

Prof. dr hab. Kazimierz Strzałka
Małopolskie Centrum Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

O c e n a

rozprawy doktorskiej p. Małgorzaty Rydzy p.t. „Strukturalna i funkcjonalna charakterystyka białek opiekuńczych zaangażowanych w biosyntezę RuBisCo”, wykonanej w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem promotora – prof. dr hab. Andrzeja Szczepaniaka oraz promotora pomocniczego – dr Piotra Kolesińskiego.

Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (Rubisco) jest enzymem ważnym i interesującym z wielu powodów. Jest to kluczowy enzym w fotosyntetycznym wiązaniu dwutlenku węgla, posiada skomplikowaną strukturę oraz złożony proces biosyntezy i według oszacowań, jest najobficiej występującym białkiem w biosferze. Od aktywności Rubisco zależy włączanie CO₂ w związki organiczne, a zatem produkcja biomasy roślinnej. Jak udowodniono, Rubisco jest enzymem pracującym bardzo wolno, przyłączającym do rybulozo-1,5-bisfosforanu zaledwie kilka cząsteczek CO₂ na sekundę. Niska aktywność katalityczna kompensowana jest dużą ilością enzymu, stanowiącego około 50% rozpuszczalnych białek liścia. Wytwarzanie tak dużych ilości białka stanowi niewątpliwie dla rośliny znaczny koszt energetyczny. Dodatkowo, aktywność oksygenazowa Rubisco, ujawniająca się przy spadku stężenia CO₂, powoduje uwalnianie wcześniej zasymilowanego dwutlenku węgla oraz straty energetyczne.

Niska wydajność katalityczna oraz niepożądana z rolniczego punktu widzenia aktywność oksygenazowa Rubisco powodowały, że od wielu lat trwały próby modyfikacji cząsteczki tego enzymu w kierunku zwiększenia jego wydajności w wiązaniu CO₂ i ograniczenia aktywności oksygenazowej. Rozwój inżynierii genetycznej dostarczył

odpowiednich narzędzi do skutecznej modyfikacji wielu białek, jednak w przypadku Rubisco, natrafiono na poważne trudności. Wiążą się one ze skomplikowaną budową cząsteczki tego enzymu, jak również ze złożonym, wieloetapowym procesem jego wytwarzania. W procesie tym uczestniczą wyspecjalizowane białka opiekuńcze, których funkcja została wyjaśniona tylko częściowo.

Roli niektórych sinicowych białek opiekuńczych w biosyntezie Rubisco poświęcona jest rozprawa doktorska p. mgr Małgorzaty Rydzy. Jest to temat ważny i naukowo aktualny, gdyż poznanie szczegółowej funkcji tych białek oraz ich specyficzności umożliwi heterologiczną ekspresję aktywnych katalitycznie cząsteczek Rubisco, co jest niezbędnym etapem do ich dalszej modyfikacji w pożądanym kierunku. W opinii recenzenta, temat rozprawy spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 111 stron i ma typowy układ. W początkowej części obszernego „Wstępu” Doktorantka skrótowo opisuje proces fotosyntezy, po czym zaznajamia czytelnika z funkcją Rubisco oraz historią ewolucyjną tego enzymu. W kolejnym podrozdziale mgr Rydzy opisuje szczegółowo budowę Rubisco z uwzględnieniem jej różnych typów, występujących w różnych grupach organizmów. W następnych podrozdziałach Doktorantka przedstawia rolę białek opiekuńczych w biosyntezie białka, w tym w biosyntezie bakteryjnej Rubisco, funkcję chaperonów w powstawaniu karboksosomów, a także charakteryzuje rolę białek opiekuńczych w biosyntezie eukariotycznej Rubisco. Końcowa część „Wstępu” poświęcona jest udziałowi białek opiekuńczych z rodziny Hsp40 i Hsp70 w biosyntezie Rubisco oraz nakreśleniu perspektywy przyszłych badań. Zagadnienia przedstawione w „Wstępie” świadczą o dobrej orientacji w literaturze przedmiotu i dobrym przygotowaniu p. mgr Rydzy do planowanych badań.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Cel pracy” Doktorantka uzasadnia wybór tematu badań przedstawionych w rozprawie i formułuje szczegółowe cele badawcze.

Kolejny obszerny rozdział to „Materiały i metody”, w którym Doktorantka szczegółowo opisuje zastosowane odczynniki, materiały i aparaturę użytą do badań jak również zastosowane metody. Należy podkreślić, że oprócz metod i technik typowych dla biologii molekularnej, Doktorantka stosuje także niektóre nowoczesne techniki fizyczne,

jak np., termoforezę mikroskalową. W opinii recenzenta, stosowane metody są nowoczesne i adekwatne do przedstawionych celów badawczych.

W rozdziale „Wyniki” mgr Rydzy przedstawia szczegółowe rezultaty przeprowadzonych badań, ilustrowane kilkunastoma rysunkami. Wyniki te następnie analizuje w rozdziale „Dyskusja” i dyskutuje odnosząc je do aktualnego stanu wiedzy na temat tych zagadnień. Rozprawę zamykają rozdziały „Podsumowanie” oraz „Bibliografia” licząca 98 pozycji.

Wśród wyników przedstawionych w rozprawie, zdaniem recenzenta na szczególne podkreślenie zasługują:

1. Opracowanie i optymalizacja metody ekspresji i oczyszczania białek DnaJ oraz DnaK z *Synechocystis sp.* PCC6083.
2. Udowodnienie, że z spośród siedmiu białek DnaJ kodowanych w genomie *Synechocystis sp.* PCC6803, tylko białko DnaJ Sll1384 wiąże się do łańcucha dużej podjednostki Rubisco.
3. Wykazanie współdziałania białek DnaJ Sll1384 i DnaK2 w powstrzymywaniu fałdowania łańcucha białkowego dużej podjednostki Rubisco.
4. Wykorzystanie techniki termoforezy mikroskalowej do wyznaczenia stałych dysocjacji w różnych układach zawierających RbcL i wykazanie, że najsilniejsze wiązanie ($K_d = 31$ nM) zachodzi, gdy w badanym układzie znajdują się białka opiekuńcze DnaK2, DnaJ Sll 1384 i ATP. Wskazuje to na współdziałanie pomiędzy białkami DnaK2 i DnaJ Sll1384.
5. Otrzymanie aktywnych cząsteczek Rubisco w *E. coli* w wyniku ko-ekspresji DnaK2 i operonu LXS z *Synechocystis sp.*, co po raz pierwszy udowadnia, że udział tego sinicowego białka opiekuńczego w biosyntezie Rubisco.
6. Wykazanie, że obecność białka opiekuńczego DnaK2 w komórkach *E. coli* powoduje przechodzenie ekspresjonowanego RbcL z ciałek inkluzyjnych do frakcji rozpuszczalnej.
7. Sporządzenie modelu struktury i scharakteryzowanie białka DnaJ Sll1384 oraz białka DnaK2 ze szczególnym uwzględnieniem elementów charakterystycznych dla sinic.

Podczas czytania rozprawy nasunęły się także pewne komentarze i uwagi krytyczne, głównie natury redakcyjnej:

1. W tekście znajduje się duża liczba błędów literowych i stylistycznych. Nie sposób tu wymienić wszystkich. Podaję poniżej tylko przykłady niektórych z nich
2. Doktorantka stosuje do skrótu Rubisco raz rodzaj nijaki lub męski (np. str. 6, 7, 22, 34), a w innych razach (częściej) rodzaj żeński, który, zdaniem recenzenta, jest bardziej właściwy.
3. Literatura w tekście rozprawy jest cytowana w sposób niejednolity. Doktorantka wymienia zazwyczaj jedno nazwisko i dodaje formułkę *et al.*, a w niektórych przypadkach wymienia więcej nazwisk zakończonych taką samą formułką *et al.*. Przykłady takich różnych sposobów cytowania znajdują się np. na str. 15.
4. Niektórych skrótów używanych w rozprawie brakuje w spisie skrótów, np. skrótu CABP na str 17.
5. Wydaje się, że należałoby pisać metka histydynowa lub his-tag, a nie metka his-tag, gdyż słowo tag oznacza metkę (np. str. 65 i inne)..
6. Niektórych prac cytowanych w rozprawie brakuje w spisie literatury (bibliografii), np. pracy Anders et al. 2008, str. 17; Huang et el, 2019, str. 88 i kilku innych.
7. W Bibliografii znajdują się dwie publikacje autorów: Kolesiński, Rydzy i Szczepaniak o identycznych tytułach, z których jedna jest oznaczona jako (2017a), a druga jako (2017b). Czy są to rzeczywiście dwie różne publikacje?
8. W opisie niektórych rysunków są zbędne, powtarzające się słowa, np. rys. 11.
9. Na str. 69 jest pomyłka w odwołaniu się do rysunku. Jest rys. 4 a powinien być rys. 12. Błędny jest także numer rysunku w odwołaniu na str. 72 „(układ 1 na rysunku 8A)”.
10. Na niektórych rysunkach pokazujących wyniki elektroforezy żelowej pomocne byłyby strzałki pokazujące gdzie znajduje się prążek omawianego białka lub białek, np. na rys. 16, gdzie rozdział jest mało czytelny.
11. Wydaje się, że w tekście rozprawy brakuje odniesienia do rys. 17.

Powyższe krytyczne uwagi nie dotyczą wyników zamieszczonych w rozprawie, a jedynie jej strony redakcyjnej. Przedstawione wyniki są interesujące i naukowo ważne. Pogłębiają one naszą wiedzę na temat udziału niektórych białek opiekuńczych

występujących w sinicach, w procesie biosyntezy Rubisco, co ma istotne znaczenie dla przyszłych badań nad zwiększeniem katalitycznej aktywności tego enzymu.

W opinii recenzenta oceniana rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Przedkładam więc Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie p. mgr Małgorzaty Rydzy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 21.09.2022


Prof. dr hab. Kazimierz Strzałka