

Lublin, 18 stycznia 2017 r.

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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kozłowskiej pt. „Charakterystyka molekularna białka kalponino-podobnego Chd64 i immunofiliny FKBP39”

Białka stanowią jedną z zasadniczych klas molekuł w Biosferze, pełniąc kluczowe funkcje biologiczne, między innymi jako enzymy, elementy strukturalne oraz uczestnicząc formowaniu regulacji hormonalnej procesów fizjologicznych. Udokumentowany udział w aktywności regulacyjnej podstawowych procesów fizjologicznych w rozwoju owadów stanowi wspólną cechę obydwu białek badanych w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej, białka kalponino-podobnego Chd64 oraz immunofiliny FKBP39. Dodatkową wspólną cechą tych białek, jest posiadanie domen inherentnie nieuporządkowanych, których istnienie zdaje się przeczyć paradygmatowi, według którego już sama struktura pierwszorzędowa białek stanowi element determinujący formę przestrzenną tego białka. Tematyka rozprawy doktorskiej pani mgr. Małgorzaty Kozłowskiej obejmuje te dwa obszary, czyli poznanie szczegółów ścieżek sygnalizacyjnych u owadów oraz odkrywanie zależności struktury i funkcji fizjologicznych białek inherentnie nieuporządkowanych. Tematykę tak zarysowaną postrzegam jednoznacznie jako ważną, a zarazem ogromnie interesującą.

Praca wykonana została w Zakładzie Biochemii, na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem prof. dr. hab. Andrzeja Ożyhara, w renomowanym ośrodku

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



związanym z badaniami biochemicznymi i biofizycznymi białek.

Praca doktorska mgr Małgorzaty Kozłowskiej zredagowana została w języku polskim, na 180 stronach standardowego maszynopisu, według typowego, optymalnego w moim przekonaniu układu. Po spisie treści, wykazie skrótów oraz streszczeniu, doktorantka przedstawia, jako rozdział 3. „Wstęp”, zarysowujący zagadnienia związane z problematyką odpowiedzi na hormon juvenilny w regulacji rozwoju *Drosophila melanogaster*. Ostatni podrozdział wstępu przybliży zagadnienia związane bezpośrednio z problematyką białek inherentnie nieuporządkowanych. Bardzo cennym aspektem rozdziału wstępnego jest ukazanie obszarów wiedzy, które wymagają uzupełnienia, stanowiąc podstawę wyzwań poznawczych. Niektóre z tych wyzwań podjęte zostały bezpośrednio przez Doktorantkę, w zaprezentowanej przez Nią rozprawie doktorskiej. Cel rozprawy, tak ogólny jak i dwa cele szczegółowe, sformułowane zostały w ramach krótkiego rozdziału 4. „Cel pracy”. Rozdział 5., zatytułowany „Materiały i metody” przedstawia w sposób wyjątkowo szczegółowy, jak na tego typu opracowania, wykazy odczynników, opisy protokołów preparatyki oraz szczegóły analiz, umożliwiające odtworzenie prowadzonych eksperymentów. Mógłbym jedynie zasugerować aby wszystkie wirowania, opisywane na str. 60., charakteryzować wartością przyspieszenia w miejsce częstości obrotów rotora, co może być wieloznaczne bez znajomości promienia. W tym miejscu swojej analizy chciałbym zwrócić uwagę na wachlarz podejść metodologicznych oraz bogaty arsenał specyficznym dobranych metod eksperymentalnych, wykorzystanych w pracy doktorskiej pani mgr Małgorzaty Kozłowskiej. Stosowane były, między innymi, chromatografia powinowactwa, sączenie molekularne, spektrometria mas, spektroskopia dichroizmu kołowego, spektroskopia fluorescencyjna, ultrawirowanie analityczne, małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego, wymiana proton-deuter oraz sączenie molekularne z wielokątowym rozpraszaniem światła laserowego. Sprawia to nieodparte wrażenie, iż wszelkie możliwe środki zaangażowane zostały w celu uzyskania odpowiedzi na stawiane pytania naukowe, z wykorzystaniem bogactwa metod oraz czasem, dzięki dobrodzieństwu nawiązywanych, wartościowych współpracy. Późniejsza analiza rozprawy pokazała również, jak wartościowe było komplementarne zastosowanie podejścia teoretycznego w postaci analiz bioinformatycznych, oraz podejścia stricte eksperymentalnego.



Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej bardzo wysokim poziomie merytorycznym, jest prezentacja wyników oryginalnych prac badawczych, mająca miejsce w ramach rozdziału 6. „Wyniki”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą sekwencję prowadzonych prac badawczych. W pierwszej kolejności, dotyczyły one opracowania systemu bakteryjnego oraz technik izolacji i oczyszczania, umożliwiających wydajne uzyskiwanie znacznych ilości badanych białek. W kolejnym kroku, zaprezentowane zostały wyniki analiz bioinformatycznych, których wyniki stanowiły częstokroć punkt wyjścia do badań eksperymentalnych. Opisane badania doświadczalne obejmowały, kolejno, analizy właściwości fizykochemicznych białka Chd64 oraz białka FKBP39. Wyniki badań przedyskutowane zostały w ramach rozdziału 7. „Dyskusja”. W moim odczuciu, zaprezentowana dyskusja wyników przeprowadzona została w sposób wieloaspektowy, w oparciu o aktualne piśmiennictwo oraz ze zwróceniem szczególnej uwagi na elementy nowości naukowej uzyskanych rezultatów. W ramach dyskusji prezentowane jest również jednostronicowe podsumowanie, jako podrozdział 7.5. Pracę zamyka wykaz dorobku naukowego Doktorantki, jako rozdział 8., dodatek prezentujący sekwencje aminokwasowe białek Chd64 oraz FKBP39, jako rozdział 9., spis tabel i rysunków, jako rozdział 10. oraz wykaz cytowanego piśmiennictwa, w ramach rozdziału 11. „Literatura”.

W pełni podzielam zdanie Doktorantki, co do wskazania rezultatów pracy doktorskiej o szczególnym znaczeniu naukowym, mające wyraz w dyskusji wyników. Wśród rezultatów o szczególnej wadze podkreślić chciałbym:

1. Opracowanie metod umożliwiającej uzyskiwanie znacznych ilości czystych białek Chd64 oraz FKBP39, które mogą być również wykorzystane przez inne laboratoria.
2. Ukazanie dualnej natury obydwu badanych białek, zawierających elementy o ściśle zdefiniowanej strukturze drugorzędowej oraz fragmenty inherentnie nieuporządkowane.
3. Zaproponowanie prawdopodobnego związku określonej struktury białek Chd64 oraz FKBP39 z pełnionymi przez nie funkcjami fizjologicznymi.
4. Określenie stanów denaturacji/renaturacji obydwu białek, w oparciu o precyzyjne analizy chromatograficzne oraz spektroskopowe.



Rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Kozłowskiej jest również, moim zdaniem, opracowaniem wyjątkowym, w aspekcie wysokiego poziomu edytorskiego oraz klarowności i precyzji sformułowań. Mógłbym zaproponować Autorce dosłownie nieliczne korekty. Oto ich krótka lista:

1. Str. 13, 8. wiersz od góry, jest „ekdzyon” a chodziło zapewne o „ekdyzon”
2. Str. 13, 1. wiersz od dołu, zamiast „odrywają” raczej „odgrywają”
3. Str. 40, 8. wiersz od dołu, zamiast „skupiła” proponuję „skupiło”
4. Str. 113, Rys. 6.18, oś rzędnych opisana jest „Fluorescencja”, co można poprawić na „Intensywność fluorescencji”, w myśl zasady wielkości fizyczne nie zaś zjawiska. Z drugiej jednak strony, opis osi zastosowany w rozprawie jest powszechny, nawet w specjalistycznej literaturze spektroskopowej.

Tak zaawansowane i wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pani mgr Małgorzaty Kozłowskiej, nie tylko przynosi wiele cennych informacji ale również pobudza ciekawość poznawczą, czego wyrazem może być sformułowanie następujących problemów oraz pytań:

1. Wstawka na Rys. 6.18 (str. 113) pokazuje bardzo precyzyjną zależność, z której wyznaczyć można punkt przejścia denaturacyjnego, na podstawie pomiarów fluorescencyjnych. Porównanie tej wielkości z analogicznymi, wyznaczonymi na podstawie analizy widm CD oraz sączenia molekularnego wskazuje na znaczne odstępstwo wyniku uzyskanego na podstawie analiz fluorescencyjnych (Tab. 6.4, str. 115). Zastanawiam się, na ile jest to efektem samej natury procesu, czyli wpływu rozwijania białka na ekspozycję fluoroforów na środowisko polarne, na ile zaś samej metody analizy przesunięcia batochromowego widma fluorescencji reszt tryptofanylowych? Czy podobną wielkość C_m otrzymało by się wykreślając w funkcji stężenia denaturanta nie intensywność fluorescencji, rejestrowaną przy



dowolnej długości fali, ale na przykład, stosunek intensywności przy 346 nm oraz 360 nm, odpowiadających maksimum emisji obydwu form spektralnych?

2. Zastanawiam się, czy pomiary czasów życia fluorescencji reszt tryptofanowych, szczególnie wrażliwych na polarność najbliższego otoczenia, mogłoby przynieść dodatkowe informacje w stosunku do analizy widm emisji fluorescencji, prezentowanych w rozprawie. Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktorantki na ten temat.

3. Bardzo interesujące wydają się również wyniki wskazujące na oligomeryzację białka FKBP39. Zastanawiam się, czy wartość dodaną, w stosunku do przeprowadzonych analiz, mogłoby przynieść zastosowanie komplementarnej analizy absorpcji promieniowania z zakresu podczerwieni (FTIR), w związku ze szczególną wrażliwością tej techniki badawczej na formowanie supramolekularnych struktur białkowych?

4. Precyzyjne zależności prezentowane w ramach Rys. 6.23 (str. 123) opierają się na pomiarach absorbancji białka przy 280 nm. Zastanawiam się, czy możliwe jest iż złożone profile elucji frakcji białkowych odzwierciedlają również, w pewnym stopniu, odmienne współczynniki ekstynkcji różnych form organizacji molekularnej białka przy tej wybranej długości fali promieniowania?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Małgorzata Kozłowska przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opartą na licznych oraz ważnych wynikach przeprowadzonych przez siebie badań naukowych. Badań, wymagających od eksperymentatora dużej wiedzy i doświadczenia z zakresu biochemii i biofizyki białek oraz biegłości w stosowaniu wielu technik i podejść badawczych, tak eksperymentalnych jak i bioinformatycznych. Większość wyników oryginalnych prac badawczych, przedstawionych



w ramach rozprawy doktorskiej, stało się również podstawą wartościowych artykułów naukowych, opublikowanych w znaczących czasopismach międzynarodowych. Wśród prac tych znalazłem piękny, interesujący i ważny artykuł, w którym Doktorantka występuje w charakterze pierwszego autora, który ukazał się właśnie w renomowanym czasopiśmie Scientific Reports (7 (2017) art. no. 40405). W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez Panią mgr Małgorzatę Kozłowską 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 (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, zarówno wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań jak i waga uzyskanych wyników, które stanowią podstawę rozprawy, czyni ją, w moim odczuciu, godną wyróżnienia. Gratulując Doktorantce oraz Promotorowi tak cennych rezultatów, uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie mojej pozytywnej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W. L. L.