

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Joanny Bednarskiej

pt. „*Spektroskopowe i strukturalne badania organizacji molekularnej kompleksu barwnikowo-białkowego LHCII w środowisku lipidowym*”

Tematyka rozprawy pani mgr Joanny Bednarskiej wpisuje się w nurt badań poświęconych zagadnieniom funkcjonowania kompleksu LHCII w warunkach oświetlenia o zwiększonej intensywności i ukształtowanej w aparacie fotosyntetycznym strategii fotoprotekcyjnej. Procesy regulujące, dostosowujące liczbę absorbowanych kwantów do szybko zmieniających się warunków oświetlenia oraz zapotrzebowania aparatu fotosyntetycznego na energię, są ważne nie tylko dla wysokiej wydajności fotosyntezy, ale także ochrony aparatu syntetycznego przed fotodegradacją. Zarówno proces fosforylacji i cykl ksantofilowy są procesami kontrolowanymi przez natężenie światła, dlatego pozwalają uzyskać informację o możliwych mechanizmach fotoprotekcyjnych. Przedstawiona rozprawa doktorska dotyczy badania wpływu barwników ksantofilowych i fosforylacji na organizację molekularną kompleksu LHCII i proces jego monomeryzacji oraz regulowanej światłem reorganizacji błon tylakoidów. Podjęta w pracy tematyka postrzegana nie tylko jako interesująca, ale również bardzo ważna, co pośrednio potwierdzają pozyskane na realizację projektu fundusze pochodzące z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (program *Team*) oraz Unii Europejskiej (Europejski Fundusz Regionalny).

Praca wykonana została pod kierunkiem prof. Wiesława Gruszeckiego oraz dr Ewy Janik, w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki, na Wydziale Matematyki, Fizyki i Informatyki UMCS w Lublinie, w uznanym w kraju i za granicą ośrodku badań biofizycznych.

Celem rozprawy doktorskiej pani mgr Joanny Bednarskiej było poznanie mechanizmów kontrolujących wykorzystanie energii zaabsorbowanej przez aparat fotosyntetyczny oraz roli wiolaksantyny i zeaksantyny w regulacji transferu energii wzbudzenia. Autorka w przemyślany sposób zaplanowała i wykonała eksperymenty rozpoczynając od badań modelowych błon lipidowo-białkowych z kompleksem LHCII i/lub egzogennymi barwnikami

cyklu ksantofilowego. W kolejnym etapie przeanalizowała możliwe procesy dyssypacji energii w trimerach i monomerach LHCII uwzględniając, że ich wzajemne relacje są kontrolowane przez natężenie oświetlenia. Natomiast końcowo w badaniach *in vivo* obserwowała reorganizację struktury błon tylakoidów, będącą elementem mechanizmu dostosowania gęstości wzbudzeń do możliwości operacyjnych aparatu fotosyntetycznego i ochrony centrum reakcji PSII przed fotoutlenianiem.

Charakterystyka spektroskopowa i badania strukturalne kompleksu LHCII w środowisku lipidów zostały przeprowadzone z wykorzystaniem wielu zaawansowanych technik eksperymentalnych, w tym spektroskopowych (spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis oraz w podczerwieni, stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej), mikroskopowych (obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM), absorpcji w podczerwieni z nanometrową rozdzielczością (nano-IR), mikroskopii konfokalnej i elektronowej (TEM)) oraz dyfraktometrii rentgenowskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa zredagowana została na 150 stronach maszynopisu i zawiera 59 rysunków oraz 9 tabel. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 156 pozycji, w większości (ok. 2/3 prac) opublikowanych po roku 2000, ale znajdujemy tam także publikacje np. z *Science* z 1956 roku (P. Latimer et al.). Świadczy to o rzetelnym przeglądzie i znajomości zarówno klasycznej, jak i aktualnej literatury dotyczącej przedmiotu badań. Układ pracy wydaje się typowy, z zachowanymi odpowiednimi proporcjami pomiędzy poszczególnymi częściami opracowania. Streszczenie oraz wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń poprzedza wprowadzenie teoretyczne. W pierwszym rozdziale pani mgr Joanna Bednarska omawia bardzo precyzyjnie podstawowe pojęcia dotyczące przedmiotu badań i mechanizmów transferu energii wzbudzenia elektronowego w aparacie fotosyntetycznym. Kolejna część prezentuje aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów regulacji wzbudzeń elektronowych, w tym fosforylacji i niefotochemicznego wygaszania wzbudzeń. Na podstawie dobrego rozeznania literaturowego i przygotowania w zakresie zagadnień teoretycznych, pani mgr Joanna Bednarska umiejętnie sformułowała cel pracy oraz cele szczegółowe, które w dalszej części konsekwentnie realizowała. W następnym rozdziale skrupulatnie zebrane są informacje dotyczące przygotowania materiału badawczego i zastosowanych metod eksperymentalnych. Zasadnicza, najobszerniejsza część rozprawy prezentuje uzyskane wyniki wraz z ich dyskusją. Wnioski zebrane są w podsumowaniu, a opracowanie zakończone jest bardzo interesującym rozdziałem, dotyczącym perspektyw i nowych możliwości badań mechanizmów fotoprotekcyjnych w aparacie fotosyntetycznym roślin, na poziomie molekularnym.

Moim zdaniem przedstawione w rozprawie osiągnięcia zasługujące na podkreślenie to m.in.:

- (1) wykazanie, że monomeryzacja LHCII jest procesem regulowanym światłem i stanowi ważny element mechanizmu fotoprotekcyjnego,
- (2) pokazanie możliwości formowania odmiennych struktur LHCII w obecności barwników ksantofilowych (wioła- i zeaksantyny) oraz ustalenie ich wpływu na organizację (agregację) LHCII w błonach tylakoidów,
- (3) spektroskopowa charakteryzacja trimerów i monomerów LHCII oraz określenie jaką rolę pełnią w aparacie fotosyntetycznym w warunkach oświetlenia o zwiększonej intensywności,
- (4) zauważenie, że przebudowa struktury tylakoidów gran w warunkach zmiennego natężenia oświetlenia koreluje się ze zwiększeniem w błonach tylakoidów puli monomerów LHCII, które powstają w wyniku procesu fosforylacji LHCII,
- (5) pokazanie na podstawie badań anizotropii fluorescencji w pojedynczym granum, że zamiany w błonie tylakoidu indukują zanik kierunkowości transferu energii wzbudzenia pomiędzy kompleksami fotosyntetycznymi, a obniżenie wydajności przekazywania energii pomiędzy LHCII i PSII wpisuje się w strategię ochrony centrum reakcji PSII w warunkach stresu świetlnego.

Przedstawione w pracy osiągnięcia znajdują pełne udokumentowanie w badaniach własnych pani mgr Joanny Bednarskiej oraz są właściwie dyskutowane i poparte przypisami literaturowymi.

Komentarze oraz pytania, jakie nasunęły się podczas czytania pracy są następujące:

1. W rozdziale 1.5 opisano transfer energii wzbudzenia elektronowego uwzględniając przejścia typu singlet-singlet i singlet-tryplet. W przyrodzie mamy większe bogactwo różnych możliwości dlatego może warto byłoby wspomnieć chociażby o przeniesieniu energii typu tryplet-tryplet, istotnym w przypadku mechanizmów fotoprotekcyjnych i fotouczulających.
2. Dlaczego w badaniach, nad wpływem fosforylacji na organizację molekularną błon tylakoidów, przeprowadzonych na modelowych układach błon lipidowo-białkowych z kompleksem LHCII w formie ufosforylowanej (s. 67) stosowano światło o gęstości strumienia fotonów $1200 \mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ do oświetlania liści z których izolowano LHCII, podczas gdy maksymalna fosforylacja LHCII w szpinaku występuje dla $100 \mu\text{moli} \cdot \text{fotonów} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$?
3. Na podstawie rozdziałów chromatograficznych oszacowano (tabela 5), że w wyniku częściowej deepoksydacji wiołaksantyny pojawia się pula zeaksantyny w LHCII-HL. W

próbkach Dark i LHCII-LL mamy podobną zawartość wiolaksantyny, natomiast w LHCII-HL sumaryczna ilość ksantofili na monomer LHCII jest mniejsza. Jak można to wyjaśnić?

4. W pracy (rys. 29) analizowano wyniki dotyczące badania sztywności wielodwuwarstw lipidowo-białkowych. Jak zdefiniowana jest sztywność?
5. Zaniki fluorescencji Chla w modelowych wielodwuwarstwach L-Dark i L-LHCII-HL poddano dekonwolucji stosując 3 składowe (s. 87). Wydaje się, że warto byłoby podać fizyczne uzasadnienie rozkładu na 3 składowe, pokazać dokładność dopasowania krzywych zaniku i uzyskanych czasów oraz skomentować otrzymane różnice np. dla składowych τ_1 i τ_2 .
6. Stwierdzono (str. 121), że „monomery mogą stanowić formę przejściową pomiędzy trimerami, a strukturami gaszącymi wzbudzenia nadmiarowe w stresie świetlnym” – jak należy tutaj rozumieć pojęcie „forma przejściowa”?
7. Interesujące wydaje się pokazanie (s. 125), że istnieją formy n-LHCII o zdecydowanie większej masie niż trimer. W pracy zasugerowano odpowiednio znaczący udział form trimerycznych lub monomerycznych w n-LHCII w zależności od rodzaju barwników cyklu ksantofilowego w badanej próbce. Niewątpliwie ciekawe będzie określenie struktury dla rozróżnionych form n-LHCII. Dla próbek z egzogenną zeaksantyną pokazano, że średnie czasy życia fluorescencji Chla są porównywalne z tymi uzyskanymi dla form monomerycznych kompleksu LHCII. Czy wyznaczono czasy życia fluorescencji Chla dla n-LHCII utworzonych w obecności wiolaksantyny, które potwierdzałyby hipotezę o większościowym udziale trimerów?
8. Jakie można zaproponować wyjaśnienie dla obserwowanych odmiennych właściwości spektralnych dimerów (s. 129) tworzonych przy niskim i wysokim natężeniu światła lub w obecności zeaksantyny (różne wartości średnich czasów życia odpowiednio 0,7 ns, 1 ns i 1,2–2,2 ns)?

Moim zdaniem, strona formalna rozprawy nie budzi zastrzeżeń. Praca została bardzo starannie zredagowana, co sprawia, że czyta się ją z przyjemnością i jest to niewątpliwie jej dodatkowy walor. Na podkreślenie zasługuje bardzo staranna i estetyczna szata graficzna. W pracy zauważono nieliczne i bardzo drobne usterki, na przykład:

1. 13, dół l. 2, „...wybicie elektronu...”;
2. s. 44, dół l. 6, brakuje odniesienia do spisu literatury „...przez grupę Polivki...”;
3. s. 46, góra l. 7 i 11, odpowiednio: tyalkoidów, superkompleksu;
4. s. 56, dół l. 5, ...barwik ...;

5. s. 57, dół l. 4, „...rejestrowano przy absorbancji na 441 nm...” czy może raczej „...dla absorbancji przy 441 nm...”?
6. s. 63, dół l. 7, „...przesłone o średnicy 30 μm , który umożliwił...”;
7. s. 64, góra l. 4, „...dwie składowe ... zostały rozdzielone ... i skierowana na dwa...”;
8. s. 90, góra l. 14, „...immunodetekcji...”;
9. s. 125, góra l. 2, „...Możliwość występowania w tych prążkach agregatów LHCI włączono...”;

Niestety w pracy doktorskiej nie znalazłam informacji o dorobku publikacyjnym pani mgr Joanny Bednarskiej. Na podstawie strony internetowej projektu *Team* i bazy danych *Web of Science* można stwierdzić, że wyniki badań pani mgr Joanna Bednarska są opublikowane w czterech renomowanych czasopismach o bardzo wysokich wskaźnikach *impact factor* (*Nanoscale*, *J. Phys. Chem. B*, *The Plant Cell*, *Biochim. Biophys. Acta: Bioenergetics*).

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że kompleksowe przygotowanie merytoryczne z zakresu szeroko rozumianych nauk przyrodniczych, pomysłowość w zastosowaniu właściwych układów i warunków eksperymentalnych oraz poprawne dobranie metodologii badań, umożliwiło pani mgr Joannie Bednarskiej charakteryzację spektroskopową oraz badania strukturalne wybranych materiałów biologicznych. Umiejętność syntetycznego opisu oraz dojrzałość interpretacji i analizy otrzymanych wyników wskazuje na bardzo dobre przygotowanie do pracy naukowej w interdyscyplinarnych zespołach badawczych. Wspomniane drobne niedociągnięcia przedstawione w recenzji dotyczą głównie strony redakcyjnej rozprawy i nie wpływają w jakikolwiek sposób na moją wysoką ocenę wartości merytorycznej pracy, która w mojej opinii zasługuje na wyróżnienie.

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane przez „Ustawę o stopniach naukowych i tytule...” z 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami), dlatego też przedkładam Radzie Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki UMCS w Lublinie, wniosek o przyjęcie mojej rekomendacji i dopuszczenie pani mgr Joanny Bednarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

