

Prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Ul. F. Joliot Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 23.08.2022

Recenzja

Rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Anny Juli Więch-Walów pt. „Analiza molekularna regionu F receptora ekdyteroidowego z *Aedes aegypti*” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Andrzeja Ożyhara w Zakładzie Biochemii Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej.

Ekspresja genów u wszystkich organizmów żywych jest podstawowym warunkiem prawidłowego rozwoju i funkcjonowania. Z tego powodu ekspresja genów jest regulowana na wszystkich poziomach. Ważnym punktem kontrolnym jest transkrypcja DNA, która jest kontrolowana przy czynnikach transkrypcyjnych. Największą grupę czynników transkrypcyjnych stanowi rodzina receptorów jądrowych. Receptory jądrowe opisano u wielu organizmów, od nicieni do ssaków. Te indukowane przez ligandy czynniki transkrypcyjne odgrywają kluczową rolę w prawie wszystkich procesach fizjologicznych, regulują proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek. Receptory jądrowe po związaniu lipofilnego hormonu przemieszczają się do jądra komórki, pozwalając na regulację transkrypcji genów przez cząsteczki lipofilowe, np. steroidy czy retinoidy. Efektem aktywacji receptora jest zwiększenie transkrypcji niektórych genów, a hamowanie innych i wynika on ze współdziałania kilku sąsiadujących motywów regulatorowych w sekwencji DNA w obrębie promotora. Kanoniczna struktura receptora jądrowego składa się z wielu domen. Domena N-końcowa, wiążąca DNA, region zawiasowy, domena wiążąca ligand są dobrze zbadane. Znana jest struktura i sekwencja domeny wiążącej DNA (DBD), struktura krystalograficzna domeny wiążącej ligand (LBD). Natomiast mało zbadany jest C-końcowy region receptora jądrowego, region F, jego sekwencja i długość są bardzo zróżnicowane. W pracy doktorskiej pani mgr inż. Anny Więch-Walów podjęła się analizy molekularnej regionu F receptora ekdyteroidowego z *Aedes aegypti* (komar egipski). Ważny jest też wybór komara egipskiego jako obiektu badań w kontekście jego zaangażowania a procesie transmisji wirusów dengi czy gorączki Zika, mogą one umożliwić kontrolowane ograniczenie populacji komara.

W opinii recenzenta temat rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Anny Więch-Walów jest ważny, naukowo aktualny i spełnia wymogi stawiane rozprawie doktorskiej.

Praca doktorska posiada klasyczny układ, liczy 86 stron maszynopisu i zawiera 25 rysunków i 16 tabel. Spis cytowanego piśmiennictwa obejmuje ponad 240 opisano pozycji literaturowych. Na początku pracy znajduje się spis treści, spis skrótów oraz streszczenie. Kolejno w „Wstępie” liczącym 12 stron maszynopisu doktorantka w skrócie opisuje receptor jądrowy, przedstawia schemat jego budowy domenowej, opisuje budowę i role poszczególnych domen, mechanizm działania receptora jądrowego. Omawia cykl życiowy komara egipskiego i jego rolę w przenoszeniu wirusów dengi i gorączki Zika.

Cel pracy bardzo precyzyjnie zdefiniowany dosłownie w dwóch zdaniach oraz w pięciu punktach opisano zaplanowane zadanie badawcze.

Rozdział „Materiały i metody” przedstawiony na dalszych 14 stronach zawiera szczegółowy opis stosowanych procedur, umożliwiający wierne powtórzenie eksperymentów i świadczy o doskonałej znajomości stosowanych metod. Zawiera on również spis stosowanych odczynników. Doktorantka wykazała się szerokim warsztem badawczym, opracowała warunki ekspresji w *E. coli* w układzie heterologicznym rekombinowanej domeny F w formie białka fuzyjnego z TF (TF-AaFEcR), nadekspresji znakowanego białka izotopami oraz ich oczyszczania chromatograficznego. Opracowała metodę odtrawienia białka fuzyjnego (TF) oraz rozdziału produktów trawienia. W badaniach stosuje spektroskopie mas AaFEcR i jej kompleksów z kationami. Analizuje właściwości hydrodynamiczne domeny F metodami ultrawierowania i sączenia molekularnego. Stosuje również spektroskopie NMR.

Rozdział wyniki to kolejne 18 stron maszynopisu, został on podzielony na podrozdziały odpowiadające poszczególnym etapom pracy. Ułatwia to zrozumienie wielowątkowej rozprawy doktorskiej oraz zapewnia przejrzysty układ prezentowanych wyników. Jest on bogato ilustrowany rysunkami i ułatwiającymi czytelnikowi śledzenie kolejnych etapów pracy. Na podkreślenie zasługują bardzo staranne opisy pod rysunkami. Drobnym wyjątkiem jest opis pod rysunkiem 6.4, zamiast nagrane widmo wolałbym zarejestrowane widmo.

Doktoranta wykazał się szerokim warsztem badawczym, opanowała metodę konstrukcji wektora ekspresyjnego ich jego zastosowania w ekspresji białka w *Escherichia coli* oraz oczyszczanie tego białka, opanowała szeroką gamę wyżej wymienionych metod badawczych.

Kolejny rozdział to licząca siedem stron „Dyskusja”, zawierająca wnioski wypływające z przeprowadzonych badań. Czyta się ją z dużą przyjemnością i w mojej ocenie jest bardzo dobrym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Podsumowuje osiągnięcia doktorantki na tle danych literaturowych.

Pracę kończy spis literatury liczący 243 pozycje w tym ponad pięćdziesiąt to pozycje z ostatniej dekady. Świadczy to o dużej wiedzy jaką musiał posiadać doktorantka przy zaznajamianiu się z tak obszerną literaturą.

Wśród wyników przedstawionych w rozprawie, zdaniem recenzenta na podkreślenie zasługuje:

- 1 Opracowanie warunków nadekspresji i oczyszczania AaFEcR.
- 2 Wykazanie, że strukturą przyjmowaną przez AaFEcR jest prawie stopiona globula (PMG).
- 3 Identyfikacja reszt w obrębie AaFEcR koordynujących oddziaływanie z jonami Zn^{2+} oraz Cu^{2+} .
- 4 Potwierdzenie powstawania kompleksów peptyd jon metalu z wykorzystaniem peptydów. Reprezentują one fragmenty sekwencji w obrębie AaFEcR potencjalnie odpowiedzialne za oddziaływanie z jonami Zn^{2+} oraz Cu^{2+} .

Rozprawę wyróżnia bardzo starannie opracowana strona graficzna, bardzo dobrze zaprojektowane wykonane rysunki ułatwiają zrozumienie zasad i celów prowadzonych eksperymentów jak i prawidłowość wyciąganych wniosków. Napisana jest poprawnym językiem, praktycznie nie ma nie poprawnych czy niezręcznych sformułowań. Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Anny Więch-Walów. Realizuje w pełni postawione cele badawcze, jest ona oryginalnym osiągnięciem naukowym i wnosi nowe ciekawe informacje na temat jest C-końcowy region receptora jądrowego, regionu F receptora ekdysteroidowego z komara egipskiego. Z uznaniem notuje fakt, że wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej ukazały się na łamach prestiżowych czasopism, są to trzy publikacje w : *New Perspectives of Nuclear Receptor Studies. Cells.*;

Inorg Chem.; oraz *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane pracą doktorskim przewidziane w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Anny Więch-Walów do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto ze względu na znaczenie naukowe recenzowanej pracy, potwierdzone trzema publikacjami w prestiżowych czasopismach naukowych (sumaryczny IF 15,23), wnioskuję o jej wyróżnienie.

Andrzej Szczepaniak