

ul. S. Banacha 2c, 02-097 Warszawa
TEL.: + 48 22 55 43 600, FAX: +48 22 55 40 801, E-MAIL: sekretariat@cent.uw.edu.pl
www.cent.uw.edu.pl

dr hab. Joanna Kargul, prof. UW
Laboratorium Fotosyntezy
i Paliw Słonecznych
CeNT Uniwersytet Warszawski
ul. Banacha 2C
02-097 Warszawa
Tel 1: +48 225 543 760
Tel 2: +48 533 844 600
Fax: +48 225 540 801
Email: j.kargul@uw.edu.pl
solar.biol.uw.edu.pl

Warszawa, 9.05.2016

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Sebastiana Pintschera pt. „Wykrycie wolno i szybko-relaksującej formy semichinonu w centrum Q_i cytochromu bc_1 i ich związek z reakcjami redoks w obrębie enzymu”

Cytochrom bc_1 (cyt bc_1) jest jednym z najbardziej fundamentalnych membranowych kompleksów enzymatycznych, który bierze udział w generowaniu siły protonomotorycznej wykorzystywanej do syntezy ATP w mitochondrialnym i bakteryjnym łańcuchu oddechowym, jak również w fotosyntetycznym łańcuchu transportu elektronów. Badania strukturalne, a szczególnie badania dyfrakcji rentgenowskiej skrytalizowanego dimerycznego kompleksu cyt bc_1 i pokrewnych filogenetycznie kompleksów cyt b_6f pozwoliły na dokładne określenie organizacji przestrzennej poszczególnych podjednostek tego kompleksu, w tym centrum katalitycznego, jak również na zaproponowanie precyzyjnej sekwencji cząstkowych reakcji katalitycznych związanych z cyklicznym utlenianiem i redukcją substratu (chinonu), sprzężonym z transportem protonów w poprzek błony.

Wiadomo od połowy lat 70-tych, że ów homodimeryczny kompleks membranowy sprzęga transfer elektronów między błonową pulą chinonu i pozabłonową pulą cyt c z transportem protonów w poprzek błony, umożliwiając tym samym powstanie siły protonomotorycznej niezbędnej do syntezy ATP. W reakcjach tych uczestniczą dwa typy centrów katalitycznych zlokalizowanych w domenach strukturalnych cyt bc_1 zlokalizowanych po przeciwległych stronach błony: centrum utleniające ubichinol (Q_o) oraz centrum redukujące ubichinon (Q_i). Aktywność katalityczna cyt bc_1 została opisana jako tzw. cykl Q , w którym następuje sprzężenie działania centrów Q_o i Q_i w pętli redoks. Dwuelektronowe utlenienie ubichinolu w centrum Q_o , połączone z uwalnianiem protonów oraz dwuelektronowa redukcja ubichinonu w centrum Q_i związana z pobieraniem protonów, prowadzą w efekcie do wytworzenia gradientu protonów w poprzek błony. Centrum Q_o katalizuje wyjątkową w biologii reakcję bifurkacji, polegającą na kierowaniu elektronów pochodzących z utlenianego ubichinolu na dwa odrębne łańcuchy kofaktorów w obrębie cyt bc_1 : wysokopotencjałowy (klaster 2Fe-2S i hem c_1) oraz niskopotencjałowy (hemy b_L i b_H), stwarzając tym samym optymalne termodynamicznie warunki dla reakcji dwuelektronowego utleniania ubichinolu.

W ostatnich latach zidentyfikowano spektroskopowo stan, który można przypisać jako stan pośredni reakcji bifurkacji, a także wykazano, że możliwy jest funkcjonalny transfer elektronu między poszczególnymi monomerami cyt bc_1 . Odkrycia te, w których wiodący udział miał prof. dr hab. Artur Osyczka wraz ze swoimi współpracownikami, pozwoliły na lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów cyklu katalitycznego w obrębie cyt bc_1 , szczególnie w kontekście fizjologii komórki.

W nurt tych fundamentalnych badań mechanistycznych nad funkcją cyt bc_1 świetnie wpisuje się praca doktorska Pana mgr Sebastiana Pintschera „Wykrycie wolno i szybko-relaksującej formy semichinonu w centrum Q_i cytochromu bc_1 i ich związek z reakcjami redoks w obrębie enzymu”. Praca została wykonana pod opieką prof. dr hab. Artura Osyczki, światowego eksperta w dziedzinie funkcjonalnych badań nad cyt bc_1 metodami spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) w połączeniu z molekularną mutagenezą tego kompleksu, co zapewniło wyjątkowo wysoki poziom naukowy wyników opisanych w recenzowanej rozprawie.

Podjęty przez doktoranta temat jest niezmiernie ważny, gdyż jak dotąd nie udało się wykryć ani zbadać bezpośredniej interakcji pomiędzy częściowo zredukowanym chinonem w miejscu Q_i (semichinonem, SQ_i), a utlenionym wyskopotencjałowym hemem b_H obecnym w bezpośrednim sąsiedztwie tej strukturalno-funkcjonalnej domeny cyt bc_1 . Co więcej, dotychczasowe badania ugruntowały swoistego rodzaju dogmę, że semichinon jako forma częściowo zredukowanej formy substratu, związana bezpośrednim oddziaływaniem magnetycznym z utlenionym hemem b_H w centrum Q_i jest niewykrywalna spektroskopowo ze względu na atyferromagnetyczny charakter tego oddziaływania. Prezentowana praca poraz pierwszy dostarczyła szeregu bezpośrednich dowodów spektroskopowych nie tylko na istnienie tej populacji semichinonu w miejscu Q_i , ale również dostarczyła wielu cennych informacji na temat dokładnego charakteru tych oddziaływań. Należy podkreślić, że dokładne zbadanie właściwości interakcji pomiędzy SQ_i , a hemami niskopotencjałowego łańcucha transferu elektronów było możliwe dzięki zastosowaniu przez Doktoranta nowatorskiego podejścia eksperymentalnego polegającego na nasyceniu układu mocą mikrofalową w czasie pomiarów EPR w podwyższonych temperaturach.

Cel pracy:

Doktorant postawił sobie jako jako nadrzędny cel zbadanie własności magnetycznych semichinonu, pośredniego wolnorodnikowego produktu jednoelektronowej redukcji ubichinonu, związanego w miejscu Q_i oraz określenie natury jego oddziaływań z metalicznymi kofaktorami łańcucha niskopotencjałowego przy użyciu dwóch komplementarnych podejść eksperymentalnych: spektroskopii EPR przy nasycającej mocy mikrofalowej oraz miareczkowania potencjometrycznego hemów b . Wykorzystał w tym celu semichinon generowany w reakcji odwrotnej w Q_i , tj. w reakcji utleniania ubichinolu przez hem b_H przy jednoczesnym farmakologicznym zablokowaniu miejsca Q_o syntetycznym inhibitorem (myksotiazolem) w formie dzięki cyt bc_1 , jak również w szeregu unikalnych mutein tego kompleksu ze specyficznie zmodyfikowanymi osiami ligacji hemowego atomu żelaza.

Opis pracy:

Niniejsza praca doktorska została napisana według tradycyjnego układu, zawierając typowe rozdziały, takie jak Wstęp (16 stron), Cel pracy (1 strona), rozdziały opisujące Materiały i Metody (w sumie 16 stron), Wyniki (34 strony), Dyskusja (10 stron) oraz półstronicowe Podsumowanie. Końcowymi sekcjami są Załączniki (3) oraz Spis literatury (126 pozycje). Proporcje poszczególnych rozdziałów są bardzo dobrze zachowane.

Wstęp wprowadza szczegółowo czytelnika we wszelkie zagadnienia poruszane w pracy doktorskiej. Jest on wyczerpująco ilustrowany odpowiednimi schematami, strukturami krystalicznymi cyt bc_1 i wzorami chemicznymi hemów w centrach katalitycznych. Omówione zostały m. in. takie zagadnienia jak: sposoby konwersji energii w komórkach, struktura i właściwości paramagnetyczne metalicznych kofaktorów białek hemowych w kontekście ich osiowej ligacji, właściwości redoks różnych błonowych, małowcząsteczkowych przenośników elektronów, struktura i właściwości spektroskopowe cyt bc_1 u modelowego organizmu *Rhodobacter capsulatus* (zastosowanego jako układ modelowy w recenzowanej pracy doktorskiej) oraz opis cyklu katalitycznego cyt bc_1 wraz z metodami badania jego

kinetyki z zastosowaniem farmakologicznych inhibitorów. Ostatni podrozdział Wstępu zawiera bardzo przystępny i zwięzły opis zastosowania spektroskopii EPR w badaniach biologicznych.

Następnie przedstawiono **Cele pracy**, tak jak to zrecenzowano powyżej. Należy w tym miejscu wspomnieć, że cel nadrzędny oraz cele szczegółowe projektu zostały świetnie zdefiniowane w sposób wyjątkowo klarowny i logiczny, co świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym Doktoranta do przeprowadzenia tak ambitnych badań mechanistycznych.

Rozdziały dotyczące **Materiałów i Metod** są wyczerpująco i przejrzysto opisane. Złożoność układów eksperymentalnych zastosowanych w badaniach Doktoranta jest bardzo przystępnie przybliżona poprzez zawarcie odpowiednich tabel, równań i przejrzystego schematu miareczkowania potencjometrycznego.

Rozdział poświęcony **Wynikom** przedstawia uzyskane dane w bardzo czytelnej formie i jest odpowiednio zilustrowany widmami EPR, wykresami miareczkowania potencjometrycznego i tabelami podsumowującymi wyznaczone eksperymentalnie wartości równowagowych potencjałów oksydoredukcyjnych dla badanych kompleksów cyt bc_1 , kofaktorów i substratów.

Z najważniejszych wyników warto wymienić:

1. Wykazanie poprzez pomiary widm EPR, że semichinon SQ_1 występuje w dwóch formach, różniących się czasem relaksacji (wolno- i szybko-relaksujące formy) oraz potencjałem redoks (o ok. 30 mV). Pokazanie po zablokowaniu enzymu w formie dzikiej i muteinach lizynowych antymycyną, że obie formy semichinonu są związane z aktywnością centrum Q_1 .
2. Określenie, że obie formy SQ_1 oddziałują magnetycznie z hemem b_H , a charakter tej interakcji zależy od stanu redoks hemów b_H i b_L .
3. Wygenerowanie mutein ze zmienioną ligacją osiową atomu Fe w hemach b_H i b_L , a tym samym pokazanie modyfikacji potencjałów redoks obydwu hemów. Pokazanie, że wolno- lub szybko-relaksująca forma SQ_1 oddziałuje odpowiednio ze zredukowanym hemem b_H (muteiny H212K i H212M) lub zredukowanym hemem b_L (muteiny H198K, H198M i H198N).
4. Pokazanie poprzez miareczkowanie potencjometryczne oczyszczonego cyt bc_1 w formie dzikiej i mutein lizynowych tego kompleksu, że istnieją dwie pule dla hemów b_L i b_H różniące się swoim potencjałem redoks oraz że występowanie obydwu form hemów jest zależne od oddziaływania elektrostatycznego z SQ_1 .
5. Precyzyjne określenie równowagowych potencjałów redoks dla dwóch form SQ_1 , dwóch frakcji hemu b_H i dwóch form hemu b_L .
6. Pokazanie poprzez miareczkowanie potencjometryczne, że redukcja hemu b_L przebiega substechiometrycznie ($n=0,54$), co jak sugeruje Doktorant, jest najprawdopodobniej spowodowane oddziaływaniem elektrostatycznym hemu b_L ze zredukowanym hemem b_H oraz hemem b_L z sąsiedniego monomeru.

Rozdział „Dyskusja” bardzo trafnie i wszechstronnie interpretuje przedstawione wyniki pomiarów EPR i miareczkowania potencjometrycznego formy dzikiej cyt bc_1 oraz szeregu mutein tego kompleksu, przedstawiając jednocześnie następujące dwa modele mechanistyczne odnoszące się do kinetyki cyklu katalitycznego Q :

1. Przedstawienie nowego mechanizmu reakcji odwrotnej w centrum Q_1 (przy zablokowaniu farmakologicznym miejsca Q_0) z uwzględnieniem oddziaływania dipolowego utlenionego hemu b_H i szybko-relaksującego SQ_1 .
2. Przedstawienie nowego modelu równowagowych stanów redoks hemów b i miejsca katalitycznego Q_1 , z uwzględnieniem pokazanego w recenzowanej pracy oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy pulami SQ_1 , hemu b_H oraz hemu b_L .

Rozdział „Podsumowanie” syntetycznie przedstawia najważniejsze osiągnięcia rezensowanej rozprawy doktorskiej, podkreślając aspekty mechanistyczne osiągniętych wyników.

Ostatni rozdział zawiera 3 Załączniki przedstawiające widma EPR dla natywnego i zdenaturowanego kompleksu cyt bc_1 , krzywe warunków równowagowych miareczkowania wg. Robertsona oraz krzywą nasycenia dla SQ w warunkach wymuszających redukcję ubichinolu w miejscu Q_i .

Na koniec pracy przedstawiono Spis literatury zawierający 126 pozycji w kolejności ich cytowania w tekście.

Najważniejsze osiągnięcia pracy:

Opisane w pracy doktorskiej wyniki mają ogromną wartość poznawczą dla światowej nauki, gdyż prezentują nowatorski model transblonowego transferu elektronów w czasie cyklu katalitycznego cytochromu bc_1 niezależny od delta E_m pomiędzy potencjałami hemów b_H i b_L , rzeczowo polemizując tym samym z utartymi od wielu dekad poglądami w tej dziedzinie. Istotne jest również, że część wyników opisanych w pracy doktorskiej wliczając w/w mechanistyczny model transferu elektronów w cyklu Q zostały ostatnio opublikowane w formie oryginalnego artykułu w renomowanym czasopiśmie *Journal of Biological Chemistry* (IF2015 4,57), w której mgr Pintscher jest pierwszym autorem, co świadczy o jego wiodącej roli eksperymentalnej i koncepcyjnej (Pintscher et al., *J. Biol. Chem.*, 2016, 291, 6872-6881).

Do najważniejszych osiągnięć pracy można zaliczyć:

1. Poraz pierwszy spektroskopowe pokazanie szybko relaksującej formy SQ_i poprzez zastosowanie nowatorskiego podejścia eksperymentalnego (poprzez zastosowanie metody pomiarów EPR przy nasyceniu układu mocą mikrofalową).
2. Dogłębne scharakteryzowanie własności magnetycznych dwóch pul semichinonu SQ_i , wygenerowanych w reakcji odwrotnej w cyt bc_1 typu dzikiego oraz określenie wpływu stanu redoks hemów na te własności przy wykorzystaniu mutein ze zmienioną osiową ligacją żelaza hemowego.
3. Stworzenie fenomenologicznego modelu reakcji odwrotnej w centrum Q_i , w warunkach kiedy miejsce Q_o enzymu jest nieaktywne, uwzględniającego redystrybucję elektronów w obrębie łańcucha niskopotencjałowego. Pokazanie oddziaływania dipolowego pomiędzy utlenionym hemem b_H i szybko-relaksującą pulą SQ_i .
4. Precyzyjne wyznaczenie równowagowych potencjałów redoks hemów b w centrach Q_i i Q_o , w obecności farmakologicznych inhibitorów tych miejsc katalitycznych.
5. Wyznaczenie równowagowych potencjałów redoks dla dwóch pul SQ_i w eksperymentach miareczkowania potencjometrycznego białka izolowanego.
6. Oszacowanie stałej stabilności (K_{stab}) dla semichinonu w miejscu Q_i na 15-70.
7. Zaproponowanie modelu opisującego równowagę oksydoredukcyjną w obrębie łańcucha niskopotencjałowego cyklu Q, a w szczególności miejsca Q_i .

Ciekawe spostrzeżenia do dalszej dyskusji:

1. Jestem ciekawa opinii Doktoranta na temat możliwości zamiany domen cyt bc_1 , np. w podjednostce FeS i cyt b oraz potencjalnie wpływu tej zamiany na redystrybucję elektronów w niskopotencjałowym łańcuchu transportu elektronów, w szczególności w kontekście oddziaływań SQ_i z hemami b_H i b_L .
2. Biorąc pod uwagę wyniki rozprawy doktorskiej, jakie jest zdanie Doktoranta na temat możliwości podwójnej reakcji utleniania UQH_2 oraz redukcji UQ w danym monomerze

cytochromu bc_1 , czy też naprzemiennej reakcji utleniania UQH_2 /redukcji UQ pomiędzy dwoma centrami Q_a/Q_b w poszczególnych monomerach dimerycznego enzymu?

3. Co wiadomo na temat oddziaływania substratu i kofaktorów hemowych w fotosyntetycznym cytochromie b_{6f} blisko spokrewnionym ewolucyjnie z cyt bc_1 ?
4. W blisko spokrewnionym kompleksie cytochromu b_{6f} podjednostka IV zawiera 1 cząsteczkę chlorofilu a . Jakie jest zdanie Doktoranta nt potencjalnej funkcjonalnej roli tej cząsteczki na kinetykę oddziaływania PQH_2 z hemem b_L w pobliżu miejsca Q_a ?

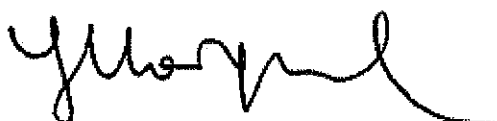
Elementy wymagające poprawy:

Praca jest napisana bardzo starannie i przejrzysto, tym niemniej kilka elementów wymaga poprawy:

- Str. 5 – PDB powinno być zdefiniowane jako baza danych zawierająca dane o strukturze przestrzennej białek
- Str. 10 – byłoby wskazane zaznaczyć na schemacie (Rys. 1) miejsca Q_a i Q_b w formach cytochromu bc oraz polaryzację błony
- Str. 51 – należy zdefiniować prawo Curie i prawo Leigh'a
- Str. 84 – proszę wyjaśnić precyzyjniej „brak nasycenia mocą mikrofalową oraz amplituda sygnału malejąca wraz z temperaturą” (kolokwializm ‘wraz z temperaturą’).
- Str. 86 – W zdaniu „Również w przypadku mutacji H198K występowanie niemal wyłącznie jednej, szybko relaksującej formy SQ_b było kłopotliwe do wyjaśnienia, ponieważ hemy b w tej mutacji w formie natywnej są niemal izopotencjałowe (rys. 42, przebiegi oznaczone kolorem czarnym) [47].” należy odnieść się do Rys. 40, a nie 42.
- Str. 99 – pozycja [20]: jakie czasopismo naukowe?
- Str. 102 – pozycja [47]: proszę wstawić numery stron 6872-6881
- Str. 107 – proszę uzupełnić dane w pozycji [109]

Powyższe uwagi w żaden sposób nie pomniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej Pana mgr Pintschera. Praca stanowi doskonale opracowanie pod względem naukowym i jest świetnym źródłem informacji na temat równowagi oksydoredukcyjnej w obrębie łańcucha niskopotencjałowego oraz środowiska elektronowego centrum Q_b w cyt bc_1 . Biorąc pod uwagę wybitny aspekt mechanistyczny przedstawionej pracy i doskonale zaprezentowany w pracy nowatorski model transbłonowego transferu elektronów w cyklu katalitycznym cyt bc_1 uważam, że mgr Pintscher wykazał wyjątkową dojrzałość pod względem naukowym przy planowaniu, wykonywaniu, analizie, interpretowaniu i dyskusji wyników swoich zaawansowanych z mechanistycznego punktu widzenia badań.

Stwierdzam zatem, że prezentowana przez mgr Pintschera rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pana mgr Pintschera do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wybitny aspekt mechanistyczny przedstawionej pracy i nowatorski charakter przedstawionych badań wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie tej wybitnej rozprawy stosowną nagrodą.



dr hab. Joanna Kargul, prof. UW