Prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Ul. F. Joliot Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław,07 .03.2018

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Kuczyńskiej pt. „Analiza wybranych aspektów funkcjonowania cyklu ksantofilowego w komórkach *Phaeodactylum tricornutum* w odpowiedzi na stres świetlny i temperaturowy".

Okrzemki są ważną grup glonów jednokomórkowych występujących powszechnie w wodach słodkich i słonych, odpowiedzialną za niemal połowę morskiej produkcji fotosyntetycznej. Wbrew powszechnemu występowaniu i znaczeniu dla ekosystemu dopiero w ostatniej dekadzie cieszą się szczególnym zainteresowaniem badaczy. Okrzemki są doskonałymi organizmami modelowymi, ponadto uzyskanie kompletnych sekwencji genomów dwóch gatunków w tym *Phaeodactylum tricornutum* umożliwiło rozwój badań tej grupy glonów. Jako organizmy fotosyntetyzujące muszą rozwiązać problem wydajnego wykorzystania energii słonecznej jak i ochrony przed jej nadmiarem. W pracy doktorskiej mgr Paulina Kuczyńska bada molekularne mechanizmy funkcjonowania dwóch cykli ksantofilowych u okrzemek oraz reakcje na stres temperaturowy i świetlny. Badania takie należy uznać za interesujące z punktu widzenia nauki, przyczyniają się one do poszerzenia naszej wiedzy.

W opinii recenzenta temat rozprawy doktorskiej p. mgr Pauliny Kuczyńskiej jest ważny, naukowo aktualny i spełnia wymogi stawiane rozprawie doktorskiej.

Praca doktorska posiada klasyczny układ, liczy 108 stron maszynopisu i zawiera 41 rysunków i 10 tabel. Spis cytowanego piśmiennictwa obejmuje 187 pozycji literaturowych. Na początku pracy znajduje się spis treści, spis skrótów oraz streszczenie w języku polskim. Kolejno w „Wprowadzeniu" liczącym 18 stron maszynopisu doktorant dokonuje krótkiej charakterystyki okrzemek, zajmuje się ich klasyfikacją, opisuje morfologie i fizjologie tej grupy glonów. Uzasadnia wybranie gatunku *Phaeodactylum tricornutum* do swych badań,

poznaniem sekwencji genomu, łatwością hodowli w tym możliwość wzrostu bez obecności krzemu. Brak informacji o miejscu występowania tego gatunku i warunkach wzrostu w naturze (np. intensywność światła, panującej temperatury) Kolejno opisuje barwniki fotosyntetyczne okrzemek, ich właściwości fizyko-chemiczne i biosyntezę. Następny podrozdział poświęca udziałowi barwników w fotosyntezie i fotoprotekcji, opisuje rodzaje cykli ksantofilowych i enzymy cyklu. W ostatnim akapicie opisuje stan badań nad cyklem ksantofilowym okrzemek.

Następnie definiuje cel pracy oraz szczegółowo w punktach opisuje problemy badawcze, którymi zajmuje się w swojej pracy doktorskiej.

Na kolejnych 12 stronach opisuje stosowane metody, używane odczynniki i aparaturę. Szczegółowy opis stosowanych procedur, umożliwiający wierne powtórzenie eksperymentów i świadczy o dobrej znajomości stosowanych metod. Doktorantka wykazał się szerokim warsztatem badawczym, opanował metody biologii molekularnej, konstrukcji wektorów ekspresyjnych ich zastosowania w nadekspresji białek w *Escherichia coli* oraz oczyszczania tych białek. Hoduje okrzemki w zmiennych warunkach świetlnych i temperaturowych, wykonuje ilościową i jakościową analizę barwników. Opracowuje metodę izolacji błon tylakoidowych z okrzemek, stosuje elektroforezę SDS-PAGE i immunodetekcję. Bada modelowe układy błon barwnikowo-lipidowych za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej oraz anizotropii fluorescencji.

Bardzo obszerny rozdział „Wyniki" to kolejne 44 strony maszynopisu, został on podzielony na części odpowiadające poszczególnym etapom pracy. Ułatwia to zrozumienie wielowątkowej rozprawy doktorskiej oraz zapewnia przejrzysty układ prezentowanych wyników. Jest on bogato ilustrowany rysunkami i tabelami ułatwiającymi czytelnikowi śledzenie kolejnych etapów pracy.

Wśród wyników przedstawionych w rozprawie, zdaniem recenzenta na podkreślenie zasługuje:

1. Wykazanie, że obniżenie temperatury hodowli *Phaeodactylum tricornutum* przyczynia się do zwiększenia wrażliwości tych glonów na stres świetlny.
2. Wynik świadczący o większej zdolności protekcyjnej Zea w stosunku do Diato, ponieważ podczas ciągłego oświetlenia światłem o wysokiej intensywności okrzemki preferują akumulację Zea.

3. W badaniach kalorymetrycznych błon modelowych wykazała, że Zea i Diato charakteryzują się dużym wpływem na termodynamikę błon, w szczególności w fazie żelu.
4. Opracowanie metody oczyszczania all-*trans* Diadino i Diato umożliwiającej uzyskanie barwników o bardzo wysokim stopniu czystości (≥ 99,9%) przy zachowaniu wysokiej wydajności.
5. Opracowanie metody izolacji i oczyszczania all-*trans*Zea z transformowanych bakterii *Escherichia coil.*
6. Opracowanie metody izolacji tylakoidów z *Phaeodactylum tricornutum* o wysokim stopniu czystości.
7. Uzyskanie rekombinowanych enzymów: epoksydazy zeaksantynowej (ZEP) z *Arabidopsis thaliana* i epoksydazy zeaksantynowej (ZEP3) *Phaeodactylum tricornutum*, chociaż w postaci ciałek inkluzyjnych. Czy można było wprowadzić jeszcze inne modyfikacje hodowli bakterii ?

Kolejny rozdział to obszerna licząca 15 stron dyskusja. Doktorantka omawia wynik swojej pracy na tle literatury światowej. Podzielona jest również na podrozdziały odpowiadające etapom pracy. W mojej ocenie w dyskusji znalazły się akapity, które można było umieścić w wstępie lub wynikach. Część merytoryczną dyskusji oceniam bardzo wysoko, pozytywnie oceniam również interesujące sugestie dotyczące kontynuacji badań. Tutaj zabrakło mi tylko porównania warunków hodowli używanych w eksperymentach z *Phaeodactylum tricornutum* do warunków występujących w naturze, a w szczególności intensywności światła. Również pozytywnie oceniam trzystronicowe podsumowanie.

Chciałbym ponadto podkreślić bardzo starannie opracowana stronę graficzną pracy doktorskiej, bardzo dobrze zaprojektowane i opracowane rysunki, wykresy i tabele ułatwiają zrozumienie czytelnikowi zasad prowadzonych eksperymentów jak i prawidłowości wyciąganych wniosków. Również wstęp zawiera liczne bardzo starannie wykonane rysunki.

Pozytywnie oceniam fakt, że efektem pracy doktorskiej są trzy patenty oraz publikacja,
opublikowanie opisanej w pracy metody izolacji diadinoksantyny i diatoksantyny w J Appl Phcol (2017), 29:78-87.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Pauliny Kuczyńskiej. Realizuje w pełni postawione cele badawcze, jest ona oryginalnym osiągnięciem naukowym.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane pracą doktorskim przewidziane ustawą określonym w art. 13 ustawy z dnia 14. 03. 2003 roku i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Pauliny Kuczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak

Andrzej Szczepaniak