



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Soni Krysiak
pt.: „ The influence of endogenous and exogenous factors on the activity
of photosystem II and its heterogeneity”**

(„Wpływ czynników endogennych i egzogennych na aktywność fotosystemu II
i jego heterogeniczność”)

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Soni Krysiak została wykonana w Katedrze Zastosowań Fizyki Jądrowej Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH w Krakowie pod opieką prof. dr hab. Květoslavy Burdy oraz prof. dr hab. Niki Spiridis. Rozprawa dotyczy procesu fotosyntezy, a dokładniej funkcjonowania fotosystemu II (dalej określanego jako PSII), który jest jednym z elementów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów w błonach tylakoidów. Funkcjonowanie tego łańcucha umożliwia wykorzystanie zaabsorbowanej energii promieniowania słonecznego do wytworzenia NADPH i ATP, wykorzystywanych w kolejnych reakcjach biochemicznych do podtrzymania funkcji życiowych fotoautotrofów i produkcji biomasy.

We wszystkich organizmach prowadzących fotosyntezę tlenową od cjanobakterii (sinic) poprzez glony, proste rośliny aż po rośliny okrytonasienne PSII pozyskuje elektrony z utlenienia cząsteczek wody. Kluczowym elementem układu rozkładającego wodę (*ang.* WOC – *water oxidising complex*) określanym też jako kompleks wydzielający tlen (*ang.* OEC – *oxygen evolving complex*) jest kompleks (klaster) manganowy (Mn_4CaO_5) o strukturze kubicznej otoczony przez część białek kompleksu PSII. Poza wspomnianymi wyżej elektronami, produktami rozkładu wody są tlen cząsteczkowy oraz protony. Wydzielenie cząsteczki tlenu zachodzi periodycznie co cztery impulsy świetlne, a cztery pozyskane elektrony są sekwencyjnie, w odpowiedzi na błysk światła, dostarczane do centrum reakcji fotosyntetycznej PSII, a następnie do kolejnych elementów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. Model cyklicznego wydzielania tlenu w PSII przedstawiono po raz pierwszy w 1970 roku przez Kok'a i współautorów. Mimo, iż od tego doniesienia upłynęło ponad 50 lat (!), podczas których zebrano wiele danych teoretycznych i eksperymentalnych uzyskanych różnymi metodami, oraz dokonano ogromnego postępu w zrozumieniu procesu rozkładu wody, w dalszym ciągu brakuje spójnego modelu funkcjonowania tego kompleksu. Dlatego też fotosyntetyczny rozkład wody oraz aktywność fotochemiczna PSII pozostają w dalszym ciągu przedmiotem badań wielu grup badawczych z różnych dyscyplin prowadzonych z użyciem coraz nowszych metod i technik badawczych. Wielkie nadzieje aplikacyjne wiąże się z możliwością wykorzystania mechanizmów działania układu rozkładającego wodę przy projektowaniu wydajnych ogniw paliwowych.

W tym świetle tematyka badań przedstawionych w ocenianej rozprawie jest aktualna, bardzo ciekawa i wpisuje się doskonale w badania prowadzone w wielu ośrodkach na świecie. Wyróżnić można dwa aspekty przedstawionych badań. Pierwszy dotyczy wyjaśnienia wpływu białek PsbO, PsbP i PsbQ znajdujących się w otoczeniu kompleksu manganowego i są zlokalizowane na zewnątrz błony tylakoidów na wydajność

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i

Biotechnologii

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

i heterogeniczność procesu wydzielania tlenu. Drugi – dotyczy oceny możliwości wykorzystania natywnych kompleksów PSII dla skonstruowania układów hybrydowych fotosystem-nanocząstki WO_3 celem zwiększenia wydajności wydzielania tlenu w porównaniu do układu półprzewodnikowego. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem izolowanych błon tylakoidów gran, zawierających kompleksy PSII, określanymi w pracy jako PSII BBY. Doktorantka sformułowała dwa cele swojej pracy doktorskiej w odniesieniu do dwóch wyróżnionych aspektów pracy i przedstawiła je w formie konkretnych pytań badawczych. Zastosowała oryginalne podejście eksperymentalne i wykorzystwała szereg zaawansowanych technik biofizycznych i fizykochemicznych.

Szczegółowa ocena pracy

Praca doktorska mgr Soni Krysiak została napisana w języku angielskim. Praca ta liczy 155 stron. Zasadnicza jej część poprzedzona jest oświadczeniami wymaganymi dla prac doktorskich, podziękowaniami oraz wskazaniem źródła finansowania badań. Po tym następuje spis publikacji i innych licznych osiągnięć Doktorantki. Wynika z niego, że pani Sonia Krysiak jest współautorką dwóch prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR (Microsc. Res. Tech., <https://doi.org/10.1002/jemt.24394> oraz Materials, <https://doi.org/10.3390/ma14144057>). W pierwszej z nich Doktorantka jest pierwszą Autorką, co wskazuje na jej wiodącą rolę w powstaniu pracy. Doktorantka ma w swoim dorobku również liczne doniesienia konferencyjne zarówno w formie posterów jak i wystąpień ustnych, niektóre z nich zostały wyróżnione.

Zasadniczą część rozprawy rozpoczynają: spis treści, lista zastosowanych skrótów oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Układ dalszej części pracy nie jest typowy. W miejsce tradycyjnego wstępu zamieszczono cztery rozdziały wprowadzające (1. Background and motivation; 2. The aim of the studies; 3. Introduction to oxygenic photosynthesis; 4. Inorganic semiconductive systems). Jeden z nich (dotyczący fotosyntezy) podzielono na cztery podrozdziały. W kolejnym rozdziale (5. Materials & Methods) podzielonym na 11 podrozdziałów Doktorantka opisała zastosowane w pracy procedury otrzymania błon fotosyntetycznych - PSII BBY oraz nanocząstek WO_3 , jak również zastosowane metody badawcze. Po tym następuje rozdział zatytułowany „Results and discussion” (rozdział 6.) podzielony na dwa podrozdziały odpowiadające sformułowanym wcześniej celom pracy (rozdział 2). Rozprawę kończą dwa rozdziały podsumowujące (7. Conclusions; 8. Prospects for the future) oraz bogaty spis literatury (ponad 400 pozycji). W pracy nie zamieszczono spisu rycin i tabel.

Wprowadzenie w zagadnienia poruszane w pracy otwiera rozdział zatytułowany „Background and motivation”, w którym Autorka wskazuje na braki w aktualnym stanie wiedzy w odniesieniu do zaplanowanych doświadczeń i bardzo dobrze uzasadnia konieczność podjęcia swoich badań. Z rozdziału tego w naturalny sposób wynikają cele pracy sformułowane w rozdziale 2. („The aim of the studies”). Po tym następują dwa rozdziały, w których podsumowano obecny stan wiedzy na temat fotosyntezy tlenowej (rozdział 3.) oraz półprzewodnikowych układów nieorganicznych (rozdział 4.). Fragment dotyczący fotosyntezy, stanowi bardzo szczegółowe wprowadzenie w tematykę pracy. Mimo iż zakres poruszonych zagadnień jest bardzo szeroki, pracę czyta się gładko. Autorka biegle porusza się w przedstawianej tematyce i umiejętnie koncentruje się na

zagadnieniach biofizycznych bezpośrednio związanych z tematyką pracy. Świadczy to o wysokim poziomie ogólnej wiedzy Doktorantki. Ta część pracy jest bogato ilustrowana co ułatwia zrozumienie tekstu. Uwagę zwracają liczne odniesienia literaturowe, zarówno najnowsze jak i starsze, ale aktualne.

Rozdział 5: „Materials & methods” został podzielony na jedenaście podrozdziałów. Pierwsze dwa z nich opisują metodykę izolacji tylakoidów gran (błon bogatych w PSII, określanych w pracy jako PSII BBY) oraz przygotowanie nanocząstek WO_3 . W kolejnych opisano techniki pomiarowe wykorzystane do zebrania wyników przedstawionych w pracy. Ten rozdział jest również bogato ilustrowany. Cenne jest umieszczenie zdjęć użytej aparatury. Część wyników, np. wyniki oczyszczania preparatu roślinnego, oraz przykładowe wyniki uzyskane każdą z użytych metod pomiarowych również została zamieszczona w tym rozdziale. Uważam, że nierozdrabnianie wyników lecz zaprezentowanie ich w jednym miejscu pracy uczyniłoby tę pracę łatwiejszą w odbiorze. Jest to moja subiektywna uwaga, która nie wymaga odpowiedzi w czasie obrony, ponieważ koncepcja, którą przyjęła Autorka pracy jest spójna, choć nietypowa.

Z obowiązku recenzenta chciałam zwrócić uwagę na pewną niestaranność Autorki przy formułowaniu opisu analizy danych oraz krytycznej oceny jakości wyników. W tym rozdziale (jak również w opisach niektórych rycin i tabel przedstawiających wyniki badań) zabrakło informacji o ilości powtórzeń pojedynczych pomiarów, wskazania czy były to powtórzenia techniczne, czy z wykorzystaniem nowo przygotowanych próbek (powtórzenia biologiczne), jak również informacji o niepewności pomiarowej i ocenie jakości dopasowanych modeli. Przedstawienie głównych założeń modelu zastosowanego do analizy danych polarograficznych i podania explicite jak otrzymano parametry omawiane w części zawierającej opis wyników (np. parametry przedstawione w tabeli 7) znacznie ułatwiłoby zrozumienie rozprawy. Opis analizy wyników polarograficznych przedstawionych str. 73 jest bardzo lakoniczny i odsyła czytelnika do zacytowanej pracy. Podobne uwagi można sformułować do opisu sposobu analizy pozostałych danych doświadczalnych. Prace doktorskie oprócz przedstawienia oryginalnych wyników służących rozwiązaniu zdefiniowanego problemu badawczego pełnią też rolę dydaktyczną, służąc kolejnym pokoleniom badaczy jako źródło poznania konkretnych protokołów i procedur. Uważam, że dokładne opisanie protokołów pomiaru, czy też analizy danych opracowanych na potrzeby pracy doktorskiej i klarowne wskazanie różnic i modyfikacji względem zacytowanych źródeł literaturowych powinno ułatwiać wprowadzenie nowych badaczy w świat przedstawionych w pracy eksperymentów.

Opis wyników został połączony z dyskusją i przedstawiony w rozdziale 6. („Results and Discussion”). Jest to niezwykle interesująca część pracy, zawiera szereg wyników, bardzo wnikliwie i dokładnie przedyskutowanych z podaniem licznych odniesień do prac innych badaczy. W mojej opinii praca zyskałaby na przejrzystości w przypadku rozdzielenia opisu wyników od dyskusji. W tak szczegółowej dyskusji umyka opis wyników, tym bardziej, że części z nich została zaprezentowana w rozdziale dotyczącym metodyki (o czym pisałam powyżej). Myślę, że łatwiej byłoby prześledzić wyniki zgromadzone w jednym miejscu. Ta część pracy została podzielona na dwa podrozdziały odpowiadające postawionym celom pracy. W pierwszym zaprezentowano wpływ

białek zewnętrznych PsbO, PsbP i PsbQ (traktowanych jako czynnik endogeny) na wydajność i kinetykę wydzielania tlenu mierzoną z wykorzystaniem szybkiej polarografii trójelektrodowej (elektroda typu Joliot). Wykazano dobrą zgodność teoretycznego 5-stanowego heterogenicznego modelu wydzielania tlenu z danymi eksperymentalnymi. Zastosowano zmodyfikowany protokół pomiarowy, dzięki czemu możliwa była analiza składowych (szybkiej i wolnej) kinetyki wydzielania tlenu. Wykazano wpływ badanych białek na obie składowe. Doktorantka przeprowadziła wnikliwą dyskusję otrzymanych wyników konfrontując je z licznymi danymi literaturowymi (doświadczalnymi i teoretycznymi) na temat dróg doprowadzenia substratu (H_2O) i odprowadzenia produktów (O_2 i H^+) reakcji rozkładu wody oraz z danymi na temat zmian konformacyjnych klastra manganowego w czasie tego procesu. Dokonała interpretacji otrzymanych wyników w odniesieniu do danych literaturowych wykazując się bardzo dobrą znajomością biofizycznych aspektów badanego procesu. Należy podkreślić imponującą znajomość i sprawne poruszanie się w bogatej literaturze tematu, co wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki.

W drugim podrozdziale pokazano wpływ nanocząstek WO_3 jako czynnika egzogenego na organizację i funkcjonowanie izolowanych tylakoidów gran zawierających PS II. Część wyników zaprezentowanych w tym podrozdziale została już opublikowana (Microsc. Res. Tech., <https://doi.org/10.1002/jemt.24394>), co zostało stosownie odnotowane w rozprawie. Analizując dane eksperymentalne zaprezentowane w tym podrozdziale należy podkreślić, iż opisany ciąg doświadczeń jest kompleksowy, logicznie zaplanowany, wykonany z użyciem odpowiednio dobranych technik i bardzo dobrze udokumentowany. Zbadano wpływ zastosowanych nanocząstek na zachowanie integralności badanych preparatów biologicznych oraz ich wpływ na parametry funkcjonowania kompleksu PSII: zdolność do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego, przekaz energii z anten fotosyntetycznych do centrum reakcji PSII, aktywność fotochemiczną PSII II i kinetykę wydzielania tlenu. Doktorantka wykazała się tu bardzo dobrą znajomością kilku zaawansowanych technik eksperymentalnych (poza wspomnianą wyżej metodą polarograficzną), w tym spektroskopią absorpcyjną i fluorescencyjną, techniką pomiaru fluorescencji chlorofilu *in vivo*, oraz technik mikroskopowych TEM i AFM. W tej części wyników Autorka umieściła dyskusję w osobnym podrozdziale, co znacznie ułatwiło odbiór wyników i ich konfrontacje z danymi literaturowymi. Za niezwykle cenny uważam schemat przedstawiony na rycinie 46, który przedstawia model nanohybrydowego systemu fotosystem-nanocząstki o potencjalnym charakterze aplikacyjnym. Doktorantka zaproponowała nowe podejście – układ samoorganizujący się oparty o izolowane preparaty PSII i wykazała skuteczność tego systemu w zwiększeniu wydajności wydzielania tlenu w odniesieniu do układów półprzewodnikowych. Podobnie jak w rozdziale pierwszym Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu oraz umiejętnością krytycznej analizy i interpretacji otrzymanych danych.

Po przeczytaniu tego rozdziału mogę śmiało stwierdzić, że Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione cele pracy. Wszystkie wyniki przedstawione w ocenianej pracy są interesujące i ważne dla poznania molekularnych mechanizmów i kinetyki procesu fotosyntetycznego wydzielania tlenu. Doktorantka sformułowała klarownie konkluzje (rozdział 7) oraz zarysowała dalsze plany badań nad zaproponowanym układem

hybrydowym (rozdział 8.). Przeprowadzona dyskusja wyników jest wszechstronna, szczegółowa i wielowątkowa i wskazuje, że Doktorantka biegle porusza się w dostępnej w obszarze pracy literaturze i właściwie interpretuje swoje wyniki. Bardzo wysoko oceniam wartość naukową ocenianej rozprawy.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam listę zauważonych drobnych niedociągnięć, które Doktorantka może uwzględnić w czasie prezentowania pracy, ale nie wymagają one odpowiedzi w czasie obrony:

- przy opisie hodowli roślin nie podano natężenia światła, ani fotoperiodu (rozdział 5.1, rycina 13). Nie podano również w jakim wieku (lub stadium rozwoju) były rośliny używane do izolacji błon tylakoidów.
- nie znalazłam wyjaśnienia dlaczego w badaniach zastosowano różne rośliny do izolacji PSII BBY
- przy opisie preparatyki błon tylakoidów nie podano specyfikacji zastosowanej aparatury (miksera, wirówek i ultrawirówki)
- we wzorach (3) i (4) nie podano w jakich jednostkach otrzymuje się wynik
- jeśli chodzi o przechowywanie próbek w zamrażarce (-80° C; str. 55) to czy do próbek dodawano krioprotektanty? I czy sprawdzono jak zmienia się wydzielanie tlenu preparatów przed i po zamrożeniu.
- w nagłówku „Elution of the external PSII proteins” (str. 55) i dalej przy opisie elektroforezy (rozdział 5.3) użyłabym raczej “washing out” zamiast “elution”, ponieważ procedura służyła usunięciu (odmyciu) białek zewnętrznych, a nie ich wymyciu (pozyskaniu)
- skrót mWO3 (wprowadzony na str. 55) nie został wyjaśniony
- na rycinie 28, jednostką na osi OX powinny być [s], nie [ms]
- w nagłówku tabeli 7 dobrze byłoby przypomnieć znaczenie pokazanych parametrów oraz oszacować niepewności. Ułatwiłoby to ocenę istotności przedstawionych i dyskutowanych różnic, np. dla parametru C.
- w opisie Ryciny 34 brakuje informacji o ilości powtórzeń, słupki błędów obecne na wykresach wskazują na to iż są to wartości uśrednione.
- w opisie ryciny 35 powinno być odniesienie do równania (7), nie (1)
- przy opisie wyników z tabeli 7 wkraść się istotny błąd literowy. Wg tabeli zajętość stanu S1, a nie S3 jest > 86 % w dwóch wymienionych w tekście próbkach.
- skrót MSP nie został umieszczony na liście skrótów, ale jest wyjaśniony w tekście pracy
- sugerowałabym zmianę podpisu osi OX na rycinie 31b na „Time period [ms]”, żeby zachować spójność z ryciną 35
- w pracy znalazłam pewne niedociągnięcia redakcyjne, z których najbardziej istotne dla czytelnika są błędy w numeracji podrozdziałów rozdziału 3. oraz zastosowanych kilka formatów cytowania literatury w tekście.

Lektura ocenianej pracy była bardzo inspirująca i nasunęła mi kilka pytań, które wynikają z ciekawości naukowej i mogą stanowić element dyskusji naukowej z Doktorantką w czasie publicznej obrony:

1. W pracy nie dodawano zewnętrznych akceptorów elektronów. Argumentacja, iż celem było niewprowadzanie dodatkowych zaburzeń układu jest dla mnie

przekonująca w części badań z użyciem nanocząstek WO_3 . Jednak w przypadku badania wpływu białek zewnętrznych na izolowanych naturalnych fragmentach błon polemizowałabym z Doktorantką, że dodanie zewnętrznych akceptorów mogłoby zaburzyć w sensie negatywnym pracę PSII. Jeśli potraktujemy PSII jako kompleks enzymatyczny katalizujący reakcję utlenienia/redukcji, to niedobór akceptora elektronów można porównać z brakiem substratu reakcji, a to może hamować reakcję tj. rozkład wody. Można zatem postawić tezę, że niedodanie zewnętrznego akceptora może być czynnikiem zaburzającym aktywność PSII.

Czy rozważano lub wykonano doświadczenia z użyciem różnych akceptorów elektronów z PSII dodanych w nadmiarze – czy rzeczywiście będzie to odpowiadało parametrowi $C=1$? Czy może to wpłynąć na wolną (lub szybką) składową wydzielania tlenu? Na ile rodzaj akceptora zmodyfikuje kinetykę wydzielania tlenu? Czy działanie soli zastosowanych przy odmywaniu białek nie wpłynie na zawartość (lub dostępność) PQ w preparacie?

Ciekawa jestem opinii Doktorantki na ten temat.

2. Przy ocenie czystości preparatu PSII BBY, zastosowano elektroforezę denaturującą. Biorąc pod uwagę ilość obserwowanych prążków na żelu trudno ocenić stopień odmycia białek zewnętrznych. Czy rozważano możliwość sprawdzenia czystości (czy też składu białkowego preparatów) innymi, bardziej czułymi metodami?
3. W pracy określa się próbkę biologiczną użytą do badań jako tylakoidy wzbogacone w PSII (PSII BBY), co może sugerować, że PSII jest w czasie izolacji błon dodawane do preparatu celem jego wzbogacenia. Według zamieszczonego opisu w pracy (rozdział 5.1) są to prawdopodobnie tylakoidy gran, w których naturalnie występuje więcej PSII, uzyskane metodą frakcjonowania z użyciem ultrawiwrowania. Nigdzie w pracy nie znalazłam wyjaśnienia, dlaczego próbkę nazywa się PSII BBY – czy jest to skrót zastosowany na potrzeby tej pracy, czy stosowany w literaturze przedmiotu? Proszę o wyjaśnienie w czasie publicznej obrony pracy.

Podsumowanie:

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca mgr Soni Krysiak spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego zdefiniowanego przez Doktorantkę i przedstawionego w celach pracy. Doktorantka wykonała badania z użyciem zaawansowanych i dobrze dobranych metod fizykochemicznych i biofizycznych, a wszystkie wyniki starannie przeanalizowała. Wysoki poziom poprowadzonej dyskusji wskazuje na dojrzałość naukową i dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki, umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz analizy i spójnej interpretacji danych eksperymentalnych otrzymanych różnymi metodami. Przedstawione uwagi mają charakter techniczny i nie obniżają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej.

Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne AGH o dopuszczenie mgr Soni Krysiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej ze względu na

wieloaspektowość przeprowadzonych badań, zastosowanie licznych zaawansowanych technik pomiarowych, wysoką rangę przedstawionych wyników (w części opublikowanych), jak również wnikliwą i dojrzałą dyskusję wyników w rozprawie.

B. Jędrzak - Kusina