



prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszcki  
Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej  
I Biotechnologii, Wydz. Chemii Politechniki  
Wroclawskiej

Wroclaw, 1 sierpnia 2022

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Rydzy „Strukturalna i funkcjonalna charakterystyka białek opiekuńczych zaangażowanych w biosyntezę RuBisCo”

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Rydzy *Strukturalna i funkcjonalna charakterystyka białek opiekuńczych zaangażowanych w biosyntezę RuBisCo* jest monografią przedstawiającą metody otrzymywania i własności kilku sinicowych białek z grupy Hsp40 i Hsp70, m.in. ich klonowania, ekspresji, oczyszczania, w celu zbadania ich roli w budowaniu aktywności katalitycznej RuBisCo. Przygotowana została w laboratorium prof. Andrzeja Szczepaniaka, przy współudziale dr Piotra Kolesińskiego, którzy od lat zajmują się badaniami relacji struktura-funkcja białek zaangażowanych w proces fotosyntezy, zarówno w roślinach, jak i algach czy cyjanobakteriach. Zwraca uwagę również fakt finansowania części badań w ramach prestiżowego grantu Preludium, który otrzymała pani Rydz w 2019 roku.

Praca napisana jest przejrzystie, dobrym językiem z minimalną liczbą potknięć językowych, edytorskich i zwykłych „literówek” (dołączone na końcu recenzji), świadczy o znawstwie zarówno problemów metodycznych, jak i badanych obiektów.

Praca, licząca 111 stron, składa się z czterech głównych rozdziałów (Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja). Część wyników opublikowano, w publikacjach w *IJMS* (modelowanie struktury RuBisCo z brudnic), w której doktorantka jest pierwszym autorem, i *Photosynth Res* (2-gi autor pracy dotyczącej roli sinicowego białka Raf1 dla aktywności RuBisCo), a także w artykule przeglądowym w *Postęпах Biochemii* (1-szy autor) częściowo pokrywającym się ze wstępem do rozprawy doktorskiej. W związku z tym w recenzji głównie skupię



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska  
wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wroclaw

[www.pwr.edu.pl](http://www.pwr.edu.pl)

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



się na danych, które mają być przedstawione w „kluczowej” publikacji eksperymentalnej, która jak wiem została wysłana do druku.

W dość długim Wstępie na 29-stu stronach autorka jasno przedstawiła podstawowe informacje dotyczące procesu fotosyntezy, zwracając uwagę na niedoskonałość substratową i kinetyczną RuBisCo, w tym różnice między enzymem pochodzącym z różnych organizmów. W dalszej części przedstawiono interesujące rozważania związane z ewolucją RuBisCo, w tym wiedzę dotyczącą biosyntezy i fałdowania enzymu z sinicy *Synechocystis*, w szczególności jego stanów konformacyjnych, zwracając uwagę na mało informacji dotyczących roli małej podjednostki w budowaniu aktywności katalitycznej holoenzymu skądinąd znanego z niezwykle małej wartości. Dalej doktorantka przechodzi do białek opiekuńczych w procesie biosyntezy RuBisCo. Biorąc pod uwagę część eksperymentalną rozprawy skupiła się na czaperoninach zaangażowanych w fałdowanie dużej podjednostki enzymu sinicowego w komórkach *E.coli*. Moją uwagę zwróciły informacje dotyczące biogenezy karboksosomów tj. bezbłonowych organelli zagęszczających RuBisCo. W związku z czym mam pytanie czy coś wiadomo o relacjach między nieustrukturyzowanymi fragmentami białek czaperonowych, zaangażowanych w powstawanie karboksosomów, a procesem ich tworzenia w procesie separacji faz.

Kolejno, tekst Wstępu uzasadnia wybór obiektu badawczego. Okazuje się, że dotąd nie poznano naturalnych czynników sinicowych regulujących fałdowanie RuBisCo, chociaż np. ekspresja białka roślinnego w *E.coli* jest dobrze opisana. Cyjanobakterie *Synechocystis PCC6803* stanowią dobry wybór jako organizmu modelowego zarówno z powodu znanego genomu, jak i braku opisu skutecznej ekspresji funkcjonalnego enzymu w *E.coli* mimo udanych eksperymentów w przypadku innych homologów kladu. Autorka interesująco zwraca uwagę czytelnika w kierunku kolejnych czaperonin z grupy DnaJ i DnaK *Synechocystis* stanowiących główny obiekt eksperymentów w tym ich dotychczas słabo poznaną strukturę i specyficzność poszczególnych domen. Podrozdział kończący Wstęp, abstrahując od nieszczęśliwego tytułu *Przyszłe perspektywy badań nad RuBisCo* (pleonazm), umieściłbym na końcu pracy. Ponadto raczej zaproponowałbym konkretne



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Evaluated by  
**IEP** INSTITUTIONAL  
EVALUATION  
PROGRAMME  
www.iep-qaa.org

Politechnika Wroclawska  
wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



eksperymenty, a nie ogólniki dotyczące konieczności poprawienia parametrów kinetycznych enzymu roślinnego.

Bezpośrednio po Wstępie jasno został przedstawiony ambitny cel pracy związany z opracowaniem procedury ekspresji w *E. coli* i oczyszczania siedmiu homologów DnaJ i białka DnaK z *Synechococcus sp. PCC6803*, opisie ich ewentualnej interakcji z RbcL, w tym, w kontekście roli poszczególnych czaperonin w biosyntezie RuBisCo, uzyskanie rozpuszczalnego RuBisCo w *E.coli* podczas koekspresji z czaperoninami i wreszcie próba otrzymania modelu struktury badanych białek *in silico* po nieudanych próbach krystalizacji.

Na kolejnych 22-stu stronach zostały opisane używane materiały i techniki badawcze wykorzystane w pracy. Nie mam zastrzeżeń, do dobrze merytorycznie napisanego rozdziału, a jedynie kilka drobnych uwag i pytań. Precyzyjnie opisano odczynniki, plazmidy, szczepy mikroorganizmów itp., również procedury klonowania, ekspresji w różnych systemach, izolacji i oczyszczania białek w tym RbcL z ciałek wtrąconych. W związku z tym mam pytanie o to, czy białko ponownie nie denaturowało po oczyszczeniu. W odniesieniu do RuBisCo pomiar aktywności był świetnym punktem odniesienia również w obecności czaperonin. W pracy nie podano molowych współczynników ekstynkcyjnych używanych do wyznaczania stężenia homogennych białek z prawa Lamberta-Beera przy 280 nm.

W przypadku pomiarów fluorescencyjnych w obecności ANS dobrze byłoby przedstawić widma, a nie tylko wyniki pomiaru zmian intensywności przy 470 nm wzbudzonej zapewne w okolicach 380 nm, czego nie podano. Zmiana emisji od 545 nm do 470 nm w obecności białka niesie również istotną informację o oddziaływaniach sonda-białko.

Na kolejnych 22 stronach przedstawiono wyniki badań. Autorka w pierwszej kolejności relacjonuje przebieg ekspresji i oczyszczania ośmiu białek Dna. Słusznym zabiegiem jest jedynie wspomnienie o szeregu nieudanych prób, zmianie warunków, szczepów, wektorów itp. Co więcej doktorantka nie powieła również kolejnych etapów optymalizacji identycznych w odniesieniu do siedmiu czaperonin DnaJ, a jedynie szczegółowo opisuje dla dwóch tj. sll1384 i sll1933.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska  
wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

[www.pwr.edu.pl](http://www.pwr.edu.pl)

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Ewentualnie można było pokusić się o jakąś formę suplementu m.in. z profilami elucji poszczególnych białek. Elektroforogramy z kolejnych etapów oczyszczania pokazują, że udało się uzyskać homogenne białka, chociaż widać również, że ulegały do pewnego stopnia trawieniu. Również można było zamieścić końcowy zbiorczy elektroforogram dla wszystkich oczyszczonych białek.

W elektroforogramie z oczyszczania DnaK brakuje śladu markera – dlaczego?

Nie przekonuje mnie fragment dotyczący badań oddziaływań DnaJ z RbcL wyznaczany przy pomocy sondy fluorescencyjnej. Zdanie (str. 67), że ANS rozpoznaje hydrofobowe czyli z założenia niesfałdowane jest tylko częściowo prawdziwe, gdyż sonda z założenia wiąże się do wnętrza hydrofobowych białek jak najbardziej sfaldowanych.

Bez wątpliwości S111384 inaczej zachowuje się niż pozostałe 6 homologów, co jest bardzo interesującym wynikiem. Natomiast prosiłbym o wyjaśnienie dlaczego wynik przedstawiony na Rys. 11 ma świadczyć o fałdowaniu RbcL. Spadek fluorescencji świadczy o zmianie mikrootoczenia sondy, która prawdopodobnie przestaje być wiązana przez białko. Co więcej, w roztworze nadal jest obecny ok. 0,5 M GdmCl co raczej nie sprzyja fałdowaniu RbcL, chyba, że fragmentów nieustrukturyzowanych DnaJ (tzw. efekt odwrotny). Szkoda, że nie spróbowano pomiarów dichroizmu kołowego. Może to właśnie RbcL ulega rozfałdowaniu, a w pozostałych przypadkach struktura (wiązanie ANS) zostaje zachowana.

Bardzo dobrym pomysłem na badania interakcji czaperonina-RbcL było użycie termoforezy (MST). W związku z tym mam pytanie czy przeprowadzono pomiary dla pozostałych DnaJ oprócz S111384. Jeżeli tak to jakie były wyniki. Jak doktorantka interpretuje sigmoidalny kształt otrzymanych krzywych, tym samym w oparciu o jaki model wyznaczano stałe dysocjacji. Nb. można było nieco zwiększyć stężenie liganda żeby otrzymać pełne wysycenie co zawsze poprawia dokładność wyznaczenia  $K_D$ .

Kolejne, bardzo ciekawe i ważne pomiary aktywności w ekstraktach po ekspresji, prowadzące do otrzymania jak najbardziej aktywnych wariantów RbcL



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Evaluated by  
**IEP** INSTITUTIONAL  
EVALUATION  
PROGRAMME  
www.iep-qaa.org

Politechnika Wroclawska  
wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



pokazały istotną rolę badanych czaperonin, które podnoszą aktywność RuBisCo, jednocześnie wpływając wzajemnie na siebie, jak DnaJSII1384 i Raf1 na DnaK2.

W dalszej kolejności doktorantka przedstawiła wyniki eksperymentów elektroforetycznych (w warunkach denaturujących i natywnych, Western blotting), które pokazały odpowiednie kompleksy RbcL-DnaK2-DnaJSII1384. Zgadząc się z wnioskami, potwierdzonymi zresztą w eksperymentach pull-down i eleganckimi dot-blotami, ograniczyłbym używanie określenia *ko-lokalizacja* do stosowanego zamiennie w pracy *ko-migracji*. To pierwsze raczej odniósłbym do pomiarów np. w mikroskopie konfokalnym.

Końcowe podrozdziały Wyników dotyczą strukturalnego opisu białek DnaK2 i DnaJSII1384, przy czym posługiwano się tu oprogramowaniem Alphafold i SWISS Model. W obu przypadkach zwracają uwagę fragmenty nieustrukturyzowane, co z pewnością uniemożliwia krystalizację białek pełnej długości. Czy do eksperymentów krystalizacyjnych próbowano otrzymać konstrukty pozbawione przynajmniej fragmentów z C- lub/i N-końców. Czy może doktorantka ma pomysł na przypisanie funkcji tych fragmentów dla anty-agregacyjnej ich roli podczas fałdowania RuBisCo.

Dyskusja obejmująca 12 stron jest dobrze napisana. Autorka podsumowuje uzyskane wyniki, umiejętnie podkreśla praktyczne aspekty swoich badań oraz opisuje możliwości ich kontynuowania w kontekście ograniczenia reakcji oksigenacji i poprawę własności kinetycznych RuBisCo w roślinach przez odpowiednio zaplanowane mutacje, które wynikają z modelu sinicowego. Autorka zrealizowała główny cel pracy polegający na identyfikacji czaperonin zaangażowanych w biosyntezę enzymu w badanych cyjnonobakteriach, tym bardziej, że udało się otrzymać aktywne białko sinicowe w *E.coli* z wektora zawierającego sekwencje kodujące czaperoniny w różnych kombinacjach. Ważnym diskutowanym wnioskiem z eksperymentów jest współdziałanie DnaJSII1384 i DnaK2 w „składaniu” RbcL, jak też określenie specyficznej roli DnaK2 w powstawaniu aktywnego RuBisCo.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Evaluated by  
**IEP** INSTITUTIONAL  
EVALUATION  
PROGRAMME  
[www.iep-qaa.org](http://www.iep-qaa.org)

Politechnika Wroclawska  
wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

[www.pwr.edu.pl](http://www.pwr.edu.pl)

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Pracę zamyka podsumowanie punktujące najważniejsze osiągnięcia i 97 pozycji literaturowych w większości z ostatnich kilku lat.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Rydzy zawiera bardzo duży materiał eksperymentalny, ma istotną wartość poznawczą. Doktorantce udało się zrealizować większość z dużej ilości ambitnych zadań. Uzyskane wyniki mają wartość naukową, stanowiąc oryginalne rozwiązanie istotnego problemu. Co ważne, badania są bezpośrednią kontynuacją doświadczeń zespołu kierowanego przez promotorów pracy, a jednocześnie stanowią świetny punkt wyjścia dla kolejnych projektów.

Na koniec uwagi natury redakcyjnej, które nie podważają wartości naukowej pracy, ale z obowiązku recenzenta wypada podać, również w celach dydaktycznych:

1. str 9 „rybulozi”
2. str. 11 – „do gazowych substratów” - powtórzone
3. str. 12 „atmosfera Ziemska”
4. str.17 „ Drugorzędową”
5. str.17 „jon metalu Ca<sub>2</sub>”
6. str.18 i 19 „proces zwijania i fałdowania”
7. str. 20 „ oddysocjowanie ud”
8. str. 20 – podpis do Rys.3 - język
9. W wielu miejscach pracy brakuje indeksu dolnego we wzorach chemicznych  
np. str. 29 CO<sub>2</sub>; str. 44, str. 53
10. Często używane: mikrokompartmentacja, suplementacja, implementacja, konserwatywność
11. str. 36 „O Białku DnaK2...”
12. str. 38 „trans membranowy”
13. str. 39 „fałdowaniu orz”
14. str. 55 „namnożony w reakcji PCD”
15. str. 68 podpis do Rys. 11 „poszczególne białka poszczególne”
16. str. 68 „z pośród” !!!



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Evaluated by  
**IEP** INSTITUTIONAL  
EVALUATION  
PROGRAMME  
www.iep-qaa.org

Politechnika Wroclawska  
wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434





17. str. 69 „co-chaperon”
18. str. 72, 81 „tym samym” !!!
19. str. 73 podpis do Rys.14 „SDS PAFE”; brak strzałek sugerowanych w podpisie
20. str. 81 „nie wielkie”
21. str. 82 podpis do Rys. 20 „Porównanie”
22. str. 94 „WT ko-lokalizuje”
23. W kilku przypadkach brakuje stron w odnośnikach literaturowych (jest DOI)

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Rydzy spełnia wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi poprawkami, o stopniach naukowych i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej tym samym uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Rydzy do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

prof. dr hab. inż. Piotr Dobrzycki



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Evaluated by  
**IEP** INSTITUTIONAL  
EVALUATION  
PROGRAMME  
[www.iep-qaa.org](http://www.iep-qaa.org)

Politechnika Wroclawska  
wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

[www.pwr.edu.pl](http://www.pwr.edu.pl)

REGON: 000001614  
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:  
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434