

Lublin, 11 czerwca 2018 r.

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

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Macieja Michalika pt. „Badanie mechanizmu przekazu energii w antenach fotosyntetycznych poprzez wymianę kofaktorów techniką rekonstrukcji”

Życie na naszej planecie zasilane jest energią promieniowania słonecznego a fotosynteza jest praktycznie jedynym procesem umożliwiającym konwersję energii promieniowania elektromagnetycznego na energię zmagazynowaną w wiązaniach chemicznych, która może być bezpośrednio wykorzystana w reakcjach biochemicznych żywych organizmów. Ponadto, produktem ubocznym aktywności enzymu rozszczepiającego wodę w Fotosystemie II jest tlen molekularny, będący składnikiem atmosfery ziemskiej i umożliwiający oddychanie, między innymi ludzimi. Efektywne i płynne funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego warunkowane jest aktywnością kompleksów barwnikowo-białkowych, zwanych antenami, pochłaniającymi kwanty promieniowania oraz przekazującymi bezpromieniście energię wzbudzenia elektronowego do centrów reakcji. W mojej ocenie, badania naukowe nad mechanizmami leżącymi u podstaw funkcjonowania kompleksów antenowych są istotne w aspekcie zwiększenia wydajności wiązania energii w procesie fotosyntezy. Ta aktywność naukowa wychodzi więc naprzeciw powszechnym oczekiwaniom społecznym, związanym ze wzrostem produkcji żywności w dobie globalnego wzrostu demograficznego. W świetle powyższych uwag, tematykę rozprawy

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



doktorskiej mgr. Macieja Michalika postrzegam nie tylko jako aktualną oraz interesującą ale również ogromnie ważną.

Praca doktorska mgr. Maciej Michalika wykonana została pod kierunkiem prof. Leszka Fiedora, w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, w renomowanym ośrodku badań fotosyntetycznych. Praca zredagowana została według typowego układu. Po streszczeniach, przygotowanych w języku polskim oraz angielskim, oraz spisie treści, zamieszczona została długa lista skrótów. Fakt, że większość zastosowanych w ramach rozprawy skrótów używana jest w środowisku badaczy fotosyntezy powszechnie, znacznie ułatwia lekturę tekstu. W ramach rozdziału pierwszego, zatytułowanego „Wprowadzenie” Autor przedstawia podstawowe informacje oraz aktualne poglądy dotyczące barwnikowo-białkowych kompleksów antenowych, bakteryjnego LH1 oraz roślinnego LHCII. W ramach tego rozdziału zaakcentowano również problemy poznawcze związane z podstawowymi funkcjami fizjologicznymi przypisanymi tym kompleksom: z funkcją antenową oraz fotoprotekcyjną. Ponadto, w swojej końcowej części, rozdział ten wprowadza czytelnika w tematykę związaną z izolacją i oczyszczaniem antenowych kompleksów barwnikowo-białkowych oraz z problemem ich rekonstytucji połączonej z wymianą barwników. Cele pracy doktorskiej, zarówno ten strategiczny, związany z badaniem ścieżek wędrowki wzbudzenia elektronowego w kompleksach antenowych, jak i szereg celów szczegółowych, sformułowane zostały w ramach półstronicowego rozdziału drugiego pt. „Cele pracy”. Rozdział trzeci, zatytułowany „Materiały i metody” zawiera szczegółowe opisy procedur biochemicznych związanych z ekstrakcją i oczyszczaniem barwników fotosyntetycznych, izolacją i oczyszczaniem kompleksów barwnikowo-białkowych oraz procedur związanych z rekonstytucją kompleksów do ich aktywnej formy, prowadzonej *in vitro*. Co ważne, przedstawione zostały również precyzyjne opisy wymiany jonu magnezu w pierścieniu porfiryńowym chlorofilu i bakteriochlorofilu na jon niklu, w czym specjalizuje się grupa badawcza prof. Leszka Fiedora, w zgodzie ze standardami umożliwiającymi powtórzenie analogicznych procedur w innych, zainteresowanych laboratoriach. Krótko, opisane zostały również parametry technik spektroskopowych, stosowanych do analiz jakości preparatów, efektywności rekonstytucji oraz badaniach wydajności transferu energii wzbudzenia. Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej wysokiej wartości poznawczej, jest zdecydowanie rozdział czwarty zatytułowany „Wyniki”.



Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą sekwencje poszczególnych zadań badawczych, realizowanych w ramach projektu doktorskiego. W trakcie lektury tego rozdziału czytelnik ma możliwość zapoznania się z meandrami otrzymywania i oczyszczania niklowych analogów chlorofilu *a* i chlorofilu *b* jak i bakteriochlorofilu *a*, jak również z wynikami potwierdzającymi zarówno tożsamość jak i czystość uzyskiwanych preparatów. Wśród wyników tych przedstawione zostały, między innymi, chromatogramy, zarejestrowane widma elektronowe, widma dichroizmu kołowego (CD) i magnetycznego dichroizmu kołowego (MCD) oraz widma masowe uzyskane dzięki zastosowaniu spektrometru mas. W dalszej kolejności przedstawiona została realizacja zadań badawczych związanych z izolacją, oczyszczaniem oraz rekonstytucją kompleksów antenowych LH1 a następnie LHClI. W miejscu tym nadmienić chciałbym, iż do rekonstytucji anteny roślinnej stosowane było białko Lhcb1 nadeksprymowane w systemie bakteryjnym. Takie bardzo eleganckie, chociaż już niemalże klasyczne podejście, ciągle robi na mnie duże wrażenie. Do arsenału technik spektroskopowych zastosowanych przy badaniu białek włączone zostały dodatkowo stacjonarna oraz rozdzielcza w czasie spektroskopia fluorescencyjna. Zaprezentowane w ramach rozdziału czwartego wyniki badań poddane zostały wieloaspektowej dyskusji w ramach rozdziału piątego pt. „Dyskusja”. Zaprezentowana w rozprawie dyskusja uzyskanych wyników odwzorowuje, według mnie, we właściwych proporcjach najbardziej istotne elementy sekwencji przeprowadzonych badań, akcentując nowe rezultaty, wnoszące istotny postęp w zrozumieniu mechanizmów transferu energii wzbudzenia elektronowego w antenowych systemach fotosyntetycznych. W tym aspekcie, za szczególnie wartościowe uważam wnioski dotyczące wypracowanych na drodze ewolucji biologicznej rozwiązań polegających na tzw. „klasterowej” organizacji chlorofilu w kompleksie barwnikowo-białkowym LHClI oraz równoległych ścieżek przekazywania energii wzbudzenia elektronowego po stronie lumen oraz stromy błon tylakoidów.

Na podkreślenie zasługuje również wysoki poziom edytorski rozprawy. Mógłbym zaproponować Autorowi dosłownie pojedyncze korekty:

1. Str. 8., 9. wiersz od dołu, do składu barwnikowego LHClI proponuję dopisać istotny element, ksantofil: luteinę,
2. Str. 70., 3. wiersz od dołu, „w związku” zamiast „z związku”,



3. Na stronach 12, 13, 25, 50, 78, 79, 90 oraz 91 proponuję korektę odmiany rzeczownika detergent: raczej „detergentu” niż „detergenta”.

Tak wieloaspektowe oraz obszerne opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pana mgr. Macieja Michalika, dostarcza wielu ważnych i nowych informacji pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Jeden z bardzo interesujących wyników przedstawionych w rozprawie wiąże się z efektem skrócenia czasów życia fluorescencji bakteriochlorofilu w kompleksach LH1 modyfikowanych analogami zawierającymi jon niklu. Okazuje się, że w stosunku do natywnego kompleksu, amplituda długo-życiowej składowej zmniejsza się 21-krotnie, podczas gdy amplituda krótko-życiowej składowej maleje jedynie 9-krotnie (str. 48). Ciekaw jestem jaka jest natura takiego zróżnicowania efektów.
2. Brak stabilności struktur trimerycznych kompleksów LHCII modyfikowanych cząsteczkami chlorofilu zawierającymi jony niklu interpretowany jest w ramach rozprawy w oparciu o efekty stereochemiczne. Czy możliwe jest, iż dysocjacja struktur trimerycznych do monomerycznych kompleksu LHCII jest indukowana termicznie, wobec ekspozycji na światło, i wiąże się w tym przypadku ze znaczną dyssypacją termiczną barwników z zamienionym centralnym jonem magnezu na jon niklu?
3. Występowanie pasma z maksimum w rejonie 650 nm, w widmach emisji fluorescencji rejestrowanych z próbek zawierających kompleksy LHCII (np. Rys. 4.26, str. 59) interpretuje się jako reprezentację występowania puli wolnego chlorofilu *b*. Z drugiej strony, pamiętać należy, moim zdaniem, iż jest to efekt typowy dla kompleksów pozostających w formie monomerycznej (np. Janik et al., J. Phys. Chem. B 119 (2015) 8501–8508). Wiąże się to z bardziej wydajnym sprzężeniem energetycznym pomiędzy chlorofilami *a* oraz *b* zlokalizowanymi w bezpośredniej bliskości powierzchni kontaktu sąsiadujących monomerów LHCII w strukturze trimerycznej.



4. W ramach rozprawy przeprowadzono bardzo elegancką, moim zdaniem, analizę prawdopodobieństwa wygaszania emisji fluorescencji w próbkach zawierających mieszaninę kompleksów LH1, natywnych oraz zawierających pochodne nikłowe bakteriochlorofilu (str. 75-76). Takie podejście zakłada jednakże, niemalże zupełne wygaszenie emisji modyfikowanych kompleksów. Ciekaw jestem czy analiza fluorescencji pojedynczych molekuł, na przykład z zastosowaniem techniki FLIM (Single Molecule FLIM), mogłaby pokazać faktyczną heterogeniczność czasów życia fluorescencji w tego typu układach mieszanych, dostarczając informacji dotyczących mechanizmów gaszenia wzbudzeń.

5. Obserwując wyjątkowo wydajną de-ekscytację termiczną wzbudzeń pochodnych nikłowych porfiryn, w czasach konkurujących z procesami bezpromienistego transferu energii wzbudzenia elektronowego, zrozumieć możemy dlaczego Natura, na drodze ewolucji biologicznej, wyselekcjonowała związki porfiryne zawierające centralnie wbudowany jon magnezu do pełnienia funkcji antenowej w procesie fotosyntezy. Z drugiej jednak strony, chlorofile charakteryzują się bardzo wysoką wydajnością generowania stanów trypletowych, na drodze przejść międzysystemowych, co w warunkach obecności tlenu cząsteczkowego stwarza ogromne ryzyko fotouczulanej destrukcji oksydacyjnej. Aparat fotosyntetyczny radzi sobie z tym problemem na wielu poziomach, między innymi poprzez syntezę naturalnych związków fotoprotekcyjnych, jak karotenoidy. Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktoranta, czy możliwe byłoby stworzenie pochodnych chlorofilu przygotowanych jednocześnie do efektywnego pełnienia fizjologicznej roli antenowej oraz fotoprotekcyjnej w fotosyntezie? Może podstawienie innymi niż Ni bądź Mg jonami metali?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Maciej Michalik przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Jestem przekonany, iż rezultaty te mogą



stać się podstawą interesujących publikacji w czasopismach o szerokim zasięgu, wnosząc istotny postęp w obszarze badania aspektów biofizycznych procesu fotosyntezy.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Macieja Michalika 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 (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Gratulując Doktorantowi pracowitości i pomysłowości w badaniach oraz tak wartościowych rezultatów uprzejmię wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pana mgr. Macieja Michalika do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

W. Grynki