

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 06.05.2024

RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr Katarzyny Lorencik
pt. „Identyfikacja ścieżek transferu elektronów w oddechowym alternatywnym
kompleksie III na podstawie mutagenetyki i badań biochemicznych”**

Prof. dr hab. Artura Osyczki z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie od wielu lat z powodzeniem zajmuje się funkcjonowaniem kompleksów przekształcających energię w błonach biologicznych. Kierowana przez niego i dra Roberta Ekiera, jako promotora pomocniczego, praca doktorska mgr Katarzyny Lorencik skupia się na badaniu na poziomie molekularnym ścieżek transferu elektronów w oddechowym alternatywnym kompleksie III (ACIII) bakterii *Flavobacterium johnsoniae*. W pierwszej części Doktorantka, wykorzystując skonstruowany przez siebie system genetyczny do delecji i komplementacji genów podjednostek kompleksu ACIII, badała ścieżki przenoszenia elektronów w obrębie kofaktorów hemowych tych podjednostek oraz między oksydazą aa_3 . W drugiej części Doktorantka oczyszczała ACIII z wybranych mutantów *F. johnsoniae* a także określone podjednostki ACIII ze skonstruowanych mutantów *Escherichia coli*. Wyizolowane białka posłużyły do miareczkowania optycznego hemów c ACIII a także do badania aktywności kompleksu ACIII.

Formalny opis rozprawy

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest zwięzłym i jasnym językiem, zawiera, co należy podkreślić, ładną oprawę graficzną. W całej pracy można znaleźć nieliczne literówki i drobne błędy stylistyczne. Świadczy to o staranności Doktorantki podczas przygotowywania rozprawy.

Praca jest dość obszerna, obejmuje 157 stron i zawiera 53 ryciny (2 w załącznikach) i 12 tabel (4 w załącznikach). Układ pracy jest typowy i obejmuje: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, spisy rysunków i tabel oraz - liczącą 156 pozycji - bibliografię, w większości złożoną z pozycji literaturowych opublikowanych w ostatnich 10 latach. Na końcu rozprawy umieszczono 4 załączniki a także informację, że opisane wyniki stanowiły podstawę publikacji w *Microbiology Spectrum*, w której Doktorantka jest pierwszym autorem.

Uwagi:

- W pracy występują pewne błędy redakcyjne na przykład: brak przypisanych źródeł literaturowych w niektórych fragmentach Dyskusji, niejednolity zapis pozycji literaturowych (tytułów artykułów), częsty brak większych spacji między poszczególnymi akapitami (wobec braku wcięć).

Jednakże wszystkie te niedociągnięcia, o których wspominam z obowiązku recenzenta, nie są istotne, biorąc pod uwagę wartość merytoryczną ocenianej pracy doktorskiej.

Merytoryczna ocena rozprawy

Poprzedzający część doświadczalną, liczący 20 stron Wstęp stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącej struktury i funkcjonowania oddechowego łańcucha transportu elektronów błon przekształcających energię. We Wstępie Doktorantka w sposób zwięzły opisała hemy, klastry żelazowo-siarkowe (Fe-S) i chinony oraz poszczególne reduktazy, oksydoreduktazy i oksydazy końcowe łańcucha transportu elektronów. Następnie scharakteryzowała alternatywny kompleks III (ACIII), stanowiący główny przedmiot jej badań. Opisała także zalety bakterii *F. johnsoniae* jako dogodnego układu modelowego do badań dróg/ścieżek transferu elektronów w tym kompleksie. Pisząc Wstęp Doktorantka sięgnęła do najważniejszego piśmiennictwa dotyczącego omawianych zagadnień.

Pytania/uwagi:

- Ryc. 1.14. Doktorantka porównała proponowane ścieżki transferu elektronów przez ACIII u różnych bakterii. Zabrakło porównania ścieżek transferu protonów. Co obecnie wiadomo na temat translokacji protonów w ACIII *F. johnsoniae*?
- W punkcie opisującym *F. johnsoniae* jako organizm modelowy brakuje schematu łańcucha transportu elektronów u tej bakterii. Czy dehydrogenaza bursztynianowa jest, jak to wynika z analizy tekstu, jedyną reduktazą menachinonu u *F. johnsoniae*?

Rozdziały Materiały i Metody (łącznie 33 strony) zawierają wyczerpujące i staranne opisy wykorzystywanych materiałów i stosowanych metod badawczych. Uwagę zwraca różnorodność stosowanych technik, świadcząca o wszechstronności Doktorantki w pracy doświadczalnej zarówno w technikach inżynierii genetycznej i metodach biochemicznych czy biofizycznych. Należy podkreślić, że tworząc system do manipulacji genetycznych w obrębie genów ACIII, Doktorantka opracowała 3 konstrukty do delekcji i 26 konstruktów do ekspresji głównie w *F. johnsoniae* (w tym 2 w *E. coli*).

Pytania/uwagi:

- Zastanawiają mnie określenia: „pelet” zamiast „osad” czy „nadsącz” zamiast „supernatant” stosowane w opisie izolacji błon czy białek.
- Punkt 4.25. Przygotowując próbki błon do tlenometrii EPR, otrzymane osady błon inkubowano z malonianem aby chronić miejsce katalityczne dehydrogenazy bursztynianowej przed szczawiooctanem. Skąd zagrożenie szczawiooctanem w preparatach błonowych teoretycznie bez rozpuszczalnych enzymów cyklu Krebsa?
- Punkt 4.30. Co sprawia, że białko mdA izoluje się z *E. coli* w postaci całkowicie zredukowanej?
- Brakuje punktu Analiza statystyczna, nawet jeśli tylko część otrzymanych wyników ma charakter ilościowy. Nie uwzględniono analizy statystycznej tych wyników.

W rozdziale Wyniki, który obejmuje 36 stron, Doktorantka zwięzłe przedstawiła wyniki kolejno realizowanych zadań badawczych stanowiących odpowiedzi na pytania zawarte w rozdziale Cel pracy. Na podkreślenie zasługuje sposób prowadzenia czytelnika przez poszczególne punkty wyników, które prezentowane w logicznej kolejności tworzą spójną całość.

Doktorantka opracowała system genetyczny dla bakterii *F. johnsoniae* do delekcji i komplementacji genów ACIII, co ważne z możliwością regulacji poziomu ekspresji białek z wektora plazmidowego aby zapobiec letalności bakterii. Doktorantka wykazała bowiem, że komplementacja mutantów delecyjnych ze zbyt dużą ekspresją podjednostek ActA i ActE

prowadzi do zmian letalnych. Doktorantka skonstruowała szereg mutantów tych hemowych podjednostek ACIII. Jak wynika z badań z użyciem mutantów delecyjnych, usunięcie podjednostki ActA powoduje utratę aktywności oksydazy aa_3 (akceptora elektronów z ACIII) oraz nieobecność ActE w błonach bakterii. Natomiast usunięcie podjednostki ActE nie wpływa na przenoszenie elektronów między ACIII a oksydazą końcową, co sugeruje rozdział ścieżek transferu elektronów na poziomie styku podjednostek ActA i ActE. Analiza zużycia tlenu przez mutanta ActA (ΔA) wykazała istnienie dodatkowej (obok kompleksu ACIII- aa_3 i cytochromu *bd*), niezależnej od tlenu i wrażliwej na cyjanek, ścieżki transferu elektronów utleniającej menachinol. Badania z mutantem pozbawionym ruchomej domeny ActA (*mdA*) potwierdziły, że hem *mdA* jest bezpośrednim donorem elektronów dla oksydazy aa_3 .

W drugiej części Doktorantka opisała różne metody oczyszczania kompleksu ACIII techniką chromatografii powinowactwa, w tym z wykorzystaniem mutantu z dołączoną do podjednostki ActE metką Strep. Ponadto stosując heterologiczną ekspresję w *E. coli*, Doktorantka wyizolowała i oczyściła rozpuszczalne białko ActE oraz domenę *mdA*. Miareczkowanie potencjometryczne wyizolowanych białek pozwoliło na określenie równowagowych potencjałów redoks dla hemów kompleksu ACIII, wykazując najwyższe wartości dla hemów ActE i *mdA*. Wykorzystując wyizolowane białka, Doktorantka zbadała także aktywność ACIII, mierząc reakcję *mdA* z muteiną ΔmdA oraz oksydazą aa_3 .

Pytania/uwagi:

- Rys. 5.1C (lewa strona) i Rys. 5.9. Wątpliwości budzi zestawienie dwóch wyciętych fragmentów żelu/i (?)
- Czy próbowano otrzymać podwójnego mutantu ActA i ActE ($\Delta A \Delta E$)?
- W pracy mierzono aktywność kompleksu ACIII w wyizolowanych błonach *F. johnsoniae* wykorzystując tlenometrię EPR. Czy użyteczny byłby pomiar aktywności ACIII w całych bakteriach wykorzystując elektrodę tlenową?
- Czy do badania podjednostek kompleksu ACIII-oksydaza aa_3 próbowano stosować rozdział w żelu niedenaturującym (Blue-Native PAGE)?
- Rys. 5.16. Doktorantka opisując izolację białka ΔA pisze, że „wyizolowano oksydazę aa_3 wolną od zanieczyszczeń innymi białkami z hemami *c*”. A co z widocznym hemem *b*?

Liczący 32 strony i podzielony na kilka porządkujących punktów rozdział Dyskusja w zasadzie wyczerpuje problemy wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych grup badawczych. Doktorantka solidnie i krytycznie przedyskutowała otrzymane wyniki, kończąc rozdział opisem dalszych badań, w których możliwe jest wykorzystanie skonstruowanego przez nią systemu genetycznego do delecji i komplementacji genów. Podobnie jak całość pracy, rozdział Dyskusja czyta się dobrze.

Pytania/uwagi:

- Rys. 6.2. Brakuje referencji literaturowej na podstawie, której przygotowano ten rysunek.
- Rys. 6.4. Opisując cztery proponowane ścieżki transferu elektronów z puli menachinolu, Doktorantka nie odnosi się do kwestii ich udziału w tworzeniu protonowej siły elektrochemicznej.
- Str. 119. Biorąc pod uwagę dyskusję wyników, jak wytłumaczyć większe zużycie tlenu podczas utleniania bursztynianu z cyjankiem w błonach WT (poprzez ścieżkę 3, z którą konkuruje nie zużywająca tlenu ścieżka 2) w stosunku do błon mutantu ΔA (poprzez ścieżkę 3) (Rys. 5.7)?



Podsumowanie

Wspomniane wcześniej uwagi nie mają wpływu na moją bardzo pozytywną ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Opracowany przez doktorantkę system do manipulacji genetycznych w obrębie podjednostek ACIII z *F. johnsoniae* stanowi nowe narzędzie do badania molekularnego mechanizmu działania tej oksydoreduktazy, które może być także wykorzystane do badania innych białek bakteryjnych. Wykorzystanie inżynierii genetycznej i technik biochemicznych pozwoliło na identyfikację ścieżek transferu elektronów w obrębie superkompleksu ACIII-aa₃. Biorąc pod uwagę merytoryczną wartość i nowatorskość pracy, dużą pracowitość i różnorodność doświadczeń i analiz, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr Katarzyny Lorencik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz