

## Recenzja

### pracy doktorskiej mgr Anety Tarczewskiej pt. "Analiza złożoności strukturalnej Chd64 i FKBP39 z *Tribolium Castaneum*".

#### Kontekst

Jak zaznaczono w rozdziale „Cel pracy”, przedstawiona do oceny rozprawa stanowi część większego projektu, który zmierza do wyjaśnienia na poziomie molekularnym pewnych aspektów działania hormonalnych szlaków sygnałowych. Kwestia znaczenia tych badań została już pozytywnie zweryfikowana recenzjami artykułów naukowych i wniosków grantowych, tak więc ograniczę się do oceny realizacji wybranego jako przedmiot rozprawy fragmentu tego projektu. Praca doktorska mgr Anety Tarczewskiej łączy w sobie długoletnie zainteresowania Zakładu Biochemii molekularnym mechanizmem hormonalnej kontroli rozwoju owadów oraz jego najnowsze badania skupione wokół struktury i funkcji białek wewnętrznie nieuporządkowanych (IDP). Szczególnie te ostatnie wydają się być bardzo ciekawym obiektem badań ze względu na wciąż słabo poznane ich funkcje oraz sposoby ich realizacji, tak bardzo odbiegające od paradygmatu ściśle wiążącego strukturę białka z jego funkcją. Z nietypową (w stosunku do paradygmatu) budową IDP wiążą się również największe wyzwania eksperymentalne, ponieważ przestaje działać w przewidywalny sposób wiele standardowych narzędzi biologii molekularnej, a niektóre z nich w ogóle przestają mieć sens, jak np. dyfrakcja promieni rentgenowskich.

Z tego rodzaju wyzwaniami od jakiegoś czasu spotykają się doktoranci w Zakładzie Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. O tym jaką rewolucję wprowadziło to do pracy biochemika najlepiej świadczy fakt, że już drugi raz na recenzenta powołany jest piszący te słowa fizyk, którego wątpliwe kompetencje biochemiczne pochodzą głównie z długotrwałych kontaktów z biochemikami i częstym wyborem na przedmiot badań makrocząsteczek biologicznych, choć traktowanych jako cząstki koloidowe lub modelowe polimery. Porównując jednak pracę pani dr Magdaleny Wojtas sprzed kilku lat z ocenianą obecnie rozprawą, zauważyć można z jednej strony wzbogacenie repertuaru technik badawczych, ale z drugiej już pewne ślady standaryzacji wyników pozwalającej na łatwiejsze

ich porównywanie i interpretację. Prawdopodobnie daleko jeszcze do zdolności pełnej charakteryzacji białek wewnątrznie nieuporządkowanych, ale znalezienie odpowiednich narzędzi i ustalenie metod posługiwania się nimi otwiera drogę do masowego gromadzenia informacji o białkach z tej rodziny i wyciągania bardziej wiarygodnych wniosków.

Moja ocena rozprawy dokonana jest w takim właśnie kontekście, czyli bez skupiania się na technicznych aspektach poszczególnych metod badawczych, a za to mając na uwadze główną przesłankę podjęcia tej pracy, czyli dążenie do zbadania funkcji dwóch wybranych białek, czego pierwszym krokiem są pomiary ich właściwości fizyko-chemicznych.

### **Statystyka i zawartość**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Anety Tarczewskiej składa się z sześciu 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 216 pozycji. Z obowiązku odnotowuję, że z jednym wyjątkiem we wszystkich pozycjach odnoszących się do książek lub źródeł internetowych brak nazwy wydawnictwa. Podwójne kropki na końcu tych pozycji sugerują, że miało być to uzupełnione na koniec, który nadszedł jednak niespodziewanie. Ponadto w jednej z pozycji zmieniono nazwisko mojemu koledze, Maciejowi Kozakowi.

W pracy znajdujemy 32 rysunki i 12 tabel w dobrej szacie graficznej i wystarczająco przejrzystych odnośnie ich treści.

We Wstępie przedstawiono streszczenie aktualnego stanu wiedzy dotyczącej regulacji rozwoju owadów z podkreśleniem roli hormonów 20E i JH oraz hipotezy odnośnie molekularnych mechanizmów reagowania na te hormony. Wyjaśniono poznaną dotychczas rolę tytułowych białek i ich potencjalne znaczenie w kwestii wyjaśnienia krzyżowania się sygnałów pochodzących od 20E JH. Dalej szeroko omówiono rodziny białek, do których należą Chd64 i FKBP39. Na koniec osobny podrozdział poświęcono ogólnym informacjom o białkach i regionach inherentnie nieuporządkowanych, do jakich należą badane białka.

Wstęp od części doświadczalnej oddziela rozdział „Cel pracy”, który jasno określa szczegółowe cele mające prowadzić do osiągnięcia zadań wyznaczonych w ramach szerszego projektu realizowanego w Zakładzie Biochemii.

Część doświadczalną standardowo podzielono na opis materiałów i metod, szczegółowo opisujący wszystkie odczynniki, procedury i układy pomiarowe użyte w ramach realizacji pracy oraz na rozdział prezentujący same wyniki.

Wyniki omówione są w rozdziale „Dyskusja”, osobno dla każdego z białek. Całość kończy rozdział „Podsumowanie i perspektywy dalszych badań”.

### **Ocena rozprawy**

Tytuł pracy odpowiada jej treści. Jako cele szczegółowe autorka wymienia:

1. przygotowanie konstruktów umożliwiających niedekspresję Chd64 i FKBP39 w układzie heterologicznym,
2. opracowanie systemu ekspresyjnego umożliwiającego syntezę rekombinowanych białek w komórkach bakteryjnych oraz wydajne oczyszczenie otrzymanych produktów białkowych,
3. przeprowadzenie kompleksowej analizy właściwości strukturalnych i fizykochemicznych Chd64 i FKBP39 (*in silico* oraz *in vivo*).

Nie podejmuję się ocenić wykonania dwóch pierwszych celów, ale ponieważ ich zrealizowanie było warunkiem koniecznym do realizacji celu 3, oczywiste jest, że zostały one osiągnięte, skoro pojawiły się wyniki badań fizykochemicznych. Dokładny opis wykonania celów 1 i 2 zawarty jest w rozdziałach 6.1 i 6.2.

Badanie właściwości obu białek rozpoczęto od analizy bioinformatycznej pozwalającej w przypadku cząsteczek o nieznannej strukturze na zawężenie pola poszukiwań. W przypadku obu białek uzyskano sugestie, że składają się one zarówno z domen uporządkowanych jak i nieuporządkowanych, przy czym w centrum białka Chd64 miałyby się znajdować domena uporządkowana, a w przypadku białka FKBP39 – domena nieuporządkowana.

Hipotezy te starano się zweryfikować doświadczalnie z wykorzystaniem szeregu metod fizykochemicznych, które w przekonujący sposób dowiodły postulowanych struktur obu białek.

W przypadku białka Chd64 na szczególną uwagę zasługują dwa aspekty: mapowanie sekwencji metodą HDX-MS, pozwalające na precyzyjną lokalizację eksponowanych atomów wodoru oraz wykazanie obecności stanu pośredniego w procesie denaturacji tego białka indukowanego przez GdmCl.

Osiągnięto, moim zdaniem, wszystkie wymienione w rozdziale „Cel pracy” cele szczegółowe.

Podczas czytania rozprawy dość irytujące były liczne literówki i zaskakująca chwilami interpunkcja. Szkoda, że autorka nie poprosiła kogoś cierpliwego o przeczytanie tekstu przed oprawieniem.

## Dorobek naukowy

Pani mgr Aneta Tarczewska jest współautorką trzech artykułów w renomowanych czasopiśmie o wysokim indeksie wpływu oraz rozdziału w książce wydanej przez wydawnictwo Springer. Ponadto jest współautorką pięciu artykułów w recenzowanych czasopiśmie nieposiadających określonego współczynnika IF.

Doktorantka uczestniczyła czynnie w sześciu konferencjach międzynarodowych i czterech krajowych. Dała się również poznać jako popularyzatorka nauki w ramach Dolnośląskich Festiwalu Nauki. Ponadto uczestniczyła jako wykonawca w jednym projekcie NCN oraz była beneficjentem dwóch dotacji na wyjazdy konferencyjne.

## Podsumowanie

Uważam, że przedstawiona praca doktorska mgr Anety Tarczewskiej pt. „Analiza złożoności strukturalnej Chd64 i FKBP39 z *Tribolium Castaneum*” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę przemyślany plan pracy i jego systematyczną realizację z wykorzystaniem najnowocześniejszych metod badawczych, wnoszę również o wyróżnienie tej rozprawy.



## Pytania:

1. W rozdziale 6.4.3 dotyczącym pomiarów właściwości hydrodynamicznych białka Chd64 pisze Pani na str. 91, że uśredniona dla poszczególnych stężeń białka wartość promienia  $R_g$  uzyskana z pomiarów sedymentacyjnych wynosiła 28,6 Å, co jest zgodne z danymi w Tabeli 6.3. Dalej pisze Pani, że odpowiada to wartości  $R_g$  obliczonej na podstawie danych uzyskanych techniką SEC, chociaż w Tabeli 6.2 na str. 89 mamy podaną eksperymentalną wartość dla pomiarów SEC  $R_g = 21,7$  Å. Proszę wyjaśnić tę rozbieżność w tekście pracy i – jeśli ta różnica rzeczywiście występuje – spróbować ją jakoś zinterpretować (czy rzeczywiście SEC i SV-AUC zawsze mierzą ten sam promień hydrodynamiczny?).
2. W Dyskusji na str. 129 pisze Pani „Zatem, wartość  $D_{max}$  jest zawyżona w odniesieniu do wartości  $R_g$ , co świadczy o asymetrycznym owalnym kształcie cząsteczki białka”. Z drugiej strony pisze Pani, że otaczające rdzeń domeny są wewnątrznie nieuporządkowane. Jak zatem pogodzić te dwa stwierdzenia (czy kłębek może być owalny)?