

*Prof. dr hab. Adam Szewczyk*  
*Kierownik Pracowni Wewnątrzkomórkowych Kanatów Jonowych*  
*Zakład Biochemii*  
*Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN*  
*w Warszawie*

## OCENA

### **Pracy doktorskiej mgr Patryka Kulety pt. „Identyfikacja szlaku transportu protonów w obrębie centrum katalitycznego redukującego ubiquinon (centrum Qi) w cytochromie bc1”.**

Przemiany energetycznych w organizmach to jedno z tajemniczych zjawisk, które jest fundamentem ich prawidłowego funkcjonowania. Często opis mitochondriów dotyczy głównie zdolności mitochondriów do syntezy ATP, czyli właśnie ich funkcji energetycznej. Wydawało się w latach dziewięćdziesiątych, że przynajmniej na poziomie fenomenologii proces ten został dość dobrze poznany. Nic bardziej błędnego! To był dopiero pierwszy rozdział tej historii. Dziś pisane są kolejne: opis przemian energetycznych jest „rozpisywany” z niezwykłą szczegółowością i precyzją, głównie za sprawą wyrafinowanych technik biofizycznych i biologii molekularnej. Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr Patryka Kulety wpisują się w ten nurt badawczy, który można nazwać - próbą zrozumienia molekularnych mechanizmów przemian energetycznych. Stąd temat recenzowanej rozprawy doktorskiej dotyczy fundamentalnych zjawisk bioenergetycznych, zjawisk o podstawowym znaczeniu. Dla podkreślenia, jak aktualna jest to tematyka badawcza przedstawię jeszcze jeden dowód – dowód doświadczalny - w czasie ostatniego zjazdu Biophysical Society Meeting w Nowym Orleanie (a jest to w opinii recenzenta konferencja biofizyczna numer jeden) miałem przyjemność być świadkiem pasjonujących i interesujących dyskusji właśnie z tego zakresu tematycznego.

Kompleks III (cytochrom bc1), jest jednym z ważniejszych, obok kompleksu I oraz kompleksu IV, układów białkowych łańcucha oddechowego. Oprócz właściwości oksydoredukcyjnych (posiada dwa centra katalityczne) ma także zdolność transportu jonów protonowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. W zjawisku tym krytyczną rolę pełnią chinony. Redukcja chinonu zachodząca w centrum katalitycznym Qi związana jest z pobieraniem protonów spoza błony do w/w centrum. Reakcje

transportu protonów (w przeciwieństwie do reakcji elektronowych) są relatywnie słabo poznane.

Rozprawę mgr Patryka Kulety otwiera tzw. wstęp teoretyczny omawiający układy bioenergetyczne (ich szlaki i konwersję energii), wytwarzanie siły protonomotorycznej w układach oddechowych i fotosyntetycznych. Przedstawiono także zagadnienia dotyczące cytochromu bc1: strukturę i cykl katalityczny cytochromu bc1, szlaki transportu protonów w obrębie cytochromu bc1. Na zakończenie wstępu teoretycznego opisano także bakteryjny cytochrom bc1 tzn. układ modelowy wykorzystywany w pracy mgr Patryka Kulety. Wstęp do rozprawy doktorskiej (relatywnie krótki bo opisany na 18 stronach) wydaje się recenzentowi wystarczający, aby w odpowiedni sposób wprowadzić czytelnika w omawiane zagadnienia – od strony merytorycznej.

Głównym celem pracy mgr Patryka Kulety było opisanie na poziomie molekularnym drogi transportu protonów w obrębie centrum katalitycznego Q<sub>i</sub> cytochromu bc1.

Szczegółowe cele (zadania), zdefiniowane w rozprawie doktorskiej, to:

- charakterystyka funkcjonalna in vivo zmutowanego bakteryjnego cytochromu bc1 z podstawionymi w miejsce lizyny 251 oraz asparaginy 252 nieprotonowanymi aminokwasami,
- określenie właściwości spektroskopowych pojedynczo i podwójnie zmutowanego cytochromu bc1.
- Określenie wpływu badanych grup protonowalnych na kinetykę reakcji redoks kofaktorów hemowych w trakcie cyklu katalitycznego cytochromu bc1.
- Zbadanie wpływu poszczególnych protonowalnych reszt aminokwasowych na stabilizację semichinonu powstającego w centrum Q<sub>i</sub>.
- Opis równowagi termodynamicznej pomiędzy stanem redoks hemów, a pulą chinonu w reakcjach zachodzących w centrum Q<sub>i</sub>.

Tak sformułowane cele według recenzenta są w pełni zasadne. Warto tu podkreślić, że rozprawa była realizowana pod kierunkiem prof. Artura Osyczki w Zakładzie



Biofizyki Molekularnej (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego) gdzie od wielu lat, z dużą ekspertyzą naukową i z wieloma sukcesami realizuje się badania dotyczące szeroko rozumianej bioenergetyki molekularnej dotyczącej procesów generowania energii.

Bazując na opublikowanych wcześniej pracach autor rozprawy doktorskiej zaproponował, że dwa aminokwasy (lizyna i asparagina) cytochromu b mogące pełnić istotną rolę w reakcjach wiązania substratu (ubichinonu) oraz transportu protonów do centrum Qi. Na podstawie tych założeń autor rozprawy skonstruował mutanty (tzw. pojedyncze i podwójne tzn. zmieniając jeden lub dwa aminokwasy jednocześnie) cytochromu bc1. Tak otrzymane białko poddano analizie technikami pozwalającymi określić wpływ tych mutacji na reakcje transportu protonów oraz na własności redoks kofaktorów. Dodatkowo badano tworzenie stanu pośredniego reakcji (semichinonu) w centrum Qi.

Przeprowadzono pomiary indukowanych światłem reakcji redoks w izolowanych błonach zawierających zmutowany cytochrom bc1. Wykazano, że usunięcie tylko jednej grupy protonowej w obrębie miejsca katalitycznego powoduje spadek aktywności białka i utrudnia transport protonów, ale nie blokuje go całkowicie. Usunięcie dwóch grup protonowych jednocześnie spowodowało całkowite zablokowanie transportu protonów i dysfunkcjonalność całego kompleksu (*in vitro* i *in vivo*). Badania te pozwoliły na identyfikację specyficznego szlaku transportu protonów. Krytyczne jest współdziałanie aminokwasów Lys251/Asp252 indukujące dostarczanie protonów spoza błony do centrum Qi cytochromy bc1.

Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr Patryka Kulety dotyczą ważnego zagadnienia w obszarze badań bioenergetycznych. Zrozumienie molekularnych mechanizmów energetycznych – mimo, że często wykorzystuje się organizmy modelowe jak w przypadku recenzowanej rozprawy doktorskiej – może mieć bezpośrednie „przełożenie” na opis różnych zjawisk w mitochondriach człowieka. Ostatnie lata to prawdziwy urodzaj na różnego rodzaju „stany patologiczne”, które u swoich podstaw mają źle funkcjonujące (na różnych poziomach molekularnych) mitochondria. Dotyczy m.in. chorób mitochondrialnych, zjawisk związanych z neurodegeneracją, czy cytoprotekcją, czy wreszcie szeroko rozumianego stresu oksydacyjnego.

Zrealizowanie celu rozprawy doktorskiej było możliwe przez wykorzystanie metod spektroskopii molekularnej oraz mutagenezę w układzie modelowym tzn. bakteryjnego cytochromu bc1 (wykazuje on bardzo duże podobieństwo do mitochondrialnego kompleksu III). W rozprawie doktorskiej wykorzystano szeroki wachlarz technik eksperymentalnych:

- zastosowano przede wszystkim metody spektroskopowe: dwuwiązkowej czasowo rozdzielczej spektrofotometrii impulsowej oraz spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego.
- zestaw technik biologii molekularnej (hodowle bakteryjne, otrzymywanie chromatoforów błonowych z bakterii itd.)
- zestaw technik biochemicznych dotyczących badania białek (oczyszczanie cytochromu bc1, pomiary aktywności enzymatycznej i syntezy reaktywnych form tlenu itd.)

Zarówno zakres wykorzystanych technik oraz ich opis (szczegółowość i precyzja) w rozprawie doktorskiej mgr Patryka Kulety recenzent ocenia celująco: z jedną uwagą krytyczną przedstawioną poniżej.

Dyskusja obejmująca 18 stron rozprawy jest bardzo dobra. Prawdopodobnie jeszcze większe wykorzystanie schematów/ilustracji ułatwiłoby śledzenie dyskusji. Spis literatury według recenzenta jest poprawny i adekwatny do zakresu tematycznego rozprawy doktorskiej.

Czas na pytania i uwagi krytyczne, komentarze recenzenta:

- Pytania natury ogólnej dotyczące drogi transportu protonów: do jakiego stopnia drogi transportu protonów w opisywanym w rozprawie kompleksie białkowym są podobne do tych opisywanych w kompleksie I (np. przedstawianych w pracach Ulricha Brandta) lub kompleksie IV łańcucha oddechowego? I dodatkowe pytanie: do jakiego stopnia opis transportu protonów w wykorzystywanym układzie modelowym jest podobny do tego jaki jest obecny w innych organizmach ?



- Pytanie dodatkowe: do jakiego stopnia – według opinii doktoranta – zdolność do kompleksu bc1 do tworzenia super kompleksów z innymi elementami łańcucha oddechowego może wpływać na molekularny opis transportu protonów?
- Pytanie dotyczące interakcji światła z elementami łańcucha oddechowego. Choć poniższe pytanie jest trochę „obok” zakresu rozprawy doktorskiej recenzent jest ciekaw opinii doktoranta na temat funkcjonalnych skutków oddziaływania światła podczerwonego z kompleksami łańcucha oddechowego np. absorpcja światła z zakresu 700-800 nm przez oksydazę cytochromową. Do jakiego stopnia te długości fal mogą również indukować reakcje redoks tak jak fale krótsze?
- W rozprawie stosowano różne biochemiczne techniki oczyszczania cytochromu bc1. Czy można prosić doktoranta o ich krytyczną ocenę dotyczącą czystości otrzymywanych „produktów końcowych”?
- Pytanie szczegółowe dotyczące metodyki: czy istnieją metody alternatywne (do tych opisanych w rozprawie), które mogą uzupełnić czy wesprzeć proponowany mechanizm molekularny transportu protonów w kompleksie bc1?
- Pytanie szczegółowe: w rozdziale „4.4.4 Wpływ pH na reakcję odwrotną w miejscu Qi cytochromu bc1” opisano wyniki dotyczące regulacji przez pH: rysunki od 4.14 do 4.18. Czy doktorant może uzasadnić wybór pH 9 w opisywanych doświadczeniach?
- Załączenie odbitek prac – czego trochę zabrakło w recenzowanej rozprawie - już opublikowanych jest dobrym obyczajem pokazującym, że otrzymane wyniki rozprawy doktorskiej mgr Patryka Kulety są w obiegu światowym. Szczególnie, że część wyników opublikowano (spis na stronie 108) w czasopiśmie z wysokim impact factor. Dla Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics jest to 4,8 a dla Scientific Reports jest to 5,5. Można tylko pogratulować promotorowi i doktorantowi opublikowania wyników w tak dobrych czasopiśmie naukowych.
- Uwaga raczej *pro futuro*: Generalnie opis wykorzystywanych metod jest bardzo dobry, czego dał wyraz recenzent powyżej. Jednak recenzent sugeruje, aby może (np. w ramach załącznika) ułatwić śledzenie rezultatów eksperymentów przez syntetyczne wprowadzenie do wykorzystywanych metod, szczególnie kiedy są one krytyczne dla otrzymywanych rezultatów.
- Na zakończenie kilka uwag edytorsko-językowych, które recenzent czyni z obowiązku niż z faktycznej potrzeby bo rozprawa jest napisana starannie.

Pierwsze zdanie Dyskusji brzmi „Prace nad badaniem reakcji redukcji...”  
Sformułowanie „prace nad” jest podobno jednak zapożyczeniem/tzw. kalką z języka obcego. Wykaz skrótów na stronie 3 został utworzony wedle schematu: skrót jest oparty o nazwy angielskie natomiast opis jest po polsku z odniesieniem do nazwy angielskiej. Recenzent uważa taką metodę za racjonalną natomiast doktorant powinien być konsekwentny. I tak: PMF czy PQ wymknęły się z tego schematu. Czy można prosić o wytłumaczenie słów „izolacja i oczyszczanie białek” (tytuł rozdziału 3.1.3) ?

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Patryka Kulety jest napisana bardzo dobrze, otrzymane wyniki są bardzo interesujące i znacząco uzupełniają naszą wiedzę w zakresie bioenergetyki molekularnej a zgłoszone uwagi nie rzutują na moją bardzo pozytywną ocenę pracy. Autor wykazuje bardzo dobrą orientację w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy. Wnioskuje zatem o uznanie pracy mgr Patryka Kulety za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie mgr Patryka Kulety do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na bardzo interesujące rezultaty uzyskane przez doktoranta oraz ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach międzynarodowych wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Patryka Kulety.



Warszawa, 12 luty 2017 r.

(Prof. dr hab. Adam Szewczyk)