Prof. Stanisław Karpiński - ocena osiągnięcia naukowego dr Joanny Grzyb
w postępowaniu habilitacyjnym

Ocena osiągnięcia naukowego dr Joanny Grzyb pt.: „Sztuczne układy do badania transportu elektronów – projektowanie i charakteryzacja"

Dr Joanna Grzyb obecnie pracuje w Zakładzie Biofizyki, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław Uzyskała stopień Magistra Biologii dnia 11 czerwca 2002 r. na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorem pracy był prof. dr hab. Stanisław Więckowski. Stopień doktora uzyskała dnia 12 czerwca 2007 r. broniąc pracę pt.: „Wpływ kadmu na oksydoreduktazę ferredoksyna: NADP+ - molekularny mechanizm inhibicji" Promotorem pracy był prof. dr hab. Kazimierz Strzałka z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ w Krakowie. Od 01.09 2006 do 30.06.2007 była zatrudniona jako asystent w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, następnie od 01.10.2009 do 30.06.2017 r. była zatrudniona jako adiunkt w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej w Instytucie Fizyki Polskiej Akademii Nauk, Aleja Lotników 32/46, 02-668 Warszawa Od dnia 01.07.2017 r. jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Biofizyki, Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław.

Dr Joanna Grzyb posiada stosunkowo dobry dorobek naukowy. Obecnie wykazuje autorstwo i współautorstwo w 24 pracach, cytowanych 396 razy, współczynnik wpływu (Indeks Hirsh) = 10. Polska w naukach o życiu i naukach technicznych należy do 20 czołowych krajów na świecie (jest obecnie na 17 miejscu pod względem liczby wytworzonych cytowalnych dokumentów natomiast pod względem liczby cytowań tych dokumentów jest na 24 miejscu). Jednak, jeśli weźmiemy pod uwagę średnie cytowanie dokumentu, to Polska z wynikiem 9,58 cytowania na jeden wytworzony dokument zajmuje 160 miejsce w świecie, USA jest na 7 miejscu z wynikiem 24,71, Szwecja na 10 z wynikiem 23,59, a Izrael na 17 miejscu z wynikiem 21,70 (dane z SJR za lata 1996-2016). To wskazuje, że nauka Polska produkuje dużo słabo cytowanych (przyczynkowych) dokumentów naukowych. Pani dr. Joanna Grzyb ma średnią cytowań na jeden dokument = 16,5, co wskazuje, że publikacje z jej autorskim czy współautorskim udziałem są cytowane znacznie powyżej średniej dla Polski. Innymi słowy prace dr Grzyb budzą międzynarodowe zainteresowanie.

Dr. Joanna Grzyb przedstawiła sześć prac (wyszczególnionych poniżej) powiązanych tematycznie i stanowiących podstawę wszczęcia postępowania habilitacyjnego.

1. Grzyb J, Xu F, Weiner L, Reijerse EJ, Lubitz W, Nanda V, Noy D, De novo design of a non-natural fold for an iron-sulfur protein: Alpha-helical coiled-coil with a four-iron four-sulfur cluster binding site in its central core, Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics (2010) 1797:406-413. IF=4.864, punkty MNiSW=40, cytowania (bez autocytowań) =33 (31)

Udział habilitanta w tej pracy został oszacowany na 35% i dotyczył: opracowania procedury ekspresji genu kodującego białka CCIS i oczyszczania tego białka, przeprowadzenia procedur mutacji Cys->Ser, opracowania procedury rekonstytucji, przeprowadzenia charakterystyki holobiałka (spektrometria UV-Vis, sączenie molekularne, dichroizm kołowy), przygotowania próbek do EPR i udziału w pomiarach oraz opracowania wyników, przygotowania próbek do ultrawirowania analitycznego, przygotowania rycin oraz udziału w przygotowaniu manuskryptu.

2. Grzyb J, Xu F, Nanda V, Łuczkowska R, Reijerse E, Lubitz W, Noy D, Empirical and computational design of iron-sulfur cluster proteins, Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics (2012) 1817:1256-1262. IF=4.864, punkty MNiSW = 40, cytowania (bez autocytowań) =16 (15)

W drugiej pracy udział habilitanta został oceniony na 40%. Dr Grzyb zaprojektowała białka RCM oraz część badań i eksperymentów go dotyczących. Opracowała również procedury ekspresji genu kodującego białka RCM i CCIS2 oraz procedury oczyszczania tych białek, wprowadziła mutację długiej pętli RCM, opracowała procedury rekonstytucji obu białek, przeprowadziła wstępną charakterystykę holobiałka (spektrometria UV-Vis, sączenie molekularne), przygotowała próbki do EPR oraz brała udział w pomiarach i interpretacji wyników. W ramach tej pracy dr Grzyb opiekowała się magistrantką wykonującą pracę magisterską dotyczącą charakterystyki RCM (w tym, obliczenie stałych wiązania hemu przez RCM i 4muteiny). Dr Grzyb pozyskała znaczącą część finansowania dla tych badań (stypendium EMBO, grant Homing PLUS). Habilitantka przygotowała manuskrypt do publikacji jako autor korespondencyjny.

3. Grzyb J, De Novo Designed Proteins - Perspective Materials for Nanotechnology, Acta Physica Polonica A (2012) 122:279-283. IF=0.525, punkty MNiSW =15, cytowania (bez autocytowań) =2 (2)

Kolejna (trzecia) praca jest pracą przeglądową. Udział habilitanta w tej pracy wynosi 100%. W pracy tej również zamieszczone zostały przykładowe dane z charakterystyki spektralnej białek wykonane przez habilitanta. Praca ta jest opublikowana w polskim czasopiśmie kat. A i jak na pracę przeglądową jest słabo cytowana.

4. Szczepaniak K, Worch R, Grzyb J, Ferredoxin:NADP(+) oxidoreductase in junction with CdSe/ZnS quantum dots: characteristics of an enzymatically active nanohybrid, Journal of Physics: Condensed Matter (2013) 25:194102. IF=2.209, punkty MNiSW =35 cytowania (bez autocytowań) =7 (6)

Udział habilitanta w kolejnej (czwartej) eksperymentalnej pracy został oceniony na 50%. Dr Grzyb zaproponowała badania przeprowadzone w ramach tej pracy, opiekowała się magistrantem wykonującym pracę magisterską dotyczącą optymalizacji wiązania enzymu do koloidalnych kropek kwantowych, przeprowadziła pomiary kinetyki enzymatycznej i obliczyła jej parametry. Uzyskała finansowanie (grant Homing PLUS, grant Opus). Dr Grzyb jako autor korespondencyjny napisała i przygotowała manuskrypt tej pracy do publikacji.

5. Grzyb J, Kalwarczyk E, Worch R, Photoreduction of natural redox proteins by CdTe quantum dots is size-tunable and conjugation-independent, RSC Advances (2015) 5:61973-61982. IF=3.289, punkty MNiSW =35, cytowania (bez autocytowań) =2 (0)

Udział habilitanta w piątej pracy został oceniony na 60%. Dr Grzyb zaproponowała badania przeprowadzone w ramach tej pracy, przygotowała próbki do wszystkich oznaczeń, wykonała badania kinetyki fotoredukcji oraz sączenia molekularnego, miała udział w pomiarze potencjału zeta, opracowała zbiorowo wszystkie wyniki. Uzyskała finansowanie jako kierownik projektu i przygotowała manuskrypt do publikacji jako autor korespondencyjny.

6. Darżynkiewicz ZM, Pędziwiatr M, Grzyb J, Quantum dots use both LUMO and surface trap electrons in photoreduction, Journal of Luminescence (2017) 183:401–409. IF=2.74, punkty MNiSW =35, cytowania (bez autocytowań) =0 (0)

Udział dr Grzyb w szóstej publikacji jest oceniony na 50%. Dr Grzyb w tej pracy opracowała koncepcje badań, przeprowadziła część pomiarów TRES oraz pomiarów wygaszania fluorescencji. Opracowała wyniki z tych pomiarów oraz uzyskała finansowanie (projekt Lider) i przygotowała manuskrypt do publikacji jako autor korespondencyjny.

Sumaryczny współczynnik wpływu (ang. IF) dla osiągnięcia naukowego dr Grzyb wynosi 18.491 a suma punktów MNiSW przyznawanych za te prace wynosi 195. Prace te są cytowane

przez innych naukowców 54 razy. Jednak zasadnicza część obcych cytowań (44) dotyczy tylko dwóch pierwszych prac osiągnięcia naukowego dr Grzyb.

Przedstawione dzieło dotyczy właściwie dwóch typów układów umożliwiających badania transportu elektronów. Pierwszy typ to białka projektowane de novo (zwane również sztucznymi białkami). Drugi układ jest układem bionanohybrydowym – zawierającym białka naturalne (izolowane z materiału roślinnego lub pozyskane z transgenicznej ekspresji bakteryjnej) oraz układy mieszane zawierające elementy abiotyczne, takie jak koloidalne kropki kwantowe. Dwie pierwsze prace osiągnięcia naukowego, jak wspominałem powyżej, są przyzwoicie cytowane i stanowią jego zasadniczą część. Trzecia praca jest pracą przeglądową i dziwi mnie fakt, że praca ta jest tak słabo cytowana (2 cytowania od 2012 r.). Natomiast pozostałe prace (4 – 6) stanowią dodatkowe elementy osiągnięcia naukowego i są relatywnie słabiej cytowane (te trzy prace mają sumarycznie 8 cytowań). Udział Dr Grzyb w dziele (osiągnięciu naukowym) jest zasadniczy.

Pomimo niekwestionowanego osiągnięcia naukowego, dziwi mnie nieprecyzyjny i skrótowy język habilitanta, a właściwie żargon naukowy. Przykładem tego jest następujący cytat pochodzący z autoreferatu (str. 5): „Dwa najważniejsze naturalne procesy zachodzące z transportem elektronów to oddychanie mitochondrialne i fotosynteza. W obu przypadkach transport elektronów odbywa się przez szereg przekaźników hydrofobowych i hydrofilowych, a efektem jest wytworzenie gradientu elektrochemicznego (inaczej: siły protonomotorycznej) w poprzek błony, co następnie napędza syntezę ATP." Jest to kuriozalne opisanie fotosyntezy i oddychania. Tak kuriozalnej definicji oddychania mitochondrialnego i fotosyntezy chloroplastowej jeszcze nie widziałem. Fakt są to fundamentalne procesy życiowe, ale „zachodzące z transportem elektronów"??? Zajść może Słońce za horyzont, zajść można w ciążę, ale nie można zajść z transportem elektronów. Następne zdanie „W obu przypadkach transport elektronów odbywa się przez szereg przekaźników..." Przekaźniki stosowane są w elektronice, a w biologii, biochemii i fizjologii mamy do czynienia z donorami i akceptorami elektronów. Dziwi mnie to, tym bardziej, że habilitant w dalszej części dzieła używa prawidłowej terminologii.

Podsumowując pierwszą część dzieła (osiągnięcia naukowego), projektowane *de novo* i opisane przez dr Grzyb białka posłużyły do zbadania znaczenia sekwencji części białka

koordynującej centrum Fe-S i znaczenia tej sekwencji dla stabilności centrum Fe-S. Otrzymanie syntetycznego białka CCIS potwierdziło potencjał algorytmów i metod komputerowych w przewidywaniu nieznanych motywów i nowych struktur białkowych, eksponując, jednakże słabości wynikające z niedostatku danych wprowadzonych do komputera. Jednocześnie, białko uzyskane metodą projektowania intuicyjnego okazało się zgodne z narzuconymi mu założeniami.

Jednak muszę tutaj zaznaczyć, że w przedstawionym osiągnięciu naukowym brakuje hipotez roboczych i celów przeprowadzanych eksperymentów. Czytelnik dzieła dr Grzyb nie może znaleźć w tekście jasno opisanych celów i postawionych hipotez roboczych dotyczących pierwszej części dzieła (osiągnięcia naukowego). Podejmowanie działań naukowych i eksperymentów bez hipotezy i wyraźnie określonych celów jest przyczynkowe i deskryptywne. Wprawdzie dr Grzyb wspomina, że „Oba białka mogą być wprowadzane w badaniach w miejsce naturalnych ferredoksyn i białek hemowych", ale nie wyjaśnia jak, w jakim organizmie i w jakim celu? Czy celem jest ulepszenie procesów oddychania czy fotosyntezy a może ulepszenie retroaktywnych sygnałów z organelli i odporności organizmów na stresy biotyczne i abiotyczne? Ulepszenie wydajności procesu fotosyntezy u roślin jest możliwe i zostało osiągnięte w tytoniu poprzez transgeniczną nadekspresję naturalnych białek PsbS i cyklu VAZ odpowiedzialnych za niefotochemiczne wygaszanie energii wzbudzenia i regulację gradientu pH w poprzek błony tylakoidów.
„Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection" (2016) Johannes Kromdijk1, *, Katarzyna Głowacka1,2, *, Lauriebeth Leonelli3, Stéphane T. Gabilly3, Masakazu Iwai3,4, Krishna K. Niyogi3,4, †, Stephen P. Long1,5, † Science 18 Nov 2016: Vol. 354, Issue 6314, pp. 857-861 DOI: 10.1126/science. aai8878.

W drugiej części dzieła (osiągnięcia naukowego) dotyczącej badania transferu elektronów w układach bionanohybrydowych habilitant opisała użycie FNR z sinicy Synechocystis sp. PCC 6803 (chloroplastowego enzymu, katalizującego redukcję NADP+ do NADPH dzięki elektronom dostarczanym przez zredukowaną ferredoksynę), oczyszczonej z ekspresji heterologicznej w bakteriach E.coli. W dalszej części badań dr Grzyb uzyskała nanohybrydę FNR z QD, która była „pierwszym literaturowym doniesieniem połączenia enzymu fotosyntetycznego z QD". Wykazała, że „szybkość reakcji katalizowanej przez QD-FNR była

niezależna od oświetlenia, a więc można było założyć, że w tym typie bionanohybrydy QD jest potencjalnie jedynie biernym składnikiem kompleksu i może służyć jako znacznik fluorescencyjny do lokalizacji FNR". Dr Grzyb dalej stwierdza, że dla „redukcji FeCy zarówno Km jak i Kcat zmniejszają się dla koniugatów z oboma typami QD. Km wyznaczona dla NADPH nie zmienia się, z dokładnością odchyleń standardowych, zarówno dla reakcji przy stałym stężeniu DBMIB jak i FeCy. Maleje jednak szybkość reakcji, mierzona stałą katalityczną". Dr Grzyb konkluduje, że obserwowane zmiany „najłatwiej wytłumaczyć poprzez inhibicję akompetycyjną (ang. Uncompetitive, chyba chodzi o niekompetycyjna???), wynikającą z wpływu inhibitora na strukturę enzymu, w taki sposób, że utrudnione jest uwalnianie produktu. Możliwe jest także, iż zmiany wynikają z lokalnego zagęszczenia substratu poprzez oddziaływanie z powierzchnią QD".

Ponownie, jak w pierwszej, tak i w drugiej części dzieła brakuje jasno postawionych hipotez roboczych i wyznaczonych celów. Z tekstu można się domyślać, że celem łączenia QD z enzymami takimi jak FNR miało być ulepszenie ich aktywności czy uzyskanie kontroli nad szybkością reakcji poprzez naświetlanie kompleksu FNR-QD impulsami światła. Jednak dr Grzyb stwierdziła, że „szybkość reakcji katalizowanej przez QD-FNR była niezależna od oświetlenia" co powoduje, że takie modyfikacje enzymu są raczej bezużyteczne dla tego celu. Taka ocena wyjaśnia relatywnie słabe cytowanie tej pracy.

Jednak w dalszej części badań dr Grzyb udowadnia, że „koloidalne nanokryształy mogą wpływać pośrednio lub też być aktywnymi uczestnikami reakcji redoks zachodzących w komórkach żywych organizmów." Wykazała, że „zależna od QD fotoredukcja angażuje elektrony z orbitalu LUMO, nie tylko z defektów powierzchniowych, a więc będzie zachodzić nawet przy pasywacji powierzchni". Zaprezentowane przez habilitanta odkrycia mogą w przyszłości przyczynić się do opracowania systemów pozwalających na sterowanie równowagą redoks w odpowiednich przedziałach komórkowych za pomocą dobranych impulsów świetlnych.

W perspektywach i przyszłych eksperymentach dr Grzyb proponuje rozszerzenie zakresu badań. Habilitant stwierdza, że prowadzone badania w zakresie nanokryształów i ich oddziaływań z cząsteczkami białek są wyrywkowe a opisy mają charakter fenomenologiczny. Dalej stwierdza, „że brakuje ujęcia całościowego, pozwalającego na podjęcie próby celowego

sterowania procesem. Brakuje również badań opisujących połączenia wieloelementowe z udziałem nanocząstek". Dr Grzyb zamierza zbadać w przyszłości układy bardziej skomplikowane niż tylko dwie oddziałujące cząsteczki, w szczególności chce łączyć cząsteczki biologiczne z nanomateriałami w wieloelementowe łańcuchy i sieci. Dr Grzyb liczy na to, że uzyskane dane pozwolą jej sformułować zasady umożliwiające zewnętrzne sterowanie (np. impulsem świetlnym) naturalnymi procesami komórkowymi.

Lepiej by było, aby dr Grzyb sformułowała i zweryfikowała w eksperymentach parę hipotez roboczych, zamiast liczyć na to, że skomplikowanie układu eksperymentalnego i jego badanie pozwoli na osiągniecie celu zdalnego sterowania procesami enzymatycznymi.

Główny wątek obecnych badań dr Grzyb, dotyczy transferu elektronów w podstawowych procesach życiowych. Tematyką tą dr Grzyb zajmuje się od pracy magisterskiej i wykazała, że grupy aminowe i tiolowe FNR nie są bezpośrednio zaangażowane w redukcję substratów chinonowych. Jednakże, po związaniu substratu, zmienia się konformacja białka na tyle, że dochodzi do zwiększonej ekspozycji grup aminowych. W pracy doktorskiej, wykonanej pod kierunkiem Prof. Kazimierza Strzałki i we współpracy z jego zespołem dr Grzyb wyznaczyła stałe inhibicji FNR przez kadm i określiła, jakie zmiany fizykochemiczne w cząsteczce białka (FNR) towarzyszą wiązaniu jonów kadmu. Wyniki te zostały opublikowane w trzech pracach (pozycje #17, #9 i #8 z listy *Pozostałych publikacji, nie wchodzących w zakres przedstawianego osiągnięcia*). Dr Grzyb opracowała też procedurę izolacji i oczyszczania dwóch izoform FNR z pszenicy (praca #11). Przy okazji realizowania badań do tej pracy, dr Grzyb rozpoczęła współpracę z prof. drem hab. Maciejem Garstką i jego grupą w celu wykorzystania elementów aparatu fotosyntetycznego w konstrukcji biosensorów.

Dr Grzyb uczestniczyła również w badaniach jednego z mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację roślin do zmiennego natężenia światła oraz za fotoprotekcję. Badania te dotyczyły zarówno reakcji *in vitro* (w tym szczególnej specyfiki środowiska lipidowego i znaczenia odwróconych struktur heksagonalnych), koniecznego do przebiegu reakcji deepoksydacji. Badania te prowadzone były przez grupę prof. Kazimierza Strzałki we współpracy z grupą prof. C. Wilhelma i R. Gossa (prace #13, 14).

Dr Grzyb uczestniczyła również w badaniach odpowiedzi roślin na napromieniowanie UV (praca #3) i badaniach elementów związanych z fotosyntezą za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) (praca #5).

Prof. Stanisław Karpiński - ocena osiągnięcia naukowego dr Joanny Grzyb
w postępowaniu habilitacyjnym

Podsumowując tę cześć oceny dorobku stwierdzam, że dr Grzyb wykazuje dużą aktywność badawczą dotyczącą podstawowych mechanizmów transferu elektronów w procesie fotosyntezy a jej dorobek naukowy w tym zakresie jest solidny i odpowiedni do uzyskania stopnia dr hab.

Dr Grzyb wykazała się solidną i dobrą aktywnością w zdobywaniu środków finansowych na badania. W latach 2010 – do dziś uzyskała finansowanie projektów badawczych z NCN, NCBiR; FNP i z Ministerstwa Nauki. Habilitant odbyła także liczne staże za granicą w tym dwuletni staż podoktorski w Instytucie Weizmanna, Rehovot, w Izraelu. Dr Grzyb była kierownikiem (promotorem) dwóch prac magisterskich i wygłaszała wykłady na konferencjach naukowych.

Podsumowując osiągniecia przedstawione w dziele i w pozostałych pracach z udziałem habilitanta, aktywność projektowa, dydaktyczna i staże zagraniczne oceniam, że dr Grzyb spełnia wszelkie ustawowe wymagania, aby uzyskać stopień doktora habilitowanego.

Warszawa, 25 maja 2018

S. Karpiński

Prof. Stanisław Karpiński