



UNIwersytet Gdański
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej

Zakład Spektroskopii Molekularnej

Prof. dr hab. Piotr Bojarski

Gdańsk, 14.08.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Bednarskiej

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

Proces fotosyntezy pozostaje przedmiotem bardzo ważnych i licznych interdyscyplinarnych badań od wielu lat. Jest to całkowicie zrozumiałe ze względu na ogromne znaczenie fotosyntezy w naukach o życiu, w biofizyce i biochemii ale też pracach rozwojowych prowadzonych w nowoczesnej technologii żywności czy licznych sztucznych systemach w których symuluje się fotosyntezę by podnosić wydajność i kontrolować procesy przekazu energii wzbudzenia i ładunku. Wysoki stopień złożoności oraz różnorodność strukturalna i geometryczna układów fotosyntetycznych sprawiają, że opis i pełne zrozumienie procesów międzymolekularnych jest zagadnieniem trudnym i dalekim od wyczerpania.

W tym ważnym i aktualnym dla biofizyki nurcie badań mieści się tematyka pracy doktorskiej Pani mgr Joanny Bednarskiej. Recenzowana praca ma charakter doświadczalny i została sporządzona w zwyczajowej formie rozprawy doktorskiej. Na rozprawę składa się 9 rozdziałów: wliczając w to wprowadzenie, część opisową porządkującą stan wiedzy o mechanizmach regulacji wzbudzeń elektronowych w układzie kompleksów antenowych, cel pracy, część aparaturowo – materiałową, wyniki badań własnych, podsumowanie,

przewidywane perspektywy, dodatki i literaturę zawierającą spis 156 pozycji. Ponadto praca zawiera przydatny spis oznaczeń oraz streszczenie rozprawy. Organizacja rozprawy ma charakter tradycyjny i nie budzi zastrzeżeń.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej jest ogólnie rzecz biorąc lepsze zrozumienie oddziaływań molekularnych i organizacji molekularnej kompleksów fotosyntetycznych zwłaszcza ze względu na rozpraszanie nadwyżki energii wzbudzenia. Ten ogólny cel rozprawy został następnie w sposób jasny lecz zwarty uszczegółowiony przez doktorantkę.

Wstępna część rozprawy została zawarta w 3 pierwszych rozdziałach, w których zarysowano aktualny stan wiedzy istotny z punktu widzenia badań własnych oraz opisano podstawową wiedzę o fotosyntezie, superkompleksie PSII-LCHII, istotnych barwnikach fotosyntetycznych, transferze energii wzbudzenia oraz mechanizmach regulacji wzbudzeń elektronowych w układzie kompleksów antenowych. Rozdziały te są napisane w sposób dość oszczędny ale na ogół jasny i bardzo staranny z przywołaniem i odniesieniem się do odpowiedniej literatury. Rozdziały te stanowią dobry punkt wyjścia do prezentacji i analizy własnych badań i świadczą o ogładzie literaturowej doktorantki.

Uważna lektura pozwala dostrzec w tej części jedynie nieliczne niedociągnięcia.

Na stronie 29 na schemacie Jabłońskiego przejście krzyżowe powinno być oznaczone jako izoenergetyczne. Pojedyncze sformułowania w tej części pracy mogłyby być ściślejsze, dotyczy to np. na tej stronie sformułowania „emisja fosforescencji jest znacznie wolniejsza ... niż emisja kwantu fluorescencyjnego” czy na stronie 31 „podwójne przeniesienie elektronu ...maleje wykładniczo wraz ze wzrostem odległości pomiędzy cząsteczkami donora i akceptora”. Na stronie 33 zdanie:

„Średnia wartość współczynnika kappa dla przypadkowej orientacji momentów dipolowych donora i akceptora wynosi $2/3$ ” nie jest do końca prawdziwe. W rzeczywistości wartość średnia kappa w kwadracie dla zbioru przypadkowo zorientowanych w przestrzeni momentów dipolowych przejść mieści się w granicach $<0.476; 2/3>$ w zależności od tego jak szybki jest proces dyfuzji rotacyjnej w stosunku do procesu przekazu energii. Należy przypomnieć, że wartość $2/3$ uzyskuje się tylko w tzw. przypadku dynamicznym. Z kolei w przypadku statycznym w wyniku średniowania uzyskujemy wartość 0.476. Wszystkie inne

przypadki prowadzą dla układów nieuporządkowanych do wartości pośrednich czynnika orientacyjnego. Nie warto też w tym miejscu cytować znanej monografii Lakowicza, gdyż nie jest to pierwotne źródło wiedzy o czynniku orientacyjnym.

W rozdziale 4 rozprawy Autorka opisała preparatykę i metody aparaturowe wykorzystane w pracy. Opis preparatyki jest staranny i szczegółowy. Po jego przeczytaniu można uzyskać pewność, że doktorantka opanowała bardzo dobrze rzemiosło laboratoryjne.

W pracy przedstawiono i wykorzystano szereg metod pomiarowych poczynając od metod analitycznych jak HPLC czy elektroforeza natywna poprzez zbiór metod spektroskopowych w zakresie UV-Vis zarówno przy wzbudzeniu stacjonarnym jak i impulsowym a skończywszy na nowoczesnych metodach mikroskopowych (FLIM, obrazowanie absorpcyjne w podczerwieni o wysokiej rozdzielczości, fluorescencyjna mikroskopia konfokalna, mikroskopia TEM) a także dyfraktometrii rentgenowskiej.

Dobór tych metod jest właściwy a ich zasób całkowicie wystarczający by prowadzić wysokiej jakości badania w zakresie fotosyntezy.

Rozdział 5 zawiera główne oryginalne wyniki doświadczalne doktorantki oraz ich analizę. Szczegółowe badania modelowe nad fosforylacją kompleksu LHCII dostarczyły wartościowych informacji na temat struktury i organizacji membran lipidowo-białkowych. Autorka dowiodła, że fosforylacja LHCII indukuje istotne zmiany w organizacji modelowych membran lipidowo-białkowych.

W badaniach tych wykorzystano z powodzeniem dyfraktometrię rentgenowską oraz obrazowanie fluorescencyjne techniką skaningowej mikroskopii konfokalnej. Ta druga metoda pozwoliła doktorantce na stworzenie spektakularnych, trójwymiarowych modeli przestrzennego rozkładu natężenia fluorescencji chlorofilu A. Rozkłady te są zasadniczo różne dla wielodwuwarstw typu L- Dark oraz L-LHCII-HL.

Kompleksowe badania Autorki w tej części rozprawy prowadzą do wniosku, że organizacja molekularna kompleksu LHCII zależy nie tylko od fosforylacji ale także od tego jaka molekula barwnika (violaksantyna czy zeaksantyna) jest związana w kompleksie. Okazuje się bowiem, że związanie zeaksantyny w kompleksie określa jego formę monomeryczną natomiast związanie violaksantyny prowadzi to powstania kompleksu w formie trimery. Ważnym

wnioskiem wynikającym z badań doktorantki jest to, że fosforylacja LHCII sprzyja przyrostowi liczby jego monomerów w próbce a ponieważ fosforylacja jak i cały cykl ksantofilowy są silnie zależne od natężenia padającego promieniowania to oznacza, że wspomniana monomeryzacja powinna być istotna z punktu widzenia efektu fotoprotekcji. Wydaje się, że ten istotny wątek stwarza ciekawe perspektywy dla dalszych bardziej szczegółowych badań.

W dalszej części rozdziału 5 przedstawiono interesujące rozważania na temat przenoszenia energii wzbudzenia elektronowego w układach trimerowych i monomerowych LHCII. Na podstawie przeprowadzonych badań spektroskopowych autorka stwierdziła, że wydajność bezpromienistego przekazu energii od chlorofilu *b* do *a* jest większa w przypadku formy trimerowej niż monomerowej co oznacza, że to trimerowej formie przypisać należy funkcję antenową w układzie fotosyntetycznym. Natomiast formy monomerowe LHCII pełnią rolę regulatorów w procesie zagospodarowania nadwyżki energii wzbudzenia.

Wydaje się, że sam mechanizm rozpadu formy trimerowej indukowany światłem do formy monomerowej jest procesem niezwykle ciekawym i istotnym z punktu widzenia lepszego zrozumienia relacji między funkcjami regulacyjnymi i antenowymi aparatu fotosyntetycznego.

Wnioski te budują dość przejrzysty, jakościowy obraz działania aparatu fotosyntetycznego w części dotyczącej procesów przekazu energii wzbudzenia. Wydaje się, że wytworzony przez doktorantkę obraz organizacji i struktury układu fotosyntetycznego oraz jakościowe wyczucie przebiegu procesów transferu energii mogłyby już stanowić podstawę do przeprowadzenia modelowania tych procesów prawdopodobnie z wykorzystaniem metody Monte- Carlo. Mając świadomość, że tworzy to osobne zagadnienie badawcze wykraczające poza zakres doktoratu, chciałbym poznać pogląd doktorantki na ten temat.

Ciekawym wieńczącym pracę wątkiem są także badania *in vivo* dotyczące zmian strukturalnych membran tylakoidów następujących w wyniku zmian natężenia światła wzbudzającego. Reorganizację strukturalną tylakoidów gran można rozumieć jako odpowiedź chloroplastu na zwiększanie lub zmniejszanie natężenia padającego światła co może mieć pewne znaczenie z punktu widzenia mechanizmu fotoprotekcji. Co ciekawe jednak Autorka pokazała, że największe zmiany strukturalne zachodzą już przy niewielkich natężeniach światła. Zgadza się z wnioskiem Doktorantki, że zachodząca w tych

warunkach monomeryzacja jest głównie wynikiem fosforylacji LHCII. Natomiast przy wysokich natężeniach światła aparat fotosyntetyczny podlega działaniu ochronnemu w wyniku osłabienia transferu energii od LHCII do centrum reakcji PSII. Wszystkie wyniki opisane są przejrzystie i starannie. Drobne i nieliczne potknięcia językowe nie są warte cytowania. Jedynie na rys. 30 uwagę można mieć do czytelności krzywej zaznaczonej szarym kolorem.

Pozytywne odczucia budzi też ciekawie zredagowany kilkustronicowy rozdział „Perspektywy”. Dość często w pracach doktorskich spotkać można w takich rozdziałach ogólnikowe stwierdzenia mające uzasadnić sensowność dalszych badań w danej dziedzinie oraz przydatność tego co zostało osiągnięte do mniej lub bardziej odległych aplikacji. Jednak w przypadku recenzowanej rozprawy doktorantka stawia konkretne pytania dotyczące molekularnych mechanizmów zjawisk zachodzących w aparacie fotosyntetycznym i posiłkując się wstępnymi ale bardzo rzetelnie zaprezentowanymi wynikami stawia dobrze umocowane hipotezy rozwijające uzyskane w części zasadniczej rozprawy wyniki. Szczególnie istotne jest pytanie o potencjalną rolę wiolaksantyny i zeaksantyny jako regulatorów przekazu energii wzbudzenia. Na podstawie przeprowadzonych analiz dla błon tylakoidów wydaje się, że wiolaksantyna działa dezagregująco i sprzyja oddzielaniu kompleksów białkowo-barwnikowych od siebie. Natomiast zeaksantyna raczej sprzyja agregacji, co powinno mieć znaczenie w gaszeniu wzbudzeń nadmiarowych zwłaszcza przy wysokim natężeniu światła. Dalsze interesujące rozważania w tym rozdziale oparte o wyniki badań luminescencyjnych przy wzbudzeniu impulsowym a także stacjonarnym a także elektroforezy dotyczą możliwych typów agregatów LHCII z udziałem tych barwników. Sygnalizacja i sposób podejścia do wzmiankowanych jak i innych zagadnień związanych z zagospodarowaniem energii wzbudzenia w aparacie fotosyntetycznym świadczą o bardzo dobrym, opartym o rzetelną wiedzę pomyśle doktorantki na jej najbliższą przyszłość naukową.

Kończąc opinię kilka słów chciałbym poświęcić jeszcze literaturze. Przegląd literatury cytowanej przez doktorantkę jest szeroki i z małymi wyjątkami właściwy. Drobne zastrzeżenie może budzić jedynie cytowanie monografii Lakowicza jako pierwotnego źródła informacji o czynniku orientacyjnym. Natomiast sam sposób cytowania poszczególnych prac choć umożliwia jednoznaczną ich identyfikację, to może budzić pewne zastrzeżenia w

przypadku prac mających kilku autorów. Doktorantka pomija autorów z trzeciego i dalszych miejsc, co w przypadku doktoratu nie ma moim zdaniem specjalnego uzasadnienia. Nieco to utrudnia poszukiwania niektórych współautorów prac a także jej samej jako współautorki. Oczywiście baza WEB of Science przynosi jednak wiedzę o 4 opublikowanych pozycjach współautorskich doktorantki, w tym trzech związanych z tematyką rozprawy. Należy podkreślić, że prace te ukazały się w bardzo dobrych czasopismach i mimo krótkiej historii mają już zauważalną liczbę cytowań. Z porównania zawartości tych prac i rozprawy doktorskiej wynika, że w rozprawie wciąż kryje się spory potencjał na dalsze publikacje. W związku z wysoką nośnością tej tematyki i wysoką wartością uzyskanych w pracy wyników nie należy w moim przekonaniu z tym zwlekać.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Bednarskiej spełnia bez żadnych wątpliwości ustawowe i zwyczajowe kryteria dla tego typu prac. Doktorantka wykazała się w pracy wysoką kulturą naukową, szeroką interdyscyplinarną wiedzą i przede wszystkim zrealizowała postawione w pracy cele. Sama praca zawiera wartościowe elementy nowatorskie w zakresie biofizyki molekularnej, pogłębia wiedzę o mechanizmach międzymolekularnych zjawisk i procesów występujących podczas fotosyntezy i jest napisana w otwartej i dojrzałej naukowo dyskursywnej formie z poważnym pomysłem na ciąg dalszy. Poczynione przeze mnie drobne uwagi nie umniejszają znacząco wartości rozprawy, stanowiąc raczej bodziec do dyskusji. Merytoryczną wartość pracy jak i sposób prezentacji wyników oceniam bardzo wysoko. Uzyskane wyniki sprawiają, że obraz procesów molekularnych w aparacie fotosyntetycznym jest pełniejszy a zrozumienie tych procesów w centrach fotosyntetycznych głębsze. Ponadto wysoka wartość uzyskanych wyników w połączeniu z przejrzystością i starannie napisaną rozprawą a także moje odczucia wynikające z porównania z poziomem innych prac doktorskich o pokrewnej interdyscyplinarnej tematyce z dziedziny fizyki skłania mnie do złożenia wniosku o rozważenie wyróżnienia rozprawy doktorskiej. Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Joanny Bednarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Piotr Bojarski