

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

Wrocław, 8.06.2015

Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pana mgr Rafała Pietrasa pt. „**Dystrybucja przestrzenna białek opisana przez intermolekularne oddziaływania magnetyczne w układzie cytochrom c_2 -cytochrom bc_1** ” wykonanej w Zakładzie Biofizyki Molekularnej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Artur Osyczka, promotorem pomocniczym dr Marcin Sarewicz

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. W nurt tych badań wpisują się prace zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Artura Osyczkę. Badał między innymi mechanizm dystrybucji elektronów w łańcuchach kofaktorów cytochromu bc_1 , transport elektronów między monomerami budującymi kompleks bc_1 oraz sposób sprzężenia łańcucha c z łańcuchem b w reakcjach transportu elektronów i protonów w cytochromie bc_1 . W przedstawionej do oceny pracy konsekwentnie rozwijane są badania transferu elektronów, tym razem badany jest kolejny etap przenoszenia elektronu, transfer pomiędzy cytochromem c i cytochromem bc_1 . Jest to temat oryginalny, nowatorski, wymagający solidnej znajomości literatury oraz opanowania szerokiego spektrum zaawansowanych i nowoczesnych metod badawczych. W opinii recenzenta temat rozprawy doktorskiej Pana mgr Rafała Pietrasa jest naukowo aktualny i spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Recenzowana rozprawa posiada standardową strukturę dla prac eksperymentalnych. Liczy 93 strony maszynopisu i rozpoczyna ją „Wstęp” liczący jedenaście strony. Doktorant

rozpoczyna od ogólnej charakterystyki cytochromów i następnie jedną stronę poświęca opisowi cytochromów c i c_2 i pół strony na opis własności spektroskopowych cytochromu c . Opis ten zdaniem recenzenta jest zbyt pobieżny. Dlatego nasuwają mi się następujące pytania. Czy hem absorbuje promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie UV? Jak zmienia się absorpcja pasma Soreta (pasma γ) po redukcji? Kiedy się pojawiają i gdzie są położone pasma δ i ϵ ? Następnie w bardzo skondensowany sposób opisuje cytochrom bc_1 . Kolejne podrozdziały to opis oddziaływań cytochromu c_2 z cytochromem bc_1 oraz oddziaływań magnetycznych w badaniach biologicznych w tym w spektroskopii EPR. Ten dział dobrze wprowadza w tematykę badań oraz stosowanej metody (PRE) wykorzystującej efekt przyspieszenia relaksacji spinu.

Kolejne części rozpraw to rozdział „Cel pracy” – precyzujący postawione zadania badawcze, jako zbadanie oddziaływań cytochromu c_2 z cytochromem bc_1 za pomocą pomiarów relaksacji paramagnetycznej z uwzględnieniem ilości miejsc wiążących cytochrom c na powierzchni cytochromu c_1 w dimerycznym kompleksie bc_1 oraz dynamikę asocjacji tych dwóch białek.

Rozdział „Materiały i Metody” przedstawiony na dalszych 9 stronach zawiera szczegółowy opis stosowanych procedur, umożliwiając wiernie powtórzenie eksperymentów i świadczy o doskonałej znajomości stosowanych metod. Doktorant wykazał się szerokim i wszechstronnym warszatem badawczym Są to metody hodowli bakterii (*Rhodobacter capsulatus* i *E. coli*), przygotowanie dwóch szczepów *Rh. capsulatus*, jednego ekspresjonującego cytochromu c_2 z dwiema mutacjami i drugiego z mutacjami w białku Rieskego i cytochromie c_1 . Izolacje cytochrom c_2 i cytochrom bc_1 z *Rh. capsulatus*, przyłączenie znacznika spinowego do cytochrom c_2 oraz pomiary EPR na spektrometrze.

Rozdział wyniki obejmuje 26 stron 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, wyróżniające się estetyką, ułatwiają zrozumienie czytelnikowi zasad prowadzonych eksperymentów jak i prawidłowości wyciąganych wniosków.

Kolejny rozdział to licząca 11 stron „Dyskusja”, zawierająca wnioski wypływające z przeprowadzonych badań

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

1. Wykazanie obecności „chmury” cząsteczek cytochromu c_2 w pobliżu domeny wiążącej cytochromu bc_1 , która zależy od siły jonowej i proporcji cytochromu bc_1 do cytochromu c_2 .
2. W warunkach fizjologicznych panująca wysoka siła jonowa, (> 150 mM NaCl) powoduje, że czas życia kompleksu pomiędzy cytochromu c_2 i cytochromu bc_1 staje się tak krótki, że jest nie do wykrycia za pomocą stosowanej metody.
3. Wykazano, że dominująca frakcja cząsteczek cytochromu c_2 zbliżając się do domeny wiążącej cytochromu bc_1 , przyjmuje orientację, w której hem c_2 jest skierowany do hemu c_1 .
4. Wykazał, że cząsteczki cytochromu c_2 stale zderzają się z cytochromem bc_1 , a efektywny transfer elektronu pomiędzy hemami c_2 i c_1 jest wynikiem kilku takich zdarzeń. Stąd wniosek, że międzycząsteczkowy transfer elektronów jest wynikiem wielu kolizji.

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

Cennym uzupełnieniem pracy jest rozdział 6, załącznik. Jest on uzupełnieniem wstępu jaki i metod, uzasadniają prawidłowość stosowanych metod i ich interpretacji.

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 transferu elektronów pomiędzy hemami c_2 i c_1 . Moją pozytywną ocenę pracy doktorskiej potwierdza fakt opublikowania znacznej części wyników w prestiżowym czasopiśmie *The Journal of Physical Chemistry B*.

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 Pana mgr Rafała Pietrasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak