



Prof. dr hab. Hanna Jańska

Wrocław, 2019-06-11

Zakład Biologii Molekularnej Komórki

Wydział Biotechnologii

Uniwersytet Wrocławski

e-mail: hanna.janska@uwr.edu.pl

Tel. (71) 375 62 43

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr Przemysława Jagodzika zatytułowana „Aktywność opiekuńcza chloroplastowej proteazy AtDeg2”

Chloroplasty, podobnie jak inne kompartmenty komórkowe, posiadają skomplikowany system kontroli jakości białek złożony z proteaz i białek opiekuńczych. Zrozumienie tego systemu jest nie lada wyzwaniem ze względu na liczbę składników systemu, rozmaitych aktywności związanych z poszczególnymi komponentami i ich wzajemnych zależności. Białka opiekuńcze mogą działać jako foldazy, holdazy i dezintergrazy, co więcej - spora grupa proteaz oprócz aktywności proteolitycznej wykazuje również aktywność białka opiekuńczego. Rozprawa doktorska Pana Przemysława Jagodzika skupia się na zrozumieniu aktywności białka opiekuńczego proteazy chloroplastowej AtDeg2 w kontekście typu tej aktywności, jej związku z określonymi domenami enzymu i jej fizjologicznego znaczenia. Rozprawa została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Grzegorza Jackowskiego, który od lat prowadzi badania nad systemem kontrolującym jakość białek w chloroplastach roślin.

Oceniana rozprawa doktorska jest liczącym 180 stron opracowaniem rozpoczynającym się streszczeniem w wersji polskiej i angielskiej. Pozostała część podzielona jest na następujące zasadnicze rozdziały: wstęp (42 strony), materiały i metody (również 42 strony), wyniki (37 stron) oraz dyskusja (13 stron). Po wstępie do rozprawy Autor opisał cel pracy, a po rozdziale: „Dyskusja” opisał podsumowanie wyników oraz osobno wydzielił wnioski. Rozprawę kończy spis cytowanej literatury zamieszczony na 17 stronach. Choć osobiście wolę bardziej zwięzłe opracowania, to muszę

zaznaczyć, że wszystkie części rozprawy zostały starannie opracowane, a całość czyta się bardzo dobrze, z dużym zainteresowaniem.

Rozpoczynający rozprawę wstęp jest wartościowym opracowaniem dla osób zainteresowanych białkami opiekuńczymi. Mgr Przemysław Jagodzicki prezentuje przegląd najnowszych informacji dotyczących budowy, mechanizmu działania, typów białek opiekuńczych, aby następnie przejść do omówienia tego typu białek zidentyfikowanych w chloroplastach *Arabidopsis*. Wśród tych białek jest proteaza AtDeg2, której aktywność opiekuńcza jest przedmiotem badań Autora. Ostatni podrozdział wstępu poświęcony jest przebiegowi ontogenezy *Arabidopsis*. Taki dobór przeglądu literatury jest właściwy, choć gdyby próbować skonstruować bardziej zwięzły wstęp, ściśle związany z tematyką rozprawy, to ograniczyłabym część dotyczącą chloroplastowych białek opiekuńczych tylko do szczegółowego opisu proteaz Deg. Niewątpliwą zaletą wstępu są liczne ilustracje.

W następnym rozdziale rozprawy zamieszczono skrupulatne opisy metod zastosowanych w trakcie wykonywania pracy doktorskiej. Należy z uznaniem podkreślić różnorodność tych metod, na przykład klonowanie DNA, ekspresje białek rekombinowanych w komórkach bakteryjnych, analizy fenotypowe roślin, techniki mikroskopowe, oznaczanie aktywności białek opiekuńczych *in vitro*.

Zasadniczą część rozprawy tj. wyniki podzielono na trzy podrozdziały odzwierciedlające realizację trzech zadań badawczych. W pierwszym podrozdziale opisano wyniki doświadczeń, których celem było ustalenie, która dokładnie domena AtDeg2 jest odpowiedzialna za aktywność opiekuńczą tego enzymu *in vitro*. Wiadomo z danych literaturowych, że AtDeg2 wykazuje aktywności holdazy w stosunku do zdenaturowanego lizozymu i można było przypuszczać, że aktywność ta związana jest z domenami PDZ2. Zadanie to wykonano przez porównanie aktywności holdazy sześciu wariantów rekombinowanych białek AtDeg2, a mianowicie wersji typu dzikiego, wersji z mutacją punktową w miejscu katalitycznym białka i czterech wersji delecyjnych: wersji pozbawionej jednej z dwóch domen PDZ, wersji bez obu domen PDZ oraz wersji pozbawionej domeny proteazowej. Sześć wariantów rekombinowanych białek AtDeg2 wykorzystano również do badania innego typu aktywności opiekuńczej - aktywności dezagregazy. Na podstawie uzyskanych wyników Autor wnioskuje, że AtDeg2 może działać nie tylko jako holdaza, ale również jako dezagregaza. Udokumentowanie, że AtDeg2 posiada aktywność dezagregazy zasługuje na szczególne wyróżnienie, bowiem jest to pierwsze doniesienie tego typu. Ponadto mgr Przemysław Jagodzicki pokazał, że dla aktywności holdazowej jak i dezagregazowej AtDeg2 niezbędne są obie domeny PDZ2. Interesujący jest wynik wskazujący, że domena proteazowa również wpływa na kształtowanie się obu typów aktywności białka opiekuńczego AtDeg2. Nie ustalono jednak jaki region domeny proteolitycznej zaangażowany jest w ten proces, ale udokumentowano, że nie są to reszty centrum katalitycznego. Do tej części wyników mam kilka pytań szczegółowych. Skoro wiadomo z literatury, że AtDeg1 posiada aktywność foldazy dlaczego nie przebadano także tego typu

aktywności opiekuńczej? Z rysunku 41, który prezentuje poziom białek rekombinowanych AtDeg2 w lizacie bakterii wynika, że wydajność nadekspresji wszystkich tych białek była bardzo dobra, ale później dowiadujemy się, że wydajność oczyszczania białka była niska. Na którym etapie oczyszczania wystąpiły problemy z wydajnością, bo w pracy brak takiej informacji? Prosiłabym o pokazanie odpowiedniej dokumentacji. W doświadczeniu określającym aktywność holdazy albumina wykazuje efekt stymulujący czyli w obecności tego białka obserwujemy zwiększoną agregację zdenaturowanego lizozymu. Jak można wytłumaczyć ten efekt? Na rysunku 43, zgodnie z oczekiwaniami, dodanie większej ilości AtDeg2 lub AtDeg2S268G koreluje ze zmniejszonym poziomem agregatów zdenaturowanego lizozymu. Nie obserwujemy jednak takiej zależności dla AtDeg2 pozbawionej domeny proteolitycznej. Jak to wytłumaczyć? Podobnie, nie obserwujemy takich zależności na rysunku 44 prezentującym wyniki doświadczenia określającego aktywność dezagregazy badanych zrekombinowanych białek AtDeg2.

W kolejnym podrozdziale mgr Przemysław Jagodzick opisuje wyniki badań przeprowadzonych w celu identyfikacji fizjologicznych substratów aktywności opiekuńczej AtDeg2 przez porównanie proteomów chloroplastowych roślin typu dzikiego i mutantów posiadających białko AtDeg2 wykazujące jedynie aktywność proteolityczną. W tym miejscu chcę zwrócić uwagę na błąd, który się wkradł w opisie mutantów wybranych do tego doświadczenia na stronie 55. Rośliny typu dzikiego i mutanty rosły w warunkach ekspozycji na światło o wysokim natężeniu, a uzyskane białka chloroplastowe były rozdzielane drogą elektroforezy diagonalnej. Zastosowanie tego typu elektroforezy umożliwia wykrywanie białek połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Założono, że AtDeg2 pozbawiona aktywności opiekuńczej powinna być mniej skuteczna w hamowaniu agregacji białko-białko poprzez mostki dwusiarczkowe. Realizacja tego zadania opartego na logicznych przesłankach i oryginalnej metodologii była pracochłonna i obejmowała kilka etapów. W pierwszej kolejności sprawdzono aktywność proteolityczną zrekombinowanych form i wybrano do dalszych badań formę AtDeg2 Δ PDZ1, która charakteryzowała się nienaruszoną aktywnością proteolityczną i brakiem aktywności opiekuńczej. Następne etapy to uzyskanie homozygotycznych transformantów ekspresjonujących białko fuzyjne AtDeg2 Δ PDZ1-GFP pod kontrolą CAMV-35S, sprawdzenie czy badane białko znajduje się w chloroplastach jak również czy jego poziom ekspresji jest podobny do poziomu białka endogennego. W wyniku tych analiz wybrano odpowiednią linię transformantów i z niej izolowano białka chloroplastowe, które poddawano elektroforezie diagonalnej w porównaniu do białek chloroplastowych wyizolowanych z roślin typu dzikiego. W rezultacie tylko jedno białko, akumulowało się u mutantu. Białko to zidentyfikowano za pomocą spektroskopii mas jako podjednostkę γ_1 kompleksu F_1 chloroplastowej syntazy ATP. Dodatkowo wykonano odpowiedni test, który wykluczył, że obserwowany efekt nie jest wynikiem niższej aktywności dwusiarczkowej. Wynik ten sugeruje, że podjednostka γ_1 kompleksu F_1 chloroplastowej syntazy ATP może być substratem aktywności opiekuńczej enzymu AtDeg2, ale aby nie było to tylko

przypuszczenie, a potwierdzenie tak stawianej tezy, wymagane są dodatkowe doświadczenia dokumentujące bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy przypuszczalnym substratem, a proteazą. Pytania szczegółowe do tej części są następujące: Jakie metody według Autora najlepiej zastosować w doświadczeniach weryfikujących potencjalny substrat AtDeg2 ? Jak wytłumaczyć większą skuteczność degradacji kazeiny przez AtDeg2 Δ PDZ1 w porównaniu z AtDeg2 (Rys. 45) ?

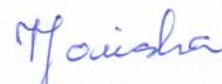
Ostatni podrozdział wyników dotyczy identyfikacji cech fenotypowych u Arabidopsis w których kształtowaniu się uczestniczy AtDeg2 w warunkach bezstresowych poprzez swoją aktywność opiekuńczą, proteolityczną lub obie aktywności jednocześnie. Analiza fenotypowa obejmowała zmiany rozwojowe, morfologiczne jak również analizę aktywności fotosyntetycznej liści. Nie zaobserwowano spektakularnych zmian, ale odnotowano statystycznie ważne różnice, które wskazują, że AtDeg2 ma wpływ na długość nasion, rozprostowywania liścieni, liczby węzłów na pędzie kwiatostanowym i jego rozgałęzieniach. Badania pojedynczych aktywności AtDeg2 wskazały tylko jedną cechę pod kontrolą wyłącznie aktywności proteolitycznej AtDeg2, a mianowicie szerokość nasion. Podsumowując ocenę rozdziału „wyniki” należy podkreślić, że opisy wyników są jasne i rzeczowe, a ich dokumentacja w większości przypadków wysokiej jakości. Ponadto w wynikach umieszczono liczne, wykonane estetycznie, schematyczne rysunki ułatwiające zrozumienie informacji zawartych w tekście.

W rozdziale dyskusja mgr Przemysław Jagodziki przeprowadza analizę swoich wyników, ustosunkowując się do nich w świetle innych danych literaturowych. W rezultacie Autor odpowiada na szereg pytań, które pojawiają się podczas lektury rozprawy np. jak wytłumaczyć wpływ domeny proteolitycznej na aktywność opiekuńczą proteazy AtDeg2. Krytyczna analiza otrzymanych wyników doprowadza Autora do słusznego w mojej opinii wniosku, że aktywność opiekuńcza Deg2 jest szczególnie ważna w warunkach stresowych. Dyskusja prowadzona jest logicznie, w sposób uporządkowany, choć w niektórych miejscach mogłaby być bardziej zwięzła. Wyraźnym mankamentem jest brak zakończenia, choćby kilku ogólnych zdań np. o planowanych dalszych badaniach, stanowiących kontynuację dotychczasowych prac.

Jak już wspominałam szata graficzna pracy jest bardzo staranna, a język poprawny. Jedyne z powinności recenzenta przytaczam nieliczne z zauważonych błędów edytorskich tzw. literówek: str. 67 – „chlropastowy”; str.117 – „w związku”; str.158 „w pacy”.

Podsumowując, realizacja ocenianej pracy doktorskiej wymagała od mgr Przemysława Jagodzika różnych umiejętności eksperymentatorskich i szerokiej wiedzy w celu interpretacji uzyskanych wyników. Przedstawiona rozprawa ma charakter nowatorski, jest zbiorem solidnie wykonanych i opisanych doświadczeń naukowych. Jej wyniki uszczegółowiły naszą wiedzę o aktywności opiekuńczej chloroplastowej proteazy AtDeg2. W związku z tym uważam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz.U.nr 65, poz.595 z późn.zm.).

Zwracam się zatem do Rady Naukowej Wydziału Biologii UAM o dopuszczenie Pana mgr Przemysława Jagodzika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Hanna Jańska