

Warszawa, 5.05.2024

Prof. dr hab. Adam Szewczyk

Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych

Instytut Nenckiego PAN w Warszawie, email: a.szewczyk@nencki.edu.pl

OCENA

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

Przemiany energetyczne w organizmach to jedno z tajemniczych zjawisk, które jest jednocześnie fundamentem ich prawidłowego funkcjonowania. Opis mitochondriów, dotyczy głównie ich zdolności do syntezy ATP, czyli właśnie ich funkcji energetycznej. Są one miejscem najbardziej wydajnej syntezy ATP. W latach dziewięćdziesiątych uważano, że przynajmniej na poziomie fenomenologii, proces ten został dość dobrze poznany. Była to błędna konkluzja. Był dopiero pierwszy rozdział molekularnego opisu syntezy ATP. Nadal pisane są kolejne „rozdziały”, gdzie opis przemian energetycznych jest analizowany z niezwykłą szczegółowością i dokładnością, głównie za sprawą finezyjnych technik biofizycznych i biologii molekularnej. Do takich badań wykorzystuje się nowe modele badawcze np. bakterie, które pozwalają na przeprowadzenie doświadczeń pod znaczną „molekularną kontrolą” eksperymentatora. Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr Katarzyny Lorencik wpisują się w ten nurt badawczy, który można nazwać najszerzej próbą zrozumienia molekularnych mechanizmów przemian energetycznych. Stąd temat recenzowanej rozprawy doktorskiej Katarzyny Lorencik dotyczy podstawowych zjawisk energetyki komórek, zjawisk o podstawowym znaczeniu na zrozumienia homeostazy energetycznej organizmów.

Biorąc pod uwagę stan wiedzy dotyczący molekularnych podstaw przemian energetycznych, cele rozprawy doktorskiej (które zostaną przedstawione poniżej) mgr Katarzyny Lorencik są według recenzenta w pełni zasadne i ważne.

Transport elektronów często wykorzystuje cytochromy z rodziny *bc*. Okazuje się, że pewne bakterie (nieposiadające cytochromów z rodziny *bc*) posiadają enzym tzw. alternatywny kompleks III. Katalizuje on podobne procesy jak cytochrom *bc*, ale ma inną budowę podjednostkową oraz strukturę. Dotychczasowe modele budowy pozwoliły zaproponować drogi transportu elektronów w alternatywnym kompleksie III. Szczegółowość modelu była ograniczona brakiem systemu do genetycznej modyfikacji alternatywnego kompleksu III.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej Katarzyna Lorencik podjęła się indentyfikacji ścieżek transferu elektronów w obrębie kofaktorów hemowych alternatywnego kompleksu III, przez mutagenezę genów kodujących poszczególne podjednostki alternatywnego kompleksu III (główny cel rozprawy). Jako model badawczy wybrano bakterię *Flavobacterium johnsoniae*. Powody, które skłoniły do wyboru takiego modelu badawczego to po pierwsze podatność na interwencje genetyczne oraz po drugie, obserwacja, że delecja genów alternatywnego kompleksu III nie „wygasza” całkowicie przepływu elektronów tzn. istnieją alternatywne ścieżki redoks.

Powyższy cel główny został uszczegółowiony przez doktorantkę przez sformułowanie następujących pytań (strona 35 rozprawy):

1. Czy możliwe są manipulacje genetyczne polegające na usunięciu, a następnie wprowadzeniu genów alternatywnego kompleksu III u bakterii *Flavobacterium johnsoniae*?
2. Czy usunięcie podjednostki ActA uniemożliwi złożenie się kompleksu alternatywnego III i będzie letalne dla bakterii?
3. Czy usunięcie podjednostki ActE uniemożliwi transfer elektronów pomiędzy alternatywnym kompleksem III a oksydazą aa_3 ?
4. Czy ruchoma domena ActA jest bezpośrednim donorem elektronów dla oksydazy aa_3 ?

5. Czy wykorzystując uzyskane mutanty możliwe będą bezpośrednie pomiary aktywności enzymatycznej alternatywnego kompleksu III?

Rozprawa doktorska Katarzyny Lorencik została wykonana na Uniwersytecie Jagiellońskim, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii w Zakładzie Biofizyki Molekularnej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Artura Osyczki oraz dr Roberta Ekierta. Badania opisane w pracy doktorskiej był finansowane przez projekt Preludium 20 z Narodowego Centrum Nauki. Warto tu podkreślić, że badania właściwości redoks w kompleksach białkowych w grupie badawczej prof. Artura Osyczki są prowadzone, z dużymi sukcesami, od wielu, wielu lat.

Praca doktorska została przygotowana w formie tzw. monografii opisującej przeprowadzone badania. Prezentowaną rozprawę Katarzyny Lorencik otwiera Streszczenie (także w języku angielskim), następnie w pierwszych rozdziałach opisano właściwości klastrów żelazowo-siarkowych oraz chinonów. Następnie opisano budowę łańcucha transportu elektronów. W kolejnym rozdziale przedstawiono alternatywny kompleks III. Wstęp bardzo dobrze wprowadza czytelnika do tematyki rozprawy doktorskiej. Pewne zastrzeżenia recenzent pragnie wyrazić w stosunku do rysunków we Wstępie. I tak np. Rysunek 1.1 wymaga od czytelnika pewnej wyobraźni co przedstawiają poszczególne elementy ilustracji. Podobną uwagę można wyrazić wobec rysunku 1.3.

Kolejny rozdział opisuje cel pracy, materiały i metody. Następnie omówiono otrzymane w czasie realizacji rozprawy wyniki. W końcowym rozdziale uzyskane wyniki zostały przedyskutowane. Ostatnie rozdziały to podsumowanie, spis rysunków, tabel i literatury. Pewne informacje dotyczące badań umieszczono w załącznikach.

Doświadczenia będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone głównie z wykorzystaniem technik biologii molekularnej i biochemicznych: hodowla bakterii, oczyszczanie DNA, PCR, delecja genów, tlenometria błon bakteryjnych, miareczkowanie potencjometryczne, elektroforeza SDS-PAGE. Opis wykorzystywanych technik wg. recenzenta jest prawidłowy i wyczerpujący.

W ramach rozprawy doktorskiej Katarzyny Lorencik opracowano system genetyczny dla bakterii *Flavobacterium johnsoniae* do delecji i komplementacji genów alternatywnego kompleksu III z możliwością regulacji poziom ekspresji białek z wektora plazmidowego. Wykorzystując ten system skonstruowano szereg mutantów podjednostek hemowych alternatywnego kompleksu III. Zaprezentowano również metody oczyszczania alternatywnego kompleksu III z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, wykorzystując mutantą z przyłączoną metką Strep do jednej z podjednostek kompleksu.

Przeprowadzone eksperymenty w ramach rozprawy doktorskiej Katarzyny Lorencik pozwoliły na następujące konkluzje (strona 133 rozprawy):

1. Zbyt wysoka ekspresja białka ActA lub ActE prowadzi do śmierci bakterii.
2. Komplementacja mutantów delecyjnych wymaga dostosowania siły promotora ekspresjonowanego genu.
3. Brak podjednostki ActA powoduje brak obecności ActE w błonach bakterii.
4. Usunięcie podjednostki ActA skutkuje utratą aktywności oksydazy aa_3 (partnera redoks alternatywnego kompleksu III u *Flavobacterium johnsoniae*).
5. Podjednostka ActE nie jest niezbędna do przenoszenia elektronów między alternatywnym kompleksem III a oksydazą aa_3 .
6. Podczas transferu elektronów w obrębie alternatywnego kompleksu III prawdopodobnie następuje rozdział ścieżek transferu elektronów na poziomie piątego hemu podjednostki ActA.
7. *Flavobacterium johnsoniae* wykorzystuje co najmniej trzy niezależne ścieżki do utleniania puli menachinonu: z udziałem alternatywnego kompleksu III, cytochromu *bd* oraz dodatkowej, niezależnej od tlenu i wrażliwej na cyjanek, ścieżki transferu elektronów.
8. Domena mdA jest bezpośrednim donorem elektronów dla oksydazy aa_3 .
9. Hemy ActE oraz mdA posiadają najwyższe równowagowe potencjały redoks spośród wszystkich hemów alternatywnego kompleksu III.

Podsumowując. Badania opisane w rozprawie doktorskiej Katarzyny Lorencik dotyczą ważnego zagadnienia bioenergetycznego. Wyniki przedstawione w publikacji będącej podstawą rozprawy doktorskiej Katarzyny Lorencik uważam za ciekawe i ważne dla zrozumienia mechanizmów przepływu elektronów w białkach redoks. Jestem głęboko przekonany, że otrzymane wyniki poszerzają naszą wiedzę o procesach generowania energii w system biologicznych. Wyniki rozprawy doktorskiej opublikowano w bardzo dobrym czasopiśmie z tzw. Impact Factor:

Lorencik, K., Ekiert, R., Zhu, Y., McBride, M. J., Gennis, R. B., Sarewicz, M., & Osyczka, A. (2021). The Monoheme c Subunit of Respiratory Alternative Complex III Is Not Essential for Electron Transfer to Cytochrome aa_3 in *Flavobacterium johnsoniae*. *Microbiology spectrum*, 9(1), e0013521. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00135-21>

Jak każda praca eksperymentalna, wyjaśniając pewne zjawiska, jednocześnie inspiruje do nowych pytań. Czas więc na komentarze i uwagi krytyczne recenzenta dotyczące wykonanych doświadczeń jak i przygotowanej rozprawy doktorskiej:

1. Pytanie dotyczące wykorzystywanego modelu badawczego. Do jakiego stopnia otrzymane wyniki dotyczące alternatywnego kompleksu III można „ekstrapolować” na inne systemy redoks w bakteriach?
2. Pytanie dotyczące „tlenometrii błon bakteryjnych”. Dlaczego w tych pomiarach wykorzystano technikę elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)? Czy inne metody pomiarowe nie byłyby prostsze?
3. Do jakiego stopnia wykorzystywane w rozprawie tzw. manipulacje genetyczne białek redoks w bakteriach wpływają na zmiany ekspresji (proteom) innych białek bakteryjnych?
4. Pytanie dotyczące otrzymywania oczyszczonego alternatywnego kompleksu III. Dlaczego wykorzystano kopolimer SMA a nie klasyczny detergent. Jakie są zalety wykorzystania kopolimeru w przeprowadzonych doświadczeniach?
5. Jak wygląda kwestia obecności reaktywnych form tlenu (ROS) w badanych układach bakteryjnych?
6. Na stronie 19 rozprawy doktorantka przedstawia informacje o pojawieniu się ubichinonu i menachinonu (w kontekście ewolucyjnym). Czy można prosić po wyjaśnienie chemicznej

„ewolucji” tych cząsteczek. Dlaczego nastąpiło (w jaki sposób?) zastąpienie menachinonu przez ubichinon?

7. Na zakończenia pytanie, które wynika z obserwacji poczynionych w badania mitochondriów. Otóż okazuje się, że białka łańcucha oddechowego mitochondriów mogą oddziaływać z innymi białkami, które bezpośrednio nie są zaangażowane w reakcje redoks. Czy podobne zjawisko było obserwowane w bateryjnych modelach?

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Lorencik jest napisana bardzo dobrze, otrzymane wyniki opublikowane w czasopiśmie z IF są bardzo interesujące a zgłoszone uwagi i komentarze recenzenta nie rzutują na moją ogólnie bardzo pozytywną ocenę pracy. Autorka wykazuje dobrą orientację w zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami).

Wnioskuje zatem, do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, o uznanie pracy mgr Katarzyny Lorencik za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie mgr Katarzyny Lorencik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Warszawa, 5 maj 2024 r.

(Prof. dr hab. Adam Szewczyk)