



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 19 maja 2020 r.

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

**Ocena rozprawy doktorskiej pani mgr Marty Kolonko
pt. „Analiza molekularna C-terminalnych fragmentów receptorów *Methoprene tolerant*
i *Germ cell-expressed z *Drosophila melanogaster**”**

Regulacja wielu istotnych procesów rozwojowych i fizjologicznych u ssaków oraz owadów realizowana jest na drodze ścieżek sygnalizacyjnych, których kluczowymi elementami są receptory białkowe, w szczególności receptory z rodziny czynników transkrypcyjnych bHLH-PAS. Praca doktorska pani mgr Marty Kolonko dedykowana jest charakterystyce molekularnej dwóch białek z tej rodziny, będących receptorami hormonu juwenilnego: *Methoprene tolerant* (Met) oraz *Germ cell-expressed* (Gce). Tak zarysowana tematyka projektu doktorskiego jest w moim odczuciu nie tylko interesująca ale również bardzo ważna w aspekcie pełnego poznania mechanizmów funkcjonowania tych białek receptorowych. Okazuje się ponadto, iż zarówno w przypadku Met jak i Gce, stosunkowo długie C-końcowe fragmenty łańcucha aminokwasowego nie podporządkowują się prostej klasyfikacji jeśli idzie o strukturę drugorzędową, wpisując się w klasę białek inherentnie nieuporządkowanych. Problemy

związane z relacją struktura-funkcja białek należących do tej rodziny są z mojej perspektywy tyleż ważne co fascynujące. Wyniki badań dotyczących białek inherentnie nieuporządkowanych łamią bowiem paradygmaty obowiązujące w klasycznej biochemii, wykraczając poza proste molekularne modele deterministyczne.

Praca doktorska pani mgr Marty Kolonko wykonana została w Zakładzie Biochemii, na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, pod kierunkiem Prof. dr. hab. inż. Andrzeja Ożyhara, z udziałem Dr inż. Beaty Greb-Markiewicz pełniącej rolę promotora pomocniczego. Istotna część badań prezentowanych w ramach doktoratu, między innymi związana z analizami prowadzonymi w oparciu o technikę NMR, przeprowadzona została w ośrodku zagranicznym, dzięki współpracy z Prof. M. Sattlerem z Zakładu Biologii Strukturalnej Helmholtz Zentrum Muenhen. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 179. stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o podstrukturę 13. rozdziałów. Otwiera ją wyjątkowo obszerny spis skrótów, jako rozdział 1. oraz streszczenie, zaprezentowane w ramach rozdziału 2. Rozdział 3. pt. „Wstęp” zawiera omówienie podstawowych informacji dotyczących problematyki rozprawy i podzielony został na obszary tematyczne związane bezpośrednio z hormonalną kontrolą rozwoju owadów, na przykładzie *Drosophila melanogaster*, oraz receptorów z rodziny białek bHLH-PAS, ze szczególnym uwzględnieniem ich budowy oraz mechanizmów działania. Opisy zawarte w tej części rozprawy opierają się na najbardziej aktualnych doniesieniach literaturowych, co uwzględniając fakt ich bardzo eleganckiej i przemyślanej zarazem prezentacji sprawia, że ich lektura stanowi niezmiernie cenne źródło wiedzy w tym zakresie, służąc szerokiemu gronu odbiorców. Cele pracy doktorskiej, zarówno ten strategiczny jak i cele szczegółowe, wyartykułowane zostały przez Autorkę w ramach półstronicowego rozdziału 4. pt. „Cel pracy”. Już z pierwszego zdania tego rozdziału dowiadujemy się, że „Celem pracy była analiza molekularna C-terminalnych fragmentów receptorów *Methoprene tolerant* i *Germ cell-expressed* z *D. melanogaster*”. Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych prac oraz uzyskane wyniki, spokojnie ocenić możemy, iż tak zarysowany cel osiągnięty został z nadmiarem, bowiem w ramach rozprawy nie tylko przeprowadzone zostały analizy ale istotnie poszerzono wiedzę dotyczącą determinantów strukturalnych oraz mechanizmów molekularnych związanych z funkcjonowaniem tych

receptorów. Materiały użyte do badań oraz zastosowane metody przedstawione zostały w ramach rozdziału 5. pt. „Materiały i metody”. Jestem pod ogromnym wrażeniem klarowności oraz szczegółowości tych opisów, które stanowią wzór nie tylko dla rozpraw doktorskich ale również wszelkiego typu opracowań naukowych. Już na etapie opisów metodologicznych, jeszcze przed analizą uzyskanych wyników, czytelnik rozprawy ma możliwość wyrobienia sobie zdania dotyczącego zakresu przeprowadzonych prac, w szczególności zastosowanych podejść metodologicznych i technik instrumentalnych. Ich lista jest, moim zdaniem, wyjątkowo długa i obejmuje, między innymi, nowoczesne techniki biofizyczne jak chromatografia jonowymienna i sączenie molekularne, spektrometria mas, ultrawiwowanie analityczne, spektrometria dichroizmu kołowego, analizy małokątowego rozpraszania promieniowania X oraz wiele wariantów spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej nowatorstwie oraz bardzo wysokim poziomie naukowym, jest rozdział 6. pt. „Wyniki uzyskane w trakcie realizacji tematu pracy”. Tak zupełnie na marginesie, moim zdaniem, tytuł tego rozdziału skrócony o wyraz „tematu” brzmi nawet lepiej. Formalny układ rozdziału 6. odpowiada sekwencji zadań badawczych wykonywanych w ramach realizacji całego projektu doktorskiego. Choć może mniej docenianym z punktu widzenia rezultatów końcowych, jednakże szczególnie istotnym elementem tego projektu było, moim zdaniem, opracowanie wydajnego systemu nadekspresji rekombinowanych białek MetC i GceC w komórkach bakteryjnych oraz opracowanie złożonych procedur ich oczyszczania. Dopiero sukces tych etapów umożliwił charakterystykę molekularnych właściwości tych białek, w oparciu o zaawansowane metody badawcze, wspomniane już przeze mnie powyżej. Rezultaty tych badań, zestawione z wynikami analiz bioinformatycznych, wskazały jednoznacznie na cechy strukturalne i dynamiczne C-terminalnego fragmentu łańcucha Met oraz Gce właściwe rodzinie białek inherentnie nieuporządkowanych. Bardzo ważną grupę uzyskanych wyników stanowią te dostarczające bezpośrednich informacji dotyczących oddziaływania molekularnego MetC oraz GceC z potencjalnymi partnerami białkowymi takich oddziaływań *in vivo* (14-3-3 lub LBD Ftz-F1). Uzyskanie tych informacji było możliwe dzięki eksperymentom mapowania przesunięć chemicznych zarejestrowanych w widmach 2D HSQC NMR. Wszystkie uzyskane wyniki poddane zostały wieloaspektowej dyskusji w ramach

rozdziału 7. pt. „Dyskusja”. Podsumowanie uzyskanych w ramach pracy doktorskiej wyników, sformułowane zostało w ramach rozdziału 8. „Podsumowanie” zaś dodatkowy rozdział 9. przedstawia krótką dyskusję obejmującą perspektywy dalszych badań w tym obszarze nauki. Kolejne rozdziały zawierają zestawienia dorobku naukowego Doktorantki (Rozdział 10.), tytułów rysunków (Rozdział 11.), tytułów tabel (Rozdział 12.) oraz cytowanego piśmiennictwa (rozdział 13.).

Bardzo wysokiemu poziomowi naukowemu rozprawy towarzyszy równie wysoki, moim zdaniem, jej poziom edytorski: tak w zakresie poprawności językowej jak i jakości zamieszczonych grafik. Pracę czyta się bardzo dobrze, kształtując w sobie wrażenie o erudycji jej Autorki. Mógłbym zaproponować rozważenie jedynie pojedynczych, drobnych korekt. Na przykład:

- Str. 69, raczej „Katarzyną Orzga” niż „Katarzyną Orzga”, chociaż z odmianą nazwisk nigdy nie ma się pewności.
- Str. 85, podpis pod rysunkiem wskazuje iż przedstawia się zależność K_{AV} od R_S podczas gdy w przyjętej konwencji jest odwrotnie, zależność wielkości na osi rzędnych od wielkości na osi odciętych czyli zależność R_S od K_{AV} .

Wobec faktu, iż nie proponuję w swojej ocenie jakichkolwiek istotnych korekt ani uzupełnień chciałbym może w tym miejscu wyrazić jeszcze raz swoje zdumienie powszechnym w środowisku przyrodników brakiem percepcji funkcjonowania białek inherentnie nieuporządkowanych, przynajmniej w stopniu odpowiadającym liczebności tej rodziny w naturze i roli jaką potencjalnie odgrywają. Wydaje się, iż brak stabilnej struktury tych makromolekuł uniemożliwia skuteczne zastosowanie wielu podstawowych technik biologii strukturalnej przy badaniach aktywności fizjologicznej tych białek. Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktorantki na temat możliwych technik badawczych oraz ich rozwoju w kierunku umożliwienia tego typu badań? Czy możliwe jest/będzie prowadzenie badań eksperymentalnych typu „single molecule” z białkami inherentnie nieuporządkowanymi na poziomie precyzji osiąganym już, na przykład, przy badaniach aktywności enzymatycznej pojedynczych molekuł?

Konkluzja

Przechodząc do konkluzji chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Marta Kolonko przedstawiła rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach przeprowadzonych przez nią oryginalnych prac badawczych. W mojej ocenie, zarówno stawiane sobie jako cel racy doktorskiej ambitne problemy poznawcze jak i poziom ich realizacji odpowiadają wysokim standardom rozpraw naukowych, spełniając tym samym w pełni 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. Znaczna część wyników badań uzyskanych w ramach projektu doktorskiego i zaprezentowanych w rozprawie została opublikowana w najbardziej renomowanych periodykach międzynarodowych, włączając w to artykuł, który ukazał się w czasopiśmie Science w 2017 r. Jak wynika z danych bibliograficznych, Doktorantka kształtowała swoją doskonałość warsztatową również w ramach innych, zbliżonych projektów badawczych. Efektem tego jest długa lista publikacji ogłoszonych przy współautorstwie pani mgr Marty Kolonko, licząca w sumie 13 pozycji. W związku z powyższym, wnoszę o dopuszczenie pani mgr Marty Kolonko do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony. Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych prac oraz rangę uzyskanych wyników, wnoszę również o uznanie przedmiotowej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.

Uprzejmie proszę o przyjęcie moich rekomendacji,

