



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryszycycki, prof. PWr

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Pawła Zatwarnickiego „Cytochromy sinicowe – struktura a właściwości”.

Rozprawa doktorska mgr inż. Pawła Zatwarnickiego „Cytochromy sinicowe – struktura a właściwości” jest monografią przedstawiającą struktury kilku sinicowych cytochromów c_6 , drogę ich klonowania, ekspresji, oczyszczania, poszukiwania warunków krystalizacji i wreszcie analizy własności fizyko-chemicznych w relacji do struktury. Przygotowana została w laboratorium prof. Andrzeja Szczepaniaka od lat zajmującego się badaniami relacji struktura-funkcja białek zaangażowanych w proces fotosyntezy, we współpracy z grupą prof. Mariusza Jaskólskiego, wybitnego specjalisty w zakresie krystalografii białek, a także doktora Wojciecha Białka, którego rolę słusznie mgr Zatwarnicki podkreśla w kilku miejscach w tekście. Napisana jest przejrzysto i świadczy o znawstwie zarówno problemów metodycznych, jak i badanych obiektów, chociaż nie jest wolna od ponadstatystycznej liczby potknięć językowych, edytorskich i zwykłych „literówek”.

Praca, licząca 136 stron, składa się z czterech głównych rozdziałów (Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja). Znaczną część wyników opublikowano, w publikacji w BBRC (IF 2.4), w której doktorant jest pierwszym autorem, a cztery struktury krystaliczne (a nie krystalograficzne; str. 30, 31, 88) zdeponowano w Protein Data Bank (w jednym przypadku doktorant jest pierwszym autorem, a w pozostałych wśród kilku autorów). Po części zwalnia mnie z bardzo szczegółowej oceny przedstawionych wyników krystalograficznych tym bardziej, że gwarantami jakości analizy struktur byli wysokiej klasy specjaliści jak dr Krzywda i prof. Jaskólski. Uwagi, które nasunęły mi się po lekturze pracy przedstawiam poniżej.

We Wstępie na 18-stu stronach autor jasno przedstawił podstawowe informacje dotyczące procesu fotosyntezy, biologii sinic i przede wszystkim budowy i funkcji cytochromów sinic, ze szczególnym uwzględnieniem cytochromów c_6 . Można wprawdzie dyskutować ze stwierdzeniem (str. 13), że sinice są najważniejszą formą



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryszycycki, prof. PWr

życia jaka kiedykolwiek pojawiła się na Ziemi, ale jest to niewątpliwie efektowne wejście w temat. Natomiast nie zrozumiałem co autor miał na myśli pisząc na str. 26 „Niektóre oddziaływania donor elektronów-PSI zależą od interakcji kolizyjnych i mogą przeciwstawiać się siłom elektrostatycznym” w kontekście przekazywania elektronów z cytochromu PetJ2 z kompleksu b₆f.

Bezpośrednio po Wstępie jasno został przedstawiony ambitny cel pracy związany z opracowaniem procedury ekspresji w *E. coli* i oczyszczania ośmiu cytochromów z *Synechococcus sp.*, określeniu ich podstawowych własności fizyko-chemicznych (pI, potencjały redoks, widma UV-VIS), opracowaniu warunków krystalizacji i w konsekwencji wyznaczeniu struktury krystalicznej.

Na kolejnych 20-stu stronach zostały opisane używane materiały i techniki badawcze wykorzystane w pracy. Nie mam większych zastrzeżeń, poza licznymi potknięciami językowymi, do dobrze merytorycznie napisanego rozdziału, a jedynie kilka uwag. Szacowanie stężenia próbki DNA (str. 42) w oparciu porównanie do emisji fluorescencji markera (nie podano jakiego) o znanym stężeniu jest grubym przybliżeniem, podobnie jak założenie $A_{260}=1$ dla 50ng/μl. Przecież dla znanych sekwencji można było wyznaczyć współczynnik ekstynkcji ze składu nukleotydowego korzystając z sieciowych „kalkulatorów”. Podobnie nie jest dla mnie w pełni zasadne korzystanie z jednego współczynnika ekstynkcji ($20\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$) dla wszystkich cytochromów (str. 42 - brak odnośnika literaturowego) i to zarówno w postaci utlenionej i zredukowanej skoro powinny być różne. Wreszcie wypadałoby określić udział Autora w eksperymentach krystalizacyjnych i rozwiązywaniu struktury.

Na kolejnych 53 stronach przedstawiono wyniki badań. Autor w pierwszej kolejności relacjonował przebieg ekspresji i oczyszczania cytochromów, następnie przechodził do ich własności fizyko-chemicznych, opisu procesu krystalizacji i wreszcie analizy struktury krystalicznej.

Uwagi i pytania, które nasunęły mi się po lekturze wyników pracy:

1. Dobrym pomysłem było przedstawienie wyników preparacji w tabelach z podkreśleniem wydajności ekspresji, natomiast ograniczyłbym dane dotyczące nieudanych eksperymentów do przedstawienia ogólnych wniosków



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryczycki, prof. PWr

dotyczących np. wpływu temperatury, induktora (IPTG), siarczanu żelazawego, czy glukozy na wydajność preparacji. Wyjaśnienie na str. 57, że wprawdzie najwięcej cytochromu PetJ1 dI6 uzyskuje się w pożywce TB, z dodatkiem glukozy, ale bez FeSO_4 i IPTG, ale ze względów ekonomicznych ją zarzucono, do mnie nie przemawia. Przecież koszty LB i TB są zbliżone, a koszty generuje raczej IPTG.

2. Wolałbym, żeby wyniki oczyszczania przedstawić nie tylko w postaci współczynnika $\alpha/280$, nb., którego znaczenie pojawia się dopiero na str. 108 w dyskusji, ale również elektroforogramów oczyszczonych preparatów, tym bardziej, że na str. 112 Autor powołuje się na takie kontrole.
3. Na widmach absorpcyjnych brak jednostek na osi rzędnych, a w podpisie - stężenia próbki; zakres długości fali rozpoczyna się od 300 nm, a nie jak podano w tekście od 260 nm.
4. Skoro podaje się dane teoretyczne i eksperymentalne (str. 78) dotyczące pI poszczególnych cytochromów, wypadałoby w dwóch zdaniach skomentować skąd biorą się różnice sięgające 3 jednostek pH.
5. W opisie (str. 76) o dopasowywaniu 4 parametrów (jakich?) do znanego skądinąd równania Nernsta brakuje informacji co i jak „fitowano”. Wydaje się, że można było po prostu odczytać wartości potencjału redoks odpowiadającej ułamkowi (a nie % jak na wykresach) = 0.5 formy zredukowanej.
6. Wyniki dotyczące krystalizacji cytochromów i ich mutantów są opisane bardzo dobrze. Doktorant zoptymalizował warunki krystalizacji. Udało mu się uzyskać kryształy pozwalające na otrzymanie wysokiej jakości danych dyfrakcyjnych, które umożliwiły rozwiązywanie struktur. Eksperymenty krystalizacyjne, z wyjątkiem cyt m i f i mutantu c_{6B} zakończyły się sukcesem w postaci otrzymania struktur krystalicznych. Za największe osiągnięcie uważam mimo wszystko zebranie danych dotyczących cytochromu c_{6B} , gdyż białko to odbiega własnościami fizykochemicznymi, od pozostałych, w szczególności PetJ1 i nie daje się w prosty sposób „wpasować” w logiczny ciąg fotosystemu I, ze względu na niski potencjał redoks.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryszycycki, prof. PWR

7. Podobnie za bardzo interesujące, choć pozostawiające uczucie niedosytu, uważam badania roli pętli K₄₄-S₄₉ w cytochromach c₆. Wprawdzie otrzymano mutanta delecyjnego w odniesieniu do podanej sekwencji, ale nie udało się otrzymać kryształów takiego białka. Wydaje się, że w przyszłości można spróbować przeprowadzić skryning poszczególnych reszt, tym bardziej, że równolegle badano rolę np. reszty L50 w PetJ2, czy Q57 w PetJ1.
8. Autor odnosił własności otrzymanych struktur do danych wyznaczonych z algorytmów PDBSum (RasMol + PROMOT If) (str. 89-90 i dalej). Jak należy w związku z tym rozumieć na rys. 38 i 43 brak helisy 3, a jak stwierdzenie (str. 102) „...struktura Gly62-Leu65 ... wykazuje 42.8% dewiacji od modelu idealnego”.
9. Dla wszystkich struktur wyliczono moment dipolowy. W związku z tym dobrze byłoby podać jakieś uogólnienie w kontekście wyznaczonych danych, a także znaczenie tej wielkości dla roli pełnionej przez cytochromy, nb. jest to wielkość, która można wyznaczyć eksperymentalnie techniką DRS (ang. *dielectric relaxation spectroscopy*).
10. Wysoko oceniam opis roli cząsteczek wody w otoczeniu pierścienia hemu poszczególnych cytochromów. Widać, że sieć oddziaływań wodorowych pełni kluczową rolę w mikrootoczeniu protoporfiryny IX i stąd szczegółowa analiza położenia i oddziaływań poszczególnych cząsteczek ma tak duże znaczenie.

Dyskusja obejmująca 19 stron jest dobrze napisana. Autor podsumowuje uzyskane wyniki, umiejętnie podkreśla to co zrobili starsi koledzy, nowatorstwo swoich badań oraz opisuje możliwości ich kontynuowania i w tym kontekście szczególnie interesujące byłoby wyznaczenie struktury krystalicznej cytochromów f i m i roli cytochromów c_{6B}, a także pętli 44-50 z cytochromu PetJ1.

Z drobniejszych uwag dotyczących Dyskusji:

1. W Materiałach i Metodach i podpisie do Rys. 4 brakuje informacji o warunkach i aparaturze do pomiaru widm UV-VIS, ale nie sadzę, żeby uzyskano rozdzielczość na poziomie 0.6 nm (Dyskusja str. 117) dla mutantu delecyjnego PetJ1.



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryszycycki, prof. PWr

2. Skoro dyskutuje się wyniki pracy kolegi, które odbiegają od własnych (str. 118), a są niedostępne recenzentowi to wypada je przynajmniej opisać.
3. Niezwykle interesujące byłoby prześledzenie losów ewolucyjnych reszt odpowiadających Gln39 z cytochromu c_{6B} z mikrootoczenia hemu i zbadanie jej roli dla własności i struktury tej grupy cytochromów.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr. inż. Pawła Zatwarnickiego zawiera bardzo duży materiał eksperymentalny, ma sporą wartość poznawczą. Doktorantowi udało się zrealizować większość z dużej ilości ambitnych zadań. Praca stanowi przykład efektywnego wykorzystania współpracy. Uzyskane wyniki mają wartość naukową, stanowiąc oryginalne rozwiązanie istotnego problemu. Doktorant musiał opanować zarówno techniki biologii molekularnej, biofizyki jak i metody hodowli kryształów i rozbudowane oprogramowanie analizy danych. Co ważne, badania są bezpośrednią kontynuacją doświadczeń zespołu kierowanego przez Promotora pracy, a jednocześnie stanowią świetny punkt wyjścia dla kolejnych projektów.

Na koniec uwagi natury redakcyjnej, które nie podważają wartości naukowej pracy, ale z obowiązku recenzenta wypada podać, również w celach dydaktycznych:

- niechronologiczna numeracja cytowanych pozycji literaturowych [16] [75] [56] itd.
- „ekspotencjalny” (str. 17) zamiast eksponecjalny
- „niskospinowy cytochrom” – żargon naukowy, chodzi zapewne o tzw. kompleksy niskospinowe” tj. z odpowiednim rozszczepieniem orbitali molekularnych d w polu krystalicznym
- wielokrotnie używane „suplementowanie” zamiast dodawanie (str. 48, 110-111 -13 razy)
- strep-tagowanie str 73 (tytuł rozdziału)
- **Angstroemy** zamiast **angstremy** (słownik PWN – nazwa jednostki) (np. str. 93, 97 itd.)
- determinacja zamiast oznaczanie/określanie (str. 113)
- brak numeracji kilku stron (12, 31,33, 54, 108)
- różna pisownia nazwiska MacMunn (w literaturze Mac Munn) i rok publikacji, odpowiednio- 1884/1886)
- „w zasadzie bezsprzeczne” (oksymoron) str. 28



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Piotr Dobryczycki, prof. PWr

- mieszanie nazw polskich odczynników z angielskimi (np. str. 36, Loading Dye)
- rozmiary podajemy w mikrometrach (μm), a nie w mikromolach (μM) (str. 82, 86)
- używanie zamiennie w Materiałach i Metodach określeń sugerujących jednorazową czynność jak: „dosypano”, odczekano itd. (str. 51) i powtarzalność „prowadzono”, „dostarczano”
- „mieszano 300 μl białka z 300 μl rezerwuaru” (str. 52)
- „warunki okazały się zbyt wymagające pod względem ekonomicznym” zamiast za drogie (str. 57)
- „zarejestrowano widma spektralne” (str. 117)
- „dewiacja” w znaczeniu odchylenie (str. 102)
- „nieobecna jest również żadna reszta boczna” oznacza, że reszta jest obecna, a nie o to chodziło zapewne autorowi (str 125.)
- i wreszcie stanowczo za dużo literówek (do wglądu w egzemplarzu recenzenta) i potknięć stylistycznych, a także nieco rażące nadużywanie w tekście naukowym określeń typu „owe, tychże, otóż, teź, tegoż, tudzież, zgoła” itp., co *wszakże* nie obniża wartości naukowej rozprawy.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Pawła Zatwarnickiego spełnia wymagania stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi poprawkami, o stopniach naukowych i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autora i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej tym samym uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie Biochemia. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr. inż. Pawła Zatwarnickiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

dr hab. inż. Piotr Dobryczycki, prof. PWr.