



UNIwersytet Warszawski WYDZIAŁ BIOLOGII

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA
TEL: (+22) 55-42-109, FAX: (+22) 55-41-106

prof. dr hab. Agnieszka Mostowska
e-mail: mostowag@biol.uw.edu.pl



Warszawa, 18.08. 2017 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Gabruka pt. „Regulacja aktywności i wiązanie substratów w zależności od światła oksydoreduktazie protochlorofilidu”

Rozprawa doktorska mgr Michała Gabruka zatytułowana „Regulacja aktywności i wiązanie substratów w zależności od światła oksydoreduktazie protochlorofilidu” dotyczy działania oksydoreduktazy protochlorofilidu (POR) i mechanizmu regulacji aktywności tego enzymu.

Rozprawa doktorska zaprezentowana została w formie trzech opublikowanych prac poprzedzonych streszczeniem po polsku i angielsku i opisem rozprawy łącznie z obszerną bibliografią. Recenzent staje więc przed faktem oceny już wcześniej zrecenzowanych prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach: *Biochemistry* (IF=2,876), *Biochimica et Biophysica Acta (Proteins and Proteomics)* (IF=2,773) i *Biochemical Journal* (IF=3,797). Oświadczenia doktoranta i innych współautorów świadczą o jego wiodącym udziale we wszystkich trzech publikacjach, ocenianym w granicach 75% do 90%.

Opis rozprawy ma charakter zarówno wprowadzenia w tematykę pracy, jak i omówienia zagadnień wchodzących w skład trzech prac stanowiących trzon rozprawy doktorskiej, a zakończony jest częścią „Podsumowanie i perspektywy”. Ta krótka, ostatnia część bardzo mi się podoba; zawarte są w niej nie tylko główne osiągnięcia Autora ale również tematy, które należałoby podjąć w przyszłości.

Praca M. Gabruka i B. Myśliwej-Kurdziel, zatytułowana „Light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase: phylogeny, regulation, and catalytic properties”, (*Biochemistry* 54: 5255-5262, 2015) jest pracą przeglądową stanowiącą kompendium wiedzy o oksydoreduktazie protochlorofilidu, o pochodzeniu filogenetycznym tego enzymu, o mechanizmach ekspresji genów POR i regulacji aktywności POR, a także jego imporcie do plastydów, udziale tego białka w tworzeniu struktury ciała prolamellarnego (PLB) oraz w redukcji protochlorofilidu. Praca jest bardzo zwięzła, a jednocześnie nie pomija żadnej istotnej funkcji POR, powinna stanowić punkt wyjścia dla tych, którzy po raz pierwszy stykają się z tym białkiem enzymatycznym. Praca opiera się na 94 pozycjach literatury, w tym ponad 1/3 stanowią pozycje z ostatnich 5 lat, jest więc dobrym źródłem danych o zależności od światła regulacji aktywności tego enzymu i jego szczególnej roli w tworzeniu parakrystalicznej struktury PLB. Kilka otwartych kwestii dotyczących roli POR jest w tej pracy zasygnalizowanych, między innymi sprawa mechanizmu oligomeryzacji POR, wiązania się Pchl_{ide} do peptydu tranzytowego POR podczas jego importu do plastydu, czy interakcji POR z lipidami błonowymi. Problemy te, w dużej mierze są tematem dalszych, eksperymentalnych prac Autora. Oceniam włączenie tej pracy przeglądowej do rozprawy doktorskiej jako właściwe wprowadzenie do własnych badań Autora.

Praca M. Gabruka i wsp., zatytułowana „Insight into the oligomeric structure of PORA from *A. thaliana*” (Biochimica et Biophysica Acta -Proteins and Proteomics 1864: 1757-1764, 2016) dotyczy badań nad procesem oligomeryzacji POR oraz wpływu substratów na strukturę tego białka. Stosując różnorodne techniki badawcze: sieciowanie chemiczne, elektroforezę natywną, metodę FRET, spektrometrię mas, Autor uzyskał informacje o organizacji oligomeru POR udowadniając, że PORA z *A. thaliana* tworzy w roztworze duże oligomery, o masie ponad 250 kDa, jeszcze przed wiązaniem się z substratem. Tworzenie oligomerów POR, u zbadanych pod tym względem gatunków było do tej pory kwestią kontrowersyjną. Wykazanie przez Autora tworzenia oligomerów POR ma więc szczególne znaczenie dla istoty struktury PLB i powiązania tej struktury z odpowiednią geometrią cząsteczek barwnika oraz przekazania wzbudzenia pomiędzy Pchl_{id}e i z Pchl_{id}u na Chl_{id}e. Drugim bardzo istotnym wynikiem otrzymanym przez Autora jest uzyskanie danych o organizacji oligomeru i wpływu substratów na jego strukturę. Po związaniu się Pchl_{id}e motywy katalityczne POR lokalizują się blisko siebie umożliwiając wzajemne interakcje cząsteczek Pchl_{id}e w obrębie oligomeru. Wyniki uzyskane techniką FRET wskazują, że podjednostki w obrębie kompleksu wymieniają się w tempie minutowym, a analiza wyników sieciowania chemicznego i spektrometrii mas umożliwiły wyznaczenie regionów białka potencjalnie uczestniczących w oligomeryzacji. Za trzeci bardzo istotny wynik otrzymany przez Autora w tej pracy uważam skonstruowanie dwóch mutantów POR o zaburzonych zdolnościach do oligomeryzacji, prawdopodobnie poprzez zmianę ich struktury drugorzędowej.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej stwierdzam, że praca „Insight into the oligomeric structure of PORA from *A. thaliana*” wnosi nowe, istotne dane do mechanizmu oligomeryzacji POR i struktury tego oligomeru. Doktorant ma wiodący udział w tej pracy czego dowodem, poza oświadczeniami współautorów jest także fakt, że praca ta jest wynikiem realizacji projektu Preludium, którego był kierownikiem.

Praca M. Gabruka i wsp., zatytułowana „MGDG, PG and SQDG regulate the activity of light-depenedent protochlorophyllide oxidoreductase” (Biochemical Journal 474: 1307-1320, 2017) dotyczy roli lipidów wewnętrznych błon plastydowych w regulowaniu aktywności POR i redukcji Pchl_{id}u. Analizując niskotemperaturowe widma emisji fluorescencji POR i Pchl_{id}e wraz z NADPH, a także z dodatkiem lipidów w różnych kombinacjach Autor stwierdził, że MGDG, ale nie DGDG, jest głównym czynnikiem wpływającym na przesunięcie maksimum emisji kompleksu Pchl_{id}e:POR:NADPH, wskazując na jego specyfikę oddziaływania z POR, a dodatkowo ujemnie naładowane lipidy PG i SQDG zwiększają powinowactwo POR do NADPH dając ostatecznie przesunięcie maksimum emisji kompleksu Pchl_{id}e:POR:NadPH do 654 nm. Wynik ten uważam za jeden z bardziej istotnych osiągnięć Autora. Dodatkowo Doktorant wykazał, że kompleksy POR z NADH, choć mniej preferowane niż z NADPH, są też funkcjonalne, co nie było dotąd stwierdzone. Sukcesem zakończyły się także, dzięki zastosowaniu ukierunkowanej mutagenyzy, poszukiwania reszt aminokwasowych POR (H323) oddziałujących bezpośrednio z Pchl_{id}e, i być może odpowiedzialnych za wiązanie z lipidami. Oligomery POR oddziałujące z lipidami tworzą, po związaniu się z Pchl_{id}e, jeszcze większe agregaty, co jak wynika z danych Autora jest zasadniczym mechanizmem tworzenia parakrystalicznej struktury PLB. Wynik ten tłumaczyłby także bardzo szybką transformację takiej regularnej struktury oraz zmianę widm emisji fluorescencji Chl_{id}u z 682 nm do 690 nm, w zależności od składowych kompleksu Chl_{id}e:POR:NADPH po zaledwie błysku światła. Dane uzyskane przez Autora udowadniają także istotną rolę lipidów w regulacji aktywności POR oraz w tworzeniu struktury PLB w etioplastach. Ranga uzyskanych danych ma już swoje

odzwierciedlenie w cytowaniach w pracach dotyczących roli lipidów roślinnych w tworzeniu struktury PLB i tylakoidów.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej stwierdzam, że praca „MGDG, PG and SQDG regulate the activity of light-depenedent protochlorophyllide oxidoreductase” wnosi nowe, istotne dane do poznania roli lipidów w regulacji ścieżki biosyntezy chlorofilu. Doktorant ma wiodący udział w tej pracy czego dowodem, poza informacjami ze strony współautorów, jest finansowanie tej pracy z grantu dla Młodych Naukowców przyznanego przez WBBiB UJ oraz programu Etiuda, obu dedykowanych dla Doktoranta.

Reasumując, za najważniejsze osiągnięcia recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam:

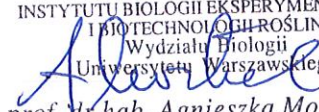
- Wykazanie, że POR tworzy duże oligomery bez względu na obecność substratów, a wiązanie substratów powoduje zmiany strukturalne zbliżając motywy katalityczne sąsiednich podjednostek.
- Udowodnienie eksperymentalne, że oddziaływanie POR z lipidami MGDG i jednym z ujemnie naładowanych lipidów SQDG lub PG indukuje agregację oligomerów w większe kompleksy o maksimum fluorescencji odpowiadającej kompleksom obecnym w PLB (654 nm).
- Znalezienie mechanizmu wiązania substratów, w szczególności reszt aminokwasowych zaangażowanych w wiązanie Pchl_{ide}.
- Wykazanie się umiejętnością zastosowania różnorodnego i bogatego wachlarza nowoczesnych technik badawczych, między innymi metody FRET czy sieciowania chemicznego.

Wyniki badań Autora stanowią poważny wkład w wyjaśnienie mechanizmu regulacji aktywności POR, w rolę lipidów w regulację tej aktywności oraz w tworzenie niezwykle regularnej struktury PLB w etioplastach. Osiągnięcia te są, w moim odczuciu, kluczowe dla zrozumienia procesu biogenezy chloroplastów w strukturalnym i funkcjonalnym aspekcie.

Chociaż trudno jest ocenić stronę edyorską rozprawy doktorskiej, która złożona jest z już wydanych prac, to jednak całość rozprawy, zarówno jej krótki opis, jak i wszystkie trzy publikacje charakteryzuje bardzo jasny, zwięzły język i styl. Tekst opisu rozprawy jest zrozumiały i przejrzysty.

W sumie rozprawę doktorską mgr Michała Gabruka oceniam bardzo pozytywnie. Uważam, że Doktorant podjął ważny temat badawczy, a recenzowana rozprawa doktorska wnosi wiele nowych, bardzo dobrze udokumentowanych danych do poznania mechanizmów działania i aktywności zależnej od światła oksydoreduktazy protochlorofilidu. Praca doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawie doktorskiej zgodnie z Ustawą o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Stawiam więc wniosek do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Michała Gabruka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na rangę uzyskanych wyników stawiam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
ZAKŁADU ANATOMII I CYTOLOGII ROŚLIN
INSTYTUTU BIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ
I BIOTECHNOLOGII ROŚLIN
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego

prof. dr hab. Agnieszka Mostowska

