



UNIwersytet Jagielloński
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Cieluch

pt. 'Mechanizm zmian dynamicznej dystrybucji elektronów w łańcuchach kofaktorów cytochromu bc_1 badany przy użyciu impulsowej spektrofotometrii dwuwiązkowej'

Oddychanie komórkowe jest jednym z podstawowych procesów metabolicznych przebiegających w organizmach żywych, prowadzącym do wytworzenia nośnika energii w postaci ATP. Kluczowym etapem oddychania tlenowego jest utlenianie mitochondrialne, którego najintensywniej badanym elementem w ostatnich latach jest łańcuch transportu elektronów. Badania nad jego komponentami prowadzone są w dwóch kierunkach: badań strukturalnych, w oparciu o wykrystalizowane kompleksy, oraz badania funkcjonalne przy wykorzystaniu różnych technik spektroskopowych, często w połączeniu z modyfikacjami sekwencji aminokwasowej białek. Jednym z najciekawszych kompleksów tego typu jest kompleks cyt. bc_1 (kompleks III). Jego struktura krystalograficzna jest dobrze poznana, natomiast jest wiele nierozstrzygniętych aspektów odnośnie mechanizmu transferu elektronów w obrębie tego kompleksu oraz czynników regulujących rozdział transferu elektronów na gałąź nisko- i wysokopotencjałową. Badania tego typu należą do zagadnień o podstawnym znaczeniu biologicznym i wybór tematu pracy doktorskiej związanego z tymi zagadnieniami jest w pełni uzasadniony.

Recenzowana praca liczy 170 stron, posiada klasyczny układ ze wstępem (24 str.), celami pracy, rozdziałem dotyczącym materiałów i metod (30 str.), wynikami (62 str.), dyskusją z podsumowaniem (30 str.) oraz spisem publikacji obejmującym 173 pozycje. Proporcja rozdziałów jest należycie zachowana, choć niektóre z nich mogłyby być nieco skrócone bez szkody dla pracy.

Wstęp jest przystępnie napisany, odpowiednio ilustrowany i wprowadza czytelnika w temat pracy doktorskiej. Omówione zostały m.in. łańcuchy transportu elektronów w różnych organizmach, struktura cytochromów z uwzględnieniem koordynacji hemów i czynników

wpływających na ich potencjały redoks, cykl Q oraz techniki spektroskopowe stosowane w pracy.

Niemniej jednak, w części tej znalazło się szereg niefortunnych i niewłaściwych sformułowań:

- str. 11, 'fotoliza wody', błąd podstawowy → utlenianie albo rozkład,
- j.w., 'niewielki wycinek wszystkich kombinacji białek',
- str. 15, 'widma widzialne', 'prążek absorpcyjny', 'spektra', 'temperatura helowa',
- str. 19, 'peryferalnie', raczej 'peryferyjnie'
- str. 20, 'widma spektrofotometryczne', → absorpcyjne
- j.w. 'prążek hemu ma szczyt przy λ ' → wykazuje maksimum (absorpcji),
- str. 30, 'dzika forma cytochromu'

Ponadto (str. 24) stwierdzenie, że 'semiubichinon wykazuje dużą stabilność' jest mylące bowiem jest to forma w stanie wolnym niestabilna, natomiast może być stabilizowana w połączeniu z białkiem. Nie jestem także przekonany co do słuszności określania stosowanej metody spektrofotometrycznej jako dwuwiązkowej. Obecnie, pewnie każdy spektrofotometr jest dwuwiązkowy, gdzie wiązka światła o wybranej λ jest rozszczepiana na 2 wiązki, z których jedna przechodzi przez próbkę a druga przez referencję. W opisywanej pracy chodzi raczej o system dwufalowy, stosowany komercyjnie do niedawna przez firmy Aminco i Shimadzu. W tej technice oświetlamy próbkę równocześnie dwoma wybranymi λ i rejestrujemy absorbancję różnicowo w czasie. Takie sposób pozwala zminimalizować niespecyficzne wpływy na absorbancję, związane z rozpraszaniem, niejednorodnością próbki, itp.

Głównym **celem pracy** było skonstruowanie, metodą ukierunkowanej mutagenezy, odpowiednich form cytochromu bc_1 fotosyntetyzującej bakterii niesiarkowej *Rhodobacter capsulatus* z podstawieniem aminokwasu (A181T) w obrębie hemu cytochromu c_1 oraz uzyskanie mutein cytochromu b , w których jedną z koordynujących histydyn hemu b_H i b_L zastąpiono metioniną oraz w kolejnych doświadczeniach lizyną, a następnie zbadanie wszechstronnymi metodami jakie konsekwencje dla funkcjonowania kompleksu bc_1 i przeżywalności bakterii mają wprowadzone mutacje.

W przypadku opisu celów pracy, wstęp na str. 32 można było spokojnie pominąć lub przenieść w inne miejsce pracy. Ponadto, str. 33, p. 1. czy nie 'podwyższa potencjał hemu'?

Sekcja '**Materialy i metody**' jest napisana z reguły przejrzysto, zawiera dokładnie opisane procedury metodyczne stosowane w pracy, pozwalające odtworzyć przeprowadzone doświadczenia. Godna podkreślenia jest różnorodność stosowanych technik na czele z

zaawansowanymi narzędziami genetyki molekularnej do stworzenia odpowiednio zmodyfikowanych form cytochromu oraz szeregu metod biochemicznych i biofizycznych, takich jak izolacja kompleksów cyt. bc_1 przy wykorzystaniu chromatografii jonowymiennej oraz powinowactwa, elektroforeza SDS-PAGE, kinetyczna spektroskopia absorpcyjna, pomiary potencjałów redoks cytochromów, spektroskopia EPR, pomiary aktywności enzymatycznej, itp. Czyni to pracę doktorską bardzo wszechstronną.

Uwagi do tego rozdziału:

- str. 38, 'bufor do oznaczania stęż. białka metodą Lowre'go', to raczej roztwór a nie bufor,
- str. 41, 'kwas boranowy', → borowy, $C_2H_3NaO_2 \cdot 3 H_2O$ – co to za związek?
- str. 42, kolumny do chromatografii, jaki typ złożeń?
- str. 45, 'długość starterów dobrano tak aby nie przekraczała zalecanej?', jaka jest zalecana?
- str. 51, 'mierząc absorpcję kwasów nukleinowych zawieszonych', → absorbancję, rozpuszczonych,
- str. 53, 'pelet' → osad, 'gilzy' → próbówki wirówkowe, przy parametrach wirowania powinno się podawać g a nie obroty,
- j.w., 'począwszy od 1 mg/ml a skończywszy na 0 mg/ml' → w zakresie 0-1 mg/ml,
- str. 54, kolumnę 'płukano' → przemywano,
- j.w., chromatografię prowadzono prawdopodobnie w obecności detergentu, brak na ten temat informacji,
- str. 57, 'dokonywano obserwacji absorbancji' → pomiaru,
- str. 61, c – 'stęż. zredukowanego cyt...', → zmiana stęż. albo szybkość redukcji,
j.w., c_x – jak mierzono całkowite stęż. białek w błonach?
j.w., v – 'aktywność enzymatyczna' → szybkość reakcji enz.,
j.w., v_{max} – 'maks. akt. enzymatyczna', → maks. szybkość reakcji enz.,
str. 62, jak 'aktywacja próbek może być kontrolowana przez program'?

Doktorantka w rozdział prezentujący **wyniki** analizuje kolejno szczepy bakterii z odpowiednimi muteinami oraz charakteryzuje uzyskane z nich chromatofory i wyizolowane kompleksy według następującego schematu: analiza wzrostu mutantów w warunkach fotosyntetycznych, elektroforeza oczyszczonych form cytochromu bc_1 , badania spektralne kofaktorów, pomiary ich potencjału redoks, pomiary kinetyki transferu elektronów w nieobecności inhibitorów oraz z ich dodatkiem oraz pomiary EPR. Zastosowanie takiego wszechstronnego podejścia metodycznego pozwoliło na szeroką charakterystykę uzyskanych mutein.

W przypadku muteiny cyt. c_1 w obrębie hemu, gdzie alaninę zastąpiono rozgałęzionym aminokwasem treoniną, potencjał redoks hemu C uległ obniżeniu o ok. 100 mV co skutkowało spowolnioną re-redukcją cyt. c. W tym przypadku, również redukcja hemu b_H w obecności antymycyny była obniżona.

Spośród 4 mutantów gdzie zamieniono koordynującą hem b histydynę na Met, do wzrostu fotosyntetycznego były zdolne tylko te w obrębie hemu b_H . W widmach absorpcji, mutanty te miały obniżoną intensywność pasma przy 560 nm w porównaniu z typem dzikim. Analizowane muteiny zarówno hemu B_H (H212M) jak też hemu b_L (H198M), co ciekawe, miały niezmienny potencjał redoks hemu b_L natomiast nieco podwyższony potencjał hemu b_H . Natomiast aktywność enzymatyczna mutein hemu b_H była obniżona do ok. 30% WT a muteiny H198M tylko do 15%.

Analogiczne mutanty hemów B gdzie metioninę zastąpiono lizyną, charakteryzowały się bardziej zbliżonymi parametrami wzrostu fotosyntetycznego i spektralnymi kompleksu do typu dzikiego. Zmiana His na Lys skutkowała podniesieniem potencjału redoks hemu b_H zarówno gdy ta zmiana dotyczyła hemu b_H jak też b_L , natomiast aktywności enzymatyczne wynosiły odpowiednio 60 i 26% wartości dla WT.

Do rozdziału poświęconego wynikom mam następujące uwagi:

- wyników dotycząca konstrukcji szczepów (plazmidy, startery, enzymy restrykcyjne, itp.) mogłaby się znaleźć w dodatku na końcu pracy. Skróciłoby to rozdział wyników i ułatwiło czytanie tej części,
- str. 102, 'przesunięcie pasm karotenoidów', nie mierzono widm absorpcji ani przesunięcia pasm tylko zmiany absorbancji w czasie (efekt elektrochromowy), więc skąd taki tytuł?

W rozdziale poświęconym **dyskusji** autorka dogłębnie i krytycznie interpretuje uzyskane wyniki w konfrontacji z danymi literaturowymi i wyciąga odpowiednie wnioski bez zbędnych spekulacji, choć niektóre fragmenty są nieco zbyt rozbudowane. Jest wiele powtórzeń tekstu ze wstępu i rozdziału dotyczącego wyników. Niemniej jednak rozdział ten czyta się z przyjemnością i uzyskuje się w nim szereg odpowiedzi na pytania, które mogą pojawić się po zaznajomieniu się z częścią pracy dotyczącą wyników. Najbardziej wartościowym efektem pracy jest niewątpliwie uzyskanie funkcjonalnych mutein cytochromu bc_1 , gdzie po raz pierwszy udało się uzyskać podstawienie histydyn koordynujących hem b przez metioninę oraz lizynę, zarówno w przypadku formy wysoko- jak też niskopotencjałowej cytochromu b . Porównując efekt podstawienia ligandu dla obu hemów, okazało się, że hem b_H jest mniej wrażliwy na zmianę ligandu. Analiza uzyskanych wyników pozwala stwierdzić, że zmiana szybkości transferu

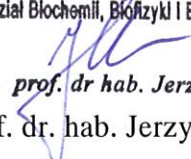
elektronów w jednym z łańcuchów wpływa na dystrybucję elektronów w drugim łańcuchu, co z kolei wskazuje, iż one łańcuchy kofaktorów (wysoko- i niskopotencjałowy) sprzężone są termodynamicznie a nie allosterycznie.

Podsumowując, wyniki pracy doktorskiej są bardzo nowatorskie i wartościowe, zastosowano w niej z sukcesem wyrafinowane i bardzo pracochłonne metody genetyki molekularnej, ponadto szereg technik biochemicznych jak też spektroskopowych. Wyniki są zinterpretowane w oparciu o gruntowną znajomość tematu i wnoszą istotny wkład w poznanie mechanizmu funkcjonowania i regulacji aktywności kompleksu cyt. *bc₁*. Szereg uwag krytycznych ma charakter dyskusyjny i nie umniejsza wartości merytorycznej pracy.

Stwierdzam więc, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie pani mgr Eweliny Cieluch do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na nowatorski charakter badań oraz duże znaczenie uzyskanych wyników dla poznania podstawowych procesów biologicznych wnioskuję o **wyróżnienie** niniejszej pracy doktorskiej.

Kraków, dn. 01.04.2014

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ


prof. dr hab. Jerzy Kruk
Prof. dr. hab. Jerzy Kruk