UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI W
KRAKOWIE

Wydział
Biochemii,
Biofizyki i
Biotechnologii

Kraków, 8 czerwca 2018

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

Znaczenie naukowe tematyki pracy

Konwersja energii świetlnej w energię chemiczną, która jest podstawą procesu fotosyntezy, jest powszechnym i jednym z najbardziej fascynujących zjawisk w przyrodzie. Proces ten obserwowany, badany i opisywany od wielu stuleci nadal skrywa wiele tajemnic. Produkty fotosyntezy są niezbędne dla funkcjonowania człowieka na Ziemi. Wobec wzrastającej populacji ludzi na świecie oraz nieodwracalnych zmian w środowisku, dalsze badania nad wyjaśnieniem fenomenu fotosyntetycznej konwersji energii zachodzącej z nieosiągalną jak dotąd w technice wydajnością są niezwykle istotne.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr. Macieja Michalika wpisuje się w nurt badań nad szczegółowym wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów funkcjonowania anten fotosyntetycznych, tj. wysoko zorganizowanych struktur złożonych z kompleksów barwnikowo-białkowych, które absorbują promieniowanie elektromagnetyczne i przekazują efektywnie energię do centrum reakcji fotosyntetycznej, jednocześnie zdolne są rozproszyć nadmiar zaabsorbowanej energii chroniąc cały układ przed destrukcją. Struktura białek antenowych została już poznana, poznano rozmieszczenie i wzajemną orientację barwników antenowych. Nadal jednak nie wyjaśniono mechanizmów sprawnej regulacji procesów przekazu energii, jak również nie poznano jak zmienia się ułożenie cząsteczek barwników i struktura kompleksów w wyniku przełączenia anteny ze stanu przekazu energii wzbudzenie do stanu rozpraszania zaabsorbowanej energii,

Mgr Maciej Michalik wykonał swoje badania pod kierunkiem prof. dr. hab. Leszka Fiedora w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Stanowią one kontynuację i rozwinięcie badań prowadzonych od wielu lat przez zespół prof. Fiedora, które przyczyniły się do poznania natury oddziaływań barwników fotosyntetycznych (bakterio)chlorofili i karotenoidów z ich otoczeniem molekularnym w kompleksach fotosyntetycznych. Badania wykonane przez Doktoranta zostały sfinansowane przez FNP w ramach projektu TEAM kierowanego przez prof. Fiedora oraz ze środków NCN pozyskanych przez Doktoranta w ramach konkursu PRELUDIUM-7.

Ocena pracy doktorskiej

Praca pana mgr. Macieja Michalika liczy 108 stron i została napisana w układzie typowym dla rozpraw doktorskich z zakresu nauk biologicznych. Zasadniczą część poprzedzają streszczenia w języku polskim i angielskim, w których przedstawiono cele i najważniejsze wyniki pracy. Właściwa część rozprawy rozpoczyna się jednostronicowym spisem treści, który obejmuje tylko główne rozdziały i podrozdziały. Na kolejnej stronie zamieszczono kompletną listę stosowanych skrótów.

Pracę rozpoczyna „Wprowadzenie", napisane na 11 stronach tekstu i zawierające 3 ryciny, w którym Autor wprowadza czytelnika w tematykę pracy i rysuje ogólny stan wiedzy w tym zakresie. Rozdział ten podzielono na cztery podrozdziały bezpośrednio związane z przedmiotem prowadzonych badań. Pierwsze dwa zawierają podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat struktury anten LH1 i LHCII, poddawanych rekonstytucji w tej

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 63 64
fax +48(12) 664 69 02
email: b.mysliwa-kurdziel@uj.edu.pl

pracy. W kolejnym podsumowano poznane i opisane dotychczas w literaturze mechanizmy antenowe i protekcyjne. Autor zwraca uwagę na brak dobrego modelu dynamiki wzbudzenia w antenach oraz na fakt, że modele stworzone na podstawie poznanych struktur kompleksów antenowych oraz te powstałe na podstawie wyników czasowo-rozdzielczej spektroskopii dostarczają znacząco różnych stałych relaksacji. W mojej opinii podrozdział ten w elegancki sposób wskazuje na potrzebę dalszych doświadczeń nad wyjaśnieniem mechanizmu funkcjonowania anten fotosyntetycznych i jednocześnie uzasadnia podjęcie tego tematu przez Doktoranta. Wprowadzenie kończy podrozdział dotyczący przeglądu technik izolacji i rekonstytucji anten LHC stosowanych w różnych pracowniach, w tym w pracowni prof. Fiedora.

Cel pracy sformułowany w krótkim jednostronicowym rozdziale został sprecyzowany następująco: „zastosowanie metody wymiany barwników w kompleksach LH1 i LHCII w celu analizy sposobu sprzężenia chromoforów i ścieżek wędrówki wzbudzenia w tych kompleksach". Doktorant wyróżnił siedem kolejnych etapów realizacji pracy, które stanowią jej cele szczegółowe.

W rozdziale „Materiały i metody", który obejmuje 16 stron tekstu, Autor opisuje zastosowane w pracy metody oczyszczania barwników i kompleksów antenowych, metody syntezy niklowych pochodnych chlorofili i bakteriochlorofili, metody otrzymania rekombinowanego białka Ihcb1 oraz zastosowane techniki rekonstytucji kompleksów antenowych. Wszystkie opisy są bardzo szczegółowe, wręcz detaliczne, w mojej opinii umożliwiające powtórzenie wykonanych doświadczeń. Kolejne etapy prac są dobrze uzasadnione. Jednocześnie Doktorant cytuje oryginalne prace, na podstawie których opracowywał stosowane w swojej pracy protokoły. Analiza tej części metodyki wskazuje na wysoki stopień zaawansowania stosowanych metod oraz na ich czasochłonność. Autor zwraca również uwagę na konieczność bieżących modyfikacji stosowanych procedur zależnie od wyjściowego materiału biologicznego. Należy tu podkreślić doskonałe opanowanie warsztatu przez Doktoranta i zdobyte doświadczenie. W dalszej tego rozdziału równie szczegółowo opisane są zastosowane metody analityczne. Doktorant wyraźnie zaznacza, które z badań wykonane zostały poza macierzystym laboratorium i wskazuje miejsce wykonania tych prac. Zastosowane metody badań zostały odpowiednio dobrane do realizacji celów pracy.

Z obowiązku recenzenta muszę wskazać, że w tej części znalazłam drobne niedociągnięcia takie jak brak numeracji wzorów, niewyjaśnione znaczenia parametru *f* we wzorze na str. 27, czy podania jednostki stężenia, choć ta ostatnia wynika z samego opisu.

Najobszerniejszą część rozprawy (38 stron tekstu) stanowi rozdział „Wyniki", zawierający 35 rycin oraz 6 tabel. Rozdział ten został bardzo dobrze napisany. Jest zwięzły, spójny i logiczny, dlatego też bardzo dobrze się go czyta. Wyniki kolejnych doświadczeń są opisane w taki sposób, że stanowią kontynuację doświadczeń opisanych wcześniej. Rozdział ten w istocie stanowi opis eleganckiej i kompletnej serii doświadczeń. Doktorant rozpoczyna (rozdział 4.1) od charakterystyki wyizolowanych i oczyszczonych przez siebie barwników oraz zsyntetyzowanych niklowych pochodnych chlorofili i bakteriochlorofili. Doktorant użył odpowiednich metod by zademonstrować, że barwniki zostały dobrze oczyszczone i odpowiednio zidentyfikowane. W tym podrozdziale, jak i w całej pracy widoczna jest rzetelność naukowa Doktoranta. W tekście podano wydajność zastosowanych metod otrzymywania barwników oraz wskazano napotkane trudności.

W podrozdziałach 4.2 i 4.3 Autor opisuje kolejno izolację i rekonstytucję bakteryjnej anteny LH1 i roślinnej anteny LHCII. W obu rozdziałach Autor porównuje właściwości natywnych oczyszczonych anten, anten rekonstytuowanych z użyciem wyizolowanych i

oczyszczonych natywnych barwników oraz anten z podstawionymi pochodnymi (bakterio)chlorofili. Dodatkowo w przypadku anteny LHCII do rekonstrukcji wykorzystano rekombinowane białko lhcb1 oraz zastosowano dwie metody izolacji natywnych kompleksów antenowych. Badania własności otrzymanych preparatów prowadzono z zastosowaniem różnych uzupełniających się nowoczesnych metod pomiarowych. Wyniki badań są prezentowane w sposób przejrzysty. Wszystkie otrzymane wyniki są oryginalne i bardzo ciekawe. Szczególnie spodobało mi się doświadczenie, którego wynik zaprezentowano na rycinie 4.21, a które pokazuje iż chlorofil b jest niezbędny do formowania anten LHCII. Dopracowanie metody i uzyskanie rekonstytuowanych anten z wbudowanymi niklowymi pochodnymi chlorofili otwiera kolejne możliwości eksperymentalne. **Chciałabym poprosić Doktoranta, aby w czasie publicznej obrony pracy nakreślił perspektywę dalszych badań.**

W rozdziale Dyskusja, Autor na 20 stronach tekstu szczegółowo analizuje uzyskane przez siebie wyniki w odniesieniu do wyników uzyskanych przez inne zespoły badawcze. Na dowód przytoczę schemat pokazany na Rys. 5.2, gdzie Autor łączy wyniki swojej pracy z modelem relaksacji ekscytonów w LHCII zaczerpniętym z opublikowanej pracy innego zespołu. Autor swobodnie prowadzi dyskusję i cytuje liczne prace z zakresu badań nad funkcjonowaniem anten fotosyntetycznych. Lektura tego rozdziału pokazuje bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu oraz dojrzałość naukową Doktoranta i świadczy o jego umiejętności dokonania krytycznej analizy własnych wyników. Szczególnie podoba mi się fragment zamykający dyskusję (podrozdział 5.4), w którym Autor porównał funkcjonowanie anten LH1 i LHCII w odniesieniu do warunków środowiskowych, w których żyją organizmy bakteryjne i roślinne.

Autor zwięźle podsumowuje najważniejsze wyniki i wnioski na czterech stronach tekstu w rozdziale „Podsumowanie".

Bibliografia liczy 146 pozycji. Rozprawę kończy rozdział Aneks złożony z 11 tabel i jednego rysunku, w którym Autor zamieścił skład zastosowanych pożywek, buforów i wykorzystywane do obliczeń krzywe kalibracyjne.

Pytania do Doktoranta

Lektura pracy doktorskiej nasunęła następujące pytania do Doktoranta:

1) Czy zastosowanie niklowych pochodnych (bakterio)chlorofilu miało wpływ na efektywność i sposób wiązania karotenoidów w procesie rekonstytucji anten bakteryjnej i anteny roślinnej?
2) Na ile powtarzalna jest procedura rekonstytucji anten LHCII z niklowymi pochodnymi chlorofili, jeśli chodzi o wiązanie tych barwników? Na ile powtarzalne są widma absorpcji elektronowej, widma CD i czasy zaniku fluorescencji dla kolejnych preparatów? Jakich metod należy użyć by porównać różne, kolejno otrzymane preparaty? Czy każdorazowo należy przeprowadzić analizę z wykorzystaniem wszystkich zastosowanych w pracy metod? Czy doświadczenie Doktoranta wskazuje na możliwość zastosowania konkretnej metody/metod by porównać różne preparaty.

Ocena poprawności redakcyjnej pracy

Praca doktorska mgr. Macieja Michalika jest staranna, przejrzysta, spójna i logiczna. Należy podkreślić szczególną staranność przy prezentacji uzyskanych wyników. Autor, poprzez zastosowanie różnych kolorów linii, konsekwentnie i jednolicie w całej pracy różnicuje wyniki dla barwników natywnych i modyfikowanych, co znakomicie ułatwia czytanie pracy. Ryciny i tabele są dobrze opisane. Mam jedynie uwagę dotyczącą lokalizacji tabel i rysunków, które są położone daleko od miejsca ich omawiania w tekście.

Dla zobrazowania problemu przytoczę wybrane przykłady. Tabela 4.3 znajduje się na stronie 48., na której brak jest do niej odniesienia. Rozdział, do którego jest przypisana zaczyna się na stronie następnej. Podobnie rys 4.17 przywołany w tekście na stronie 49. znajduje się na stronie następnej, ale już na obszarze kolejnego podrozdziału. Takie rozmieszczenie rysunków i tabel stanowi pewną niewygodę dla czytającego.

W mojej opinii pominięcie w spisie treści kolejnych poziomów podrozdziałów utrudnia szybkie odnalezienie szukanych treści, zwłaszcza że dotyczy to odnalezienia protokołów wykonanych doświadczeń.

W tekście znalazłam jedynie pojedyncze, nieistotne dla zrozumienia treści błędy edytorskie.

Pragnę zwrócić uwagę Doktoranta na stosowaną terminologię pochodzącą z języka angielskiego w języku polskim. W szczególności, w języku polskim przyjęto tłumaczenie: „białko rekombinowane" a nie „rekombinantowe".

Uwagi końcowe

Podsumowując stwierdzam, że pan mgr Maciej Michalik zrealizował wszystkie postawione cele pracy i przedstawił bardzo dobrą pracę doktorską. Autor wykazał się dużą wiedzą teoretyczną i znajomością nowoczesnych technik. Wykonał ogromną ilość badań poprzedzonych dopracowaniem metod. Przedstawiona praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i dostarcza nowych danych na temat przekazu energii w antenach LH1 i LHCII. Opracowane przez Autora protokoły otrzymywania kompleksów LHC zawierających pochodne chlorofili będą z pewnością wykorzystywane przez innych badaczy. Jak dotąd wyniki uzyskane przez Doktoranta nie zostały opublikowane. Jestem przekonana, że wkrótce to nastąpi i zostaną one uznane przez innych badaczy. Uważam, że pan mgr Maciej Michalik jest dojrzałym naukowcem, gotowym do samodzielnej pracy naukowej.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska mgr. Macieja Michalika spełnia wymagania 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 dnia 27 września 2017 r., poz. 1789). Zwracam się zatem do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii o dopuszczenie mgr. Macieja Michalika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

B. Myśliwa Kołodziej