



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Umultowska 89
61-614 Poznań

Poznań, 14.02.2017

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr. Patryka Kulety

p.t. „Identyfikacja szlaku transportu protonów w obrębie centrum katalitycznego redukującego ubichinon (centrum Q_i) w cytochromie bc_1 ”

Zespół prof. dr hab. Artura Osyczki z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie od wielu lat z powodzeniem zajmuje się funkcjonowaniem kompleksów przekształcających energię w błonach biologicznych. Praca doktorska mgr. Patryka Kulety skupia się na badaniu na poziomie molekularnym drogi transportu protonów w obrębie centrum katalitycznego Q_i cytochromu bc_1 . W badaniach użyto ukierunkowaną mutagenezę i zaawansowane metody spektroskopowe w układzie modelowym cytochromu bc_1 bakterii purpurowej *Rhodobacter capsulatus*, wykazującego duże podobieństwo do cytochromu bc_1 , podstawowej pierwotnej pompy protonowej mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów (kompleksu III). Wykorzystano skonstruowane na podstawie danych literaturowych 4 pojedyncze (K251M, K251E, D252N, D252A) i dwie podwójne (K251M/D252N, K251M/D252A) muteiny cytochromu bc_1 ze zmianami Lys251 i Asp252 w podjednostce *b*. Muteiny te poddano szczegółowej analizie biochemicznej i kinetycznej, badając wpływ danej mutacji na reakcje transportu protonów, własności redoks kofaktorów oraz tworzenie stanu pośredniego reakcji (semichinonu) w centrum katalitycznym redukującym ubichinon (centrum Q_i). Podstawowymi technikami użytymi w pracy były dwuwiązkowa czasowo rozdzielcza spektrofotometria impulsowa oraz spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

Formalny opis rozprawy

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest bardzo ładnym i jasnym językiem. Nie zauważyłam, co jest wyjątkowe, żadnych literówek i błędów stylistycznych. Na wyróżnienie zasługuje także staranna i bardzo ładna oprawa graficzna pracy. Świadczy to o dużej staranności Doktoranta podczas przygotowywania rozprawy.

Praca, licząca w sumie 120 stron, zawiera 47 rycin (2 w załączniku) oraz 16 tabel. Układ pracy jest typowy i obejmuje: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie, wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, załączniki, oraz liczącą 134 publikacje bibliografię. Na końcu rozprawy umieszczono listę 2 publikacji eksperymentalnych (w *Biochimica Biophysica Acta – Bioenergetics*, IF 4.8 i *Scientific Reports*, IF 5.5), w których częściowo opublikowano wyniki opisane w doktoracie.

Poprzedzający część doświadczalną, liczący 20 stron Wstęp stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego struktury i funkcjonowania cytochromu bc_1 , ze szczególnym uwzględnieniem cyklu katalitycznego i zachodzącego w nim procesu transportu protonów. Na początku Wstępu Doktorant bardzo kompetentnie przedstawił podstawy procesu przekształcania energii w układach oddechowych i fotosyntetycznych błon bakteryjnych, mitochondrialnych i chloroplastowych. Opisał także zalety cytochromu bc_1 z

bakterii purpurowych rodzaju *Rhodobacter* jako dogodnego układu modelowego do badań szlaków/kanałów transportu protonów w tym kompleksie. Pisząc Wstęp Autor sięgnął do najważniejszego piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień.

W czasie lektury tej części pracy nasunęły mi się pytania:

- Czy obecność dodatkowych (poza trzema podstawowymi) podjednostek w niebakteryjnym cytochromie bc_1 może wpływać na katalizę, w tym na transport protonów?
- Czy istnieją modele bakteryjne do badania cytochromu bc_1 w układzie heterotroficznego oddychania tlenowego?
- Czy w błonach bakteryjnych występują superkompleksy podobne do superkompleksów łańcucha oddechowego mitochondriów? Czy występowanie w superkompleksie może mieć wpływ na katalizę cytochromu bc_1 ?

Rozdział Materiały i metody (20 stron) zawiera wyczerpujące i staranne opisy stosowanych metod badawczych. Uwagę zwraca różnorodność stosowanych technik, świadcząca o wszechstronności Doktoranta w pracy doświadczalnej. Podczas badań kinetycznych mutein cytochromu bc_1 wykorzystano głównie zaawansowane metody spektroskopowe, m.in. dwuwiązkową spektrofotometrię impulsową, umożliwiającą obserwacje aktywowanych światłem reakcji transferu elektronów w próbkach chromatoforów oraz spektroskopię EPR, umożliwiającą obserwacje stanu redoks kofaktorów hemowych i powstających w tych reakcjach semichinonowych stanów pośrednich.

Uwagi i pytania do rozdziału Materiały i metody:

- Jak otrzymywano zredukowaną formę decylubichinonu (DBH_2)? A przy okazji, jaka forma ubichinonu (z iloma jednostkami izoprenowymi, Q_{10} ?) występuje u *R. capsulatus*?
- Doktorant pisze, że mierzył „produkcję anionorodnika ponadtlenkowego/poziom reaktywnych form tlenu”. Moim zdaniem mierzył jedynie aktywność enzymatyczną cytochromu bc_1 (poziom redukcji cytochromu c) w obecności i przy braku dysmutazy ponadtlenkowej, co pośrednio wskazuje na poziom produkcji anionorodnika ponadtlenkowego.
- Brakuje opisu rozdziału elektroforetycznego białek SDS-PAGE.
- Brakuje rozdziału Analiza statystyczna i informacji ile wykonywano powtórzeń biologicznych i technicznych dla danego typu doświadczeń. Większość wyników nie uwzględnia analizy statystycznej.

W rozdziale Wyniki, który obejmuje 39 stron, Autor rozprawy rzeczowo przedstawia wyniki kolejno realizowanych zadań badawczych wcześniej przedstawionych w rozdziale Cel pracy. Na podkreślenie zasługuje sposób prowadzenia czytelnika przez poszczególne etapy analizy funkcjonalnej i kinetycznej mutein cytochromu bc_1 w kontekście ich możliwego udziału w procesie transportu protonów do centrum katalitycznego Q_i . Poszczególne wyniki są prezentowane w logicznej kolejności tworząc spójną całość. Przeprowadzona charakterystyka kinetyczna i funkcjonalna wskazuje, że zarówno Lys252 jak i Asp252 biorą udział w szlaku transportującym protony do centrum Q_i , w szlaku który dostarcza protony do grupy karbonylowej C-1 chinonu w miejscu wiązania. Obie reszty oddziałują ze sobą będąc częścią tego samego szlaku transportu protonów. Uzyskane wyniki i analiza danych literaturowych wskazują, że szlak Lys252/Asp252 funkcjonalnie oddziałuje z innym szlakiem transportu protonów do grupy karbonylowej C-4 chinonu, w którym bierze udział His217. Wyłączenie jednego z tych szlaków prowadzi do zatrzymania transportu protonów w obrębie centrum Q_i . Biorąc pod uwagę niewielką ilość dotychczasowych danych eksperymentalnych dotyczących reakcji protonowych w obrębie cytochromu bc_1 oraz trudności w bezpośrednich badaniach tych reakcji, przedstawione badania można uznać za nowatorskie i unikatowe.



Tu mam tylko zapytanie:

- Rozdział 4.5. Dlaczego nie zmierzono efektu mutacji D252A na wartość potencjałów hemów b bez inhibitorów?

Liczący 21 stron i podzielony na kilka porządkujących punktów rozdział Dyskusja w zasadzie wyczerpuje problemy wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych grup badawczych. Doktorant solidnie i krytycznie przedyskutował otrzymane wyniki, przedstawił swoje rozważania wywnioskowane na podstawie nowych danych eksperymentalnych i teoretycznych. Bardzo ciekawe są modele oddziaływania chinonu i semichinonu z łańcuchami bocznymi aminokwasów oraz proponowany schemat przebiegu reakcji dwuelektronowej redukcji chinonu w miejscu Q_i dla cytochromu bc_1 *R. capsulatus*, otrzymane na podstawie symulacji dynamiki molekularnej wiązania chinonu w centrum Q_i . Podobnie jak całość pracy, rozdział Dyskusja czyta się bardzo dobrze.

W czasie lektury tej części pracy nasunęły mi się pytania:

- Czy długość ogona węglowodorowego (ilość jednostek izoprenowych) ubichinonu ma wpływ na katalizę cytochromu bc_1 ? Czy używanie w badaniach benzochinolu (DBH_2) jest optymalne?

- Czy podobnie jak u drożdży, kardiolipina (czy inny fosfolipid) może brać udział w protonacji grupy C-1 chinonu w centrum Q_i badanej bakterii?

- Jakie są Pana zdaniem perspektywy dalszych badań szlaków transportu protonów w cytochromie bc_1 ?

Podsumowanie

Wspomniane wcześniej uwagi nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Wyniki doświadczeń przedstawione w rozprawie nie tylko stanowią dobrą podstawę do dalszych badań ale również są istotne dla zrozumienia molekularnego mechanizmu transferu protonów i reakcji protonowych w obrębie cytochromu bc_1 , a także w szerszym aspekcie pierwotnych pomp protonowych. Biorąc pod uwagę merytoryczną wartość i nowatorskość pracy, dużą pracowitość i różnorodność doświadczeń i analiz, a także umiejętność prezentowania i dyskusowania wyników, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr. Patryka Kulety do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie recenzowanej rozprawy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz