



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ
PROF. DR HAB. WOJCIECH FRONCISZ

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Arkadiusza Borka

„Mechanizm produkcji anionorodnika ponadtlennego przez cytochrom *bc₁* badany poprzez modyfikację poszczególnych etapów przepływu elektronów w łańcuchach kofaktorów”

Drogą do zrozumienia mechanizmów procesów zachodzących w układach biologicznych na poziomie molekularnym, w których jednocześnie uczestniczy wiele czynników jest tworzenie teoretycznych modeli będących najczęściej układem odpowiednich równań różniczkowych. Prawdliwość skonstruowanego modelu wymaga potwierdzenia eksperymentalnego. Jeśli zatem eksperymentalne czasowe zależności np. stężenia produktów czy aktywności uczestniczącego w procesie enzymu są zgodne z rozwiązaniami układu równań różniczkowych to można przypuszczać, że stworzony teoretyczny model ma cechy poprawności, czyli dobrze odzwierciedla rzeczywistość. Dalsza weryfikacja poprawności stworzonego modelu następuje w wyniku przeprowadzenia nowych eksperymentów celem zbadania zgodności otrzymanych wyników z teoretycznym modelem.

Taką drogę wybrał mgr Arkadiusz Borek w swojej rozprawie doktorskiej. Zrozumienie mechanizmu produkcji anionorodnika ponadtlennego, który jest produktem ubocznym i w swej naturze szkodliwym w badanym układzie, wymagało tworzenie alternatywnych pełnych teoretycznych modeli funkcjonowania monomeru cytochromu *bc₁* i ich eksperymentalnej weryfikacji. Model, który zachowywał się zgodnie z danymi eksperymentalnymi został zaakceptowany, jako poprawny. W tym kontekście tytuł rozprawy sugeruje przeprowadzenie mniejszego zakresu badań niż faktycznie dokonał doktorant. Stworzył on pełny model funkcjonowania kompleksu *bc₁* nieograniczony tylko do produkcji tego rodnika.

Przedstawiona mi do recenzji praca jest bardzo obszerna. Wraz z załącznikami liczy 200 stron. Doktorant cytuje w niej 114 artykułów naukowych. Część wyników opisanych w rozprawie została już opublikowana w dwóch artykułach, które ukazały się

w recenzowanych czasopismach naukowych, *Biochemistry* i *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. Ułatwia to znacznie pracę recenzenta, ponieważ publikacja tych artykułów w tak renomowanych czasopismach świadczy, iż duża część materiału zawarta w tej rozprawie doktorskiej została już pozytywnie oceniona przez grono powoływanych przez redakcje recenzentów, będących ekspertami w dziedzinie funkcjonowania kompleksu bc_1 .

Sam tekst rozprawy obejmujący 114 stron ma klasyczny układ: krótkie streszczenie i wprowadzenie, obszerny, bo liczący 49 stron wstęp teoretyczny, bardzo przejrzyste sformułowane na dwóch stronach cele, 6 stronicowy opis użytych materiałów i aparatury, 8 stronicowy opis zastosowanych do badań metod, 48 stronicowy szczegółowy opis uzyskanych wyników, przeprowadzoną na 8 stronach dyskusję i opis wyciągniętych z badań wniosków i wreszcie dwu stronicowe podsumowanie. Do rozprawy jest dołączonych 10 załączników, z których 9 poświęconych jest szczegółowemu opisowi wszystkich rozważanych modeli funkcjonowania kompleksu bc_1 łącznie z użytymi równaniami różniczkowymi. Cytowana w rozprawie literatura naukowa liczy 114 pozycji.

Głównym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było „opisanie reakcji katalitycznych i ubocznych dla układu cytochrom bc_1 – cytochrom c – chinon z uwzględnieniem oddziaływań enzym – substrat, białko – białko”. Opis ten polegał na konstrukcji modeli matematycznych weryfikowanych eksperymentalnie poprzez analizę aktywności enzymatycznych formy natywnej i szeregu form zmutowanych kompleksu bc_1 .

W ramach głównego celu doktorant realizował cztery cele szczegółowe, zmierzające do opracowania:

- A. kinetycznego opisu mechanizmu działania cytochromu bc_1 ,
- B. kinetycznego opisu mechanizmu inhibicji cytochromu bc_1 podczas inkubacji z chinolem
- C. opisu mechanizmu produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez cytochromu bc_1 ,
- D. opisu mutacji mitochondrialnych w obrębie cytochromu b

Analizując przedstawione wyniki zarówno teoretyczne (tworzenie modeli matematycznych) jak i eksperymentalne można stwierdzić, że doktorant w nadmiarze

zrealizował postawione sobie zadania badawcze. Z punktu widzenia recenzenta najbardziej interesujące są wyniki dotyczące ruchu białka żelazowo-siarkowego – ISP. Był to kluczowy element do stworzenia pełnego modelu opisującego działanie monomeru badanego białka.

W czasie prac nad pełnym modelem doktorant stworzył szereg alternatywnych uproszczonych modeli funkcjonowania tego białka. Były to:

- A. Model nieuwzględniający etap tworzenia się kompleksu ISP_c – cytochrom c_1
- B. Model uwzględniający powstawanie kompleksu ISP_c – cytochrom c_1
- C. Model powstawania rodników w miejscu Q_o , w którym formą pośrednią jest powstający w tym centrum semichinon w wyniku sekwencyjnego przekazu elektronu (57 równań różniczkowych)
- D. Model powstawania rodników w miejscu Q_o , w którym następuje jednoczesny przekaz elektronu na białko ISP i hem b_L (57 równań różniczkowych).

Przeprowadzone przez doktoranta badania eksperymentalne doprowadziły do wniosku, że najbardziej oddającym rzeczywistość modelem jest model zakładający jednoczesność przekazu elektronu na łańcuchy wysoko potencjałowe i nisko potencjałowe podczas utleniania chinolu w centrum Q_o . Jest to duże osiągnięcie doktoranta pozwalające na zrozumienie mechanizmów funkcjonowania tego białka. Pozwoliło to na zrealizowanie zadania badawczego- cel C- zasugerowanego tytułem rozprawy doktorskiej, a więc zaproponowanie mechanizmu produkcji anionorodnika ponadtlennkowego przez cytochrom bc_1 . Bez stworzenia ogólnego modelu matematycznego funkcjonowania kompleksu bc_1 nie byłoby możliwe osiągnięcie celu C. W oparciu o przeprowadzone badania doktorant doszedł do wniosku, że najbardziej prawdopodobnym mechanizmem powstawania anionorodników ponadtlennkowych jest częściowa redukcja chinonu w miejscu Q_o i w następstwie reakcja tlenu z powstałym semichinonem. Główną reakcją neutralizującą semichinon jest przekaz elektronu z semichinonu na utlenione białko ISP. Jest to bardzo znaczące osiągnięcie doktoranta.

Bardzo interesującą częścią pracy jest zaproponowanie molekularnych efektów wybranych mutacji mitochondrialnych w kontekście opracowanego modelu funkcjonowania cytochromu bc_1 . W szczególności na podstawie opracowanego modelu została wyjaśniona przyczyna spadku wydajności działania ludzkiego cytochromu bc_1

z mutacją chorobotwórczą S151P. Mutacja ta powoduje odsunięcie białka ISP w kierunku c_1 zmniejszając aktywność cytochromu bc_1 i powodując wzrost produkcji rodnika nadtlenkowego.

Przy czytaniu rozprawy, oprócz zauważania niewątpliwych osiągnięć, nasuwa się również wiele pytań, z których niektóre wymienione są poniżej.

W związku z tym, że wszystkie badania aktywności białka bc_1 oraz szybkości produkcji rodnika nadtlenkowego były przeprowadzone w buforze z dodatkiem detergentu nasuwa się ogólne pytanie na ile to środowisko odzwierciedla natywną sytuację, gdy kompleks bc_1 jest zanurzony w błonie fosfolipidowej. I tak np. białko ISP przechodząc ze stanu utlenionego do zredukowanego zmienia swój ładunek z neutralnego na ujemny. Położone jest ono w pobliżu ujemnie naładowanej powierzchni błony i można przypuszczać, że oddziaływania elektrostatyczne odgrywają dużą rolę w aktywności kompleksu bc_1 , co oczywiście nie następuje w użytych do badań roztworze tego kompleksu. Podobnie, szybkość wytworzenia anionorodnika nadtlenkowego zależy od częstotliwości zderzeń cząsteczek tlenu z umieszczonym w centrum Q_0 semichinonem, a więc od lokalnego stężenia tlenu i współczynnika jego dyfuzji oraz efektów sterycznych. Wiadomo, że rozpuszczalność tlenu w błonie fosfolipidowej jest większa niż w wodzie a poza tym dyfunduje on w strukturze dwuwymiarowej, jaką jest błona fosfolipidowa a nie w trzech wymiarach jak w użytych do badań roztworze tego białka. Jaki jest pogląd doktoranta na te problemy?

W opisanych badaniach cytochrom c był użyty zarówno do badania aktywności bc_1 jak i szybkości generacji anionorodnika nadtlenkowego. Aby odróżnić utlenianie cytochromu c spowodowane aktywnością bc_1 od bezpośredniej reakcji z anionorodnikiem nadtlenkowym została użyta dysmutaza nadtlenkowa. Czy nie można byłoby przeprowadzić doświadczenia w warunkach anaerobowych?

Kolejna ogólna uwaga dotyczy braku oceny dokładności przeprowadzonych pomiarów aktywności bc_1 czy też szybkości generacji anionorodnika nadtlenkowego. Na żadnym wykresie punktowym nie ma naniesionych słupków błędów pomiaru. Czy była szacowana dokładność pomiarów?

Na str. 21 są przedstawione dwa wzory, z których pierwszy określa liczbę protonów uwalnianych do przestrzeni międzybłonowej, a drugi liczbę protonów,

których ubyło w matriks w zależności od liczby zużytych cząsteczek NADH. Nasuwa się pytanie czy te wzory zostały wymyślone przez doktoranta, czy też znane są z literatury naukowej? Są to przybliżone wzory, w których liczba cząsteczek NADH (n) może przybierać jedynie wartości będące liczbą dwa podniesioną do potęgi z liczby naturalnej, a więc $2^0, 2^1, 2^2, \dots$ czyli $n= 1, 2, 4, 8, \dots$. Jest to rzeczywiście przybliżenie, bo dla jednej cząsteczki NADH (2^0) daje nie całkowitą liczbę protonów, 11,5 z pierwszego wzoru i 12,5 z drugiego. Kolejne dozwolone w tych wzorach liczby cząstek NADH dają już całkowitą liczbę protonów. Różnica między liczbą protonów, których ubyło w matriks a liczbą protonów uwalnianych do przestrzeni międzybłonowej jest zawsze równa liczbie zaangażowanych cząsteczek NADH, n . Pozwala to na prostsze otrzymanie liczby protonów z drugiego wzoru dodając do wyniku otrzymanego z pierwszego wzoru liczbę n . Czy doktorant może uzasadnić taką uproszczoną zależność?

Aktywność wyznaczano przez dopasowanie do początkowych punktów przebiegu aktywności zależność liniową. Jakie było kryterium doboru tych początkowych punktów?

Trudno uniknąć przy tak obszernym tekście różnych drobnych niedociągnięć czy pomyłek. Niektóre z nich, z racji obowiązków recenzenckich, pozwalam sobie przykładowo wymienić poniżej:

czy poprawną jest definicja inhibicji, jako opóźnienie reakcji chemicznej na str. 41 a nie np., jako obniżenie aktywności enzymatycznej?,

na str. 79 przy opisie czasowych parametrów spektrometru EPR brakuje jednostek czasu,

niejasne jest stwierdzenie na str. 138, że: „Jak wynika z paragrafu 7.3 inkubacja (?) powoduje zwiększoną produkcję rodników...”. Czy chodzi o inkubację z DBH_2 ?,

z treści str. 183 wynika, że rozszerzeniem załącznika 9 jest ten sam załącznik,

Są to oczywiście drobne niedociągnięcia o charakterze edytorskim nie mające wpływu na ocenę rozprawy.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku

o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę, zatem do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Arkadiusza Borka do dalszych etapów przewodu doktorskiego, wnosząc jednocześnie o wyróżnienie jego rozprawy.

Wojciech Tomasz

