



Warszawa 22.03.2017

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Renaty Welc

„Wpływ ksantofili na organizację molekularną oraz właściwości fotofizyczne kompleksu barwnikowo-białkowego LHCII”

Naukowe znaczenie tematyki badawczej

Ewolucyjny fenomen wykorzystania energii świetlnej przez rośliny wymagał nie tylko powstania wydajnych układów absorpcji światła i konwersji wzbudzenie fotochemicznego w energię chemiczną ale także wytworzenia mechanizmów regulujących aktywność fotosyntetyczną na różnych jej etapach. Układy barwnikowo-białkowe zorganizowane są w sposób hierarchiczny, kompleksy rdzeniowe fotosystemu I i II (PSI i PSII), w których centrach reakcji następuje rozdzieleniem ładunków rozpoczynające transport elektronów, tworzą z odpowiednimi zewnętrznymi kompleksami antenowymi (LHCI, LHCII) superkompleksy, a te zorganizowane są w bardziej złożone struktury typu mikromacierzy lub mikrodomen. Poszczególne superkompleksy rozmieszczone są niejednorodnie w błonach tylakoidów, przy czym w ściśnionych błonach tylakoidów gran dominuje PSII związany z kompleksami LHCII (Light Harvesting Complex II). Regulacja wykorzystania światła, a także rozproszenia jego nadmiaru, który może prowadzić do uszkodzenia cząsteczek barwników i białek, odbywa się na kilku poziomach i związana jest ze zmianami struktury tylakoidów, zmianami w organizacji superkompleksów oraz ograniczoną dyfuzją kompleksów w płaszczyźnie lateralnej błon. Jednym z elementów krótkotrwałej regulacji fazy świetlnej fotosyntezy jest zjawisko niefotochemicznego wygaszania fluorescencji (Non-Photochemical Quenching), związane w znacznym stopniu z wygaszaniem nadmiaru energii świetlnej w kompleksach barwnikowo-białkowych LHCII. Kompleksy LHCII występujące w postaci ściśle zorganizowanych trimerów w superkompleksie LHCII-PSII i mikrodomenach tylakoidów, ale w warunkach nadmiaru światła zmieniają formę organizacji tworząc formy zagregowane, co umożliwia wydajne wygaszanie energii świetlnej. Jednak nadal, mimo z górą dwóch dziesięcioleci badań NPQ, nie określono całej złożoności czynników indukujących zmiany strukturalne superkompleksów LHCII-PSII i trimerów LHCII oraz nie określono ostatecznie molekularnego mechanizmu wygaszania energii wzbudzenie.

Przedstawiona praca porusza jeden z elementów procesu NPQ, tzw. składową zależną od energii, qE, opisującą proces wygaszania wzbudzenia energii świetlnej w kompleksach LHCII. Zjawisko to zależne jest od obecności barwników ksantofilowych, zeaksantyny i wiolaksantyny, oraz stopnia agregacji LHCII. Badania Autorka wykonała w modelowym układzie monowarstw molekularnych, złożonych z różnych kombinacji kompleksów LHCII i ksantofili, czyli w warunkach odległych od natywnych błon tylakoidów, ale pozwalających precyzyjniej określić oddziaływania na poziomie

molekularnym. Uzyskane *in vitro* wyniki Autorka poddała weryfikacji w układzie *in vivo* czyli w poddanych działaniu światła o różnej intensywności liściach dwóch gatunków roślin.

Uwagi ogólne

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki, Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki UMCS pod kierunkiem dr hab. Rafała Luchowskiego. Grupa Zakładu Biofizyki badania nad własnościami kompleksów LHCII i zjawiskiem wygaszania nadmiaru energii prowadzi od wielu lat, a zgromadzony dorobek naukowy i doświadczenie badawcze w tej dziedzinie jest ogromne. Praca była realizowana w ramach projektu TEAM pt.: „Molecular Spectroscopy for BioMedical Studies” finansowanego przez FNP.

Praca doktorska ma formę klasyczną, z podziałem na typowe dla prac eksperymentalnych rozdziały. Rozprawę rozpoczyna streszczenie, będące raczej wprowadzeniem do tematu i zarysowaniem celu pracy, gdyż uzyskane wyniki są ogólnie opisane w jednym zdaniu. Autorka zdecydowała się zestawić najważniejsze wnioski w punktach w rozdziale znajdującym się na końcu pracy. Wstęp pracy liczy 23 strony maszynopisu, w tym 15 rysunków i diagramów. W rozdziale „Hipoteza badawcza i cel pracy” Autorka jasno określiła cel pracy i zadania badawcze, jednak nie wyodrębniła zadań planowanych w układzie *in vitro* i *in vivo*, co ułatwiłoby analizę rozprawy. Rozdział materiały i metody liczy 8 stron, a najważniejszy rozdział „Wyniki badań”, powinien nazywać się „Wyniki i dyskusja”, gdyż Autorka właściwie nie oddziela opisu wyników od dyskusji, wstawiając tylko dwa krótkie podsumowania badań *in vitro* i *in vivo*. Rozdział ten liczy 41 stron i zawiera 23 rysunki, w większości prezentujące kilka paneli z widmami czy diagramami. Nietypowym elementem rozprawy jest rozdział „Perspektywy”, sygnalizujący kontynuację zagadnień prezentowanych w rozprawie.

Wyniki uzyskane przez Autorkę w układach *in vitro* weszły w skład publikacji w Journal of Physical Chemistry B 120 (2016) 13056-13064, gdzie Doktorantka jest pierwszym z sześciu autorów. Strona edytorska pracy jest bardzo staranna, wykresy i diagramy czytelne.

Uwagi szczegółowe

Wstęp Autorka rozpoczęła od omówienia budowy i funkcjonowania budowy tylakoidów i łańcucha fotosyntetycznego, niestety popełniając szereg błędów opierając się na zbyt ogólnej literaturze. Schemat Z przedstawiony na rys. 1.2 jest daleko idącym uproszczeniem, podobnie jak nazwanie utlenienia plastochinolu przez cytochrom b_6/f „z ostatnim etapem wędrówki elektronu w obrębie PSII”. Także nie istnieje osobna flawoproteina reagująca z ferredoksyną, a FAD jest związany w reduktazie ferredoksyny, enzymie katalizującym redukcję NADP (str. 11). Autorka nie doceniła innych niż NPQ mechanizmów zapobiegających nadredukcji PSII takich jak zjawisko „state transition” związane z przeniesieniem kompleksów LHCII z PSII do PSI lub chlororespiracja (str. 14). Także nie należy stosować pojęcia agregacja do oddziaływań kompleksów LHCII czy LHCII-PSII w sąsiadujących błonach, gdyż oddziaływania te raczej nie wiążą się z qE ale ze zjawiskiem ścieśniania gran tylakoidów (stacking). Na kolejnych stronach Wstępu Autorka przechodzi do omówienia molekularnej budowy LHCII i zjawisk związanych z absorpcją i transferem wzbudzenia elektronowego w układach barwnikowych, czyli zjawisk opisywanych pojęciami i wzorami fizycznymi. I tutaj czuje się już swobodnie, opisując kwantową naturę transferu energii wzbudzenia (EET) czy stanów ekscytonowych. Bardzo szczegółowo Autorka opisała

zjawiska odpowiedzialne za qE, w tym przede wszystkim rolę cyklu ksantofilowego polegającego na indukowanej światłem przemianie wiolaksantyny w zeaksantynę, udział białka PsbS i znaczenie agregacji LHCII.

Autorka zdefiniowała główny problem pracy jako konflikt między wydajnym transferem wzbudzenia, wymagający niedużych odległości między kompleksami barwnikowo-białkowymi, a zjawiskiem wygaszania, także zależnym od bezpośrednich oddziaływań barwników w kompleksach LHCII. W natywnych błonach tylakoidów jednym ze sposobów rozwiązania tej sprzeczności jest istnienie superkompleksów i mikrodomen, ukierunkowujących EET. Autorka postawiła hipotezę, że rozwiązaniem mogą być także oddziaływania między barwnikami związanymi w LHCII a wolnymi barwnikami znajdującymi się w fazie lipidowej.

Metodyka pracy podporządkowana jest weryfikacji postawionej hipotezy. Autorka szczegółowo opisała otrzymywanie kompleksów LHCII i barwników oraz formowanie układu badawczego – warstw monomolekularnych złożonych z kompleksów LHCII z dodatkiem wiolaksantyny (Vio) lub zeaksantyny (Zea). Metody analityczne można podzielić na umożliwiające określenie struktury układów, m.in. wyznaczanie izoterm sprężania i modułów ściśliwości, mikroskopię sił atomowych, stacjonarną spektroskopię fluorescencyjną i spektroskopię absorpcyjną FTIR-AR, oraz na metody określające dynamikę układów, jak pomiary i obrazowanie czasów życia fluorescencji, anizotropię fluorescencji czy pomiar widma wzbudzenia fluorescencji.

Na podstawie tak wszechstronnych badań Autorce udało się stwierdzić, że w układach *in vitro*:

- 1) w monowarstwach zbudowanych z trimerów LHCII dominują formy zagregowane kompleksów, w monowarstwach zbudowanych z LHCII oraz Vio lub Zea zmniejsza się liczba form zagregowanych, kompleksy tworzą struktury supramolekularne typu pierścieni, z dużymi obszarami pozbawionymi kompleksów LHCII. Badania wskazują, że łącznikami, czy też separatorami między trimerami LHCII są ksantofile, przy czym ze względu na różnice ich budowy, struktury uzyskane w obecności Zea są bardziej rozproszone i sztywniejsze. Autorka zaproponowała, że egzogenna Vio lub Zea łączą się z LHCII poprzez wiązania wodorowe ze związaną z białkiem neoksantyną (Neo). Model ten opiera się na analizie widm absorpcyjnych i możliwości powstania na granicy fazy białka struktur ksantofili typu J. Przyjęcie tego założenia wydaje się kluczowe dla dalszych rozważań funkcjonalnych.
- 2) wygaszania energii wzbudzenia może następować na skutek transferu energii do poziomów ekscytonowych powstałych poprzez oddziaływania endogennej Neo z cząsteczkami egzogennej Vio lub Zea. Poziomy ekscytonowy Vio pokrywają się z poziomami pasma Soreta chlorofilu, a poziomy Neo i Zea leżą poniżej, co powoduje, że wygaszanie energii wzbudzenia z pasma Soreta zachodzi wydajnie w obecności egzogennej Zea. W tego typu układzie nie są wygaszane wzbudzenia z poziomu Q_y chlorofilu.

Uzyskane wyniki w układach modelowych, w szczególności dotyczące wygaszania wzbudzeń z pasma Soreta chlorofilu przez układy endogenna Neo - egzogenna Zea sugerują istnienie nowego mechanizmu fotoprotekcji. Odmiennego lub uzupełniającego znane mi teorie zakładające wygaszanie wzbudzenia w kompleksie LHCII między związanymi z białkami cząsteczkami chlorofilu i cząsteczką zeaksantyny. Także brak jednoznacznego związku proponowanego mechanizmu wygaszania wzbudzenia z agregacją LHCII odbiega od akceptowanych schematów. Autorka nie dyskutuje w pracy różnic swojego modelu z modelami dotychczas badanymi, a w szczególności z układami natywnych błon tylakoidów. Dlatego proszę o krótkie odniesienie się do tej kwestii w czasie obrony.

Badania modelowe *in vitro* wskazały na istnienie dwóch frakcji Zea, z których prawdopodobnie tylko jedna bierze udział w procesach wygaszania. Autorka przeprowadziła badania *in vivo* z zastosowaniem liści *Delonix regia* (Wianowłostki królewskiej) i *Arabidopsis thaliana*, oświetlanych światłem o rosnącym natężeniu. Potwierdziły one dwuetapowe zwiększanie się puli Zea. Autorka sugeruje, i jest to dość prawdopodobne, że pierwszy przyrost zawartości Zea dotyczy wiązania tego ksantofilu z kompleksami LHCII, a drugi ze wzrostem puli Zea we frakcji lipidowej. Hipoteza przeniesiona z doświadczeń *in vitro* zakłada, że wzrost drugiej puli Zea będzie związany ze wzrostem wydajności wygaszania pasma Soreta, co powinno być widoczne przy wzroście natężenia światła. Analiza widm wzbudzenia fluorescencji rzeczywiście potwierdza taką korelację, sugerując występowanie *in vivo* mechanizmu wygaszania w układzie endogenna Neo - egzogenna Zea.

Dalsze badania *in vivo* wskazują, że mechanizm wygaszania wyższych stanów wzbudzenia chlorofilu nie działa wydajnie przy dużych natężeniach światła. Autorka zakłada że włączają się wtedy inne mechanizmy fotoprotekcji, czego efektem jest wzrost wydajności wygaszania pasma Q chlorofilu związany prawdopodobnie z wzrostem form monomerycznych LHCII. Wnioski te Autorka opiera na analizie widm emisji fluorescencji z powierzchni liścia. W moim odczuciu te wyniki nie są przedstawione w sposób jednoznaczny prze co wydają mi się nieco spekulatywne. Dlatego prosiłbym Doktorantkę o zwięzłą analizę tego zjawiska w czasie prezentacji tez rozprawy.

Wniosek końcowy:

Oceniając rozprawę doktorską Pani mgr Renaty Welc mogę stwierdzić, że zarówno poziom uzyskanych danych eksperymentalnych, sposób ich wykonania jak i ich wartości naukowe zasługują na wysoką ocenę. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przedstawia ciekawe, nowe spojrzenie na mechanizm fotoprotekcji i zmian w organizacji LHCII, w szczególności na udział w tym procesie wolnej frakcji ksantofilu. Zasugerowanie mechanizmu wygaszania wyższych stanów wzbudzenia chlorofilu, także *in vivo*, może rozpocząć ciekawe badania strukturalne, co Autorka zapowiada w rozdziale „Perspektywy”.

Część wyników została opublikowana w uznanym czasopiśmie, czyli już poddana recenzji przez specjalistów, i weszła w obieg naukowy. Moje krytyczne uwagi dotyczą zbytniego zawężenia wstępu i zaniedbania nieco szerszego (biologicznego) spojrzenia na zjawisko NPQ. Nieco brakuje mi w rozprawie wyraźnego porównania proponowanego mechanizmu z dotychczasowymi teoriami. Jednak uwagi te są raczej redakcyjne i mam nadzieję natchną Autorkę nowymi pomysłami, ale nie wpływają na bardzo wysoką ocenę pracy. Chciałbym także zwrócić uwagę na opanowanie przez Autorkę wielu trudnych i skomplikowanych metod badawczych. A także Jej zaangażowanie w badania Zakładu Biofizyki, co zaowocowało współautorstwem trzech innych publikacji.

Praca doktorska Pani mgr Renaty Welc spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki UMCS o dopuszczenie Pani mgr Renaty Welc do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na nowatorski charakter otrzymanych wyników, ich opublikowanie i staranne opracowanie wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Renaty Welc stosowną nagrodą.

Maciej Garstka