Olsztyn, 20 lipca 2020 r.

Opinia promotora dotycząca rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Katarzyny Dyrdy

pt. „Analiza fosfoproteomu najądrzowego nasienia ogiera”

Przedłożona praca stanowi oryginalne dzieło, stanowiące próbę rozwiązania problemu naukowego związanego z charakterystyką zmian fosforylacji białek nasienia najądrzowego ogiera w zależności od regionu najądrzy oraz dodatkowo pory sezonu rozrodczego. Jest ona zwieńczeniem długoletnich badań prowadzonych przez Doktorantkę w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie. W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących intensywności fosforylacji białek nasienia najądrzowego ogiera, jak również nie ma informacji na temat identyfikacji fosfoprotein płynu i plemników najądrzowych. Stosując techniki proteomiczne podjęto badania, których celem była charakterystyka fosfoproteomu nasienia najądrzowego ogiera z uwzględnieniem różnych okresów sezonu reprodukcyjnego. Z mojego punktu widzenia jako Promotora na podkreślenie zasługuje pracochłonność przeprowadzonych badań oraz bardzo duża samodzielność Doktorantki. Materiał doświadczalny, czyli najądrza 12 ogierów ras gorącokrwistych, pozyskiwano podczas rutynowych zabiegów kastracji w dwóch okresach sezonu rozrodczego. Wyizolowane metodą chromatografii powinowactwa do jonów metali fosfoproteiny rozdzielano metodą elektroforezy 1D-PAGE, następnie poddawano identyfikacji z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas NanoLC-MS/MS. Dodatkowo wykonano analizę stopnia fosforylacji białek przy pomocy metody immunoblottingu.

W przygotowanej dysertacji stosując metody proteomiczne, po raz pierwszy zidentyfikowano fosfoproteiny charakterystyczne dla ekstraktów plemnikowych oraz płynu najądrzowego ogiera biorąc pod uwagę podział anatomiczny na głowę, trzon i ogon. Ponadto określono zmiany występujące w fosfoproteomie ekstraktów i płynów najądrzowych w różnych okresach sezonu rozrodczego. Zidentyfikowane białka wyizolowane z płynu najądrzowego pełnią funkcje regulacyjne, transportowe, opiekuńcze (chaperony) oraz enzymatyczne, w tym antyoksydacyjne. Zaangażowane są one między innymi, w procesy ubikwitynacji, apoptozy oraz nabywania przez plemniki zdolności do ruchu. Z kolei zidentyfikowane fosfoproteiny ekstraktów plemnikowych wchodzą w skład cytoszkieletu oraz pełnią funkcje enzymatyczne, transportowe i modulujące, co wskazuje na ich istotną rolę w dojrzewaniu

plemników ogiera. Szczególną uwagę należy zwrócić na białka i peptydy będące elementami systemu antyoksydacyjnego, który pełni bardzo istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu rozrodczego samca. W przypadku większości fosfoprotein plemników najądrzowych ogiera fosforylacji podlegają równocześnie reszty seryny, treoniny i tyrozyny zarówno w sezonie rozrodczym jak i poza nim. Wydaje się, że dwa badane czynniki istotnie wpływają na fosfoproteom plemników najądrzowych. Pierwszym z nich jest sezon rozrodczy i związane z nim zmiany fosforylacji białek o masach cząsteczkowych 75 (β-dystrobrewina, DTNB), 50 (białkowa izomeraza disiarczkowa, PDIA3), 32 (białko opiekuńcze retikulum endoplazmatycznego, BiP), 23 (dystonina DST; SYNE-1), 17 (peroksyredoksyna, PRDX) i 15 (homolog białka bikaudalnego 2, BICD2) kDa. Drugim czynnikiem jest region najądrzy w przypadku fosfoprotein o masach cząsteczkowych 61 (białko E związane z centromerem, CENP-E), 50 (białkowa izomeraza disiarczkowa A3, PDIA3) i 15 (homolog białka bikaudalnego 2, BICD2) kDa.

W oparciu o uzyskane wyniki mgr inż. Katarzyna Dyrda sformułowała następujące wnioski:

1. Intensywność procesów fosforylacji/defosforylacji białek płynu najądrzowego oraz plemników jest różna w poszczególnych segmentach najądrzy.

2. W płynie najądrzowym nasilenie procesu fosforylacji białek stwierdzano poza sezonem rozrodczym, podczas gdy w ekstraktach plemnikowych w trakcie jego trwania.

3. Fosfoproteom plemników najądrzowych ogiera zawiera różne grupy białek, w tym białka regulacyjne, transportowe, opiekuńcze, antyoksydacyjne, ubikwitynacyjne oraz związane z ruchliwością i apoptozą komórek. Odwracalnej fosforylacji może podlegać wiele enzymów.

4. Szereg białek płynu najądrzy pełniących funkcje antyoksydacyjne podlega regulacji z wykorzystaniem fosforylacji reszt seryny, treoniny i tyrozyny. Należą do nich serotransferyna, S-transferaza glutationowa, ceruloplazmina, peroksyredoksyna 1 i 2 oraz białka HSP 70 i HSP β1.

5. W ekstraktach plemnikowych zidentyfikowano białka związane z ochroną antyoksydacyjną podlegające zróżnicowanej fosforylacji. Są to białka z rodziny HSP, izomeraza wiazań disiarczkowych A3 i A6 oraz peroksyredoksyna 5,

6. Wiele składników systemu ubikwitynacji białek w nasieniu najądrzowym ogiera (enzym aktywujący ubikwitynę, tioesteraza ubikwityny, hydrolaza C-końca ubikwityny, białka z

rodziny HSP, receptory sprzężone z białkiem G) podlega regulacji na szlaku fosforylacji / defosforylacji. Jest to prawdopodobnie związane z intensywnymi procesami degradacji białek w kolejnych odcinkach najądrzy.

Uzyskane wyniki stanowią cenne uzupełnienie wiedzy z zakresu fosfoproteomiki nasienia najądrzowego ogiera. Są pierwszym kompleksowym opracowaniem dotyczącym tego zakresu biologii rozrodu koni. Stanowią istotne uzupełnienie wiedzy podstawowej

Biorąc pod uwagę całość przedstawionych elementów dysertacji stwierdzam, że przedłożona rozprawa mgr inż. Katarzyny Dyrdy jest osiągnięciem oryginalnym i spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.). W związku z powyższym, jako Promotor wyrażam zgodę na przystąpienie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Paweł Wysocki, prof. UWM