



Prof. dr hab. Dariusz Rakus

Wrocław, 03.05.2020

**OCENA**

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Kolonko

pt. „Analiza molekularna C-terminalnych fragmentów receptorów *Methoprene tolerant* i *Germ cell-expressed z Drosophilla melanogaster*”

Białka inherentnie nieustrukturyzowane oraz mechanizmy przekazywania sygnału związanego z rozwojem ontogenetycznym owadów od lat leżą w kręgu zainteresowań badawczych Zakładu Biochemii Politechniki Wrocławskiej. Badania te przyniosły szereg istotnych odkryć zarówno z zakresu chemii/biologii białka, jak i fizjologii owadów i fizjologii molekularnej.

Rozprawa doktorska Pani magister Marty Kolonko wpisuje się więc w wiodącą tematykę badań prowadzonych w Zakładzie. Jednocześnie praca ta poszerza zakres badawczy, jako że skupia się na kolejnym – słabo jeszcze poznanym – elemencie odpowiedzi na stymulacje hormonalną u owadów: na białkach receptorowych dla hormonu juwenilnego.

Pani magister w trakcie badań postawiła sobie za cel strukturalne/molekularne scharakteryzowanie C-terminalnych fragmentów receptorów dla hormonu juwenilnego, białek *Methoprene tolerant* (Met) i *Germ cell-expressed* (Gce). Wybór ów wynikał z dobrze uzasadnionego domysłu, iż regiony te mogą być odpowiedzialne za zróżnicowaną rolę obu białek w trakcie rozwoju embrionalnego *D. melanogaster*.

W trakcie badań Pani magister wykorzystwała szereg technik biochemicznych i fizykochemicznych, które doprowadziły ją do dobrze uzasadnionej konkluzji, iż C-końcowe fragmenty obu białek można zakwalifikować do białek inherentnie nieuporządkowanych, przy czym-terminalny region białka Gce okazał się być „mniej nieustrukturyzowanym”: zawierał więcej motywów potencjalnie zaangażowanych w



oddziaływania białko-białko i wykazujących skłonności do strukturyzacji. Na tej podstawie Pani magister wnioskuje, że rola białka Gce w biologii komórki/organizmu jest bardziej złożona, niż białka Met. Wydaje się to być bardzo słuszna konkluzja.

Wyniki przedstawione w rozprawie zostały już, przynajmniej częściowo, opublikowane w solidnych czasopismach biochemicznych z listy filadelfijskiej, co oznacza, że poddane były już gruntownej ocenie merytorycznej.

Zadaniem recenzenta jest jednakże nie tylko przytakiwanie recenzentom w czasopismach naukowych, ale także próba oceny istotności osiągnięć i jakości sposobu ich prezentacji. Co nie oznacza oczywiście, że recenzent rozprawy nie może popełniać błędów.

Wyniki uzyskane przez Panią magister Kolonko są przedstawione czytelnie, jednakże niektóre wykresy pokazujące widma NMR-owskie (np. Rys. 6.10.1 albo 6.10.4) są bardzo mało czytelne dla ludzi o innej wrażliwości optycznej (tam naprawdę są użyte dwa kolory?). Rozumiem, że praktycznie żaden z recenzentów nie analizuje takich widm i ufa interpretacji autora, ale chyba byłoby lepiej przedstawić owe ryciny powiększone do rozmiaru całej strony i z „intensywniej” wyrażonymi kolorami. Nie ma tych rycin aż tak wiele.

Niewątpliwie minusem pracy jest brak dokładnego zdefiniowania, która izoforma białka 14-3-3 została użyta w eksperymentach. Być może ta informacja jest gdzieś umieszczona, ale jej nie znalazłem. Tymczasem izoform białka 14-3-3 jest bardzo wiele; tylko u człowieka występuje chyba siedem izoform białka 14-3-3). Choć białka 14-3-3 wiążą „niemal wszystko” (znanych jest po kilkaset partnerów białkowych dla poszczególnych ssaczych izoform białek 14-3-3), to wybór izoformy odległej od owadziego białka może dawać fałszywie negatywne, albo fałszywie pozytywne wyniki pomiarów oddziaływania. Fałszywe z punktu widzenia biologii komórki. Dodatkowym problemem w badaniach oddziaływania białka 14-3-3 jest fakt, iż białko to podlega wielorakim fosforylacjom i modyfikacje te wpływają nie tylko na subkomórkową lokalizację 14-3-3, ale także na jego powinowactwo do różnych partnerów.



Wydaje mi się, że Pani magister popełnia także pewną nadinterpretację wyników uzyskanych dzięki technice dichroizmu kołowego w badaniach wpływu TFE na tworzenie struktur helikalnych w C-końcowych rejonach Met i Gce. Pani magister zauważyła znaczny wzrost udziału struktur helikalnych przy jednoczesnym braku zmian zawartości struktur beta i na podstawie tego wyciągnęła wniosek wykluczający przejście struktur beta w struktury helikalne. Jest to, pomimo pozorów deterministycznego podejścia, wnioskowanie nieuprawnione i ażeby je uwiarygodnić, to należałoby przeprowadzić gruntowną analizę statystyczną (oczywiście, nadal nie byłoby to „ostatecznym dowodem” z punktu widzenia biologii strukturalnej).

Czytając zarówno Wstęp, jak i Dyskusję, znalazłem ciekawą informację, z którą nie za bardzo mogę się zgodzić. W opisie funkcji białka Hif1 $\alpha$  Pani magister pisze, iż jest to białko odpowiedzialne za utrzymanie odpowiedniego poziomu tlenu w komórkach. Otóż, właściwie, to nie. Białko to jest ważnym regulatorem ekspresji erytropoetyny i stymuluje ekspresję VEGF, ale zjawiska te są ograniczone do specyficznych komórek (w przypadku erytropoetyny chyba tylko do jednego typu komórek nerki), a ponadto ani erytropoetyna, ani VEGF nie zapewniają „odpowiedniego poziomu tlenu w komórce” (chyba, że traktujemy tę wypowiedź bardzo elastycznie i uznamy, że płuca zapewniają odpowiedni poziom tlenu w komórkach). Nadrzędną rolą Hif1 $\alpha$  jest adaptacja metabolizmu komórki do niskiej prężności tlenu. Powyższa uwaga ma charakter raczej redakcyjny niż merytoryczny w kontekście badań Pani magister, jako że białko Hif1 $\alpha$  służyło tylko jako przykład „strukturalny”, a nie funkcjonalny. Ale nawet w takim przypadku powinno się podawać bardziej poprawnie funkcje białka „modelowego”.

W tak obszernej pracy, jaką jest przedstawiona mi do oceny rozprawa, trudno nie ustrzec się drobnych błędów stylistycznych, czy też gramatycznych, ale nie wpływają one na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy (choć wolałbym czytać, że coś jest „równomiernie rozmieszczone” niż „homogennie dystrybuowane”).

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH**

KATEDRA FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ

ul. Sienkiewicza 21

50-335 Wrocław

tel. +48 71 375 40 56 | +48 71 375 40 53

fax +48 71 375 40 56

Podsumowując, uważam, że Pani magister Marta Kolonko zrealizowała postawione przed nią zadania badawcze, a uzyskane wyniki istotnie poszerzają wiedzę dotyczącą biologii receptorów hormonu juvenilnego oraz biologii strukturalnej białka. Nie jestem tylko pewien, czy dwukrotnie powtórzone stwierdzenie, iż spektroskopia NMR jest najlepszym sposobem analizy słabych oddziaływań międzybiałkowych IDPs (i IDRs) nie jest zbyt kategoryczne; czasem zapewne jest, a czasem być może nie jest...

Uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, z późn. zm.).

Wrocław, 03.05.2020

Dariusz Rakus