

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Renaty Welc

pt. ***“Wpływ ksantofili na organizację molekularną oraz właściwości fotofizyczne kompleksu barwnikowo-białkowego LHCII”***

Wykształcone w procesie ewolucji mechanizmy, umożliwiające ochronę centrum reakcji w warunkach zmieniającego się oświetlenia, są ważne z punktu widzenia wydajnego przebiegu procesu fotosyntezy. Tematyka rozprawy wpisuje się w nurt badań poświęconych fotoprotekcyjnej roli barwników karotenoidowych w warunkach stresu świetlnego.

Celem rozprawy doktorskiej pani mgr Renaty Welc było poznanie mechanizmów molekularnych regulujących jednocześnie funkcjonowanie procesu wydajnego przekazywania i dyssypacji energii na ciepło w kompleksach fotosyntetycznych LHCII. Badania ukierunkowane były na określenie wpływu barwników ksantofilowych na organizację molekularną LHCII oraz ich roli w procesach zachodzących w warunkach słabego i nadmiarowego oświetlenia. Badania prowadzono w układach modelowych (monowarstwach i liposomach) oraz w układach naturalnych izolowanych z liści wianowłostki królewskiej (*Delonix regia*) i rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*).

Praca została wykonana w renomowanym w kraju i za granicą ośrodku badań biofizycznych pod opieką dr. hab. Rafała Luchowskiego. Stanowi ona fragment bardzo wnikliwych i obszernych badań organizacji molekularnej kompleksów barwnikowo-białkowych LHCII, prowadzonych w znakomitym zespole prof. dr. hab. Wiesława Gruszeckiego, w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma 99 stron. Układ pracy jest typowy, a cytowane piśmiennictwo liczy 107 pozycji. Na s. 7-8 zamieszczono streszczenie w języku polskim, jednak zgodnie z wymogami, rozprawa doktorska powinna być opatrzona również streszczeniem w języku angielskim.

Rozdział pierwszy rozprawy (*Wstęp*) obejmuje zagadnienia pozwalające na zapoznanie się z przebiegiem procesu fotosyntezy, strukturą i budową aparatu fotosyntetycznego roślin

wyższych, charakterystyką barwników chlorofilowych i karotenoidowych oraz procesami transferu energii w antenach fotosyntetycznych, jak również teorią dotyczącą tworzenia stanów ekscytonowych w wyniku oddziaływania cząsteczek o określonej orientacji momentów dipolowych. W następnym rozdziale (*Regulacja wzbudzeń elektronowych w obrębie anten fotosyntetycznych*) przedstawiono wybrane mechanizmy (niefotochemiczne wygaszanie wzbudzeń, cykl ksantofilowy i reorganizacja anten LHCII), które funkcjonują na poziomie molekularnym i pozwalają na ochronę aparatu fotosyntetycznego przed fotodegradacją. W rozdziale 1.3.1, warto byłoby zauważyć, że w świetle ostatnich badań (Kania *et al. Inorg. Chem.* 53 (2014) 8473-8484) atom magnezu z makrocyklem tworzy wiązania jonowe, a nie jak do tej pory uważano wiązania koordynacyjne. Ponadto, w rozprawie na s. 19 podając wydajność przejścia międzysystemowego chlorofilu, błędnie zacytowano pracę Drzewiecka-Matuszek *et al. J. Biol. Inorg. Chem.* 10 (2005) 453-462. Biorąc pod uwagę pasmo Soreta dla monomerycznego Chl (tzw. obszar „niebieski”) raczej ogranicza się ono do zakresu 450 nm, a nie do 500 nm (s. 18), tym bardziej, że w dalszej części rozprawy podano, że w obszarze niebiesko-zielonym (350-500 nm) absorbują karotenoidy (s. 20). W niektórych miejscach w rozdz. 1 i 2 należałoby zacytować odpowiednią literaturę, np. w rozdz. 1.5 opisującym teorię rozszczepienia ekscytonowego, nie odwołano się do żadnego odnośnika literaturowego.

Rozdział trzeci zawiera precyzyjnie sformułowaną przez Autorkę hipotezę badawczą i cel pracy, a kolejny – *Materiały i metody* (rozdz. 4) umożliwia zapoznanie się z preparatyką próbek i otrzymywaniem monowarstw oraz stosowanymi metodami badawczymi. Do badań jakościowych i ilościowych zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), monowarstwy formowano na subfazie metodą Langmuira i przenoszono na różne podłoża metodą Langmuira-Blodgett, a liposomy GUV tworzą z lipidów DPPC. Ponadto, wykorzystano spektroskopię emisyjną i czasów życia fluorescencji, mikroskopię obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) i anizotropii fluorescencji, spektroskopię absorpcyjną UV-vis i FTIR-ATR oraz mikroskopię sił atomowych. Wydaje się, że część informacji dotyczących przygotowania próbek z liści roślin (np. ze s. 65) można było również zawrzeć w tym rozdziale. Z punktu widzenia eksperymentatora, interesujący jest opis przygotowania monowarstw mieszanych barwników karotenoidowych z LHCII, który mógłby być rozszerzony o informacje dotyczące sposobu dodawania kompleksów antenowych do barwników znajdujących się na powierzchni subfazy, co umożliwiło uzyskanie stosunku molowego 1:1 barwnika do LHCII.

Istotną częścią rozprawy jest rozdział *Wyniki badań* (rozdz. 5) złożony z dwóch podrozdziałów. Pierwszy z nich opisuje wpływ wiolaksantyny i zeaksantyny na molekularną organizację i właściwości strukturalne LHCII w monowarstwach. Większość wyników zawarta w tym rozdziale została opublikowana w *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 13056-13064. Drugi podrozdział obejmuje rezultaty badań w układach naturalnych. Istotą tych badań było potwierdzenie czy protekcyjne gaszenie poziomów elektronowych w kompleksach fotosyntetycznych można obserwować także *in vivo*. Przeprowadzone w rozprawie badania pokazały, że wygaszanie pasma Soreta związane jest z tworzeniem poziomów ekscytonowych pomiędzy cząsteczkami zeaksantyny i neoksantyny. Przy czym, neoksantyna obecna jest w strukturze LHCII, natomiast zeaksantyna, odpowiedzialna za gaszenie nadmiarowych wzbudzeń w wyższych poziomach elektronowych chlorofili, powstaje w wyniku deepoksydacji wiolaksantyny (w cyklu ksantofilowym) obecnej w fazie lipidowej błon chloroplastów. Wykazano, że w przypadku gdy tworzenie oddziaływań ekscytonowych jest mechanizmem protekcyjnym niewystarczającym do wygaszania wzbudzeń, to uruchamia się kolejny mechanizm ochronny. Związany jest on ze zmianą organizacji molekularnej kompleksów antenowych (rozpad form trimerycznych), skutkujący spadkiem wydajności wygaszania pasma Soreta (zanikają oddziaływania ekscytonowe) i wzrostem wydajności wygaszania wzbudzeń pasma Q (pojawiają się formy monomeryczne LHCII) w warunkach bardzo intensywnego oświetlenia. Na podstawie badań przeprowadzonych dla liści typu dzikiego i mutantu typu npq1 (niezdolnego do syntezy zeaksantyny oraz przeprowadzenia cyklu ksantofilowego) potwierdzono powszechność występowania mechanizmu fotoprotekcyjnego angażującego wyższe wzbudzone poziomy elektronowe ksantofili.

Kompleksowo przeprowadzone badania, wykazały strategiczną rolę barwników ksantofilowych, obecnych w fazie lipidowej w błonach tylakoidów, w regulacji aktywności fotosyntetycznego zbierania światła w roślinach. Wiolaksantyna, która obecna jest w fazie lipidowej, w warunkach fizjologicznego oświetlenia może być odpowiedzialna za stabilizowanie kompleksów fotosyntetycznych i zapewnienie pomiędzy nimi wydajnego transferu energii. Potwierdzono także występowanie dwóch pul zeaksantyny (powstałej w wyniku deepoksydacji wolnej wiolaksantyny obecnej w fazie lipidowej oraz tej zaangażowanej w tworzenie kompleksów antenowych) i powiązano je z konkretnymi mechanizmami fotoprotekcyjnymi.

Dobrze zaplanowane i wykonane eksperymenty oraz dobór komplementarnych metod stworzyły możliwość całościowego opisu obserwowanych zjawisk i poprawną interpretację wyników badań. Natomiast rozszerzenie badań modelowych o badania przeprowadzone dla

układów naturalnych pozwoliło pani mgr Renacie Welc na zweryfikowanie hipotez i wnioskowanie o uniwersalności mechanizmów regulujących fotoprotekcyjne rozpraszanie energii w supermolekularnych strukturach LHCII.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie dostarczają niewątpliwie interesujących informacji o fundamentalnych procesach fotoprotekcyjnych wytworzonych w procesie ewolucji aparatu fotosyntetycznego roślin, a jednocześnie nasuwają pewne pytania:

- (1) Autorka wnioskuje „...o efektywnym funkcjonowaniu mechanizmu rozpraszania energii nadmiarowej w liściach z poziomu Q_y przez powstałą w cyklu ksantofilowym zeaksantynę” (s. 77/78). Jakie stany elektronowe są zaangażowane w ten proces?
- (2) Na s. 73 napisano, że „...emisja fluorescencji zachodząca z niższego poziomu ekscytonowego odpowiada prawdopodobnie za występowanie widma w obszarze 450-660 nm...” i dalej „...poziomy ekscytonowe utworzone w obecności zeaksantyny znajdują się niżej na skali energii, niż te utworzone w obecności wiolaksantyny...” Czy można zaobserwować tę różnicę energii analizując widma na rys. 5.16?
- (3) Jakie właściwości zeaksantyny (w porównaniu do wiolaksantyny) predestynują ją do pełnienia tak ważnej funkcji w mechanizmie fotoprotekcyjnym?
- (4) Czy na podstawie przeprowadzonych badań można określić ułożenie momentów dipolowych neoksantyny i zeaksantyny w mieszanych monowarstwach barwnik-LHCII?

Rozdział *Zestawienie najważniejszych wniosków* zawiera opis osiągnięć, które w pełni znajdują udokumentowanie w przeprowadzonych przez panią mgr Renatę Welc badaniach. Za najbardziej interesujące moim zdaniem, uważam:

- (1) określenie lokalizacji poziomów ekscytonowych powstałych w wyniku oddziaływania egzogennej zeaksantyny z neoksantyną obecną w kompleksie LHCII i zaproponowanie ich udziału w wygaszaniu wzbudzeń,
- (2) zaproponowanie modeli supramolekularnych struktur, w których wiolaksantyna i zeaksantyna są łącznikami stabilizującymi trimeryczne formy kompleksu LHCII,
- (3) pokazanie, że właściwości kompleksów barwnikowo-białkowych są modulowane przez zmiany organizacji molekularnej LHCII, w której istotną rolę pełnią barwniki cyklu ksantofilowego; w warunkach słabego oświetlania pozwala to na optymalizację wydajnego przekazywania energii do centrów reakcji, a przy nadmiernym oświetleniu, przełączenie układu na gaszenie wzbudzeń elektronowych, w celu ochrony przed fotodegradacją.

Strona merytoryczna i metodologiczna rozprawy nie budzi, moim zdaniem, żadnych zastrzeżeń. Z obowiązku recenzenta, mogłabym zaproponować nieliczne, drobne korekty, które wypisałam poniżej:

1. ogólna uwaga: może warto w opracowaniu zdecydować się na konsekwentne używanie słowa „molekuły” lub „cząsteczki”;
2. s. 12, „...gradient ten stanowi element szybkiego sygnalingu...”
3. s. 16/17, 21, „...dyssypacji energetycznej...” – może dyssypacji energii?
4. s. 22, „współczynnika kierunkowego (κ^2)” czy „współczynnika orientacji”?
5. s. 23, rys. 1.12, przejście T-S powinno być oznaczone jako ISC, a nie jako IC,
6. s. 40, „rekonwolucja” czy raczej dekonwolucja zaników?
7. s. 61, „...LHCII mają zdolność do samoorganizacji pod wpływem barwników...” raczej w obecności barwników.

Pani mgr Renata Welc jest współautorem czterech publikacji w specjalistycznych czasopismach z listy JCR o wskaźnikach *impact factor* od 2,807 do 5,228 (*Scientific Reports*, *The Journal of Physical Chemistry B*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*). Jedna z tych prac stanowi podstawę rozprawy doktorskiej, jednakże wydaje się, że pozostałe wyniki umieszczone w pracy mają również szansę na opublikowanie w dobrym czasopiśmie. Podjęta w pracy tematyka była realizowana w ramach programu *Team* finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej i Unię Europejską (Europejski Fundusz Regionalny) oraz projektu *Preludium* z Narodowego Centrum Nauki.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wnosi cenne z naukowego punktu widzenia informacje, które poszerzają naszą wiedzę o funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego roślin. Zrozumienie na poziomie molekularnym mechanizmu procesu fotoprotekcji aparatu fotosyntetycznego i zapostulowanie, że zeaksantyna uczestniczy w tworzeniu poziomów ekscytonowych zdolnych gasić energię jeszcze w paśmie Soreta, stanowi niewątpliwie nowy pogląd na działanie mechanizmów fotoprotekcyjnych u roślin.

Moim zdaniem, oceniana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone przez „Ustawę o stopniach naukowych i tytule...” z 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767), dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, wniosek o przyjęcie mojej rekomendacji i dopuszczenie pani mgr Renaty Welc do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

