

Lublin, 5 czerwca 2015 r.

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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Rafała Pietrasa pt. „Dystrybucja przestrzenna białek opisana przez intermolekularne oddziaływania magnetyczne w układzie cytochrom c_2 – cytochrom bc_1 ”

Nie pomniejszając wagi badań w obszarze biologii strukturalnej, stwierdzić należy, iż nie sama struktura biomolekuł ale dynamiczne oddziaływanie wielu komponentów, złożonych układów cząsteczkowych, stanowi istotę procesów metabolicznych. Wraz z rozwojem technik spektroskopowych pojawiły się możliwości dynamicznego monitorowania oddziaływania cząsteczek, ich wzajemnej odległości a nawet orientacji. Sztandarowym przykładem może być tu zastosowanie wydajności bezpromienistego transferu energii wzbudzenia elektronowego pomiędzy fluoryzującymi cząsteczkami do określenia ich odległości, w oparciu o formalizm Förstera. Podejście to, ze względu na towarzyszącą mu precyzję, nazywane bywa „linijką molekularną”. W swojej rozprawie doktorskiej, mgr Rafał Pietras zastosował inną, wysoce precyzyjną metodę określania odległości wyselekcjonowanych fragmentów oddziałujących cząsteczek białek, opierającą się na zależnym od odległości efekcie przyspieszenia relaksacji spinu elektronowego. Okazuje się, iż na relaksację spinu elektronu znacznika spinowego, umiejscowionego selektywnie na jednym z białek, istotny wpływ wywierało pole magnetyczne szybko-relaksującego spinu fragmentu hemowego innego białka. Efekt ten, przy zastosowaniu

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



zaawansowanej techniki impulsowej spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), dostarczył „potężnego” narzędzia badawczego, umożliwiającego badanie oddziaływania kompleksów białkowych, na poziomie precyzji odpowiadającym określeniu wzajemnej lokalizacji kompleksów. Narzędzie to wykorzystał Doktorant do badania oddziaływania dwóch elementów mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów: cytochromu c_2 oraz kompleksu cytochromowego bc_1 . Pomimo wieloletnich i intensywnych badań interakcji pomiędzy elementami łańcucha oddechowego, zagadnienia te nie są do dzisiaj w pełni poznane i w świetle tego, wyzwania badawcze podjęte w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, wydają się nie tylko bardzo interesujące ale również niezwykle ważne. Chciałbym też zaznaczyć, iż z mojej perspektywy, zastosowane podejścia badawcze są bardzo zaawansowane i wymagające, zarówno z punktu widzenia technik eksperymentalnych jak i formułowania pytań poznawczych i projektowania eksperymentów, w których pytania te mogły by być zaadresowane.

Eksperty i ich analizy, na których podstawie zredagowana została rozprawa doktorska, przeprowadzone zostały pod kierunkiem prof. Artura Osyczki, przy współudziale promotora pomocniczego dr. Marcina Sarewicza, w renomowanej i doskonale rozpoznawalnej w skali światowej grupie badań bioenergetycznych. Rozprawa zredagowana została w języku polskim, na 93 stronach maszynopisu. Klasyczny układ prezentowanych treści wydaje się nie tylko logiczny ale również sprzyjający interesującej lekturze rozprawy. Po części wstępnej, mającej charakter przeglądu literaturowego istotnych zagadnień związanych z własnościami oraz oddziaływaniem badanych cytochromów oraz przybliżającej szczegóły stosowanego podejścia opierającego się na oddziaływaniach magnetycznych w spektroskopii EPR, prezentowane są cele rozprawy (jako rozdział 2.) oraz materiały i metody, w ramach rozdziału 3. W moim odczuciu, opis procedur i parametrów technicznych jest na tyle szczegółowy, iż umożliwia powtórzenie analogicznych eksperymentów, oczywiście badaczom na stopniu oswojenia z technikami impulsowego EPR porównywalnym z zespołem z Krakowa. Najważniejszym fragmentem rozprawy, stanowiącym o jej wyjątkowej wartości, jest rozdział 4., w ramach którego prezentowane są wyniki badań. Jak już wspominałem, w moim odczuciu, zaprojektowane badania są nie tylko wysoce zaawansowane ale również bardzo eleganckie, z metodologicznego punktu widzenia. Lektura analizy wyników tych eksperymentów,



prezentowanej w ramach rozdziału 5. pt. „Dyskusja”, potwierdza złożoność badanych układów, powodującą, iż uzyskane wyniki, pomimo odpowiedzi na wiele problemów natury poznawczej, otwierają kolejne pytania. Przeprowadzona na łamach rozprawy dyskusja jest bardzo dojrzała i wieloaspektowa, potwierdzając kompetencje Doktoranta jako dojrzałego badacza. Pracę zamykają załączniki oraz wykaz cytowanego piśmiennictwa.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska mgr. Rafała Pietrasa jest również opracowaniem bardzo starannym, pod względem edytorskim. W wyniku szczegółowej lektury pracy, zaproponować mógłbym jedynie dwie drobne korekty:

1. Str. 10., 16. wiersz od dołu, w miejsce „ilość ligandów i sposób koordynacji” proponuję „ilości ligandów i sposobu koordynacji”
2. Str. 40., 3. wiersz od góry, w zamiast „miejsca” powinno raczej być „miejsc”.

Wśród głównych osiągnięć rozprawy znajduje się z pewnością precyzyjny i wielostronny opis oddziaływania cytochromu c_2 z cytochromem bc_1 . Bardzo ważnym elementem uzyskanego obrazu, jest moim zdaniem, wynik swoistego miareczkowania, wskazujący na fakt, iż w bezpośrednim sąsiedztwie kompleksu cytochromów bc_1 , w szczególności jego domeny odpowiedzialnej za oddziaływanie z cytochromem c_2 , znajduje się nie jedna cząsteczka tego ostatniego białka ale ich kilka. Zwykle w takich przypadkach, naturalnym wydaje się pytanie, czy efekt ten związany jest jedynie ze stosunkowo niską siłą jonową warunków eksperymentu czy ma może znaczenie fizjologiczne? Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktoranta na temat prawdopodobieństwa funkcjonowania hipotetycznego mechanizmu molekularnego, w ramach którego cząsteczki cytochromu c_2 tworzą mniej bądź bardziej specyficzne struktury supramolekularne, w miejscu wiązania na cytochromie bc_1 ? Struktury takie posiadając znaczną powierzchnię, zwiększały by przekrój czynny na oddziaływanie z kolejnymi cząsteczkami cytochromu c_2 a w konsekwencji, biorąc pod uwagę możliwość transferu elektronów w obrębie takiej struktury supramolekularnej, gwarantowałyby wydajność oraz płynność wymiany elektronów z kompleksem bc_1 . Nasuwa mi się tu, daleka może analogia z antenami fotosyntetycznymi i bezpromienistym transferem energii wzbudzenia elektronowego. Eksperymenty badające możliwości formowania tego typu struktur mogły by być przeprowadzone, na przykład, z zastosowaniem technik absorpcji w podczerwieni.



Formułując konkluzję, chciałbym stwierdzić, iż mgr Rafał Pietras przedstawił rozprawę doktorską opierającą się na zaawansowanych oraz doskonale zaprojektowanych badaniach naukowych. Część wyników z tych badań ukazała się już w dwóch oryginalnych artykułach, opublikowanych w renomowanych czasopismach specjalistycznych. W świetle uzyskanych wyników jak i poziomu merytorycznego rozprawy, doktorant jawi się jako dojrzały i bardzo wartościowy pracownik naukowy. W mojej ocenie wartość naukowa uzyskanych wyników jak i szczególna jakość rozprawy, czynią ją godną wyróżnienia.

Gratulując Doktorantowi oraz Promotorom tak cennych rezultatów, uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie mojej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie mgr. Rafała Pietrasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki