

Lublin, 25 stycznia 2013 r.

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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Kłodawskiej
pt. „Oligomeryzacja fotosystemu I jako czynnik regulujący procesy fazy świetlnej
fotosyntezy w komórkach sinicy *Synechocystis* PCC6803”

Życie na Ziemi możliwe jest, praktycznie, dzięki energii słonecznej zaś fotosynteza jest pomostem, który zamienia energię promieniowania elektromagnetycznego na energię wiązań chemicznych, możliwą do bezpośredniego wykorzystania dla podtrzymania procesów życiowych. Wydajne i stabilne funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego warunkowane jest aktywnością wielu precyzyjnych procesów regulacyjnych, zapewniających, między innymi, dostosowanie gęstości wzbudzeń elektronowych w fotosyntetycznych kompleksach antenowych, do tempa procesów fotochemicznych oraz do kinetyki fotosyntetycznego transportu ładunku elektrycznego. Pomimo powszechnego konsensusu co do wagi tego typu procesów regulacyjnych ich pełne zrozumienie pozostaje ciągle bardziej w obszarze celów wielu grup badawczych niż w kategoriach wiedzy podręcznikowej. Wśród mechanizmów molekularnych, których funkcjonowanie łączy się z aktywnością regulacyjną tego typu, dyskutuje się, między innymi, oligomeryzację fotosyntetycznych kompleksów barwnikowo-białkowych LHCII roślin lub formowanie struktur trimerycznych kompleksów fotosystemu I w błonach fotosyntetycznych sinic. Tego ostatniego zagadnienia dotyczy właśnie rozprawa doktorska mgr Kingi Kłodawskiej. W swoich badaniach Autorka podjęła próbę wyjaśnienia znaczenia fizjologicznego procesu oligomeryzacji białek fotosystemu I w aspekcie regulacji fazy świetlnej w aparacie fotosyntetycznym sinicy z grupy *Synechocystis*. W mojej ocenie tematyka rozprawy jest nie tylko interesująca ale również bardzo ważna!

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-0311 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl

Rozprawa doktorska mgr Kingi Kłodawskiej przygotowana została pod kierunkiem prof. Kazimierza Strzałki, w jednym z czołowych ośrodków fizjologii i biochemii roślin w Kraju. Mutant $\Delta psal$, nie wykazujący procesu trimeryzacji kompleksów PSI, istotny więc dla prowadzenia badań porównawczych ze szczepem dzikim *Synechocystis*, utworzony został w laboratorium prof. Zoltana Gombosa w Biological Research Center w Szeged na Węgrzech. Rozprawa zredagowana została na 131 stronach maszynopisu. Zawiera 37 rysunków, w większości przedstawiających wyniki przeprowadzonych badań. Wyniki badań zawarte zostały dodatkowo w 12 tabelach. Zamieszczony na końcu rozprawy dodatek zawiera 6 dodatkowych tabel, w których zawarte są precyzyjne informacje dotyczące składów pożywek, poszczególnych buforów izolacyjnych oraz składu faz ruchomych stosowanych w technikach chromatograficznych. Bardzo obszerny, liczący 196 pozycji, wykaz piśmiennictwa zawiera prace klasyczne, niezbędne w pełnym literaturowym osadzeniu problemu regulacji fazy świetlnej fotosyntezy, jak i najnowsze prace, związane z organizacją molekularną fotosystemu I, włącznie z wydanymi w 2011 oraz 2012 roku. Praca zredagowana została według typowego, optymalnego w moim odczuciu, układu. Po streszczeniu, spisie treści oraz wykazie skrótów Autorka zamieszcza rozdział wstępny, zwięźle zredagowany, a zarazem zawierający wszystkie informacje istotne dla wprowadzenia w tematykę organizacji aparatu fotosyntetycznego sinic. Cele pracy sformułowane zostały w ramach rozdziału drugiego: cel nadrzędny określony jako poznanie znaczenia fizjologicznego procesu trimeryzacji kompleksu PS I w komórkach sinic oraz szereg celów cząstkowych, sformułowanych jako zadania badawcze, na drodze których osiągnięcie tak postawionego celu mogłoby zostać osiągnięte. Rozdział trzeci zawiera szczegółowe opisy procedur eksperymentalnych, stosowanych zarówno na etapie hodowli komórek sinic, izolacji materiału biologicznego jak i późniejszych badań. W moim odczuciu, opisy te są na tyle obszerne, klarowne i precyzyjne, iż umożliwiają odtworzenie wszystkich przeprowadzonych eksperymentów. Z pewnością, pomocne okazały by się również wówczas informacje zawarte w dodatkach, na końcu rozprawy. W tym miejscu swojej oceny chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na bardzo szeroki, moim zdaniem, wachlarz stosowanych metod eksperymentalnych, w szczególności technik spektroskopii molekularnej, dobieranych adekwatnie do stawianych pytań oraz formułowanych problemów poznawczych.

Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą o jej bardzo wysokiej wartości, jest jednak, moim zdaniem, część zawierająca opisy przeprowadzonych prac badawczych. Główną osią rozprawy jest analiza porównawcza, prowadzona na różnych poziomach organizacji organizmu fotosyntetyzującego *Synechocystis*, szczepu dzikiego oraz mutantu $\Delta psal$ z upośledzonym procesem trimeryzacji PS I. Nie do przecenienia, w tym aspekcie, wydaje się posiadanie tak skonstruowanego organizmu zmutowanego! Układ prezentacji wyników, zastosowany przez Autorkę, sprawia, że pracę czyta się jak ciekawą powieść. Początkowo prezentowane są wyniki prac badawczych prowadzonych na całych organizmach sinic (morfologia komórek i dynamika podziałów komórkowych), poprzez charakterystyki na poziomie fizjologicznym (na przykład analizy fotosyntetycznego wydzielania tlenu) aż do badań spektroskopowych na poziomie wyizolowanych błon aparatu fotosyntetycznego oraz wyizolowanych kompleksów barwnikowo-białkowych PS I. Przeprowadzone badania układają się w logiczny ciąg, w którym wnioski cząstkowe z przeprowadzonych eksperymentów stają się podstawą do formułowania następnych pytań i projektowania kolejnych eksperymentów. W wielu przypadkach, badania prowadzono również technikami komplementarnymi. Na przykład, procesy utleniania i re-redukcji P700 badane były zarówno techniką EPR jak i fluorescencji modulowanej. Wyniki przeprowadzonych badań przedyskutowane zostały w rozdziale piątym, zredagowanym w oparciu o podstrukturę odpowiadającą poszczególnym blokom eksperymentalnym. Pomimo takiego podziału dyskusja jest wieloaspektowa i stanowi zarazem próbę integracji wyników badań cząstkowych, uzyskanych na poziomie całych organizmów sinic, izolowanych błon aparatu fotosyntetycznego jak i poszczególnych jego elementów. Rozprawę kończy zestawienie najważniejszych wniosków, w ramach rozdziału szóstego, oraz zestawienie cytowanego piśmiennictwa, w ramach rozdziału siódmego: Literatura.

Oceniana rozprawa jest również, moim zdaniem, opracowaniem bardzo starannie zredagowanym. Wszystkie rysunki i schematy są precyzyjnie zaprojektowane i bardzo czytelne. Mógłbym zaproponować Autorce nieliczne poprawki. Oto ich krótka lista:

1. Streszczenie. 2 wiersz od dołu, zamiast „tempo komórkowych” proponuję „tempo podziałów komórkowych”.
2. Str. 12, 1 wiersz od góry, zamiast „*Synechosystis*” powinno być „*Synechocystis*”.
3. Str. 15, 7 wiersz od dołu, zamiast „1 miliona kDa” powinno raczej być „1 miliona Da”.

4. Str. 15, 7 wiersz od dołu, przy cytowaniu (Fromme et al. 2003) można uzupełnić o indeks „a”: (Fromme et al. 2003a).
5. Str. 23, ostatni punkt wyliczania, zamiast „fluorescencji filobilisomów” powinno być „fluorescencji fikobilisomów”.
6. Str. 28, 8 wiersz od dołu, w zasadzie zapis jednostek „ug ml⁻¹”, choć jest czasami stosowany, wygląda gorzej niż „µg ml⁻¹”, tak jak w pozostałych miejscach tekstu, między innymi na tej samej stronie.
7. Str. 28, 4 wiersz od góry, cytowany za Lichtenthalerem współczynnik ekstynkcji 12,7 podawany jest bez jednostek.
8. Str. 48, tytuł brzmi „Względny stosunek...” co wydaje się być redundancją ponieważ już sam stosunek oznacza względność.
9. Str. 48, 7 wiersz od góry, zamiast „rośnie o obu typach” raczej „rośnie w obu typach”.
10. Str. 65, 4 wiersz od dołu, zamiast „przy przy” po prostu „przy”.
11. Str. 66, Rysunek 4.12, nazwa wielkości odkładanej na osi rzędnych powinna być raczej „intensywność fluorescencji” nie zaś „fluorescencja”, co jest nazwą zjawiska. Podobnie Rysunek 4.13 na str. 68, czy też Rysunek 4.6 na str. 48.
12. Str. 72, 7 wiersz od góry, zamiast „osiemnastowęglowych” raczej „osiemnastowęglowych”.

W pełni podzielam zdanie Doktorantki co do wskazania najważniejszych osiągnięć rozprawy, mające wyraz w zastawieniu zaprezentowanym w ramach rozdziału „Wnioski”. Osobiście, za najbardziej istotne, interesujące a nawet intrygujące uważam wykazanie, iż rozdział ładunku elektrycznego w centrach P700 zachodzi szybciej gdy centra reakcji zorganizowane są w formy trimerów. Odkrycie to rodzi pytania o możliwe mechanizmy molekularne odpowiedzialne za zaobserwowany efekt. Może również nie bez związku jest tutaj inna ważna obserwacja opisana w rozprawie doktorskiej, dotycząca zmiany chiralności form trimerycznych P700 w obszarze spektralnym, który przypisać można barwnikom karotenoidowym?

Tak obszerne i wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską Pani mgr Kingi Kłodawskiej, dostarcza bardzo wiele cennych informacji i jednocześnie pobudza ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące przemyślenia i pytania:

1. Bardzo interesujące, w mojej ocenie, są analizy widm emisji fluorescencji niskotemperaturowej, przedstawione na Rysunku 4.13. Panele B oraz C przedstawiają widma emisyjne zarejestrowane dla komórek szczepu dzikiego oraz mutantu $\Delta psal$, unormowane w maksimach odpowiadających odpowiednio, obszarom spektralnym charakterystycznym dla fotosystemu II oraz fotosystemu I. Jak widać z rysunku, granica długofalowa panelu B nie schodzi się z granicą krótkofalową panelu C. W przypadku fotosystemu II intensywność fluorescencji szczepu dzikiego jest wyższa, podczas gdy przy normalizacji przy ok. 720 nm intensywność fluorescencji komórek szczepu dzikiego jest niższa. Zastanawiam się na ile trimeryzacja kompleksów fotosystemu I może wpływać na wydajność kwantową fluorescencji chlorofilu w tych kompleksach i czy możliwe w takim razie jest porównanie stosunku ilości PS I do PS II na podstawie widm emisji fluorescencji? Może analiza widm emisji fluorescencji wyizolowanych form monomerycznej oraz trimerycznej PS I mogłaby przybliżyć rozwiązanie takiego problemu? Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktorantki na ten temat.
2. Jak to zostało podkreślone we wniosku nr 7 rozdziału szóstego, komórki mutantu $\Delta psal$ akumulują karotenoidy, miksoksantofil oraz zeaksantynę, co odbywa się kosztem β -karotenu. Szczegółowa analiza Tabeli 4.4 na str. 59 pokazuje dodatkowo inną interesującą i potencjalnie ważną prawidłowość w komórkach typu dzikiego. Obniżenie temperatury hodowli sinic z 30 do 15 °C powoduje istotne zmniejszenie poziomu zeaksantyny, któremu towarzyszy 14-krotny (!) wzrost poziomu β -karotenu. Również w przypadku mutantu $\Delta psal$ obniżenie temperatury hodowli rodzi skutek w postaci 47-% wzrostu puli β -karotenu. Jednocześnie nie zaobserwowano równie znacznych zmian w poziomie nienasyconych kwasów tłuszczowych. Badania w układach modelowych pokazują, że obecność β -karotenu w fazie lipidowej błon wpływa na wzrost płynności warstwy hydrofobowej (m. in. Strzałka et al.). Czy możliwe jest, że zaobserwowane zjawisko jest przejawem aktywności mechanizmu regulacyjnego, którego zadaniem byłoby zapobieganie нефизjologicznemu zmniejszeniu płynności błon aparatu fotosyntetycznego w obliczu stresu chłodu?

Formułując konkluzję chciałem stwierdzić, że Pani mgr Kinga Kłodawska przedstawiła w Swojej rozprawie doktorskiej bardzo liczne oraz wartościowe wyniki prac badawczych. Prac prowadzonych na bardzo wysokim stopniu zaawansowania, wymagających od eksperymentatora wiedzy, doświadczenia, precyzji oraz zaangażowania. Moim zdaniem, przedstawiona rozprawa spełnia w zupełności ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Wyniki, na podstawie których zredagowana została praca doktorska są bardzo liczne oraz przedstawione zostały i przedyskutowane w sposób wzorcowy, co pozwala sądzić o tej rozprawie jako o wyróżniającej. Gratulując Doktorantce oraz Promotorowi, jak i całemu współpracującemu zespołowi, tak cennych rezultatów uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie mojej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Kingi Kłodawskiej do publicznej obrony.

W. Lutyński