

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

### **Recenzja**

**Rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Kozłowskiej pt. „Charakterystyka molekularna białka kalponino-podobnego Chd64 i immunofiliny FKBP39” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Andrzeja Ożyhara w Zakładzie Biochemii Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej.**

Organizmy eukariotyczne dla ich prawidłowego funkcjonowania i rozwoju wymagają istnienia wewnątrzkomórkowych i międzykomórkowych szlaków komunikacyjnych. Komunikację taką umożliwiają cząsteczki sygnałowe, do których zaliczają się hormony. Badaniami szlaków sterujących rozwojem owadów od lat z dużym sukcesem zajmuje się zespół kierowany przez prof. dr hab. inż. Andrzeja Ożyhara. W tych organizmach metamorfoza regulowana jest przez hormon juwenilny i 20-hydroksyekdyzon. Funkcja biologiczna i mechanizm działania 20-hydroksyekdyzon są dość dobrze poznane w przeciwieństwie do hormonu juwenilnego, którego mechanizm działania nie jest w pełni poznany. Ostatnio w *Drosophila melanogaster* zidentyfikowano dwa białka biorące udział w przekazywaniu sygnału od hormonu juwenilnego, które wiążą się do fragmentu DNA będącego elementem odpowiedzi na hormon juwenilny. Białkami tymi są kalponinopodobne białko Chd64 oraz FKBP39 należące do rodziny immunofilin. W przedstawionej do oceny pracy badany są te białka przekazujące sygnał hormonalny zapewniający prawidłowy rozwój owadów. Jest to temat oryginalny, nowatorski, wymagający solidnej znajomości literatury naukowej oraz opanowania szerokiego spektrum zaawansowanych metod badawczych. W

opinii recenzenta temat rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Kozłowskiej jest naukowo aktualny i spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Recenzowana rozprawa posiada tradycyjną strukturę. Liczy 180 stron maszynopisu i zawiera 45 rysunków i 12 tabele. Spis cytowanego piśmiennictwa obejmuje 180 pozycji literaturowych. Pracę rozpoczyna dwustronicowe „Streszczenie”, kolejno w obszernym „Wstępie” liczącym trzydzieści cztery strony, doktorantka opisuje rolę białek Chd64 i FKBP39 w regulacji odpowiedzi na hormon juvenilny, charakteryzuje rodzinę białek CH, kalponin i immunofilin, opisuje funkcję Chd64 i FKBP39 w *Drosophila melanogaster*. Ostatni podrozdział wstępu poświęca białkom inherentnie nieuporządkowanym. Następnie w sposób bardzo syntetyczny definiuje cel pracy. Rozdział „Materiały i Metody” przedstawiony na dalszych 29 stronach zawiera bardzo szczegółowy opis stosowanych procedur, umożliwiając wiernie powtórzenie eksperymentów i świadczy o doskonałej znajomości stosowanych metod. Doktorantka wykazała się wszechstronnym warsztatem badawczym, opanowała metody ekspresji badanych białek w komórkach *Escherichia coli*, oczyszczania rekombinowanych białek. Analizowała wynik ekspresji rekombinowanych białek elektroforetycznie i metodą Western blot. Opisuje szczegółowo metody fizykochemiczne, które stosowała do badania właściwości białek takie jak spektrometria mas, dichroizm kołowy, fluorescencja, sączenie molekularne, ultrawierowanie.

Rozdział wyniki obejmuje 53 stron maszynopisu, stanowi najbardziej obszerna część pracy doktorskiej i został podzielony na części odpowiadające poszczególnym etapom pracy eksperymentalnej. Ułatwia to zrozumienie rozprawy doktorskiej oraz zapewnia przejrzysty układ prezentowanych wyników. Tak obszerna praca i użycie wielu metod badawczych wymagała nawiązania współprac. Pomiary ESI-MS były wykonywane w ramach współpracy z prof. Zbigniewem Szewczukiem z Uniwersytetu Wrocławskiego, ultrawierowanie

analityczne we współpracy dr inż. Michałem Jakóbcem i dr inż. Dominiką Bystranowską z Politechniki Wrocławskiej, eksperymenty SAXS z dr Kamilem Szpotkowskim z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu oraz dr Michałem Taube i prof. Maciejem Kozakiem z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, eksperymenty HDX-MS we współpracy z dr Magdaleną Kaus-Drobek z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, eksperymenty SEC-MALS we współpracy z dr Mariuszem Cieciorą z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Pozytywnie oceniam umiejętność nawiązywania licznych współprac, ale w przypadku pracy doktorskiej prosiłbym o precyzyjne określenie własnego udziału w tych badaniach.

Wśród wyników przedstawionych w rozprawie na podkreślenie zasługuje:

1. Otrzymanie rekombinowanych pochodnych Chd64 i FKBP39
2. Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowej Chd64 i FKBP39 przewidująca obecność fragmentów o nieuporządkowanej strukturze
3. Badanie właściwości fizykochemicznych Chd64 i FKBP39
4. Analiza właściwości strukturalnych Chd64 za pomocą SAXS, wykazanie obecności regionów nieuporządkowanych
5. Wygenerowanie modelu struktury FKBP39 na podstawie analizy SAXS

Kolejny rozdział to licząca 23 strony dyskusja, zawierająca wnioski z przeprowadzonych badań. Została ona podzielona na części odpowiadające etapom pracy i podsumowuje osiągnięcia doktorantki na tle prowadzonych na świecie badań. Szczególnie interesujący jest rozdział wykazujący, że białko FKBP39 tworzy dynamiczny i częściowo nie uporządkowany tetramer, który charakteryzuje dynamiczna, elastyczna struktura. Na podstawie analizy SAXS

opisano dwanaście modeli struktur tetrameru tego białka. Nasuwa się pytanie czy te struktury występują *in vivo*, czy mają znaczenie funkcjonalne?

Rozprawę wyróżnia bardzo starannie opracowana strona graficzna, bardzo dobrze zaprojektowane i 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.

Wyjątkiem są tylko dwa zwroty: „w szczegółach atomowych poznana struktura” i „struktura krystaliczna” (Wstęp, str. 21).

Podsumowując wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr inż. Małgorzaty Kozłowskiej, zastosowanie niezwykle szerokiego spektrum nowoczesnych technik eksperymentalnych pozwoliło na uzyskanie bardzo wartościowych wyniki wnoszących istotny wkład w poznanie szlaku przekazywania sygnału od hormonu juvenilnego. Moją wysoką ocenę pracy doktorskiej uzasadnia fakt opublikowania części wyników, są to dwa artykuły opublikowane w PlosOne oraz przygotowanie trzeciego artykułu będącego w recenzji. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane pracą doktorskim określonym w art. 13 ustawy z dnia 14. 03. 2003 roku i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Wrocław, 23.01.2017

Prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak