



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ
DR HAB. ARTUR OSYCZKA, PROF. UJ

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Zatwarnickiego:

„Cytochromy sinicowe – struktura a właściwości”.

Cytochromy c stanowią obszerną grupę białek hemowych definiowaną na podstawie kryterium posiadania hemu typu C kowalencyjnie przyłączonego do łańcucha polipeptydowego. Białka te angażują się w procesy oksydacyjno-redukcyjne i stanowią istotny element wielu układów bioenergetycznych funkcjonując jako pojedyncze białka, bądź jako części (podjednostki) złożonych kompleksów białkowych. Obecnie uważa się że szereg przedstawicieli tej grupy (np. mitochondrialny cytochrom c) obejmuje białka bardzo dobrze poznane strukturalno-funkcjonalnie. Stanowią one przez to zarówno dogodny materiał modelowy dla zaawansowanych badań procesów biochemiczno-biofizycznych (takich jak zwijania białek, dynamiki oddziaływań typu białko-białko) jak i wyjściowy materiał porównawczy do badań nad mniej poznanymi cytochromami i innymi białkami redoks.

W ten właśnie nurt badań strukturalno-funkcyjnych i porównawczych cytochromów wpisuje się praca doktorska Pana mgra Pawła Zatwarnickiego „Cytochromy sinicowe – struktura a właściwości”. Doktorant jako nadrzędny cel postawił sobie rozwiązanie struktur krystalograficznych szeregu mniej poznanych cytochromów sinicowych z niedawno wyodrębnionej grupy cytochromów sinicowych podobnych do c_6 i odniesienie struktur do właściwości fizyko-chemicznych. By to osiągnąć opracował procedury heterologicznej ekspresji cytochromów w komórkach *E.coli*, metody izolacji i oczyszczania białek i warunki ich krystalizacji. Zbadał również własności spektralne, punkty izoelektryczne i potencjały oksydacyjno-redukcyjne oczyszczonych białek.

Na wstępie należy podkreślić, że podjęta tematyka badań jest bardzo aktualna i ciekawa zarówno z punktu widzenia bioenergetyki molekularnej jak i biochemii strukturalnej, a promotor pracy prof. A. Szczepaniak jest jednym ze światowych pionierów w badaniach strukturalnych nad sinicowymi cytochromami, w tym w szczególności cytochromami c_6 i cytochromami podobnymi do c_6 . W ogólnym ujęciu praca ma bardzo wysoki poziom naukowy a prezentowane wyniki mają istotną wartość poznawczą dla nauki o zasięgu międzynarodowym.

Opis pracy

135-stronicowa praca ma układ typowy dla prac doktorskich.

Na początku cztero-stronicowe streszczenie wprowadza główną ideę pracy i przedstawia najistotniejsze jej osiągnięcia.

Wstęp rozpoczyna się krótkim opisem procesu fotosyntezy, po którym natępuje opis sinic, ze szczególnym uwzględnieniem gatunku *Synechococcus* sp. PCC 7002, który stanowił źródło badanych cytochromów. Same białka są opisane w następnych podrozdziałach wstępu. Na początku znajdujemy rozdział wprowadzający podstawowe informacje o cytochromach, po którym znajdujemy rozdziały w których w każdym, osobno opisano kolejno: cytochrom c, c_6 , cytochromy

podobne do c_6 , c_M oraz f . Opiswane rodzaje białek odpowiadają tym, które doktorant bada w dalszej części pracy.

Po wstępie znajdujemy syntetyczny opis celów pracy, w którym doktorant podaje listę cytochromów stanowiących przedmiot jego badań (obejmującą poza cytochromami podobnymi do c_6 w formie dzikiej i zmutowanej również cytochrom c_M i f). Kolejny rozdział opisuje aparaturę, materiały i metody wykorzystane w pracy. Kolejne dwa rozdziały poświęcone są opisowi wyników uzyskanych w pracy i ich dyskusji. W podrozdziałach wyników w kolejności opisane są wyniki nad ekspresją i oczyszczaniem cytochromów (w kolejności PetJ1 Q57V; PetJ1 – dl7, -dl6, -dl5; cyt c_M ; cyt c_{6B} ; oraz cyt f). Dla każdego cytochromu przedstawiono tabelkę bilansu oczyszczania (kolejne etapy/iłość/czystość) oraz tabelkę zestawiającą wydajność ekspresji dla różnych testowanych warunków hodowlanych. W następnym rozdziale zebrane są widma absorbcyjne oczyszczonych cytochromów. Kolejne dwa rozdziały opisują wyniki genetycznego modyfikowania cytochromów: pierwszy z nich opisuje etapy konstrukcji plazmidu użytego do delekcji unikalnej pętli PetJ1 oraz wynik transformacji komórek sinicowych, drugi z nich poświęcony jest opisowi konstrukcji plazmidu i transformacji komórek sinicowych celem przyłączenia etykiety strep-tag do cytochromu f . Kolejny rozdział porównuje wyznaczone eksperymentalnie punkty izoelektryczne poszczególnych cytochromów z wartościami obliczonymi teoretycznie. W następnym – zestawione są wyniki miareczkowania potencjometrycznego z podaniem wyznaczonych potencjałów redoks w pH 7 cytochromów PetJ1 Wt, PetJ1 Q57V, PetJ1 dl6, PetJ2 WT, PetJ2 L50Q, cyt c_M oraz cyt c_{6B} . Kolejny rozdział opisuje wyniki krystalizacji cytochromów prezentując zdjęcia uzyskanych kryształów. Ostatni rozdział wyników opisuje same struktury krystalograficzne cytochromów, w kolejnych trzech podrozdziałach: PetJ1 Q57V; PetJ2 WT razem z L50Q; oraz c_6 . Dla każdego cytochromu opisano strukturę drugorzędową oraz ogólne ułożenie α -helis wokół hemu. Szczególną uwagę poświęcono analizie kieszeni hemowej pod kątem istotnych reszt bocznych, uwidocznionych sieci wiązań wodorowych a także obecności cząsteczek wody i ich udziału w tworzeniu wiązań wodorowych. Zaprezentowano też wektory momentu dipolowego.

Dyskusja rozpoczyna się krótkim wprowadzeniem, po którym następuje omówienie w dwóch osobnych rozdziałach wyników dotyczących ekspresji i oczyszczania cytochromów. W kolejnym rozdziale porównano struktury natywnego PetJ1 z jego mutantem Q57V, a w kolejnym porównano natywny PetJ2 z mutantem delecyjnym. Ostatnie dwa podrozdziały dyskusji poświęcone są kolejno PetJ2 oraz c_{6B} .

Po rozdziale dyskusja znajduje się spis 75 pozycji literaturowych.

Dodatek przedstawia publikacje i wystąpienia konferencyjne związane z wynikami prezentowanymi w doktoracie a także zestawia informacje na temat struktur zdeponowanych w Protein Data Bank.

Ostatnią częścią pracy jest 4 stronicowe streszczenie napisane w języku angielskim.

Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczyć należy:

- wykazanie iż obecność pętli K44-S49 w PetJ1 jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek sinicowych oraz że jej usunięcie skutkuje znacznym (ok. 100 mV) spadkiem potencjału redoks tego białka,

- wykazanie że mutacja Q57V w obrębie kieszeni hemowej PetJ1 skutkuje znacznym (ok. 100 mV) spadkiem potencjału redoks i wyjaśnienie/zaproponowanie, na podstawie porównania struktur krystalograficznych natywnego i zmutowanego PetJ1, że zmiany te spowodowane mogą być różnicą w sieci wiązań wodorowych wokół cząsteczki wody strukturalnej 309, która w białku natywnym oddziałuje z łańcuchem bocznym glutaminy 57 i propionianami hp-6 i hp-7, a w muteinie --- jedynie z propionianami. Ponieważ była to jedyna zaobserwowana różnica w strukturze obu cytochromów, doktorant zaproponował że właściwości polarne oraz elektrostatyczne kieszeni hemowej w powiązaniu ze stabilizacją wody strukturalnej poprzez specyficzny układ wiązań wodorowych wpływają znacząco na właściwości fizykochemiczne tego cytochromu.

- wykazanie że mutacja L50Q w obrębie kieszeni hemowej PetJ2 skutkuje znacznym podniesieniem potencjału redoks z +150 mV do 203 mV (w pH 7) oraz wyjaśnienie na podstawie porównania struktur PetJ2 WT i L50Q, że efekt ten jest spowodowany zmianą w profilu wiązań wodorowych stabilizowanych przez cząsteczki wody strukturalnej obecne w kieszeni hemowej białka. W tym przypadku dwie, zamiast trzech cząsteczek wody oddziałują z resztą propionianową hp-6 i dodatkowo jedna cząsteczka wody oddziałuje z resztą boczną Gln50.

- wykazanie, że cyt c_{6B} posiada unikalne właściwości strukturalne w postaci β -spinki położonej za III helisą α . Jest to szczególnie ciekawe ze względu na to że rejon ten obejmuje 6-ty ligand hemowy (Met 58). Ponadto wykazano, że cyt c_{6B} posiada stosunkowo niski potencjał redoks (113 mV vs 333 mV natywnego PetJ1), odmienne właściwości spektralne (przesunięcie maksimum absorpcji pasma α) oraz wysoki moment dipolowy (w porównaniu do PetJ1).

Na uwagę zasługuje fakt, że struktury PetJ2 typu dzikiego i mutanta L50Q są pierwszymi strukturami cyt c_{6C} opublikowanymi w PDB, a struktura c_{6B} jest pierwszą strukturą białka z tej rodziny cytochromów opublikowaną w PDB.

Lektura pracy nasuwa następujące ciekawe zagadnienia i spostrzeżenia do dalszej dyskusji:

- badane cytochromy z grupy c_6 należą (jak to zaznaczył doktorant we wstępie) do klasy I cytochromów (wg klasyfikacji Amblera), w klasie tej znajdują się też dobrze poznane – mitochondrialny cyt c i bakteryjne cyt c_2 . Ciekawe byłoby porównanie badanych w pracy cytochromów z tymi właśnie "klasycznymi" cytochromami. Mam tu na myśli zwłaszcza samo sąsiedztwo kieszeni hemowych i układ cząsteczek wody strukturalnej, o której szeroko dyskutuje doktorant w pracy.

- podniesienie potencjału redoks zaprojektowaną mutacją L50Q w PetJ2 jest efektem bardzo ciekawym i rzadko osiągalnym eksperymentalnie (o ile stosunkowo łatwo jest obniżyć potencjał przez mutację, to w drugą stronę nie jest to takie proste). Wartołoby, moim zdaniem, podkreślić ten fakt w dyskusji odnosząc uzyskany wynik do opisywanych w literaturze efektów mutacji na potencjał redoks cytochromów, choćby na paru przykładach.

- ciekawy byłby opis powierzchni cytochromów od strony wyeksponowanej do środowiska zewnętrznego krawędzi hemu. Stanowią one zapewne (w analogii od innych cytochromów) rejon oddziaływania z innymi białkami (partnerami fizjologicznymi), dlatego też analiza tych rejonów i ich porównanie z „klasyczną” domeną reakcyjną mitochondrialnego cyt c (pierścieniem reszt lizynowych) mogłaby wskazać na możliwy charakter oddziaływań (czy elektrostatyczny, czy może bardziej hydrofobowy)?

- przy opisie struktury cyt podobnych do c_6 autor zaznacza obecność mostka disiarczkowego, jest to cecha rzadko spotykana w cytochromach c , ciekawym byłoby nawiązanie do innych znanych przypadków w tej grupie białek

Uwagi krytyczne i elementy wymagające poprawy:

- Rys 2 (ze wstępu na str 17) podaje szereg skrótów, które nie są wyjaśnione w tekście. Jest to prawdopodobnie konsekwencja tego, że jak zaznaczył doktorant, pochodzi on ze strony internetowej zespołu D. Bryanta. Dodatkowo, wskazane by było zaznaczyć że cytochrom b_6f jest w formie dimeru.
- typy hemów powinno się pisać dużą literą, np hem typu A
- czy rzeczywiście w cytochromach c_2 obserwuje się zależność potencjału redoks od pH (strona 20)?
- str 21 "Tym samym cykl przeniesienia elektronu z b_6f na PSI się zamyka" – z opisu nie jest to oczywiste, bo jest zaznaczone tylko połączenie białkowe od strony lumen.
- czy rzeczywiście interakcje kolizyjne mogą przeciwstawiać się siłom elektrostatycznym (strona 26)?
- str 26 i 27 – dwa razy powtórzono tę samą informację „PetJ2 ze względu na niski potencjał nie jest zdolny do pobierania elektronów z kompleksu b_6f ”
- czy rzeczywiście sekwencja CxxCH jest cechą wyróżniającą cytochrom f spośród innych cytochromów (strona 29)?, w tym paragrafie jedną z ważnych różnic, o której nie wspomniał autor jest różnica w sposobie zwinienia łańcucha białkowego wokół hemu
- w celach pracy zabrakło mi uzasadnienia logiki wyboru cytochromów, które były przedmiotem badania (np. czemu akurat wybrano mutanty Q57V, L50Q, czemu cyt c_M czy f ?), można też było bardziej rozwinąć ostatnie zdanie, które dotyczy najistotniejszego elementu „interpretacji struktur w kontekście poznaczonych właściwości biochemicznych”
- w opisie miareczkowania brakuje wyszczególnienia jaki typ krzywej Nernsta był dopasowywany ($n = ?$)
- ogólna uwaga dotycząca wyników: ponieważ znaczna część pracy dotyczy oczyszczania białek, wskazanym byłoby zamieszczenie porównawczych zdjęć elektroforezy SDS-Page (zwłaszcza, że doktorant wspomina o dokonaniu takiej analizy w dyskusji na str 112), czystość jest jedynie opisywana za pomocą parametru liczbowego stosunku A_{560}/A_{260} , który zresztą powinien być zdefiniowany i opisany co oznacza
- na str 57 pojawia się informacja „po porównaniu modeli ... zdecydowano że dalsze badania będą prowadzone na cytochromie PetJ1 d16” – brakuje wyjaśnienia dlaczego?
- wykresy na str 66-68 posiadają niekompletny opis osi X i brak opisu osi Y
- na widmie B i E pojawiło się rozszczepienie w paśmie α – brak informacji na ten temat w tabelce i brak komentarza w tekście
- nie rozumiem czemu rozdziały opisujące manipulacje genetyczne (6.3) znajdują się między rozdziałami opisującymi widma, punkty izoelektryczne i miareczkowania
- na wykresach przedstawiających wyniki miareczkowania wskazane jest zaznaczenie kierunku miareczkowania (oksydacyjny, redukcyjny), brakuje też informacji o długościach fal branych do analizy

- w tekście znaleźć można niepotrzebne powtórzenia, np. początek dyskusji (str 108, pierwszy akapit) oraz str 124, 2-gi akapit powtarzają informacje ze wstępu
- od strony graficznej : niektóre rysunki byłyby wygodniejsze w analizie, gdyby je lepiej rozmieścić – np. umieszczając rys 45 i 46 na jednej stronie, czy umieszczając oba panele rys 52 na jednej stronie
- str 117 – „ tym samym, mutant delecyjny ze względu na zbyt niski potencjał redoks jest niezdolny do przenoszenia elektronu na PSI” , nie do końca rozumiem dlaczego?, należy wziąć pod uwagę, że sama zmiana potencjału w granicach 100 mV nie zawsze musi skutkować utratą funkcjonalności
- str 118 – „paradoksalnie... doprowadziły do zupełnie odmiennych hipotez, które w tej pracy zostały obalone” niejasne – o jakie hipotezy chodzi i czemu zostały obalone
- str 120 – „Najważniejsza różnica.... reszty bocznej waliny (PetJ2)” – na rys. 57 widać jednak resztę leucyny?
- str 126 – opis do Rys 60 „cząsteczki wody w kolorze czerwonym” błędnie sugeruje że są dwie cząsteczki wody, podczas gdy jest to jedna cząsteczka wody w dwóch różnych pozycjach
- str 127 „Niski potencjał redoks to nie jedyna właściwość definiująca funkcjonalność biologiczną” to sformułowanie jest niejasne
- w pracy brakuje zbiorczego podsumowania podkreślającego najbardziej wartościowe wyniki strukturalno-funkcjonalne
- styl : „strep-tagowanie cytochromu” „wstępny skryning” „spektrofotometr zerowano”
- styl formatowania literatury jest niejednolity i niestarannie przygotowany: np nazwy czasopism w niektórych przypadkach są italicizowane a w niektórych nie; przypadkowo podawane są DOI też w różnych formatach; nazwy tych samych czasopism (np Photosynthesis Research, Journal of Biological Chemistry) pojawiają się jako pełne nazwy i jako skróty, styl podawania nazwisk autorów też jest niejednolity
- błędy w numeracji rozdziałów (str 3): w rozdziale 5.7 znajdujemy podrozdziały 5.1.1 do 5.1.3, a w rozdziale 5.8 – podrozdziały 5.1.4 do 5.1.6.
- niezręczne sformułowania: str 8 „Przepływu elektronu zamyka się...”; str 8 „Zgromadzenie czterech ładunków dodatnich skutkuje wydzieleniem tlenu.”; str 106 „cząsteczki wody ..., w ich ścisłym sąsiedztwie znajduje się ich numer porządkowy”; str 110 „wy tłumaczenie tego faktu jest nieskomplikowane”; str 124 „zakończył się sukcesem, ukoronowanym zdeponowaniem...”
- literówki: str 12 „elektron ... są przenoszone...”; str 23 „...funkcję zdają się...”; str 111 „Warto pamiętać jednak,..”; str 123 „odpowiada fenyloalaniny”; str 126 „... analizy rozmieszczenie cząsteczek wody...”

Powyższe uwagi w żaden sposób nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej Pana Zatwarnickiego. Jest to bardzo dobre opracowanie pod względem naukowym i może stanowić doskonałe źródło informacji dla osób chcących pogłębić temat sinicowych cytochromów. Całość świadczy o dojrzałości Doktoranta pod względem naukowym przy planowaniu, wykonywaniu, interpretowaniu i dyskusowaniu wyników badań naukowych.

Mając na względzie przedstawioną powyżej opinię, uważam że **prezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi niezbędne do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia**. Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgra Pawła Zatwarnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/dr hab. Artur Osyczka/