ZAKŁAD BIOFIZYKI

Lublin, 4 października 2018 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Ocena 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*"

Aktywność związana z prowadzeniem badań przyrodniczych przynosi nam wiele radości i satysfakcji jednakże, a może przede wszystkim, jest źródłem postępu cywilizacyjnego ukierunkowanego na ułatwianie nam codziennego życia, niejednokrotnie stwarzając możliwości ratowania życia i zapobiegania wielu groźnym chorobom. Zwykle, podnosimy te aspekty naszej działalności naukowej redagując wstępy do artykułów oraz dysertacji naukowych. Ich lektura, niejednokrotnie sugeruje, iż właśnie ta konkretna tematyka, której dotyczy rozprawa, jest jedną z najbardziej interesujących oraz najważniejszych, na tle innych. Potwierdzają to zwykle recenzenci, reprezentujący na ogół te same obszary aktywności badawczej. Teza o niezwykłej wadze prowadzonych badań broni się doskonale w przypadku zagadnień związanych z bioenergetyką. To bowiem „zasilanie w energię" warunkuje zachodzenie wszelkich reakcji biochemicznych i procesów biofizycznych w komórkach i organizmach. Wydaje się, iż szczególną rolę w reakcjach bioenergetycznych w błonach mitochondrialnych i chloroplastowych zajmują enzymatyczne kompleksy białkowe, w których krzyżują się szlaki transferu ładunku elektrycznego przez nośniki charakteryzujące się różnym

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl

powinowactwem do środowiska membranowego oraz wodnego. Do klasy tych kompleksów należą białka z rodziny cytochromów *bc* oraz b_6f. Ponadto, postuluje się udział tego ostatniego w regulacyjnym, cyklicznym przepływie elektronów wokół Fotosystemu I w roślinach oraz w procesie tzw. „chloro-respiracji" czyli mieszania się procesów bioenergetycznych łańcuchów transportu ładunków fotosyntetycznego oraz oddechowego w bakteriach fotosyntetyzujących. Paradoksalnie, pomimo wielu dekad intensywnych prac badawczych ukierunkowanych na szczegółowe poznanie wszelkich mechanizmów leżących u podstaw funkcjonowania kompleksów cytochromowych, wiedza w tym zakresie wciąż nie jest pełna. Przytoczone aspekty czynią, w moim mniemaniu tematykę rozprawy pana mgr. Łukasza Bujnowicza wyjątkowo aktualną, ważną oraz interesującą.

Praca doktorska mgr. Łukasza Bujnowicza wykonana została w renomowanym ośrodku bioenergetycznym: Zakładzie Biofizyki Molekularnej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem prof. Artura Osyczki, przy współudziale dr. Marcina Sarewicza, pełniącego funkcje promotora pomocniczego. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 163. stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o typowy w przypadku tego typu opracowań układ. Po spisie treści oraz streszczeniu, Autor zamieszcza wykaz używanych skrótów i symboli, istotnie ułatwiających lekturę tekstu. Rozdział 1. „Wstęp", w sposób syntetyczny wprowadza w podstawowe zagadnienia z obszaru bioenergetyki, ze szczególnym uwzględnieniem problemów związanych z architekturą układów bioenergetycznych, przenoszeniem elektronów oraz związku pomiędzy strukturą i pełnionymi funkcjami chinonów i kompleksów cytochromowych. Ponadto, w ramach rozdziału wstępnego, Autor przybliża czytelnikowi zasady działania oraz rodzaj uzyskiwanych informacji w oparciu o stosowane techniki badawcze, w szczególności elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR). Cele rozprawy, zarówno ten strategiczny, określony jako „poznanie właściwości i mechanizmów powstawania semichinonu w miejscu Q_o cytochromów z rodziny *bc*", jak i szczegółowe wyzwania poznawcze, sformułowane zostały przez Doktoranta w ramach krótkiego rozdziału 2. pt. „Cele rozprawy". Używane w badaniach materiały oraz stosowane procedury preparatyki i metody pomiarowe opisane zostały w sposób wyjątkowo obszerny w rozdziale 3. pt. „Materiały i metody". Poziom precyzji opisów zamieszczonych w ramach tego rozdziału

nie odbiega od najwyższych standardów tego typu opracowań, umożliwiających odtworzenie analogicznych eksperymentów. Szczególnie, zaakcentować chciałbym w tym miejscu twórczy wkład Doktoranta w rozwój technik badawczych umożliwiających niejako „poklatkowe" badania układów bioenergetycznych, zatrzymanych na wybranych etapach reakcji. Stało się to możliwe dzięki autorskiemu połączeniu techniki „stop-flow" oraz „freeze-quench", czyli opracowaniu koncepcji oraz wykonania i zestawienia odpowiednich elementów aparatury. Dokumentacja techniczna opracowanych układów załączona została do zasadniczej części rozprawy, w ramach materiałów uzupełniających, prezentowanych w ramach rozdziału 8. „Materiały uzupełniające" zawierają również szczegółowe prezentacje kodów programowych opracowanych przez Doktoranta do sterowania aparaturą oraz autorskiego kodu programu „*DIMER_BC1_STOCHASTIC*" opracowanego w celu przeprowadzenia symulacji stochastycznych. Prace badawcze przeprowadzone w ramach realizacji projektu doktorskiego zaprezentowane zostały w ramach rozdziału 4. pt. „Wyniki". Poszczególne sekcje tego rozdziału odpowiadają siedmiu realizowanym zadaniom badawczym. Wśród nich znajdują się:

- eksperymenty prowadzone z zastosowaniem fali ciągłej EPR, ukierunkowane na pełną charakterystykę sygnałów pochodzących od semichinonu związanego z klastrem żelazowo-siarkowym cytochromu bc_1 z nieaktywnym miejscem Q_i
- badania kinetyczne, w warunkach tlenowych i beztlenowych, prowadzone na muteinach cytochromu bc_1
- eksperymenty ukierunkowane na określenie czasów życia stanów związanych SQ-FeS
- eksperymenty prowadzące do ustalenia stanu redoks hemu b_L w warunkach trwania kompleksu SQ-FeS
- symulacje stochastyczne funkcjonowania kompleksu bc_1
- eksperymenty pokazujące generowanie stanu SQ-FeS w nieinhibowanym kompleksie cytochromów b_6f.

Prezentacji badań oraz ich wyników, przeprowadzonej w ramach rozdziału 4., towarzyszy ich wstępna interpretacja oraz dyskusja. Zabieg ten sprawia, iż pomimo całej złożoności

oraz zaawansowanej metodologii prowadzonych badań, rozdział ten czyta się z zainteresowaniem, a nawet pewną lekkością. Uwagę zwraca również precyzja sformułowań Autora. Przykładem może tu być używanie określenia „temperatura wrzenia azotu" w miejsce powszechnie używanego przez nas określenia „temperatura ciekłego azotu". Uzyskane rezultaty zostały również poddane całościowej, wieloaspektowej dyskusji w ramach rozdziału 5. Zatytułowanego „Dyskusja". Tytuły podrozdziałów zredagowanych w ramach tej części rozprawy, w formie haseł, odwołują się już do głównych wyzwań badawczych, zapowiadając zarazem osiągnięcia w wymiarze poznawczym akcentowane w tej części dyskusji. Jest to, moim zdaniem, zabieg o szczególnym znaczeniu dla klarowności prezentacji zasadniczych tez rozprawy a wynika zapewne bezpośrednio z próby twórczej integracji wielu uzyskanych wyników przez samego Autora.

W pełni podzielam zdanie Doktoranta w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć pracy, wyartykułowanych w ramach jednostronicowego rozdziału szóstego pt. „Podsumowanie". Wyniki te składają się na stosunkowo pełny oraz precyzyjny mechanizm wiązania i funkcjonowania semichinonu w miejscu Q_o cytochromów bc_1 oraz b_6f.

Na podkreślenie zasługuje również wysoki poziom edytorski rozprawy. Mógłbym przedstawić Autorowi nieliczne sugestie drobnych korekt. Oto ich krótka lista:

1. Str. 14., 2. wiersz od góry, proponuję aby w miejsce „szybkość…szybsza" wstawić „szybkość…większa"
2. Str. 22., 2. akapit, „cierpiącego" zamiast „ciepiącego"
3. Str. 23., 10. wiersz od góry, „z cytochromem *c*" zamiast „z cytochromu *c*"
4. Rys. 1.8, w podpisie rysunku można dodać, że w widmie optycznym chodzi o absorpcję światła, np. absorbancja
5. Str. 119, 4. wiersz od dołu, „Dzieje" zamiast „Dzieję"
6. Str. 123, 3. wiersz od góry, „przez niego" zamiast „przezniego"
7. Literatura, pozycja 141 pokrywa się z pozycją 157.

Tak wieloaspektowe oraz obszerne opracowanie, jakim jawi się rozprawa doktorska pana mgr. Łukasza Bujnowicza, odpowiada w najwyższym stopniu na wyzwania poznawcze określone tytułem rozprawy. Można oczywiście, ożywiając swoją ciekawość, formułować dodatkowe pytania, na przykład dotyczące natury oscylacji czasowych, obserwowanych przy zaniku amplitudy echa spinowego, zarejestrowanych dla próbek cytochromu bc_1 (Rys. 4.20, str. 81). Odpowiedź na takie pytanie może okazywać się stosunkowo trudna, jak sugeruje to Autor, bądź może nawet mało interesująca. W tym miejscu swojej oceny chciałbym jednak zaprosić Doktoranta do bardziej ogólnych przemyśleń: aby w oparciu o swoje ogromne doświadczenie uzyskane w trakcie pracy nad rozprawą wyraził opinię dotyczącą możliwych funkcji barwników fotosyntetycznych, chlorofilu *a* oraz β-karotenu, w strukturze kompleksu cytochromów b_6f. O ile rola karotenoidu prawdopodobnie sprowadza się do wygaszania stanów trypletowych chlorofilu, wydajność formowania których na drodze przejścia międzysystemowego ze stanu singletowego wynosić może nawet ponad 60 % (Bowers and Porter, 1967), to enigmatyczna wydaje się być rola samego chlorofilu. Czy fakt, iż zlokalizowany jest on w pobliżu dwóch innych porfiryn sugerować może rolę w modulowaniu transportu elektronów wewnątrz kompleksu?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż mgr Łukasz Bujnowicz przedstawił ogromnie wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Badania te wymagały doskonałego przygotowania w zakresie preparatyki materiału biologicznego oraz opanowania warsztatu doświadczalnego w zakresie wielu zaawansowanych technik eksperymentalnych. Pełna realizacja niektórych zadań badawczych możliwa stała się dzięki twórczej aktywności Doktoranta w obszarze projektowania oraz konstruowania elementów aparatury. Kandydat wykazał się również badaczem posługującym nie tylko warsztatem eksperymentalnym ale również umiejącym projektować oraz wykonywać prace w oparciu o obliczenia i symulacje numeryczne. Znaczna część wyników tych badań ogłoszona została już równolegle w dwóch artykułach opublikowanych w specjalistycznych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, włączając w to renomowane czasopismo *PNAS USA*.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Łukasza Bujnowicza spełnia w zupełności 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. Co więcej, w moim odczuciu, ranga naukowa uzyskanych rezultatów, sprawiają iż rozprawę doktorską postrzegam jako wyróżniającą. Gratulując tak wartościowych rezultatów uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. Łukasza Bujnowicza do dalszych etapów postepowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony. Stawiam również wniosek o uznanie rozprawy doktorskiej za wyróżniającą.

