AGH
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica
w Krakowie

Prof. dr hab. Květoslava Burda

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
30-059 Kraków, ul. Reymonta 19

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Pauliny Kuczyńskiej

Pani mgr Paulina Kuczyńska wykonała pracę doktorską zatytułowaną *„Analiza wybranych aspektów funkcjonowania cyklu ksantofilowego w komórkach Phaeodactylum tricornutum w odpowiedzi na stres świetlny i temperaturowy"* w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Kazimierza Strzałki. Badania, których wyniki zostały zawarte w niniejszej rozprawie były finansowane w ramach realizacji projektu Preludium nr 2013/-9/N/NZ1/01031 („Analiza porównawcza epoksydaz zeaksantynowych okrzemek z zastosowaniem *Phaeodactylum tricornutum"*) oraz projektu nr 2011/01/M/NZ1/01170 („Sztuczne błony, jako układy modelowe w badaniach molekularnych mechanizmów adaptacji okrzemek do zmiennych temperatur").

Pani P. Kuczyńska zajmowała się udziałem w procesach ochronnych dwóch cykli ksantofilowych występujących w okrzemkach poddanych stresowi wywołanemu temperaturą bądź światłem. Jako układ badawczy wybrała modelowy gatunek okrzemki morskiej o znanym genomie *Phaeodactylum tricornutum.* Pozwoliło to Doktorantce poza ilościową analizą składu barwnikowego, kinetyki de-epoksydacji diadinoksantyny i epoksydacji diatoksantyny na przeprowadzenie dodatkowo analizy ekspresji genów kodujących enzymy cyklu ksantofilowego w zależności od rytmu dobowego. Stres świetlny był wywoływany oświetleniem periodycznym bądź światłem ciągłym. Ponadto Doktorantka przeprowadziła badania wpływu różnych reżimów oświetleniowych na poziom peroksydacji lipidów w komórkach okrzemek oraz w izolowanych z nich tylakoidach. Innym ważnym zadaniem, które postawiła sobie pani P. Kuczyńska było opracowanie wydajnego procesu izolacji i oczyszczania izomerów all-trans diadinoksantyny i diatoksantyny z *Phaeodactylum tricornutum.* Dzięki temu mogła zbadać wpływ różnych stężeń zeaksantyny oraz diatoksantyny na przejścia fazowe i zmiany płynności modelowych układów - liposomów utworzonych z DPPC (dipalmitoilofosfatydocholiny). Doktorantka podjęła się także próby opracowania procedury ekspresji wybranych rekombinowanych epoksydaz zeaksantynowych w *Escherichia coli.*

Problemy, którymi pani P.Kuczyńska zajmowała się w ramach realizacji pracy doktorskiej są bardzo ważne ze względu na zrozumienie molekularnych mechanizmów obronnych

wytworzonych przez organizmy szczególnie wrażliwe na warunki środowiskowe. Niektóre okrzemki są wykorzystywane do monitorowania jakości wód (np. ich odczynu i zasolenia lub zasobu składników odżywczych). Poza tym, ze względu na swoją budowę i skład chemiczny oraz wytworzone specyficzne mechanizmy, m.in. fotoprotekcyjne, czy wysoką zawartość lipidów, okrzemki stanowią pożądany materiał badawczy o potencjalnym zastosowaniu w wielu gałęziach przemysłu począwszy od zastosowań w budownictwie, rolnictwie po przemył spożywczy, kosmetyczny, farmaceutyczny czy energetyczny. Jednym słowem, niniejsza praca doktorska bardzo dobrze wpisuje się w nurt badań, które mogą znacząco przyczynić się do rozwoju nowych nano- i bio-technologii.

Praca liczy 107 stron. Napisana jest w języku polskim. Została podzielona na sześć rozdziałów poprzedzonych wykazem skrótów i streszczeniem. Pierwszy rozdział jest „Wprowadzeniem", w którym w czterech podrozdziałach Doktorantka zawarła: (i) charakterystykę okrzemek, przedstawiając ich klasyfikację, morfologię i fizjologię; (ii) informacje o barwnikach fotosyntetycznych występujących w okrzemkach, opisując własności fizyko-chemiczne, biosyntezę, czynniki regulujące skład i zawartość barwników oraz informacje na temat dostępnych procedur ich izolacji i udziale w procesie fotosyntezy i fotoprotekcji; (iii) dostępne dane na temat cykli ksantofilowych, ich rodzajach, enzymach w nich uczestniczących i poznanych podobieństwach i różnicach pomiędzy cyklami ksantofilowymi występującymi u okrzemek i u roślin; (iv) cele pracy. Drugi rozdział „Materiały i metody" został podzielony na dwa podrozdziały, z których każdy został dla przejrzystości jeszcze podzielony na kolejne podrozdziały. Zamieszczone zostały w nim dane o stosowanych odczynnikach, aparaturze, organizmach wykorzystanych w badaniach oraz metodologii poszczególnych etapów badawczych. W rozdziale trzecim zostały przedstawione wyniki badań (i) wpływu temperatury i światła na mechanizmy fotoprotekcji u okrzemek, (ii) wpływu zeaksantyny i diatoksantyny na termodynamikę błon modelowych, (iii) procedury otrzymywania i badania jakości diadinoksantyny i diatoksantyny oraz zeaksantyny, a także tylakoidów z okrzemek, (iv) przygotowania konstruktów genowych do ekspresji rekombinowanych epoksydaz zeaksantynowych, sposoby ich izolacji i oczyszczania oraz badania aktywności. Rozdział czwarty zawiera dyskusję uzyskanych wyników. Został on odpowiednio podzielony na siedem podrozdziałów, z których każdy dotyczy odrębnego problemu badawczego zgodnie z tymi wyodrębnionymi we wcześniejszym rozdziale trzecim. Kolejny rozdział jest podsumowaniem całej pracy. Konkluzje zostały przedstawione w postaci odrębnych punktów. Na końcu pracy znajduje się rozdział szósty, który stanowi „Bibliografia". Zawiera ona 184 pozycje literaturowe w porządku alfabetycznym i trzy odnośniki do zgłoszeń patentowych. Wśród zebranej bogatej literatury znajdują się publikacje zarówno z ostatnich lat, jak i pierwsze doniesienia dotyczące prekursorskich badań związanych z tematyką poruszaną przez Doktorantkę. Rozprawa zawiera 10 tabel oraz łącznie 41 ryciny, z których 32 przedstawiają oryginalne wyniki eksperymentalne oraz ich analizę. Należy podkreślić, iż praca została zredagowana z dużą starannością.

W celu zrozumienia funkcjonowania dwóch cykli ksantofilowych u okrzemki *Phaeodactylum tricornutum* hodowanej w różnych warunkach temperaturowych i świetlnych Doktorantka przeprowadziła szereg eksperymentów z zastosowaniem różnorodnych metod biochemicznych i biofizycznych, między innymi: wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), system do analizy PCR w czasie rzeczywistym, elektroforezę do separacji białek i kwasów nukleinowych, spektrometr absorpcyjny UV-VIS i spektrometr fluorescencyjny, czy skaningowy mikrokalorymetr różnicowy. Okrzemki poddawane różnym stresom świetlnym i temperaturowym w warunkach hodowlanych były następnie badane pod kątem składu

barwnikowego, poziomu ekspresji genów, kinetyki reakcji cyklu ksantofilowego i peroksydacji lipidów.

Czynnik temperaturowy był wprowadzony wyłącznie dla okrzemek hodowanych w warunkach niskiej intensywności światła 30 μmol $m^{-2}s^{-1}$ przez 7 dni. Wybrano dwie temperatury 15°C (LL-15) i 20°C (LL-20), które wyznaczają granice optymalnych temperatur dla hodowli *Phaeodactylum tricornutum*. Raz dziennie w fazie jasnej był sprawdzany poziom stężenia barwników (chlorofilu a i c – Chl a i Chl c, chlorofilidów – Chlde, fukoksantyny – Fuco, diadinoksantyny – Diadino, diatoksantyny – Diato, β-karotenu – β-Car) oraz ekspresji sześciu genów zaangażowanych w cykl ksantofilowy (ZEP1, ZEP2, ZEP3, VDE, VDL1 i VDL2) względem genu referencyjnego RPS. Przyjmując poziom zawartości Chl a jako wyznacznik wzrostu okrzemek, pozostałe barwniki analizowano względem zawartości Chl a. W normalizacji dodatkowo uwzględniano zawartość Chlde, będącego produktem degradacji Chl a. Wysoka zawartość Chlde wynikała ze zbyt dużej koncentracji komórek w hodowli i stąd w tych eksperymentach nie był zachowany spodziewany eksponencjalny wzrost okrzemek. Potwierdziły to wyniki zmian zawartości Chl a w czasie. O ile zawartość Chlde była podobna w obu hodowlach począwszy od 2 dnia, to poziom Chl a pozostawał istotnie niższy w próbie hodowanej w niższej temperaturze. Także zawartość Fuco była nieznacznie niższa (o ok. 9%) w początkowym etapie wzrostu okrzemek inkubowanych w 15°C. Oszacowana średnia względna zawartość Fuco wynosiła ok. 700 mmol/mol (Chl a + Chlde). Natomiast względna zawartość Chl c była zbliżona dla obu warunków hodowlanych przez cały okres 7 dni (ok. 180 mmol/mol (Chl a + Chlde)), przy czym systematycznie nieznacznie malała w kolejnych dniach począwszy od 3 dnia (o ok. kilka procent w 7 dniu hodowli). Analiza zawartości barwników fotoprotekcyjnych wykazała, że w warunkach zastosowanego niskiego natężenia oświetlenia nie wykryto obecności barwników uczestniczących w cyklu ksantofilowym, anteraksantynowym czy wiolaksantynowym (VAZ), a jedynie obecne były te zaangażowane w cykl diadinoksantynowy (DD). Zawartość Diadino utrzymywała się na stałym poziomie ok. 135 mmol/mol (Chl a + Chlde) przez okres 7 dni dla obu temperatur, 15°C i 20°C, podczas gdy zawartość Diato rosła systematycznie, ale przekroczyła błąd pomiarowy wyznaczania dopiero w trzecim dniu,a w 7 dniu osiągnęła wartość ok. 8 mmol/mol (Chl a + Chlde). Ponadto wyznaczono poziom β-Car, który od drugiego dnia hodowli ustabilizował się na poziomie ok. 20 mmol/mol (Chl a + Chlde) wykazując nieznacznie mniejszą zawartość w okrzemkach inkubowanych w 20°C. Różnica pomiędzy hodowlami była istotna wyłącznie dla 2 dnia. Wobec bardzo niskiej zawartości Diato Doktorantka wykluczyła funkcjonowanie cyklu DD, zakładając, że Diato może pochodzić z kompleksu FCP. Dlatego też proces de-epoksydacji Diadino i epoksydacji Diato przeprowadzono na komórkach okrzemek w 3 dniu hodowli po uprzedniej godzinnej adaptacji w ciemnościach, a następnie poddaniu działaniu światła białego o dużej intensywności 1250 μmol $m^{-2}s^{-1}$ przez 1h i ponownej godzinnej inkubacji w ciemnościach. Cykl de-epoksydacji i epoksydacji był monitorowany poprzez pomiary zawartości obu barwników w różnych interwałach czasowych, po 1, 2, 3, 4, 5, 15, 30 i 60 min. Pomijając przedstawione w pracy próby matematycznej analizy uzyskanych wyników, do której swoje uwagi przedstawię na końcu niniejszej recenzji, z całą pewnością można stwierdzić w oparciu o przedstawione dane eksperymentalne, że cykl DD był aktywny, przy czym proces epoksydacji w temperaturze 15°C zachodził ok. dwukrotnie szybciej niż w 20°C. Natomiast nie można takiego wniosku wyciągnąć na podstawie danych prezentowanych dla procesu de-epoksydacji. Dopiero właściwa analiza matematyczna mogłaby dać jednoznaczną odpowiedź, której tu zabrakło. Korzystając z wykresu Ryc. 13 można wyznaczyć czas, dla którego zaobserwowano w procesie de-epoksydacji zmiany zawartości Diato i Diadino o ok. 50% i wydaje się on być porównywalny (ok. 3-4 min), a jeśli wziąć pod uwagę wyznaczony współczynnik c zamieszczony w tabeli 5, to ta różnica z pewnością jest mniejsza niż czynnik 1.5.

Analiza zawartości transkryptów cyklu ksantofilowego dla hodowli LL-15 i LL-20 wykazała utrzymywanie się ich na stałym poziomie w przeciągu 7 dni. Ekspresja ich była wyższa w przypadku LL-15 prawie 1.,2- , 2- , 1.8- i 2- krotnie odpowiednio dla ZEP1, ZEP2, VDE i VDL1. W przypadku hodowli w niższej temperaturze dodatkowo zarejestrowano niewielki wzrost mRNA dla VDL2, ale był on kilkukrotnie niższy od obserwowanego dla VDL1. W obu temperaturach największy przyrost zaobserwowano dla ZEP1, ponad 2-krotnie niższy dla ZEP2 i VDE oraz prawie 10-krotnie niższy dla VDL1. W oparciu o eksperymenty przeprowadzone w różnych warunkach temperaturowych, Doktorantka zauważyła, że okrzemki hodowane w temperaturze 15°C wykazywały wykształcenie mechanizmów adaptacyjnych zwiększających wydajność fotoprotekcyjną efektywniej w porównaniu z tymi hodowanymi w wyższej temperaturze 20°C. Przypuszcza, że mogą się one wiązać nawet ze zmianami strukturalnymi, a więc m.in. płynnością błon tylakoidalnych, gdyż wyższa ekspresja genów nie musi oznaczać wzrostu zawartości kodowanych białek. Z powodu braku dostępnych przeciwciał nie mogła zweryfikować podwyższonej obecności kodowanych białek w badanych układach.

W celu wyjaśnienia roli współistnienia dwóch cykli ksantofilowych DD i VAZ zaobserwowanych w *Phaeodactylum tricornutum* przez inne grupy badawcze, pani P. Kuczyńska przeprowadziła eksperymenty w różnych reżimach świetlnych dla stałej temperatury 15°C. Okrzemki były hodowane w fotoperiodzie 6/18 : L/D lub w świetle ciągłym o intensywności 30 μmol $m^{-2}s^{-1}$ (LL), 700 μmol $m^{-2}s^{-1}$ (HL) lub 1250 μmol $m^{-2}s^{-1}$ (HL-const). Zaobserwowano niewielki spadek Chl a przy jednoczesnym wzroście Chlde dla HL-15 w porównaniu z LL-15, ale względne zwartości Fuco i Chl c nie uległy zmianie. Natomiast zastosowanie ciągłego światła powodowało spadek zawartości zarówno Chl a jak i Chlde w kolejnych dniach oraz zmniejszenie względnej zawartości Fuco i Chl c, nawet kilkukrotne (trudne do oszacowania ze względu na niestabilność warunków hodowlanych). O ile zawartość Diadino była raczej stała przez 7 dni w przypadku LL-15, to dla HL zarejestrowano już w pierwszym dniu wzrost 1.7-krotny zawartości Diadino i utrzymywał się on na tak wysokim poziomie (nawet dwukrotnym) przez kolejne dni. Wyjątkiem był drugi dzień, kiedy zawartość Diadino spadła do poziomu zarejestrowanego dla LL-15. Najprawdopodobniej spadek ten wynikał z powstania Diato, której zawartość była wtedy najwyższa. Średni poziom Diato w HL-15 był prawie dwukrotnie niższy i wahał się wokół ok. 100 mmol/ mol (Chla a +Chlde). Począwszy od trzeciego dnia względna zawartość Diadino w HL-15 i HL-15-const była zbliżona osiągając maksimum w piątym dniu hodowli (ok. 300 mmol/ mol (Chla a +Chlde)). Natomiast zawartość Diato w okrzemkach hodowanych w warunkach ciągłego oświetlenia rosła przez pierwsze trzy dni, stabilizując się na poziomie ok. 350 300 mmol/ mol (Chla a +Chlde). Jeśli chodzi o zawartość Viol, Anth, Zea i β-Car, to w pełni wiarygodne wyniki uzyskano tylko dla HL-15, a dla HL-15- const przedstawione dane uznano za reprezentatywne, co rozumiem, że wskazują jedynie trend zachowań zmienności zawartości tych barwników pomimo niestabilności hodowli w ciągłym świetle. W przypadku HL-15 poziom β-Car był podobny jak w LL-15, przy czym tu widoczne było maksimum dla 3 dnia hodowli. Natomiast jego nawet ponad 3-krtony wzrost zaobserwowano dla HL-15-const w 6 i 7 dniu hodowli po wcześniejszej stabilizacji na poziomie ok. 60 mmol/ mol (Chla a +Chlde) w dniach od drugiego do piątego. Zawartość barwników VAZ w HL-15 stabilizowała się w już w trzecim dniu hodowli na poziomie ok. 10 mmol/ mol (Chla a +Chlde) w przypadku Anth i Zea oraz 2 mmol/ mol (Chla a +Chlde) dla Viol. Natomiast zawartość antheraksantyny była dwukrotnie wyższa od w/w w pierwszym dniu, a zeaksantyny w drugim dniu. Analizując trend zmian barwników VAZ pod wpływem ciągłego światła można zauważyć niski poziom Viol i kilku- , a nawet kilkudziesięcio-krotny wzrost zawartości Ant i Zea. Anth wykazuje, dwa maksima dla 2 i 7 dnia hodowli, a Zea dla 3 i 7 dnia hodowli. Co więcej zwartość Zea od 4 dnia jest zbliżona do zawartości β-Car i ich rosnąca akumulacja w kolejnych dniach jest identyczna. Aktywność cyklu

DD i VAZ w przypadku okrzemek hodowanych w warunkach HL została niezależnie potwierdzona przez pomiar zmian zawartości karotenoidów tuż przed i po ich godzinnym naświetlaniu (1250 μmol $m^{-2}s^{-1}$) oraz zaraz po przeniesieniu do ciemności i godzinnej inkubacji ich w tych warunkach. Wszystkie zmiany były istotne pomiędzy próbą kontrolną LL-15-D, a badanymi HL. Zmiany Diadino, Diato, Viola, Anth, Zea i CrypE istotnie różniły się także dla HL-15-D i HL-15L. Zmiany zawartości ksantofli uczestniczących w cyklu DD i VAZ były zgodne z oczekiwaniami aktywacji procesów de-epoksydacji i epoksydacji w zależności od warunków świetlnych. Zawartość Fuco malała pod wpływem światła i rosła w ciemnościach, a β-Car wykazywał odwrotną zależność. Jego zmiany były istotnie różne dla HL15-L i HL-15-D tylko w wyniku godzinnej ekspozycji na silne światło białe. W przypadku hodowli LL-15-D nie zaobserwowano aktywacji cyklu VAZ. Doktorantka przeprowadziła dyskusję tych wyników, ale ponieważ nie wszystko w niej jest dla mnie zrozumiałe będę prosiła o wyjaśnienie pewnych kwestii w trakcie obrony.

W dalszej części pracy Autorka przedstawiła badania kinetyki cyklu DD dla okrzemek hodowanych w warunkach HL-15-D i HL-15-L, aby móc sprawdzić, jak zależy ona od uruchamianego dodatkowo cyklu VAZ w tych warunkach. Wyniki porównywała z tymi otrzymanymi dla LL-15-D, kiedy cykl VAZ nie był aktywowany. Z powodu braku poprawnej analizy matematycznej wyników eksperymentalnych trudno jest stwierdzić, jakie są zależności czasów procesu de-epoksydacji i epoksydacji dla poszczególnych przypadków. Jednak nawet przy braku tych danych można zauważyć, że epoksydacja jest najszybsza w przypadku HL-15-L, a najwolniejsza dla LL-15-D. Natomiast czas połowicznego wzrostu poziomu Diato w procesie de-epoksydacji jest porównywalny dla LL-15-D i HL-15-D (ok. 2 min) i z pewnością mniejszy niż 2min w przypadku HL-15-L. Zgadzam się z konkluzją p. Kuczyńskiej, że cykl DD dla badanych warunków eksperymentalnych nie zależy od początkowego poziomu Diadino i Diato. Natomiast trudno jest stwierdzić w oparciu o przedstawione wyniki, czy zwiększyła się zawartość barwników VAZ w przypadku HL-15-L. Można jedynie zauważyć, że cykl VAZ był wtedy najbardziej efektywny, następowały największe zmiany zawartości barwników VAZ.

Badania poziomu transkryptów genów cyklu ksantofilowego w warunkach periodycznego stresu świetlnego dla fazy dziennej i nocnej wykazały znaczną ekspresję genu ZEP3, który nie był detektowalny w przypadku LL-15, poza tymi, które także przy niskim natężeniu światła były zaobserwowane po 48 h inkubacji w ciemności (ZEP1, ZEP2, VDE, VDL1 i VDL2). Autorka przeprowadziła dyskusję zmian periodycznych poszczególnych genów i zasugerowała, że ZEP1 i VDL2 mogą być ważne przy reakcjach spoza cyklu ksantofilowego. Natomiast uważa za wielce prawdopodobne, że poza VDE także ZEP2 może być odpowiedzialne za regulację cyklu DD, a VDL1 i i ZEP3 cyklu VAZ. Wciąż zbyt mało wiemy o innych zmianach towarzyszących cyklom ksantofilowym, ale nie można wykluczyć, że interpretacja zaproponowana przez Doktorantkę jest prawdopodobna.

Pomiary stopnia peroksydacji lipidów w komórkach okrzemek i wyizolowanych z nich tylakoidów wykazały, że jest on prawie 2-krotnie niższy w warunkach LL-15-D w porównaniu z HL-15-D. Dodatkowe oświetlenie ciągłe przez 1h powodowało w pierwszym przypadku wzrost peroksydacji, a w drugim jej spadek. Pani Kuczyńska przypuszcza, że zaobserwowany efekt mógłby być spowodowany obecnością Zea w hodowli HL-15 (brak cyklu VAZ w LL-15). Co więcej sugeruje, że Zea mogłaby przyśpieszać kinetykę przemian w cyklu DD, ale nie rozumiem na jakiej podstawie.

Badania wpływu produktów procesu de-epoksydacji uruchamianego w wyniku stresu świetlnego, tj. Diato i Zea, na zmiany własności termodynamicznych błon Doktorantka przeprowadziła na układach modelowych, którymi były liposomy DPPC wielo-warstwowe (pomiary kalorymetryczne) lub jedno-warstwowe (pomiary anizotropii z wykorzystaniem

fluorescencji). W oparciu o wyznaczone wartości zmian entalpii swobodnej i entropii oraz temperatury dla charakterystycznych przejść pomiędzy fazą lamelarną żelu a fazą pofałdowanego żelu (L_{β}-$P_{\beta'}$, tzw. przedprzejście), oraz pomiędzy fazą pofałdowanego żelu a fazą ciekłokrystaliczną (L_{β}-$P_{\beta'}$, tzw. główne przejście fazowe), mogła stwierdzić, że powyższe parametry wykazują podobny kierunek zmian dla obu badanych układów. Zarówno temperatury przejść, jak i zmiany entalpii i entropii maleją, przy czym zmiany te są większe dla przedprzejścia. Co więcej Diato wykazuje większy wpływ na te parametry i przy najwyższym badanym stężeniu (1 mol%) powoduje zanik przedprzejścia, które wciąż pozostaje widoczne dla Zea o tym stężeniu. Wytłumaczeniem tego efektu może być budowa cząsteczki Diato, która w większym stopniu niż Zea może wpływać na osłabienie oddziaływań pomiędzy polarnymi głowami lipidów, o czym w dyskusji wspomina Autorka. Bardzo interesujący wynik uzyskała p. Kuczyńska badając wpływ Diato i Zea na lepkość w modelowych układach liposomalnych DPPC dla dwóch różnych faz: lamelarnej i ciekłokrystalicznej. Zea w obu fazach powodowała wzrost lepkości i efekt był silniejszy dla temperatury 20°C. Diato wykazywała podobny wpływ na lepkość błony jak Zea w fazie ciekłokrystalicznej dla całego zakresu badanych stężeń za wyjątkiem najwyższego (1mol%), kiedy anizotropia była ponad 1.5-raza mniejsza niż dla Zea. Natomiast w fazie lamelarnej Diato wykazywała wpływ identyczny, jak Zea dla stężeń $\leq$ 0.10 mol%, a dla wyższych powodowała spadek anizotropii, która jednak pozostawała nieco wyższa niż ta wyznaczona dla próbki kontrolnej liposomów (bez karotenoidów). Doktorantka uważa, że zjawisko to może wynikać głównie ze zmian na powierzchni, a nie wewnątrz liposomów i odpowiedzialna za to jest struktura Diato.

Przeprowadzenie powyższych eksperymentów nie byłoby możliwe bez opracowanej przez Doktorantkę procedury otrzymywania czystych izomerów trans Diadino i Diato, co z kolei wymagało ustalenia optymalnych warunków hodowli, aby uzyskać także odpowiednio wysoką wydajność pozyskiwania tych ksantofili. Opracowała również wysoce efektywną procedurę pozyskiwania trans-Zea z transgenicznych bakterii *Escherichia coli*. Ze względu na niskie koszty i dostępność stosowanych odczynników i materiałów procedury powyższe mogą także znaleźć zastosowanie w przypadkach konieczności uzyskiwania dużej ilości tych związków, a więc na skalę przemysłową.

Wcześniej opisane eksperymenty dotyczące pomiarów peroksydacji lipidów wymagały także opracowania/ dopracowania metody izolacji tylakoidów z *Phaeodactylum tricornutum* w celu uzyskania czystych aktywnych błon fotosyntetycznych.

Jednym z celów pracy pani P.Kuczyńskiej było opracowanie układu umożliwiającego ekspresję wybranych rekombinowanych epoksydaz zeaksantynowych w *Escherichia coli*. Wymagało to przygotowania konstruktów genowych dostosowanych do bakteryjnego systemu ekspresyjnego, ustalenia optymalnych warunków hodowlanych, aby nastąpiła produkcja białek rekombinowanych, które wykazywałyby wymaganą aktywność enzymatyczną. Przy realizacji tego celu Doktorantka napotkała wiele trudności. Była świadoma trudności wyzwania, którego się podjęła. Nie udało się jej osiągnąć oczekiwanych rezultatów, jednakże dzięki zdobytemu doświadczeniu mogła zaproponować kierunek przyszłych działań w celu dopracowania właściwego układu ekspresyjnego.

Bez wątpienia Doktorantka osiągnęła postawione sobie cele. Nawet, jeśli nie zawsze mogła pochwalić się końcowym rezultatem, to wynikało to z trudności samego problemu, którego się podjęła i jestem przekonana, że do osiągnięcia pełnego sukcesu zabrakło tylko czasu. Każdy z problemów, których dotyczą badania zawarte w niniejszej pracy, mógłby być z powodzeniem przedmiotem odrębnych rozpraw doktorskich. Ogrom pracy i doświadczenia, które nabyła Doktorantka w trakcie realizacji powyższych zadań oraz wiedza, którą zaprezentowała podczas

dyskusji, czyni ją osobą, która z powodzeniem może samodzielnie stawiać i rozwiązywać problemy badawcze. Z pewnością jest to zasługą zarówno zaangażowania samej Doktorantki, jak i zespołu, w którym mogła pracować i zdobywać wiedzę.

Tematyka pracy jest niezwykle interesująca. Dotyczy badania mechanizmów cykli ksantofilowych. Mimo zaangażowania wielu grup badawczych, w tej dziedzinie wciąż pozostaje więcej pytań niż odpowiedzi, a nawet rodzą się nowe. Kierowana ciekawością mam kilka pytań do Doktorantki, i proszę aby się do nich odniosła w trakcie obrony:

1) Na wykresach przedstawiających procesy de-epoksydacji i epoksydacji w cyklu DD (Ryc. 13 i 21) brakuje błędów, choć dane punkty eksperymentalne są średnią z trzech prób biologicznych. Dlatego mam pytanie dotyczące dokładności wyznaczenia zawartości Diadino i Diato dla poszczególnych warunków hodowlanych. Od tej dokładności zależy, czy należy zastanawiać nad przyczyną wzrostu całkowitej zawartości ksantofili w trakcie prowadzonych eksperymentów. Większe różnice obserwowane są dla pomiarów prowadzonych w obecności światła białego.
2) Nie znalazłam uzasadnienia dla stosowania tak różnorodnych funkcji teoretycznych, które Doktorantka wykorzystała do opisu kinetyk w cyklu DD. Przebiegi mają ewidentnie, zgodnie z oczekiwaniami, charakter eksponencjalny (w niektórych przypadkach być może bi-eksponencjalny) i stosowanie funkcji, których parametry w żaden sposób nie pozwalają na uzyskanie informacji o kinetyce badanych procesów nie ma sensu. Np. dlaczego wykorzystywano funkcję, która w eksponencie ma funkcję kwadratową. Dla ujemnych współczynników przy członie kwadratowym jest to funkcja Gaussa, która ma kształt krzywej dzwonowej. W eksperymentach nie obserwuje się kształtu dzwonowego. Z kolei dla dodatnich wartości tego współczynnika, krzywa ma kształt odwróconego dzwonu, którego ramiona idą do nieskończoności szybciej niż funkcja eksponencjalna. Tego efektu również nie widać w danych. Wybór tej funkcji do analizy danych wydaje się więc niezbyt trafny. Przy bardzo gładkich przebiegach danych eksperymentalnych wystarczyło wziąć pod uwagę linie proste. We wcześniejszej części niniejszej recenzji zasugerowałam, jak można łatwo i prawdziwie oszacować ewentualną skalę czasową obserwowanych procesów. Przy opracowaniu trzeba jednak odpowiednio dobrać krzywe teoretyczne, w tym przypadku eksponencjalne krzywe typu: Ae^{-bx} lub dla przebiegów wzrostowych $A(1-e^{-bx})$. Uzyskane w oparciu o nie parametry dostarczą poprawnej informacji na temat kinetyki de-epoksydacji i epoksydacji. Dlatego prosiłabym, aby taką analizę przeprowadzić i w oparciu o uzyskane wyniki, ponownie przedyskutować zależność tych procesów od stresu wywołanego temperaturą oraz intensywnością światła.
3) Czym różniły się warunki eksperymentalne dla kinetyki cyklu DD dla LL-15 przedstawionego na Ryc. 13 i LL-15-D na Ryc. 21? Nawet bez analizy matematycznej widać, że różnią się one między sobą.
4) Co mogło być przyczyną niestabilności hodowlanej dla warunków HL-15-const?
5) Jak należy rozumieć stwierdzenie, że dane dotyczące wyznaczenia zawartości barwników VAZ i β-Car w przypadku HL-15-const są reprezentatywne (Ryc. 19). Jak duży jest błąd ich wyznaczenia? Czy podobnie, dane dla zawartości Fuco, Chl c, Diadino i Diato przedstawione na Ryc. 17 i 18 są reprezentatywne dla HL-15-const?
6) Patrząc na Ryc. 22 od razu można zauważyć, że tylko ZEP3 i VDE nie są związane ze zmianami faz i że ich zależności od czasu i periodów są podobne. Gdyby też złożyć zmiany ZEP2 i VDL1 dla poszczególnych periodów, to uzyskałoby się porównywalne, prawie stałe, oscylacje dla całego badanego zakresu czasowego. Dlatego jestem bardzo ciekawa, jak by to

Doktorantka skomentowała. Czy można spodziewać się, że ZEP3, VDE, ZEP2 i VDL1 mogą pełnić inne dodatkowe funkcje poza tym sugerowanymi w pracy?

7) Czy porównywalny poziom utlenionych lipidów w obu próbach LL-15-L i HL-15-L poddanych stresowi świetlnemu jest przypadkowy czy też może mieć znaczenie dla funkcjonowania błon tylakoidalnych okrzemek?
8) Czy Doktorantka może wskazać bezpośredni dowód eksperymentalny w oparciu o przeprowadzone badania DSC i anizotropii fluorescencji na potwierdzenie tezy szczególnego oddziaływania Diato z lipidami w porównaniu z Zea, wynikającego z jej budowy?
9) Ponieważ fragment dyskusji zawarty na stronie 88 (drugi akapit) jest dla mnie niejasny, prosiłabym o jej doprecyzowanie w trakcie rozprawy podczas omawiania wyników zawartych na Ryc. 20. Konkretnie nie rozumiem, jak spadek zawartości Anth podczas oświetlenia może sugerować, że szybkość de-epoksydacji Viola jest większa niż Anth , a wzrost zawartości Anth w ciemności, że szybkość epoksydacji Zea jest większa niż Anth.
10) Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tezy, że obecność Zea może przyśpieszać cykl DD.
11) Jak była weryfikowana jedno- i wielowarstwowość liposomów i czy wiadomo jakiej były wielkości?

Tylko dla porządku dodam, że zauważyłam kilka drobnych błędów edytorskich. Nie wpływają one jednak na zrozumienie pracy.

Mimo powyższych krytycznych uwag, pracę doktorską pani mgr Pauliny Kuczyńskiej uważam za niezwykle interesującą, a uzyskane wyniki za bardzo ważne dla zrozumienia procesów ochronnych wypracowanych w drodze ewolucji przez okrzemki. Opracowanie izolacji aktywnych tylakoidów z *Phaeodactylum tricornutum* pozwoli na rozwijanie badań w naturalnych układach eksperymentalnych, a wypracowane metody izolacji czystych izomerów Diadino, Diato czy Zea umożliwią prowadzenie kolejnych eksperymentów w bardzo dobrze zdefiniowanych układach modelowych. Poza tym ksantofile te mają wiele potencjalnych zastosowań w różnorodnych gałęziach przemysłu i stąd aż trzy zgłoszenia patentowe.

Praca spełnia wszystkie kryteria rozprawy doktorskiej i dlatego wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Pauliny Kuczyńskiej do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.

16 -03- 2018

Prof. dr hab. Květoslava Burda