ZAKŁAD BIOFIZYKI

Lublin, 20 września 2017 r.

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

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Michała Gabruka pt. „Regulacja aktywności i wiązanie substratów w zależnej od światła oksydoreduktazie protochlorofilidu"

Życie na naszej planecie zasilane jest energią światła słonecznego zaś fotosynteza jest praktycznie jedynym procesem umożliwiającym konwersję energii promieniowania elektromagnetycznego na formy energii wiązań chemicznych, które mogą być wykorzystane bezpośrednio w reakcjach biochemicznych. Wydaje się więc, iż fotosynteza jest jednym z centralnych procesów naszej biosfery zaś badania zmierzające do pełnego poznania jej mechanizmów, struktur oraz szlaków regulacji stanowi grupę zagadnień nie tylko interesujących ale również bardzo ważnych. Właśnie w tę szeroką grupę tematyczną wpisuje się rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Michała Gabruka, dotycząca bezpośrednio badania organizacji molekularnej oraz regulacji aktywności oksydoreduktazy protochlorofilidu, jednego z kluczowych enzymów szlaku biosyntezy chlorofilu. Obok swojej rangi związanej ze znaczeniem fizjologicznym, enzym badany przez Doktoranta wydaje się również bardzo interesujący, jako należący do niezbyt licznej klasy biokatalizatorów, których aktywność kontrolowana jest światłem.

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 doktorska mgr. Michała Gabruka przygotowana została w renomowanym ośrodku badań fotosyntetycznych, w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Roślin na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Profesora Jerzego Kruka. Rozprawa zredagowana została w formie tzw. „zszywki", czyli zestawienia anglojęzycznych oryginalnych artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach specjalistycznych, opatrzonych streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz 23.-stronicowym opisem w języku polskim. Opis rozprawy przedstawiony przez Doktoranta jest, moim zdaniem, opracowaniem bardzo dobrze zredagowanym, spełniającym doskonale funkcję wprowadzenia w tematykę badawczą oraz zarysowania celów poznawczych, będących jednocześnie sformułowaniem celów rozprawy doktorskiej. W tej części rozprawy mógłbym jedynie zaproponować trzy drobne korekty:

1. Str. 4., 7. wiersz od góry: zamiast „to inicjacji" raczej „do inicjacji",
2. Str. 15., 10. wiersz od góry: zamiast „odpowiadającym" proponuję „odpowiadających",
3. Str. 15., 5. wiersz od dołu: zamiast „wyników w akapicie..." lepiej brzmi „wyników wspomnianych w akapicie...".

Zasadniczą zawartość merytoryczną rozprawy stanowią trzy artykuły; jeden o charakterze twórczego przeglądu najnowszych opinii i koncepcji dotyczących aktywności światło-zależnej oksydoreduktazy protochlorofilidu (POR) oraz dwóch oryginalnych artykułów badawczych. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, zaś w pracach eksperymentalnych również autorem korespondującym. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej dotyczą zasadniczo trzech grup zagadnień. Są to:

1. Analiza formowania struktur oligomerycznych POR i związku tego procesu z aktywnością enzymatyczną,
2. Określenie roli lipidów chloroplastowych w organizacji molekularnej oraz aktywności enzymatycznej POR,
3. Identyfikacja reszt aminokwasowych POR odpowiedzialnych bezpośrednio za stabilizację form oligomerycznych oraz za aktywność enzymatyczną.

Prace eksperymentalne przeprowadzone były w oparciu o wiele zaawansowanych, komplementarnych podejść metodologicznych i technik badawczych. Przede wszystkim, opracowany został system otrzymywania oraz oczyszczania rekombinantowego enzymu z *Arabidopsis thaliana oraz* wiele precyzyjnie zaprojektowanych mutein tego białka. Wśród przeprowadzonych eksperymentów wyróżnić chciałbym zaawansowane badania transferu energii wzbudzenia elektronowego pomiędzy makrocząsteczkami enzymu znakowanego małymi białkami fluoryzującymi, umożliwiające precyzyjne wyznaczanie odległości białek w strukturach oligomerycznych. Ponadto, przywołać chciałbym również bardzo eleganckie, moim zdaniem, badania strukturalne kompleksów POR, prowadzone z zastosowaniem techniki spektrometrii masowej. Badania te są przykładem ewolucji techniki spektrometrii masowej, która od metody czysto analitycznej stała się alternatywną do badań dyfraktometrycznych oraz NMR metodą wychodzącą naprzeciw problemom strukturalnym makromolekuł.

W mojej opinii, wyniki badań naukowych zawartych w artykułach zestawionych w ramach rozprawy doktorskiej mgr. Michała Gabruka zdecydowanie charakteryzują się znacznym potencjałem oryginalności i nowości naukowej, wnosząc istotny postęp w pełnym zrozumieniu mechanizmów molekularnych związanych z aktywnością i regulacją zależnej od światła oksydoreduktazy protochlorofilidu. W gronie tych wyników zaakcentować chciałbym następujące:

1. Potwierdzenie tendencji do samoistnej organizacji enzymu w formy oligomeryczne, bez względu na oddziaływanie z substratami,
2. Odkrycie mechanizmu rearanżacji struktur oligomerycznych POR, pod wpływem wiązania cząsteczek chlorofilidu do miejsca aktywnego enzymu,
3. Określenie reszt aminokwasowych białka odpowiedzialnych za proces formowania struktur supramolekularnych,
4. Odkrycie mechanizmu regulacji aktywności POR na drodze oddziaływania z naładowanymi ujemnie lipidami chloroplastowymi (PG bądź SQDG), zwiększającymi powinowactwo enzymu do NADPH.

W ramach rozprawy podjęto również próbę interpretacji czynników wpływających na położenie na skali energii pasm emisji fluorescencji protochlorofilidu związanego z enzymem.

Bardzo przekonujące w tym względzie wydają mi się rozważania dotyczące formy spektralnej z maksimum pasma emisji fluorescencji przy 654 nm. Jednocześnie, moją ciekawość budzi pochodzenie długofoalowych form spektralnych, w obszarze ok. 670 nm oraz powyżej (np. widocznych na widmach prezentowanych w ramach pracy ogłoszonej w Biochemical Journal).

W konkluzji, chciałem stwierdzić, iż pan mgr Michał Gabruk przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opartą na licznych i ważnych, z naukowego punktu widzenia, wynikach przeprowadzonych przez siebie prac eksperymentalnych. W moim odczuciu, wyniki te stanowią istotny postęp w ramach aktywności zmierzającej do pełnego poznania mechanizmów molekularnych, na drodze których regulowana jest aktywność enzymatyczna światło-zależnej oksydoredultazy chlorofilidu. Rozprawa opiera się na trzech opublikowanych artykułach jednakże, jak wynika z analizy baz danych, swój warsztat naukowy Doktorant kształtował również w realizacji jeszcze wielu zbliżonych tematycznie projektów badawczych, zwieńczonych publikacjami naukowymi w czasopismach międzynarodowych. Jest to zapewne jednym z elementów sukcesu naukowego w postaci tej wartościowej rozprawy doktorskiej, która w moim odczuciu jest wyróżniająca.

Gratulując Doktorantowi oraz Promotorowi tak cennych wyników uprzejmie proszę Wysoką Radę wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie mojej pozytywnej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie pana mgr. Michała Gabruka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.