



Prof. dr hab. Hanna Jańska

Wrocław, 2017-03-29

Zakład Biologii Molekularnej Komórki

Wydział Biotechnologii

Uniwersytet Wrocławski

Email: janska@ibmb.uni.wroc.pl

Tel. (071) 375 62 43

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anety Tarczewskiej zatytułowana „Analiza złożoności strukturalnej Chd64 i FKBP39 z *Tribolium castaneum*”

Kluczowymi czynnikami kontrolującymi wzrost i metamorfozę owadów są dwa współdziałające lipofilowe hormony: 20-hydroksyekdyzon (20E) i hormon juwenilny (JH). Wiadomo, że ścieżki sygnałne uruchamiane przez te hormony krzyżują się, ale podstawy molekularne tych interakcji są słabo zrozumiałe. W 2007 roku ukazała się praca wskazująca, że dwa białka, kalponino-pochodne białko Chd64 oraz immunofilna FKBP39, są składnikami wielobiałkowego kompleksu, który bierze udział w dialogu pomiędzy 20E i JH u *Drosophila melanogaster*. Celem ocenianej rozprawy był identyfikacja cech molekularnych białek Chd64 i FKBP39 z *Tribolium castaneum*, owada stosunkowo odległego ewolucyjnie od *Drosophila melanogaster*, które pozwalają tym białkom funkcjonować w dynamicznym, wieloskładnikowym kompleksie regulacyjnym. Warto podkreślić, że rozprawa była realizowana pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Ożychara w Zakładzie Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, gdzie od wielu lat w oparciu o dogłębną wiedzę i z wieloma sukcesami naukowymi realizuje się badania dotyczące hormonów owadzych. W zakładzie, równoległe z badaniami Pani Anety Tarczewskiej, były prowadzone podobne badania nad homologicznymi białkami z *Drosophila melanogaster*. Taka strategia miała umożliwić sprawdzenie uniwersalności weryfikowanego mechanizmu regulacyjnego z udziałem owadzych białek Chd64 oraz FKBP39.

Rozprawa ma układ standardowy i liczy 148 stron. Rozpoczyna się długim, ale bardzo pomocnym zestawem skrótów i akronimów. Poza streszczeniem, wstępem, rozdziałami opisującymi cel pracy, materiały i metody, dyskusją, krótkim rozdziałem podsumowującym

wyniki i prezentującym perspektywy dalszych badań zawiera rozdział opisujący dorobek naukowy doktorantki. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi również rozdział nazwany dodatkiem zawierającym uzupełniające rysunki oraz katalog tabeli i rysunków. Ostatni rozdział to spis literatury.

Na początek moich rozważań pragnę zaznaczyć, że cała rozprawa doktorska jest w sposób logiczny uporządkowana, napisana jasno i ciekawie. Wstęp rozpoczyna się od opisu materiału badawczego, czyli filogenetyki i cech charakterystycznych owada *Tribolium castaneum*. W tym miejscu zabrakło mi jedynie nazwy potocznej i fotografii tego organizmu. Co było głównym powodem wyboru tego owada? Czy rozważano inne gatunki owadów? Następnie doktorantka omawia hormonalną regulację cyklu życiowego owadów. Szczególnie istotny w kontekście tematyki doktoratu jest podrozdział opisujący model krzyżowania się hormonalnych szlaków sygnałowych za pośrednictwem białek Chd64 i FKBP39. W dalszej części wstępu charakteryzowana jest rodzina białek do których należą białka będące przedmiotem badań. Wstęp kończy podrozdział dotyczący białek inherentnie nieuporządkowanych. Równie klarownie opisane są materiały i metody. Zwraca uwagę różnorodność stosowanych przez doktorantkę metod. Część z nich wykonywała sama, część we współpracy ze specjalistami. Ten bogaty zestaw metod przekłada się na bogactwo wyników zaprezentowanych w pracy.

Prezentacja wyników rozpoczyna się od opisu sposobu otrzymania i oczyszczania rekombinowanych białek Chd64 i FKBP39. Dowiadujemy się, że doktorantka przygotowała trzy typy konstruktów dla każdego białka, ale w pracy wykorzystała tylko konstrukty umożliwiające syntezę badanych białek z metką ośmiohistydylową na końcu C. W pracy podano powody odrzucenia pozostałych konstruktów z wyjątkiem konstruktów umożliwiającego otrzymanie białka Chd64 ze znacznikiem Strep na końcu N. Chciałabym wiedzieć jaki był powód w tym przypadku? Jest wysoce prawdopodobne, że badane owadzie białka ulegają modyfikacjom posttranslacyjnym. Czy nie lepiej byłoby nadprodukować rekombinowane białka z wykorzystaniem owadziego systemu ekspresyjnego, a nie zastosowanego w pracy bakteryjnego? Kluczowym krokiem w realizacji celu pracy było otrzymanie homogennych preparatów rekombinowanych białek. Dla obu białek procedura oczyszczania była dwustopniowa, jako pierwsza zastosowana została chromatografia powinowactwa, a następnie sączenie molekularne. W rezultacie otrzymano preparaty o czystości powyżej 95%. Nieco brakowało w pracy podania jakiej procentowości były żele wykorzystywane do analiz elektroforetycznych.

Następna część wyników to seria analiz bioinformatycznych składu i sekwencji aminokwasowych białek Chd64 i FKBP39. Doktorantka wspomina, że zastosowano szereg narzędzi, z których wybrano kilka, a ich wyniki opisano w rozprawie doktorskiej (str.74). Proszę podać przykładowo jakie wyniki odrzucono i dlaczego? Przedstawione w rozprawie analizy *in silico* wskazują, że oba białka posiadają zarówno domeny globularne jak i regiony nieuporządkowane. Białko Chd64 ma według przewidywań globularny rdzeń oraz nieuporządkowane regiony N i C końcowe, natomiast białko FKBP39 odwrotnie długi, nieuporządkowany region środkowy oskrzydłony dwiema uporządkowanymi domenami.

Przewidywania bioinformatyczne były następnie weryfikowane za pomocą szeregu metod biofizycznych umożliwiających wyznaczenie parametrów sugerujących kształt i strukturę analizowanych białek. Doktorantka udokumentowała, że cysteiny obecne w białku Chd64 nie tworzą mostków dwusiarczkowych i wspomina, że trzy z nich są eksponowane i trzy spośród nich - nie wiemy tylko czy te same - zajmują identyczną pozycję u wielu białek owadzych homologicznych do Chd64. Konserwowana pozycja sugeruje znaczenie strukturalne i/lub funkcjonalne. Jaka jest opinia Doktorantki ? W rozprawie znalazły się nie całkiem spójne opinie w tym względzie (str. 84 i str. 126). Analiza za pomocą spektroskopii CD ujawniła, że dominującym typem struktury drugorzędowej w białku Chd64 jest helisa. Wyniki otrzymane z analitycznego sączenia molekularnego i analitycznego ultrawiwrowania oraz analiza za pomocą małokątowego rozpraszania promieniowania X wskazują, że białko Chd64 ma asymetryczny, wydłużony kształt. Doktorantka zakłada, zapewne słusznie, że taki kształt wynika z obecnych na obu końcach nieuporządkowanych regionów. Obecność terminalnych, nieuporządkowanych struktur w białku CHd64 sugeruje również analiza wymiany izotopowej HDX-MS. Następnie, w celu wykrycia specyficznych cech strukturalnych Chd64 Doktorantka pokusiła się o przebadanie przejścia ze stanu natywnego do rozfałdowanego indukowanego przez chlorowodorek guanidyny. Wykorzystała trzy niezależne, ale uzupełniające się techniki, spektroskopię CD w celu monitorowania zmian w stabilności struktur drugorzędowych, fluorescencję reszt tryptofanu do badań integralności struktur trzeciorzędowych oraz sączenie molekularne do uwidocznienia zmian dotyczących całej cząsteczki. Te kompleksowe badania ujawniły, że w trakcie denaturacji chemicznej białko Chd64 tworzy specyficzny stan pośredni przypominający formę stopionej globuli (MG). Natomiast zastosowanie spektroskopii CD do śledzenia zmian w białku Chd64 pod wpływem wzrastającej temperatury pokazało, że białko to jest strukturą o znacznej stabilności i w przeciwieństwie do denaturacji chemicznej denaturacja termiczna tego białka jest

procesem nieodwracalnym. Czy oznacza to, że przejście ze stanu natywnego do rozwiniętego jest inne pod wpływem denaturacji cieplnej w stosunku do denaturacji chemicznej?

Kilka technik, jak, sączenie molekularne, ultrawierowanie analityczne, małowatowe rozpraszanie promieniowania X, analiza wymiany izotopowej HDX-MS czy badania stabilności termicznej Doktorantka zastosowała również do charakterystyki fizykochemicznej białka FKB39. Zasługą Autorki rozprawy jest udokumentowanie, że białko FKB39 posiada strukturę czwartorzędową tworząc pentamery o wydłużonym kształcie i luźnej strukturze. Trudno nie zgodzić się z interpretacją Doktorantki, że taka struktura jest najprawdopodobniej wynikiem występowania w białku długiego regionu nieuporządkowanego. Obecność takiego regionu w centralnej części FKB32 była przewidziana *in silico*, a następnie potwierdzona eksperymentalnie metodami biofizycznymi: SAXS, a przede wszystkim HDX-MS. Badania stabilności termicznej wykazały, że przejście białka FKB39 ze stanu natywnego do rozfałdowanego jest typowe dla białek oligomerycznych.

Dobrze napisana Dyskusja jest dogłębną analizą uzyskanych danych własnych i literaturowych. Analizy te dają podstawę do stwierdzenia, że autorka potrafi krytycznie zanalizować własne wyniki. Czytając tę część rozprawy nasunęło mi się ogólne pytanie: Czy inna lokalizacja podobnego nieuporządkowanego regionu w obrębie łańcucha peptydowego (np. terminalnie versus w środkowej części łańcucha) wpływa w różny sposób na plastyczność białka/tworzenie specyficznych interakcji z innymi białkami?

Generalnie, jak już wspominałam wcześniej, cała rozprawa napisana jest bardzo jasno i klarownie, a szata graficzna jest estetyczna i staranna. Język używany w rozprawie, umożliwia zrozumienie tekstu czytelnikowi niekoniecznie związanemu bezpośrednio z przedmiotem rozprawy. Nieznacznym utrudnieniem dla zrozumienia tekstu są dość często stosowane skróty, ale zawsze można było znaleźć ich wytłumaczenie w spisie skrótów i akronimów. Jedynie z powinności recenzenta przytaczam nieliczne z zauważonych błędów edytorskich:

Str. 66 opis pod rysunkiem 6; brakuje słowa indukcja.

Str. 118 linia 2; brakuje „w”.

Str. 122 linia 3; brakuje kropki.

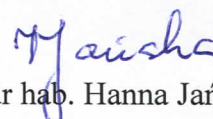
Str.132 linia3; „różnice”, a nie „różne”

Str. 133 linia 17; zapewne chodziło o „histony nukleosomowe”

Str.139 linia 8; brakuje „w”

Podsumowując, chciałabym wyrazić uznanie dla zakresu przeprowadzonych badań oraz różnorodności podejść eksperymentalnych wykorzystanych w celu potwierdzenia

stawianej hipotezy. O randze wyników świadczy również fakt, że większość z nich została już opublikowana w trzech pracach, które ukazały się w prestiżowych czasopismach naukowych jak Scientific Reports (jedna praca), PlosOne (dwie prace). Należy dodać, że Pani Aneta Tarczewska jest pierwszym równorzędnym autorem wszystkich tych publikacji. Z pełnym przekonaniem uważam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz.595 z późn.zm.). Zwracam się zatem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Anety Tarczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze ogrom wykonanej pracy a także fakt, że otrzymane w wyniku realizacji doktoratu wyniki stanowią ważny wkład w rozwój dziedziny naukowej, którą się para Doktorantka oraz, że zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach, sugeruję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Hanna Jańska