

Prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Ul. F. Joliot Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 12.05.2014

Ocena

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Cieluch pt. „**Mechanizm zmian dynamicznej dystrybucji elektronów w łańcuchach kofaktorów cytochromu bc_1 badany przy użyciu impulsowej spektrofotometrii dwuwiązkowej**” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Artura Osyczki w Zakładzie Biofizyki Molekularnej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Cieluch, poświęcona mechanizmowi dystrybucji elektronów w łańcuchach kofaktorów cytochromu bc_1 , wpisuje się w nurt badań prowadzonych od wielu lat z dużym sukcesem przez promotora prof. dr hab. Artura Osyczkę. Kompleks cytochromu bc_1 należy do najstarszych i najbardziej konserwatywnych białek, stanowi centralny element w większości łańcuchów transportujących elektrony. Jego funkcją jest katalityczna reakcje przenoszenia elektronów z błonowej puli ubichinonów do hydrofilnej puli cytochromów c . Ze względu na jego znaczenie i powszechne występowanie, kompleks ten jest intensywnie badany od wielu lat. Poznano mechanizm działania enzymu i określono jego strukturę krystalograficzna. Mimo tego wciąż pozostaje bez odpowiedzi wiele ważnych pytań związanych z poszczególnymi etapami funkcjonowania kompleksu. Jednym z nich jest sposób sprzężenia łańcucha c z łańcuchem b w reakcjach transportu elektronów i protonów w cytochromie bc_1 . Podjęcie tego tematu przez doktorantkę z poznawczego punktu widzenia należy uznać za uzasadnione. Jest to temat oryginalny, nowatorski, wymagający solidnej znajomości literatury oraz opanowania szerokiego spektrum zaawansowanych metod badawczych. W opinii recenzenta temat rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Cieluch jest naukowo aktualny i spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Recenzowana rozprawa posiada tradycyjną strukturę. Liczy 170 stron maszynopisu i zawiera 56 rysunków i 43 tabele. Rozpoczyna ją „Wstęp” liczący dwadzieścia cztery strony. Doktorantka omawia kolejno takie zagadnienia jak przekształcanie energii w komórkach, budowę i własności cytochromów, następnie budowę i funkcję kompleksu bc_1 z szczególnym uwzględnieniem kompleksu z *Rhodobacter capsulatus*. W ostatnim akapicie omawia impulsową spektrometrię dwuwiązkową. „Wstęp” napisany jest w sposób jasny i zrozumiały i stanowi dobre wprowadzenie do badań opisanych w rozprawie. Świadczy także o bardzo dobrej orientacji doktorantki w literaturze przedmiotu, dobrze wprowadza w badane zagadnienia i uzasadnia celowość podjętych badań. Jednakże doktorantka nie uniknęła pewnych błędów. Opisując widmo widzialne cytochromów nie wspomniała o pasmie γ . Na stronie 9 pisze, że syntaza ATP wypompowuje protony do przestrzeni międzybłonowej mitochondrium, dzięki hydrolizie ATP. Związku z tym mam pytanie do doktorantki:

1. Mitochondrialna syntaza ATP ma dodatkową podjednostkę, zwaną białkiem inhibitorowym, jak jest jego rola ?
2. W jakich warunkach mitochondrialna syntaza ATP może pompować protony do przestrzeni międzybłonowej kosztem hydrolizy ATP ?

Kolejne części rozpraw to rozdział „Cel pracy” – precyzujący postawione zadania badawcze, oraz „Materiały” zawierający wykaz stosowanych plazmidów, szczepów bakteryjnych, podłoży stosowanych do hodowli, buforów, enzymów, mediatorów, odczynników i aparatury.

Rozdział „Metody” przedstawiony na dalszych 21 stronach zawiera bardzo szczegółowy opis stosowanych procedur, umożliwiający wierne powtórzenie eksperymentów i świadczy o doskonałej znajomości stosowanych metod. Doktorantka wykazała się bardzo szerokim i wszechstronnym warsztatem badawczym od metod hodowli mikroorganizmów po skomplikowane metody biologii molekularnej, metody izolacji kompleksów bc_1 i chromatoforów, metody elektroforetyczne i spektrofotometryczne w tym impulsową spektrofotometrię dwuwiązkową oraz opisuje metody pomiaru aktywności enzymatycznej i miareczkowania potencjometrycznego. Jedyna moja uwaga do tej części pracy to jeśli warunki wirowania określa się w rpm, to należy dodatkowo podać typ wirówki i rodzaj użytego rotora, a najlepiej podawać je w wartości „g”.

Rozdział wyniki obejmuje aż 62 strony maszynopisu, stanowi najbardziej obszerną część pracy doktorskiej, został podzielony na części odpowiadające poszczególnym etapom pracy. Ułatwia to zrozumienie wielowątkowej rozprawy doktorskiej oraz zapewnia przejrzysty układ prezentowanych wyników.

W tym miejscu chciałbym podkreślić starannie opracowaną stronę graficzną pracy doktorskiej, bardzo dobrze zaprojektowane i opracowane rysunki ułatwiają zrozumienie czytelnikowi zasad prowadzonych eksperymentów jak i prawidłowości wyciąganych wniosków.

Kolejny rozdział to licząca 21 stron „Dyskusja”, zawierająca wnioski wypływające z przeprowadzonych badań. Została ona podzielona na części odpowiadające odpowiednim etapom pracy i podsumowuje osiągnięcia doktorantki na tle prowadzonych na świecie badań. Pomimo tego, że jest obszerna, czyta się ją z dużą przyjemnością i w mojej ocenie jest najlepszym, bezbłędnym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Każda część dyskusji poprzedzona jest wprowadzeniem literaturowym pt. „Tło literaturowe” ułatwiającym zrozumienie danej części dyskusji wyników.

Pracę kończy spis literatury liczący ponad sto siedemdziesiąt pozycji w znacznej części z ostatniej dekady. Świadczy o dużej wiedzy jaka musiał posiadać doktorant przy zaznajamianiu się z literaturą.

Wśród wyników przedstawionych w rozprawie, zdaniem recenzenta na podkreślenie zasługuje:

1. Uzyskanie mutacji modyfikujących własności hemu c_1 należącego do łańcucha kofaktorów c. Mutacja A181T obniża potencjał hemu c_1 , ale w takim zakresie, że białko jest funkcjonalne.
2. Uzyskanie mutacji modyfikujących własności hemów b należących do łańcucha kofaktorów b i wykazanie że, :
 - a. możliwa jest zamiana ligandu żelaza hemowego hemów B kompleksu bc_1 z histydyny na metioninę lub lizynę.
 - b. większą tolerancję na zmianę ligandów wykazuje hem b_H .
 - c. w przypadku hem b_L ekspresji ulegają jedynie muteiny ligandu w pozycji 198.
 - d. mutacja w pozycji 97 (H97M) powoduje zahamowanie biosyntezy kompleksu bc_1 .
 - e. zmiana reszty histydynowej na metioninową lub lizynową powoduje podniesienie potencjału hemu b_H .
 - f. w przypadku hemu b_L następuje podniesienie potencjału dla mutacji H198K oraz brak zmiany dla mutacji H198M.

Wyniki prezentowane w tej pracy wykazały, że wszystkie reakcje przepływu elektronów są kinetycznie sprzężone i pozwoliły na postawienie tezy, że model kinetyczny a nie model oddziaływań allosterycznych lepiej opisuje działanie kompleksu cytochromu bc_1 .

Podsumowując, wyniki pracy doktorskiej są bardzo wartościowe, nowatorskie, zastosowano w nich szerokie spektrum nowoczesnych technik doświadczalnych, wyniki są zinterpretowane w oparciu o gruntowną znajomość tematu i wnoszą istotny wkład w poznanie mechanizmu działania kompleksu cytochromu bc_1 . Moją wysoką ocenę pracy doktorskiej potwierdza fakt opublikowania części wyników w prestiżowym czasopiśmie *Biochemica et Biophysica Acta Biornergetics*, chociaż jest to niewielka część wyników ocenianej pracy doktorskiej. Zasadnicza część pracy ciągle nie jest opublikowana.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Cieluch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Szczepaniak