

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Joanny KENANIDIS pt. „*Analiza molekularna regionu A/B receptora jądrowego z komara egipskiego (Aedes aegypti)*”

Kontekst

Praca doktorska mgr inż. Joanny Kenanidis łączy w sobie długoletnie zainteresowania Zakładu Biochemii molekularnym mechanizmem hormonalnej kontroli rozwoju owadów oraz jego najnowsze badania skupione wokół struktury i funkcji białek wewnątrznie nieuporządkowanych (IDP). Gwałtowny rozwój narzędzi biochemicznych ułatwił pozyskiwanie dużych ilości doskonałej jakości materiału do badań w postaci roztworów białek lub ich dowolnie wybranych fragmentów oraz ich szybką i precyzyjną analizę biochemiczną i porównawczą fizykochemiczną. W przypadku wielu badanych ostatnio w Zakładzie białek często okazywało się, że najbardziej interesujące z nich, a przynajmniej ich fragmenty, to właśnie IDP, które wymykają się standardowym procedurom opracowanym dla białek globularnych.

Statystyka i zawartość

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Joanny Kenanidis składa się z pięciu zasadniczych rozdziałów, uzupełnionych o Streszczenie, bogaty spis literatury oraz różnego rodzaju zestawienia dotyczące zarówno samej pracy jak i dorobku naukowego Doktorantki. Czytanie ułatwia spis skrótów i akronimów.

Spis literatury obejmuje szacunkowo ponad 500 pozycji, co dowodzi niezwykle starannego przygotowania i mrówczej pracy kandydatki. W pracy znaleźć można 15 tabel i 39 rysunków o eleganckiej szacie graficznej i doskonałej przejrzystości.

Jeszcze przed streszczeniem pojawia się kilkustronicowy spis skrótów, bez którego osobie spoza branży trudno byłoby zrozumieć sporą część tekstu. Obszerny, 50-stronicowy Wstęp omawia dość szczegółowo trzy zasadnicze zagadnienia: najpierw autorka wyjaśnia rolę receptorów jądrowych na tle ogólnego zagadnienia komunikowania się komórek w organizmie wielokomórkowym, następnie omówiony jest komar *Aedes aegypti* ze szczególnym uwzględnieniem roli receptorów jądrowych w jego cyklu życiowym, a ostatnie 20 stron poświęcone jest białkom IDP w ogólności i w odniesieniu do NTD w receptorach jądrowych. Krótki rozdział Cel, definiujący jasno zamierzenia autorki, prowadzi do rozdziału Materiały i Metody. Na niemal trzydziestu stronach autorka opisuje wszystkie szczegóły laboratoryjne swoich działań oraz omawia 25 technik badawczych wykorzystanych otrzymania, oczyszczenia i scharakteryzowanie swoich próbek. Dalej następuje 40 stron Wyników, stanowiących zapis ogromu pracy laboratoryjnej wykonanej przez Doktorantkę. Wyniki zaprezentowane są w postaci zdjęć, schematów, wykresów i tabel w czytelnej i eleganckiej szacie graficznej wraz z komentarzem niezbędnym do ich zrozumienia. Zasadniczą część pracy kończy kilkunastostronicowy rozdział Dyskusja z Podsumowaniem. W Dyskusji Doktorantka omawia

zgromadzone wyniki porównując je z dokonaniem innych autorów i dokonując ich końcowej interpretacji. Kończące Dyskusję Podsumowanie streszcza wnioski Doktorantki, które wydają się dobrze potwierdzać osiągnięcie postawionych celów. Pracę zamykają rozdziały: Dorobek naukowy, Dodatek A z listą sekwencji nukleotydowych, Spis rysunków, Spis tabel oraz Bibliografia.

Ocena merytoryczna

Podstawowym celem rozprawy było scharakteryzowanie właściwości molekularnych domeny N-końcowej (NTD) jednej z odmian białka Ultraspiracle z komara *Aedes aegypti*, pełniącego rolę receptora jądrowego. Ze względu na wcześniejsze przypuszczenia, skupiono się na zbadaniu czy i w jakim zakresie domena ta posiada cechy charakterystyczne dla białek wewnątrznie nieuporządkowanych. Do realizacji tego celu konieczne było opracowanie systemu ekspresyjnego wraz z wydajnymi metodami oczyszczania niezbędnego zestawu rekombinowanych białek oraz scharakteryzowanie ich właściwości biochemicznych i fizykochemicznych. Wybór obiektu badań został świetnie uzasadniony poprzez ukazanie skali problemów wywoływanych przez zakażenia drobnoustrojami przenoszonymi przez *Aedes aegypti*. Niewątpliwie dokładne poznanie mechanizmów kontrolowania najważniejszych procesów życiowych tego komara dałoby szansę na skuteczne ograniczenie jego rozwoju.

Opis części doświadczalnej poprzedza bardzo obszerny opis aktualnego stanu wiedzy na temat budowy i funkcji receptorów jądrowych. Zastosowano najnowocześniejsze metody badawcze, z których kilka jeszcze niedawno dopiero raczkowała. Plan badań został starannie nakreślony i w razie konieczności uzupełniany. Na uwagę zasługuje np. badanie szybkości wymiany izotopów, czy wydajności wiązania ligandów przy użyciu mikrotermoforezy. Bardzo ciekawa jest również obserwacja dość wydajnego zjawiska dimeryzacji NTD i zwrócenie uwagi na możliwe istotne konsekwencje tego efektu.

Doktorantka konsekwentnie bada NTD różnymi technikami i niemal za każdym razem uzyskuje potwierdzenie braku uporządkowania jego struktury. Zastanawiam się z jakim stopniem nieuporządkowania mamy tu do czynienia. Mam na myśli przede wszystkim swobodę konformacyjną tego białka. Jeśli zachowuje się bardziej jak kłębek statystyczny, to są tego dwie ważne konsekwencje: i) prawdopodobnie nie występują trwałe domeny o strukturze helis alfa lub kartek beta, bo brak zewnętrznej stabilizacji będzie umożliwiawał rozpad takich domen, a tworzyć się będą mogły w różnych miejscach łańcucha; ii) w ogóle nie ma sensu mówić o konformacji, czy kształcie cząsteczki, ponieważ w każdym momencie występuje cały rozkład mocno różniących się konformacji i sens fizyczny mają tylko parametry opisujące ten rozkład, np. średni promień żyrcacji, czy średni promień hydrodynamiczny. Druga możliwość, to istnienie trwałych domen luźno ze sobą powiązanych, co automatycznie nadaje sens używaniu sformułowania „struktura białka”. Ta druga możliwość wydaje się mocno ograniczona przez wyniki pomiarów szybkości wymiany izotopów opisane w rozdziale 6.5.2. Pewna niejednoznaczność tych wyników wiąże się z ciekawą obserwacją polegającą na słabszym dostępie atomów łańcucha głównego do rozpuszczalnika w „odciętej” domenie NTD niż w tej samej domenie będącej częścią całego białka Usp. Nie potrafię wyjaśnić tego inaczej jak większą swobodą konformacyjną „odciętej” NTD pozwalającą na tworzenie większej liczby (tymczasowych) domen o określonej strukturze drugorzędowej. Np. umieszczenie jednego końca kłęбка poza jego obrysem musi prowadzić do jego wydłużenia. Tak czy inaczej, wydaje się, że model kłęбка jest dość adekwatny dla NTD i może warto tak o niej myśleć i w tym

duchu interpretować wyniki. O ile w pierwotnym opisie wyników użycie sformułowań typu „kształt”, „struktura” ma uzasadnienie, o tyle w podsumowaniu właściwe byłoby chyba co najmniej dopuszczenie opisu bazującego na parametrach średnich i nieodwołującego się do hipotetycznej, a nieistniejącej, struktury NTD. W Podsumowaniu pojawia się co prawda pojęcie „zbiór konformerów”, ale poprzedzone jest wyraźnym odniesieniem do kształtu (wydłużony, eliptyczny).

Ocena dorobku

Wśród swoich osiągnięć autorka wymienia:

- 6 publikacji „twardych” (IF), z czego 1 związana z tematyką pracy doktorskiej
- Kilka publikacji w języku polskim, najczęściej opisujących aspekty metod badawczych
- 2 rozdziały w książkach o zasięgu międzynarodowym
- Udział w kilku konferencjach krajowych i kilku zagranicznych
- Udział w 3 warsztatach doskonalących metodykę badawczą i zarządzanie projektami.

Moim zdaniem to lista spełniająca z naddatkiem wymogi osoby ubiegającej się o stopień doktora.

Uwagi/Pytania

Str. 93 – lepkość podana jako 0.01 mPa·s - prawdopodobnie były to P (puazy)

gdzieniegdzie w tekście mieszane są kropki i przecinki jako separatory dziesiętne

Analiza wyników MST:

- na str. 133 występuje odwołanie do Rysunku 6.18A zamiast do 6.19A.
- Wyniki na Rys 6.19C wydają się sugerować wartość K_D na poziomie 200 nM, tymczasem jako wynik podaje się wartość 85,5 nM.
- Proszę się zastanowić jak mogłoby wyglądać Podsumowanie, jeśli by porzucić koncepcję ustalonego kształtu. Czy zgodziłaby się Pani z takim obrazem i czy niosłoby to jakieś konsekwencje w kwestii oddziaływania NTD z otoczeniem (dowolną inną cząsteczką)?

Podsumowanie

Stwierdzam, że rozprawa spełnia 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 (t.j. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o **dopuszczenie pani mgr inż. Joanny KENANIDIS do dalszych etapów przewodu.**

Ze względu na wysokie walory rozprawy, **wnioskuję również o jej wyróżnienie.**

prof. UAM dr hab. Jacek Gapiński

