Dr hab. Krzysztof Gibasiewicz, prof. UAM
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Fizyki
Zakład Biofizyki Molekularnej

Poznań, 15 października 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Bujnowicza pt. „Semichinon sprzężony z klastrem żelazowo-siarkowym jako nowy element w mechanizmie działania i regulacji białek z rodziny cytochromów *bc*".

W pracy badano semichinon sprzężony z klastrem żelazowo-siarkowym obserwowany przejściowo w miejscu Q_O dwóch białek z rodziny cytochromów *bc*. Te białka to cytochrom bc_1 wyizolowany z bakterii purpurowej *Rhodobacter capsulatus* oraz fotosyntetyczny cytochrom b_6f ze szpinaku.

Wiadomo, że białka z rodziny cytochromów *bc* pełnią zasadniczą rolę w generowaniu potencjału elektrochemicznego w poprzek błon fotosyntetycznych i mitochondrialnych, a tym samym w przetwarzaniu energii w komórkach. Mimo wielu lat badań i znajomości ogólnego schematu funkcjonowania, wiele istotnych aspektów działania tych białek pozostaje niezrozumiałych. Praca doktorska, eksploatując badawczo zjawisko przejściowego tworzenia semichinonu w miejscu Q_O, zawiera wiele cennych obserwacji, które przybliżają do pełnej odpowiedzi na zasadnicze pytanie, jak działają białka z rodziny cytochromów *bc*. Wyniki zawarte w pracy sugerują, że semichinon sprzężony z pobliskim klastrem żelazowo-siarkowym w miejscu Q_O stanowi ważny element w mechanizmie działania i regulacji cytochromów *bc*, a w szczególności: (1) zapobiega powstawaniu szkodliwego anionorodnika ponadtlenkowego, (2) w powiązaniu ze stanem redoks cytochromu b_H jest istotnym czynnikiem regulującym przepływ elektronów wewnątrz cytochromów *bc*.

Praca podzielona jest na osiem rozdziałów. Po wstępie zawierającym niezbędne podstawowe informacje nt. budowy, właściwości spektroskopowych i funkcjonowania cytochromów bc_1 i b_6f oraz nt. zjawiska EPR i oddziaływania wymiennego, w rozdziale 2. sformułowano zasadniczy cel pracy jako „poznanie właściwości i mechanizmów powstawania semichinonu w miejscu Q_O..." oraz dziewięć celów szczegółowych. W dwudziestu podrozdziałach rozdziału 3. pt. „Materiały i metody" opisano pokrótce jak hodowano bakterie i izolowano z nich kompleksy bc_1 oraz jak przeprowadzano liczne doświadczenia (bio)chemiczne, optyczne i magnetyczne (EPR). Na szczególną uwagę zasługuje podrozdział 3.17 na str. 46-47 opisujący autorski układ (typu „stopped-flow-freeze-

ul. Umultowska 85, Collegium Physicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 51 50, +48 61 829 52 02, fax. +48 61 829 51 55
dziekfiz@amu.edu.pl
www.fizyka.amu.edu.pl

quench") służący do kontrolowanego mieszania i inkubacji trzech roztworów i umożliwiający przygotowanie próbek do jednoczesnych stacjonarnych pomiarów absorpcji i pomiarów kinetycznych z zastosowaniem spektroskopii EPR. Mgr Łukasz Bujnowicz jest również autorem oprogramowania opisanego w podrozdziale 3.20 pt. „Symulacje stochastyczne", które opiera się na złożonym modelu matematycznym funkcjonowania białek z rodziny *bc* i służy do całościowego, choć uproszczonego oglądu reakcji zachodzących w tych białkach.

Najobszerniejszy i najważniejszy jest rozdział 4. zawierający bardzo ciekawe wyniki prac doświadczalnych i symulacji komputerowych. Jest on podzielony na siedem podrozdziałów, z których każdy zawiera wiele interesujących obserwacji i ich wstępnych interpretacji. Każdy z nich wymaga osobnej uwagi i oceny.

W podrozdziale 4.1 pt. „Identyfikacja stanów wolnorodnikowych w miejscu Q_O na widmie EPR" (str. 54) pokazano szereg widm fali ciągłej EPR wykazując przejściowy charakter sygnału SQ-FeS przy g = 1,945 (dla pasma X i 1,964 dla pasma Q) pochodzącego od semichinonu sprzężonego z klastrem żelazowo-siarkowym w miejscu Q_O kompleksu bc_1 (1) izolowanego oraz (2) osadzonego w błonach fotosyntetycznych. To właśnie te widma stanowią podstawową obserwację pracy, w której dalej opisane są inne doświadczenia zmierzające do wyjaśnienia właściwości i mechanizmów powstawania tego semichinonu. Moje pierwsze pytanie zrodziło się przy analizie rys. 4.1 (str. 54), w którego komentarzu zabrakło wyjaśnienia skąd wziął się sygnał przy polu magnetycznym ok. 3 350 G w eksperymencie kontrolnym z miejscem Q_O zainhibowanym myksotiazolem (widmo fioletowe). W próbce zainhibowanej antymycyną (w miejscu Q_i; widmo szaro-niebieskie) sygnał ten został przypisany SQ-FeS w miejscu Q_O (str. 55, linia 3), które w próbce kontrolnej powinno być zajęte przez myksatiazol. Warto zwrócić uwagę, że podobny, choć mniejszy sygnał pojawia się w warunkach równowagi zarówno przy zastosowaniu pasma X jak i Q (str. 58, rys. 4.5, panel prawy) a także w późniejszych wynikach (np. na str. 72 na rys. 4.13, panel prawy). Jak można go wyjaśnić? Czy może on pochodzić od semichinonu w miejscu Q_O nie sprzężonego z klastrem FeS? Jaka może być relacja między tym sygnałem a sygnałem wolnorodnikowym obserwowanym w temperaturze 200 K (rys. 4.3 i 4.4)? Ponadto mam pytanie natury ogólniejszej. Czy DBH_2 i DPH_2 są równie „dobrymi" substratami dla cytochromów bc_1 i b_6f, jak ich naturalne odpowiedniki? Czy użycie rozpuszczalnych w wodzie chinoli zamiast naturalnych nie wpływa na otrzymane wyniki?

W podrozdziale 4.2, pt. „Wpływ wybranych mutacji na powstawanie SQ-FeS" (str. 61) zaprezentowano bardzo ciekawe wyniki przebiegów kinetycznych sygnałów EPR semichinonu, semichinonu sprzężonego z klasterm FeS, zredukowanej formy FeS oraz utlenionego cytochromu *c* dla białek bc_1 z dzikiego szczepu oraz kilku zmutowanych szczepów *Rba. capsulatus* (str. 64, rys. 4.8 i 4.9). W muteinach, oddziaływanie pomiędzy semichinonem w miejscu Q_O a klastrem FeS

ul. Umultowska 85, Collegium Physicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 51 50, +48 61 829 52 02, fax. +48 61 829 51 55
dziekfiz@amu.edu.pl
www.fizyka.amu.edu.pl

zostało ułatwione (przez bardziej lub mniej trwałe przybliżenie białka FeS do miejsca Q_O; szczepy +1Ala, +2Ala), utrudnione (przez odsunięcie białka FeS do miejsca Q_O; szczep G167P), lub zakłócone przez kombinacje powyższych mutacji (rys. 4.8). Omawiając przebiegi kinetyczne, Autor zauważa dużą wydajność tworzenia stanu SQ-FeS (kilkadziesiąt %) oraz zwraca uwagę na niskie tempo redukcji cytochromu *c* przez enzym (str. 63 na samej górze). Mnie natomiast zastanawia, dlaczego Autor nie rozważa możliwości bezpośredniej redukcji cytochromu *c* przez chinol podczas inkubacji przed zamrożeniem próbek. Przy stosowanych wyjściowych stężeniach cytochromu *c* oraz chinolu DBH_2 (380 μM) i potencjałach redoks obu związków (odpowiednio 300 i 70 mV) oczekiwałbym wydajnej redukcji cytochromu *c* przez DBH_2 z pominięciem enzymu. (Podobny problem pojawia się w doświadczeniu opisanym w podrozdziale 4.3.3 na stronie 75, gdzie cytochrom *c* zastąpiono jeszcze silniejszym utleniaczem – żelazicyjankiem potasu.) W innym miejscu Autor zauważa, że „sygnał wolnorodnikowy jest zawsze pozytywnie skorelowany z sygnałem SQ-FeS." i dalej, że „Wynik ten nie jest zgodny z koncepcją mówiącą, że semichinon w miejscu Q_O nieoddziałujący z FeS jest źródłem sygnału wolnorodnikowego [98]" (str. 63, dolny akapit). Wracam do pytania z poprzedniego akapitu: czy ta interpretacja Autora nie kłóci się z obserwacją sygnału przy $g \approx 2$ na rys. 4.5 (prawy) pomimo zaniku sygnału przy $g = 1{,}945$ pochodzącego od SQ-FeS? Podrozdział 4.2 kończą interesujące wnioski: (1) pomimo wspomnianej korelacji, „sygnał SQ-FeS oraz sygnał wolnorodnikowy pochodzą od innych centrów paramagnetycznych" oraz „sygnał wolnorodnikowy pochodzi od semichinonu, który w pewien sposób jest stabilizowany przez FeS, natomiast nie oddziałuje z nim wymiennie dostatecznie mocno by dawało to obraz na widmie EPR" (podrozdział 4.2.3, str. 67); (2) stan SQ-FeS zapobiega produkcji anionorodnika ponadtlenkowego (wniosek z rys. 4.11 przedstawiającego negatywną korelację między zmierzonym przez Autora poziomem sygnału EPR SQ-FeS a literaturowymi wartościami produkcji anionorodnika dla tych samych mutein); (3) maksymalny obserwowany poziom sygnału SQ-FeS w warunkach beztlenowych nie jest wyższy niż w warunkach tlenowych, podczas gdy wedle powszechnego przekonania tlen odbiera elektron z semichinonu i można by oczekiwać wyższego sygnału SQ-FeS w warunkach beztlenowych.

W podrozdziale 4.3 pt. „Mechanizm zaniku oraz czas życia stanu SQ-FeS" opisano eksperymenty związane z badaniem zaniku stanu SQ-FeS za pomocą zarówno EPR jak i pomiarów absorpcji stacjonarnej w funkcji czasu. Najpierw elegancko wykazano, że zredukowany klaster FeS nie może opuścić miejsca Q_O, dopóki jest on związany z SQ tworząc stan SQ-FeS (str. 72, rys. 4.13). W celu określenia górnego limitu średniego czasu życia pojedynczego stanu SQ-FeS wykonano bardzo pomysłowy, w mojej ocenie, eksperyment, polegający na pomiarze czasu zaniku sygnału SQ-FeS po dodaniu azoksytrobiny – inhibitora miejsca Q_O (str. 74, rys. 4.15). Założono przy tym, ze

ul. Umultowska 85, Collegium Physicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 51 50, +48 61 829 52 02, fax. +48 61 829 51 55
dziekfiz@amu.edu.pl
www.fizyka.amu.edu.pl

zmierzony czas jest sumą (1) czasu wiązania azoksytrobiny do cytochromu bc_1, który zmierzono w osobnym doświadczeniu (rys. 4.14) oraz (2) czasu życia stanu SQ-FeS. W efekcie oszacowano czas życia SQ-FeS na kilka do 100 ms, zauważono, że jest on podobny do czasu narastania tego stanu (str. 64, rys. 4.8), co ma uzasadniać ~50% obsadzenie białka tym stanem w maksimum jego sygnału. W ostatnim podrozdziale 4.3.3 wywnioskowano z doświadczeń z azoksytrobiną (str. 77, rys. 4.17), że początkowo zredukowany przez chinol hem b_H ulega, w zainhibowanym antymycyną cytochromie bc_1, spontanicznej reoksydacji z czasem zbliżonym do czasu zaniku sygnału SQ-FeS. Na tej podstawie zaproponowano, że proces spontanicznej reoksydacji cytochromu b_H jest istotnym procesem współodpowiedzialnym za zanik stanu SQ-FeS. W odniesieniu do pomiaru stężenia zredukowanego hemu c_1 (str. 78-79, rys. 4.19), mierzonego równolegle z pomiarem stężenia zredukowanego hemu b_H, intryguje mnie źródło pochodzenia nieenzymatycznej redukcji tego kofaktora. Autor nie zwarł w pracy żadnych sugestii na ten temat.

W podrozdziale 4.4 pt. „Weryfikacja stanu redoks hemu b_L" połączono pomiar widm fali ciągłej EPR z pomiarem relaksacji FeS metodą impulsową, celem weryfikacji stanu redoks hemu b_L w zainhibowanym antymycyną cytochromie bc_1 typu dzikiego i muteinie +2Ala (w której klaster FeS był na stałe unueruchomiony w miejscu Q_O). W obu przypadkach pomiary widm fali ciągłej EPR wyraźnie pokazują, że hem b_L pozostaje całkowicie utleniony, zarówno w czasie gdy występuje stan SQ-FeS, jak i po jego zaniku (w stanie równowagi), natomiast hem b_H jest zredukowany, gdy jest obserwowany stan SQ-FeS, i ulega utlenieniu wraz z zanikiem tego stanu (str. 82, rys. 4.21). W eksperymencie impulsowym, również dla obu próbek widać duże przyspieszenie zaniku echa spinowego spowodowane oddziaływaniem SQ-FeS z utlenionym hemem b_L i mniejsze – spowodowane oddziaływaniem FeS z utlenionym hemem b_L (po zaniku stanu SQ-FeS) w porównaniu ze stanem, w którym hem b_L jest sztucznie zredukowany ditionianem (str. 81-82, rys. 4.20 i 4.22). Obserwacja, że w zainhibowanym antymycyną cytochromie bc_1, zarówno w warunkach nierównowagowych jak i równowagowych hem b_L jest stale utleniony, jest ważną informacją, choć nie całkiem zgodną z większością teorii, istotną dla modelowania zaprezentowanego w rozdziale 4.5.

Liczne obserwacje doświadczalne opisane w podrozdziałach 4.1-4.5 zainspirowały Autora do stworzenia modelu funkcjonowania cytochromu bc_1, przedstawionego w rozdziale 4.5 pt. „Model stochastyczny cytochromu bc_1". Jak sam Autor zauważa jest to model, który (1) jest uproszczony, (2) ma kilka założeń, które nie muszą być ściśle poprawne, (3) ma wiele parametrów, których część ma nieznane wartości, więc zostały one przyjęte w sposób arbitralny. Mimo to, szereg wyników eksperymentalnych zostało jakościowo poprawnie odtworzonych w modelu. Najpierw dość wiernie odtworzono przebiegi kinetyczne stanów SQ-FeS, zredukowanego FeS oraz utlenionego cytochromu c w cytochromie bc_1 z dzikiego szczepu inhibowanym antymycyną – wyniki doświadczalne

ul. Umultowska 85, Collegium Physicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 51 50, +48 61 829 52 02, fax. +48 61 829 51 55
dziekfiz@amu.edu.pl
www.fizyka.amu.edu.pl

pokazano na rys. 4.8 (str. 64), a wyniki modelowania – na rys. 4.23 (str. 90). Dodatkowo potwierdzono jakościowo obserwacje opisane w podrozdziałach 4.3 i 4.4: reoksydację zredukowanego hemu b_H po zaniku stanu SQ-FeS oraz ciągły stan utlenienia hemu b_L. Ponadto, zerując wybiórczo prawdopodobieństwa odpowiednich reakcji wykazano, że model nie prowadzi do istotnych różnic wyników dla dwóch dyskutowanych w literaturze mechanizmów tworzenia stanu SQ-FeS: mechanizmu częściowego utleniania i mechanizmu częściowej redukcji. W innej symulacji, modyfikując prawdopodobieństwa przejść pomiędzy trzema położeniami klastra FeS, udało się odtworzyć trend przebiegów kinetycznych powyższych stanów w trzech muteinach o zróżnicowanej ruchomości i różnych preferowanych położeniach klastra FeS (por. rys. 4.8 i rys. 4.24 na str. 92). Z kolei, wyniki eksperymentalne przedstawione w rozdziale 4.3 na rys. 4.17-4.19 (str. 77 i 79) dla (niezmodyfikowanego genetycznie) zainhibowanego antymycyną cytochromu bc_1, ukazujące wpływ dodania azoksytrobiny na kinetyki cytochromów b, c_1 oraz stanu SQ-FeS, zostały w miarę poprawnie odtworzone w symulacji. Jestem ciekaw, czy dobrze zrozumiałem z opisu, że dodanie azoksytrobiny było modelowane poprzez zablokowanie miejsca Q_O (czyli zerowanie prawdopodobieństw odpowiednich reakcji) po jego opuszczeniu przez chinon, ale nie wcześniej niż 0,5 s po rozpoczęciu symulacji. Przedostatnia opisana symulacja potwierdziła brak wpływu dodania nadmiaru utleniacza na stan SQ-FeS (por. rys. 4.13, lewy panel, z rozdziału 4.3 i rys. 4.26, prawy panel na str. 95). Na koniec przedstawiono wyniki symulacji dla nieinhibowanego cytochromu bc_1, demonstrując praktycznie brak tworzenia się stanu SQ-FeS i bardzo szybką redukcję cytochromu c, zgodnie z obserwacjami eksperymentalnymi. Obserwowana jakościowa zgodność wyników symulacji z eksperymentami daje podstawę, aby uznać model za użyteczne narzędzie stworzone przez Autora, które może, po dalszych udoskonaleniach, być dalej stosowane w badaniach białek z rodziny cytochromów *bc*.

W podrozdziale 4.6 pt. „Stan SQ-FeS w cytochromie b_6f " są pokazane ciekawe wyniki doświadczeń optycznych i EPR przekonujące, że w cytochromie b_6f, podobnie jak w cytochromie bc_1, dochodzi do tworzenia stanu SQ-FeS, ale w przeciwieństwie do tego drugiego, nie jest do tego potrzebna inhibicja miejsca Q_i.

W ostatnim podrozdziale 4.7 pt. „Wpływ podniesienia potencjału redoks chinolu na stan SQ-FeS" zaobserwowano i po raz pierwszy zidentyfikowano stan SQ-FeS zarówno w cytochromie bc_1 jak i w cytochromie b_6f, w których zamiast stosowanych wcześniej chinoli, zbliżonych do naturalnych, zastosowano dibromotymochinon (DBMIB) – chinon o znacznie wyższym od tamtych potencjale redoks. W rozdziale tym podana jest sugestia, że stan ten jest trwały w związku z wysokim potencjałem redoks DBMIB, ale brakuje wyraźnego stwierdzenia, po jakim czasie

ul. Umultowska 85, Collegium Physicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 51 50, +48 61 829 52 02, fax. +48 61 829 51 55
dziekfiz@amu.edu.pl
www.fizyka.amu.edu.pl

inkubacji od dodania chinonu były zebrane wyniki przedstawione na rys. 4.35 i 4.36 (str. 106) i jak czas inkubacji wpływał na te wyniki oraz czy cytochrom bc_1 był inhibowany antymycyną.

Rozdział 5 zawiera dyskusję podsumowującą uzyskane wyniki. Najpierw podjęta jest stanowcza i, według mnie, przekonująca polemika z autorami negującymi istnienie stabilnego stanu SQ-FeS, możliwego do zarejestrowania techniką EPR. Z kolei dyskutowana jest kwestia niskiej wydajności cytochromu bc_1 inhibowanego antymycyną. W tym aspekcie podkreślana jest, również w przekonujący sposób, modyfikacja potencjału redoks hemu b_L przez zredukowany hem b_H i ogólnie rola gałęzi niskopotencjałowej w regulacji przepływu elektronów w cytochromach *bc* i całych łańcuchach transportu elektronów. Na rysunku 5.2 (str. 118) pokazano bardzo ciekawy uproszczony diagram energetyczny cytochromów *bc*, wyliczony na podstawie symulacji stochastycznych i rozkładu Boltzmanna oraz spójny z wynikami doświadczalnymi zaprezentowanymi w pracy. Stanowi on w efekcie streszczenie wielu wyników uzyskanych przez Autora. W centrum schematu jest stan SQ-FeS, który jest metastabilny w przypadku inhibicji enzymu antymycyną i niestabilny w przypadku braku tej inhibicji. Schemat elegancko wyjaśnia tworzenie rodnika ponadtlenkowego przez niestabilny semichinon w miejscu Q_O i zapobieganie tworzenia tego rodnika po powstaniu stanu SQ-FeS. Wyjaśnia ponadto (1) spowolnienie działania enzymu przez antymycynę, regulowane przez gałąź niskopotencjałową, (2) inhibicję cytochromów *bc* przez DBMIB oraz (3) obserwację stanu SQ-FeS w nieobecności inhibitora miejsca Q_i w cytochromie b_6f. W dalszej części dyskusji Autor zwraca uwagę (1) na dynamiczną zmianę właściwości kofaktorów w cytochromach *bc* w czasie cyklu katalitycznego enzymu, właściwości, które w stanie nierównowagi są istotnie różne niż w stanie równowagowym oraz (2) na rolę FeS stabilizującą semichinon, który sam w sobie jest potencjalnie niebezpieczny. Następnie Autor czyni interesujące uwagi nt. analogii między funkcjonowaniem cytochromów z rodziny *bc* a działaniem tranzystorów, podsumowane śmiałym nazwaniem tych cytochromów tranzystorami biologicznymi. Na koniec dyskusji Autor spekuluje nt. znaczenia stanu SQ-FeS w fizjologii komórki. Najpierw zauważa, że w warunkach po hipoksji sprzyjającej powstawaniu stanu SQ-FeS mógłby on zapobiegać powstawaniu reaktywnych form tlenu po nagłym podniesieniu poziomu tlenu w komórce. Po drugie, poprzez regulację szybkości pracy enzymu, mógłby stabilizować potencjał błonowy. Był bym ciekaw szerszego przedstawienia tego mechanizmu podczas obrony. Po trzecie, stan SQ-FeS w cytochromie b_6f miałby być zaangażowany w regulację cyklicznego i liniowego transportu elektronów w układach fotosyntetycznych roślin i sinic.

Jednostronicowy rozdział 6. stanowi 10-punktowe podsumowanie najważniejszych dokonań opisanych w pracy, rozdział 7. przedstawia wykorzystywaną literaturę (171 pozycji), a rozdział 8

ul. Umultowska 85, Collegium Physicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 51 50, +48 61 829 52 02, fax. +48 61 829 51 55
dziekfiz@amu.edu.pl
www.fizyka.amu.edu.pl

zawiera materiały uzupełniające, zawierające m.in. schematy autorskich urządzeń i kody autorskich programów.

Z obowiązku recenzenta, poniżej wypunktowałem najważniejsze uchybienia, które jednak nie wymagają dyskusji podczas obrony i nie umniejszają w sposób istotny wartości przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

1. Na str. 35 - we wzorze 3.1 końcowy czynnik „1 cm" powinien być w mianowniku.
2. Na str. 39 (3. linia od dołu) jest odwołanie do rysunków, których nie ma lub są oznaczone inaczej 4.1.1-4.1.5 i 4.2.1-4.2.5.
3. Str. 48, tabela 3.12, wiersz 1., kolumna 5. – powinno być [s] zamiast [ms].
4. W rozdziale „Wyniki" bardzo często brakuje odwołania do właściwych opisów technik z rozdziału „Materiały i metody", co utrudnia śledzenie wywodu. Np. w podrozdziałach 4.1 i 4.2 brakuje odwołania do podrozdziału 3.10, w którym opisano metodę *„freeze-quench"*, albo w podrozdziale 4.3 brakuje odwołania do podrozdziałów 3.15-3.18. Te braki utrudniają lekturę.
5. W podrozdziale 4.2.1 brakuje choćby przykładowych sygnałów EPR od cytochromu *c* i pozostałych centrów paramagnetycznych pokazujących jakość wyników i trend zmian w funkcji czasu inkubacji.
6. W pierwszym akapicie na stronie 65 nie jest jasne, czy Autor pisząc o aktywności różnych mutein relacjonuje własne wyniki, czy literaturowe, zwłaszcza, że w „Materiałach i metodach" nie znalazłem informacji nt. wyznaczania aktywności mutein cytochromów bc_1.
7. W podpisie do rys. 4.15 (str. 74) jest odniesienie do nieistniejącego „rys. 4.3.2, lewy panel" zamiast prawdopodobnie do rys. 4.14, prawy panel.
8. Str. 78, ostatni akapit: jest „W przypadku dodania buforu obserwujemy jedynie redukcję hemu c_1 będącą wypadkową nieenzymatycznej redukcjik spowodowanej utlenianiem DBH_2 oraz powolną aktywnością enzymatyczną" a powinno być „W przypadku dodania buforu obserwujemy jedynie redukcję hemu c_1 będącą wypadkową enzymatycznej redukcji spowodowanej utlenianiem DBH_2 oraz powolną aktywnością nieenzymatyczną".
9. Str. 80 – w pierwszym zdaniu rozdziału 4.4, „W pierwszej publikacji dotyczącej stanu SQ-FeS pokazano, że w czasie, gdy obserwuje się sygnał SQ-FeS widoczny jest także na widmie EPR utleniony hem b_L", brak jest odnośnika, o jaką publikację chodzi.
10. Str. 89, 3. linia: zamiast „$b_l^{red} + Q_O(Q\text{-}FeS^{red}) \rightarrow Q_O(SQ\text{-}FeS^{red})$" powinno być „$b_l^{red} + Q_O(Q\text{-}FeS^{red}) \rightarrow Q_O(SQ\text{-}FeS^{red}) + b_l^{ox}$".

ul. Umultowska 85, Collegium Physicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 51 50, +48 61 829 52 02, fax. +48 61 829 51 55
dziekfiz@amu.edu.pl
www.fizyka.amu.edu.pl

11. Str. 96: nie rozumiem zdania „Dlatego możliwe, że sygnał SQ-FeS nie będzie obserwowany w realnym doświadczeniu, podobnie jak w rzeczywistym doświadczeniu."
12. Str. 99, przedostatnia linia: zamiast „pole około 3150 G" powinno być „pole około 3250 G".
13. Str. 102, 6. linia: zamiast „na widmie czwartym" powinno być „na widmie trzecim".
14. Str. 115, 9. linia od dołu: zamiast „iloraz" powinien być „iloczyn".

Podsumowując, uważam, że oceniana praca zawiera bardzo dużo bardzo wartościowych wyników i ich ciekawych interpretacji. Stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przede wszystkim dokumentuje powstawanie stanu SQ-FeS w dwóch różnych cytochromach z rodziny *bc* w różnych warunkach eksperymentalnych – kompleksach izolowanych i osadzonych w błonach, w warunkach tlenowych i beztlenowych, w białkach inhibowanych i nieinhibowanych, naturalnych i genetycznie zmodyfikowanych. W pomysłowy sposób został oszacowany czas życia pojedynczego stanu SQ-FeS w miejscu Q_O oraz stworzone zostały modele stochastyczny i energetyczny cytochromów *bc* dające pewna syntezę funkcjonowania tych białek uwzględniającą uzyskane wyniki. Zastosowano różne techniki EPR w kombinacji z pomiarami absorpcji w zakresie widzialnym. Autor wykazał się wszechstronnością hodując bakterie, izolując z nich białka, stosując rozmaite techniki spektroskopowe, projektując i budując własne podukłady układów eksperymentalnych i pisząc własne kody programów. Zaprezentował w pracy wiedzę teoretyczną z zakresu biofizyki, biologii, biochemii, fizyki, informatyki i elektroniki oraz dowiódł umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Część wyników pracy została opublikowana w bardzo prestiżowym czasopiśmie „Proceedings of the National Academy of Sciences". Ponadto pan mgr Bujnowicz jest współautorem pięciu innych publikacji naukowych. Wobec powyższych uwag, w mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Łukasza Bujnowicza spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z dnia 27 września 2017 r. Poz. 1789). Wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pana mgr. Łukasza Bujnowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na jakość przedstawionych wyników badań naukowych wnioskuję również o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

ul. Umultowska 85, Collegium Physicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 51 50, +48 61 829 52 02, fax. +48 61 829 51 55
dziekfiz@amu.edu.pl
www.fizyka.amu.edu.pl