumowanie

Pracę doktorską oceniam ogólnie jako bardzo wartościową, zarówno ze względu na pionierski charakter związany z otrzymaniem nowego obiektu - fragmentu F receptora ekdyzonu komara egipskiego - jak i na różnorodność zastosowanych metod, których konsekwentne użycie doprowadziło do otrzymania ciekawych wyników. Wypełniają one w istotny sposób dotychczasową lukę w wiedzy na temat EcR i zostały opublikowane w dwóch artykułach w dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: Więch A,



Rowińska-Żyrek M, Wąty J, Czarnota A, Hołubowicz R, Szewczuk Z, Ożyhar A, Orłowski M. *The intrinsically disordered C-terminal F domain of the ecdysteroid receptor from Aedes aegypti exhibits metal ion-binding ability.* **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2019; 186:42-55. oraz Rowińska-Żyrek M, Więch A, Wąty J, Wieczorek R, Witkowska D, Ożyhar A, Orłowski M. *Copper(II)-Binding Induces a Unique Polyproline Type II Helical Structure within the Ion-Binding Segment in the Intrinsically Disordered F-Domain of Ecdysteroid Receptor from Aedes aegypti.* **Inorg Chem.** 2019; 58(17): 11782-11792. Doktorantka jest również autorką dwóch innych publikacji w bazie JCR. Była też bardzo prężna w promocji swoich wyników poprzez aktywną działalność konferencyjną oraz odbyła roczny zagraniczny staż naukowy w Instytucie Genetyki i Biologii Molekularnej i Komórkowej w Illkirch we Francji w ramach stypendium im. Iwanowskiej z NAWA. Widać wielkie zaangażowanie Doktorantki w pracę naukową, własny rozwój zawodowy oraz w popularyzację nauki.

Podsumowując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia kryteria formalne i zwyczajowe, wobec czego wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej *Nauki Chemiczne* Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr Anny Więch-Walów do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Anna Niedźwiecka