

Lublin, 15 października 2014 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Arkadiusza Borka pt. „Mechanizm produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez cytochrom bc_1 badany poprzez modyfikację poszczególnych etapów przepływu elektronów w łańcuchu kofaktorów”

Problemy poznawcze w obszarze bioenergetyki należą zdecydowanie do najbardziej podstawowych, związanych bezpośrednio z funkcjonowaniem organizmów żywych. Pomimo faktu, iż koncepcja chemiosmotyczna, stanowiąca centralny paradygmat bioenergetyki, należy już do klasyki współczesnej nauki o życiu, wiele szczegółowych mechanizmów na poziomie molekularnym, związanych ze sprzężonym transportem elektronów i protonów, prowadzących do powstawania tzw. „siły protonomotorycznej” niezbędnej do produkcji ATP, pozostaje wciąż niewyjaśniona. Wśród problemów tych, znaczna grupa zagadnień związana jest bezpośrednio z funkcjonowaniem mitochondrialnego kompleksu cytochromów bc_1 . W pracy doktorskiej mgr. Arkadiusza Borka, wiele z kategorii nierozwiązanych problemów poznawczych pojawia się w formie konkretnych celów badawczych. Cele te są, moim zdaniem, śmiało a stawiane pytania interesujące oraz ważne. Początkowe wrażenie, a może nawet obawa, iż stawiane zadania wydać się mogą zbyt ambitne jak na jedną rozprawę doktorską, ustępują miejsca podziwowi i uznaniu, ogromnej liczby i wagi rezultatów badawczych oraz bardzo dojrzałej i niezwykle wieloaspektowej dyskusji.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



Praca wykonana została w Zakładzie Biofizyki Molekularnej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr. hab. Artura Osyczki, w grupie o uznanym w świecie dorobku w obszarze bioenergetyki molekularnej.

Praca doktorska mgr. Arkadiusza Borka jest opracowaniem wyjątkowo obszernym. Zredagowana została na 200. stronach maszynopisu! Literaturowa część wprowadzająca, prezentacja wyników oraz ich dyskusja opierają się na licznych tabelach, rysunkach, schematach oraz wykresach, usystematyzowanych (ponumerowanych) w sposób klarowny w odrębnych kategoriach. W pracy zacytowanych zostało 114 pozycji piśmiennictwa, wśród nich artykuły klasyczne, dotyczące zagadnień bioenergetyki, jak również prace najbardziej aktualne, związane z otwartymi problemami w obszarze bioenergetyki molekularnej i submolekularnej oraz te, dotyczące chorób mitochondrialnych, łącznie z wydanymi w ostatnich kilku latach. Praca zredagowana została według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Po streszczeniu (jako rozdział 1.) oraz krótkim wprowadzeniu (przedstawianym jako rozdział 2.) następuje obszerna prezentacja aktualnego stanu wiedzy w obszarze badawczym związanym bezpośrednio z prowadzonymi eksperymentami. W moim odczuciu, tego typu, wysoce wyspecjalizowane a jednocześnie bardzo dobrze usystematyzowane opisy spełniają w sposób doskonały swoją funkcję. Centralnym punktem rozprawy, zarówno w aspekcie dramaturgii jej lektury jak i oceny rangi uzyskanych wyników, jest zwykle rozdział zatytułowany „Cele” (w tym przypadku rozdział 4.). Dzieje się tak zwykle wobec faktu, iż rozdział ten, wbrew numeracji, redaguje się na końcu pisania rozprawy, gdy wiadomo już jakie wyniki prac eksperymentalnych uzyskano i na ile wykraczają one poza pierwotny zamysł, określony zwykle tytułem samej rozprawy. Jedną z zalet pracy naukowej jest to, iż jest to wędrówka w nieznaną a nagrodą, która często nas spotyka, jest uzyskiwanie wyników pierwotnie nieprzewidywanych. Analiza rozdziału „Cele”, w rozprawie doktorskiej mgr. Arkadiusza Borka, zwiastuje już, iż uzyskane wyniki nie ograniczają się wyłącznie do mechanizmów produkcji anionorodnika ponadtlenkowego ale wkraczają w bardziej obszerne problemy wszelkich reakcji katalitycznych związanych z funkcjonowaniem kompleksu cytochromów bc_1 . Rozdział 5. („Materiały”) oraz rozdział 6. („Metody”), zredagowane zostały w sposób wyjątkowo przejrzysty oraz precyzyjny. Moim zdaniem, zawarte w nich opisy umożliwiają w sposób pełny przeprowadzenie analogicznych eksperymentów. Najważniejszym rozdziałem rozprawy, stanowiącym o jej szczególnej wartości,



jest rozdział 7., „Wyniki”. Przeprowadzone w ramach przygotowywania rozprawy eksperymenty opierają się na wielu komplementarnych, nowoczesnych i zaawansowanych podejściach, między innymi na technikach genetyki molekularnej, enzymologii oraz spektroskopii molekularnej (absorpcyjnej spektroskopii elektronowej w obszarze widzialnym oraz spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego). Według koncepcji autora rozprawy, prezentacja wyników usystematyzowana została w oparciu o następujące obszary tematyczne: Kinetyczny opis mechanizmu działania cytochromu bc_1 , kinetyczny opis inhibicji cytochromu bc_1 , mechanizm produkcji anionorodnika ponadtlenkowego oraz mutacje mitochondrialne. Dyskusja i wnioski zawarte zostały w rozdziale 8. pt. „Dyskusja i wnioski”. Rozprawa doktorska mgr. Arkadiusza Borka zawiera, ponadto, 11 obszernych załączników, o wyjątkowym znaczeniu dla wartości całości pracy, zawierających, między innymi, modele kinetyczne aktywności poszczególnych podjednostek kompleksu cytochromów bc_1 oraz modele inhibicji. Od strony matematycznej modele sformułowane zostały jako układy szeregu równań różniczkowych o stosunkowo wysokim stopniu zaawansowania. Na zasadzie celnika z lotniska Okęcie, sprawdzającego wrywkowo wybrane bagaże, przeanalizowałem model działania białka ISP, prezentowany w Załączniku nr 1, i w mojej ocenie wszystkie sformułowane tam równania opierają się na prawidłowych założeniach zaś przedstawione przekształcenia są poprawne.

Rozprawa zredagowana została bardzo starannym i precyzyjnym językiem. Staranna jest również jej strona graficzna oraz redakcyjna. Mógłbym zaproponować Autorowi rozprawy nieliczne korekty. Ich krótka lista zamieszczona jest poniżej:

1. str. 16., 12. wiersz od dołu, zamiast „semichinonu” proponuję „semichinon”
2. str. 19., 16. oraz 19. wiersz od góry, zamiast „ubywa”, „przybywa” proponuję „ubywają” oraz „przybywają”
3. str. 24., 3. wiersz od góry, zamiast „rozpszęgasz” powinno być „rozprzęgacz”
4. str. 51., 4., 5., 12. wiersz od dołu, proponuję ujednocilić pisownię: „triplet” vs. „tryplet”
5. str. 55., 3., 4., 7. wiersz od dołu, proponuję ujednocilić skrót: „tys.” vs. „tyś.”
6. str. 65., 6. wiersz od góry, zamiast „Cele” raczej powinno być „Cel”
7. str. 75., 6., 7. wiersz od dołu, zamiast „ilość” proponuję rozważyć określenie „liczbę”
8. str. 76., 3. wiersz od dołu, zamiast „stącony” chodziło raczej o „strącony”



9. str. 102., 4. wiersz od dołu, zamiast „niekopetycyjna” powinno być „niekompetycyjna”
10. str. 139., 7., 6. wiersz od dołu, zamiast „Pierwsza” i „Druga” raczej powinno być „Pierwszy” i „Drugi”
11. str. 143., 7. wiersz od dołu, zamiast „z zredukowanego” proponuję „ze zredukowanego”
12. str. 144., 15. wiersz od dołu, zamiast „z schematem” proponuję „ze schematem”
13. str. 145., 9. wiersz od góry, zamiast „w wcześniejszych” proponuję „we wcześniejszych”.

W pełni podzielam zdanie Doktoranta co do wskazania najważniejszych wyników rozprawy, odzwierciedlone w ramach rozdziału 9. „Podsumowanie”. Osobiście, za szczególnie wartościowy aspekt ocenianej rozprawy doktorskiej uważam zaproponowanie modelu powstawania anionorodnika ponadtlenkowego w miejscu Q_o kompleksu cytochromów bc_1 , wraz z uwzględnieniem zmiany pozycji białka ISP. Ponadto, wyjątkowej wagi osiągnięciem naukowym, jest w moim odczuciu, zaproponowanie całościowego modelu funkcjonowania kompleksu bc_1 , obejmującego miejsca i rodzaje inhibicji oraz wpływy poszczególnych mutacji.

Tak zaawansowane i wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską mgr. Arkadiusza Borka pobudza ciekawość poznawczą, czego wyrazem mogą być problemy i przemyślenia sformułowane poniżej:

1. Model teoretyczny aktywności enzymatycznej cytochromu bc_1 w funkcji siły jonowej przewiduje lokalne maksimum w bardzo niskim obszarze stężenia soli (np. Wykres 7, str. 93; Wykres 23, str. 112 czy też Wykres 34, str. 121). Jakie mogłoby być mechanistyczne wytłumaczenie takiego efektu (w oparciu o oddziaływania molekularne)?
2. Zastanawiam się czy wyznakowanie znacznikiem fluorescencyjnym globularnego segmentu białka ISP umożliwiłoby analizę jego potencjalnej ruchliwości, na przykład w oparciu o technikę depolaryzacji fluorescencji, przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego? Ciekaw jestem jakie jest zdanie doktoranta na ten temat.



Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż mgr Arkadiusz Borek przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opartą na licznych oraz ważnych wynikach przeprowadzonych przez siebie badań naukowych. Badań, wymagających od eksperymentatora dużej wiedzy z zakresu biochemii i biologii molekularnej białek oraz spektroskopii i biofizyki molekularnej. Część z zawartych w pracy doktorskiej wyników stało się już podstawą oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach specjalistycznych, w tym w *Biochemistry* oraz w *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. W moim odczuciu, przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie ustawowe oraz zwyczajowe wymagania. Co więcej, zarówno bardzo wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań jak i poziom przedstawionych w ramach rozprawy dyskusji oraz analiz uzyskanych wyników świadczy o znacznej dojrzałości naukowej Autora i czyni rozprawę doktorską, w moim odczuciu, godną wyróżnienia. Uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie mojej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr. Arkadiusza Borka do dalszych etapów postępowania.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki

