



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biochemii i Biologii Komórki
Uniwersytetu Rzeszowskiego

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Daniela Brody pt. „Badanie zdolności szczepów drożdży *Ogatea (Hansenula) polymorpha* z nadprodukcją flawoprotein – produktów genów *CYB2* i *DLD1* – do detoksykacji chromianu i D-mleczanu”

Biodetoksykacja substancji toksycznych jest istotnym i aktualnym problemem współczesnej biologii i biotechnologii. Rozprawa doktorska mgr Daniela Brody jest elementem tego nurtu badań, mającego – oprócz znaczenia poznawczego – perspektywy praktycznych zastosowań w diagnostyce, ochronie środowiska i medycynie. Celem badań podsumowanych w rozprawie było poszukiwanie sposobów detoksykacji dwu toksyn: chromianu i D-mleczanu z użyciem drożdży - nadproducentów enzymów: flawocytochromu b_2 (zdolnego do selektywnego utleniania L-mleczanu) i oksydoreduktazy D-mleczanu oraz wytwarzanych przez nie białek.

Rozprawa doktorska mgr Daniela Brody ma klasyczny układ. Rozpoczyna ją *Wstęp*, w którym Doktorant przedstawia drożdże metylotroficzne, omawia drożdżowe oksydoreduktazy L- i D-mleczanu (flawocytochrom b_2 i oksydoreduktazę D-mleczanu), metabolizm mleczanu u człowieka oraz chrom jako mikroelement i substancję toksyczną. Szczególne ciekawe jest krytyczne podsumowanie danych piśmiennictwa dotyczących kontrowersyjnego zagadnienia postulowanej przez wielu autorów roli chromu jako niezbędnego mikroelementu, o korzystnym działaniu metabolicznym, zwłaszcza enigmatycznego „czynnika tolerancji glikozy” (*glucose tolerance factor*). *Wstęp* jest ogólnie dobrym wprowadzeniem w część doświadczalną rozprawy i mógłby stać się podstawą przynajmniej jednego artykułu przeglądowego, do którego napisania zachęcam Autora rozprawy nie tylko w uznaniu dla użytecznego opracowania danych piśmiennictwa, ale także ze względu, który przedstawię w dalszej części recenzji.

Szczegółowo sprecyzowany *Cel pracy* obejmuje, oprócz aspektu sformułowanego zwięźle powyżej, także charakterystykę fizyko-chemiczną biokompleksów Cr(III) oraz ocenę działania tych biokompleksów *in vivo* (ich wpływu na wybrane parametry fizjologiczne i biochemiczne szczurów). Cele pracy uważam za szerokie (może nawet nieco zbyt rozległe?) i niewątpliwie ambitne.

Materiały i metody przedstawione są w zasadzie należycie szczegółowo. Budzi uznanie szeroki zakres metod biologii molekularnej, metod preparatywnych i analitycznych zastosowanych w pracy; naliczyłem 69 szczegółowych procedur opisanych w tym rozdziale rozprawy. Daje to wyobrażenie o ogromie włożonej pracy i rozległości warsztatu

badawczego opanowanego przez Doktoranta w trakcie realizacji rozprawy. Drobne uwagi krytyczne pod adresem tej części rozprawy: pewien niedosyt budzi np. opis metody izolowania biokompleksów Cr(III) (s. 78). Wprawdzie Autor rozprawy podaje odnośniki do odpowiednich publikacji, jednak ten opis nie zaspokaja natychmiastowej ciekawości Czytelnika nie mającego dostępu do materiałów źródłowych. Nie jest też jasne, gdzie (w jakiej zwierzętarni) przeprowadzone były doświadczenia na zwierzętach.

Wyniki, opisane w sposób ogólnie odpowiedni i należycie szczegółowy, są relacją ze żmudnych zmagañ Doktoranta z mikroorganizmami i produktami ich metabolizmu, nie zawsze uwieńczonych powodzeniem - co jest, niestety, nieodłączną cechą autentycznej pracy badawczej. Eukariotyczne systemy ekspresyjne oparte na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces lactis* dla ekspresji, odpowiednio, białka fuzyjnego zawierającego sekwencje białka yEGFP, dehydrogenazy D-mleczanu z drożdży *Hansenula polymorpha* i znacznika (His)₆ tag oraz dehydrogenazy D-mleczanu z *Hansenula polymorpha* nie pozwoliły na uzyskanie aktywnych enzymatycznie białek i uzyskanie fluorescencji białka w transferowanych komórkach jest słabym pocieszeniem (tym bardziej, że nie sprawdzono, co dokładnie daje tę fluorescencję). Nie udało się zidentyfikować składu i struktury biokompleksów Cr(III), ale nie udało to się dotychczas wielu badaczom i oczekiwanie, że badania Doktoranta rozwiążą ten problem, byłoby zbyt daleko optymizmem. Badania podsumowane w rozprawie przyniosły jednak szereg oryginalnych i wartościowych wyników. Za najciekawsze z nich uważam wykazanie (i) oksydacyjnej detoksykacji D-mleczanu przez komórki szczepu tr6 drożdży *H. polymorpha* z nadekspresją dehydrogenazy D-mleczanu, (ii) możliwości otrzymania D-mleczanu z mieszaniny racemicznej poprzez enzymatyczne utlenianie L-mleczanu katalizowane przez flawocytochrom *b₂* wyizolowany z drożdży *H. polymorpha*, (iii) bezpośredniej redukcji chromianu do Cr(III) przez flawocytochrom *b₂* w obecności L-mleczanu jako donora elektronów, (iv) zdolności drożdży *H. polymorpha* tr1 z nadekspresją flawocytochromu *b₂* do wydajnej redukcyjnej bioremediacji chromianu, zewnątrzkomórkowej redukcji chromianu i chelatowania powstającego chromu(III) z wytworzeniem tiokompleksów Cr(III) w podłożu hodowlanym, (v) antyoksydacyjnych właściwości tiokompleksów Cr(III) i (vi) pozytywnego efektu fizjologicznego tych kompleksów podawanych szczurom w postaci obniżenia stężenia glukozy we krwi oraz (vii) zastosowanie jednoetapowej procedury oczyszczania białka fuzyjnego zawierającego flawocytochrom *b₂*, wytwarzanego w systemie prokariotycznym (*E. coli*) tworzącego ciała inkluzyjne, dla uzyskania enzymatycznie aktywnej formy tego białka.

Wysoko oceniając wyniki uzyskane w badaniach, z obowiązku recenzenta chcę podzielić się kilkoma refleksjami polemicznymi pod ich adresem. Moim zdaniem niektóre fragmenty opisu wyników winny znaleźć się raczej w *Dyskusji* niż w tej części pracy (to pochodna poglądu, że opis wyników powinien być możliwie lapidarny i nie zawierający elementów interpretacji, a kluczem do ich zrozumienia dla Czytelnika, który nie potrafi ich samodzielnie zinterpretować, jest *Dyskusja*). Dla odmiany, *Dyskusja* nie powinna już pokazywać nowych wyników.

Czy zasadne było użycie błękitu Nilu jako mediatora transferu elektronów skoro jego standardowy potencjał redoks jest bardzo niski, dużo niższy niż standardowy potencjał redoks rdzenia cytochromu b_2 ? Doktorant wykazał podwyższenie poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach *H. polymorpha* traktowanych chromianem. Czy przeprowadzone było doświadczenie kontrolne dotyczące możliwości bezpośredniego utlenienia stosowanej sondy fluorogennej przez chromian? Kilka tabeli przedstawia wartości pojedyncze zamiast średniej i odchylenia standardowego (np. tab. 6-9,11). Czy oznacza to, że eksperymenty te nie były powtarzane? Analogiczna uwaga nasuwa się w odniesieniu do wartości K_m pokazanej na Ryc. 30. Frapujące są wyniki oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej biokompleksów Cr(III) (Tab. 12). Zazwyczaj aktywność jest wyższa w teście redukcji ABTS* niż w teście redukcji jonów Fe(III); wyniki przedstawione w Tabeli sugerują swoisty mechanizm aktywności antyoksydacyjnej, zasługujący na dalsze badania.

Obszerna, 25-stronicowa *Dyskusja* krytycznie analizuje uzyskane wyniki na tle danych piśmiennictwa. Ta część pracy wystawia dobre świadectwo dojrzałości naukowej Doktoranta. Drobną uwagę polemiczną: czy zwiększenie rozmiarów cząsteczki białka enzymatycznego może tłumaczyć utratę jego aktywności enzymatycznej (s. 123)?

Kolejną częścią rozprawy to *Wnioski* i *Podsumowanie*. Doktorant formułuje 12 wniosków; jak zwykle to bywa, nie wszystkie z nich to wnioski *sensu stricto* (np. „wniosek” 8 relacjonujący, co badano). Rozprawa zaopatrzona jest w podsumowanie w języku angielskim i *Wykaz skrótów* rozpoczynający pracę. Ten ostatni wydaje się nieco zbyt skromny i nie zawiera szeregu skrótów stosowanych w pracy. Bogate piśmiennictwo zajmuje 26 stron tekstu.

Pewną słabością pracy jest strona językowa. Niestety, praca obfituje w błędy stylistyczne, niekiedy powtórzenia, niespójności gramatyczne i literówki. Zapewne wynika to z pośpiechu wymuszonego terminem złożenia i obrony. Nie chcę podawać w recenzji listy takich błędów, omówiłem je z Doktorantem. Kilka przykładów „ku przestrodze”. Autor nie zawsze przestrzega zasady, by przy pierwszym użyciu skrótu podać pełną nazwę białka kryjącego się za tym skrótem (np. FC). Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego (*superoxide radical anion*), nie zaś „anionu rodniaka nadztlenkowego” (s. 142). Nie zgadzę się ze sformułowaniem, że ksenobiotyki to „produkty przemysłowej działalności człowieka”. Symbol „angstrem” powinien być pisany jako Å, nie jako A (s. 19). Tym bardziej chciałbym więc zasugerować Doktorantowi napisanie artykułu przeglądowego w języku polskim, co winno być okazją do ćwiczenia poprawności językowej. Za czasów mojej młodości prawie nieodzowne było przejście przez szkołę nieodżałowanej pamięci Prof. Zofii Zielińskiej, redaktora naczelnego *Postępów Biochemii*, która bezbłędnie wyłowiła każdą nieścisłość, niewłaściwe sformułowanie i błąd w artykule przeglądowym składanym do tego czasopisma. Swego czasu, przeglądając Jej naniesione ołówkiem uwagi do prawie każdego zdania swojego manuskryptu rozumiałem, że artykuł przeglądowy musi być do bólu logiczną, bezbłędną konstrukcją, w której każde zdanie musi logicznie wiązać się z

poprzednim i następnym i w którym nie ma miejsca na błędy merytoryczne, ortograficzne, gramatyczne czy jakiegokolwiek inne. To winno dotyczyć również rozpraw doktorskich. Chyba nie ma już dziś redaktorów, którzy całe serce wkładaliby w życzliwą krytykę i nauczanie, jak pisać w języku polskim – ale winni przynajmniej częściowo spełnić takie zadanie.

W podsumowaniu, mimo pewnych drobnych w ostatecznym rozliczeniu uwag krytycznych wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Daniela Brody i uważam, że zawiera ona oryginalne i cenne wyniki, które mogą stanowić podstawę praktycznych zastosowań dotyczących usuwania szkodliwego metabolitu jakim jest D-mleczan i bioremediacji chromianu, a także zawiera nowe dane dotyczące tiokompleksów chromu i jest niewątpliwym osiągnięciem naukowym Doktoranta i Jego Promotora.

Z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Daniela Brody do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

Rzeszów, 12 marca 2015 r.