

Warszawa, 27.09.2023

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

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska dotyczy jednego z najbardziej fundamentalnych procesów biologicznych: molekularnego mechanizmu fotooksydacji wody przez fotosystem II (PSII). Zrozumienie mechanizmu cyklicznej fotooksydacji cząsteczek substratowych wody przez centrum katalityczne PSII, tzw. kompleks wydzielający tlen (ang. oxygen evolving complex, OEC) jest jednym z największych wyzwań współczesnej nauki i pozostaje jednym z najbardziej gorąco debatowanych i badanych od wielu lat mechanizmów fotokatalizy. Pomimo ogromnego postępu w tej dziedzinie, wciąż istnieją koncepcyjne i eksperymentalne kontrowersje wokół precyzyjnego mechanizmu fotokatalitycznego rozszczepienia wody, począwszy od wiązania cząsteczek substratowych wody, poprzez określenie stopnia utlenienia Mn centrów redoks na poszczególnych etapach biofotokatalizy (tzw. stanów S), ekstrakcję protonów, szlaki dostarczania cząsteczek substratowych wody i odbierania cząsteczek tlenu, powiązanie strukturalnych zmian w obrębie centrum katalitycznego w czasie przejścia stanów z mechanizmem fotoutleniania wody, a kończąc na najbardziej obecnie kontrowersyjnym i gorąco debatowanym zagadnieniu: mechanizmie tworzenia wiązania O-O w końcowych etapach cyklu Koka. Z tego względu rozprawa doktorska mgr Soni Krysiak ma ogromne walory poznawcze i jest ważną kontrybucją dla światowej nauki, ponieważ przybliżyła nas do lepszego zrozumienia związku pomiędzy strukturą białkową w obrębie OEC a funkcjonowaniem tego kluczowego centrum katalitycznego. Wyjaśnienie tej zależności ma znaczenie zarówno dla nauk podstawowych – przez poszerzenie naszej fundamentalnej wiedzy na temat wczesnych etapów fotosyntezy, jak i aplikacyjnych – poprzez inspirację fundamentalnymi procesami naturalnej fotosyntezy wytworzonymi na drodze ewolucji ponad 3 mld lat temu do efektywnego przekształcania energii słonecznej w urządzeniach skonstruowanych przez człowieka.

W nurt fundamentalnych badań mechanistycznych nad fotooksydacją wody przez kompleks PSII oraz badań nad opracowaniem innowacyjnych rozwiązań biohybrydowej sztucznej fotosyntezy doskonale wpisuje się rozprawa doktorska Pani mgr Soni Krysiak pt. „The influence of endogenous and exogenous factors on the activity of photosystem II and its heterogeneity”. Praca została wykonana pod opieką Pań prof/prof. dr hab. Květoslavy Burda oraz Niki Spirodis w Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie.

Prezentowana rozprawa dostarczyła poraż pierwszy kompleksowych informacji na temat kinetyki przejścia stanów S w cyklu Koka w zależności od obecności zewnętrznych białek lumenalnych poprzez bezpośrednie pomiary heterogeniczności wydzielania tlenu za pomocą nowo opracowanej metodologii z użyciem szybkiej polarografii. W szczególności praca dostarczyła cennych informacji na temat czynników wpływających na przełączanie funkcjonalności PSII pomiędzy szybkimi i wolnymi fazami wydzielania tlenu w cyklu Koka. Drugie ważne osiągnięcie pracy dotyczy opracowania innowacyjnej strategii utworzenia biohybrydowych systemów konwersji energii słonecznej poprzez fotouczulenie przez PSII (tylakoidy BBY) nanocząstek szerokopasmowego półprzewodnika typu  $n$ ,  $WO_3$  do wydajnej produkcji tlenu w świetle widzialnym, w pH 6,5 oraz bez stosowania egzogennych mediatorów redoks.

### Cele i nowatorski charakter rozprawy

Doktorantka postawiła sobie jako jako nadrzędny cel zbadanie wpływu czynników endogennych i egzogennych na wydajność i heterogeniczność wydzielania tlenu przez PSII z tylakoidów roślinnych wzbogaconych w ten fotoenzym (tzw. membrany BBY). Jako czynniki endogenne uznane zostały lumenalne białka PsbO, PsbP i PsbQ, które stabilizują kompleks OEC oraz zawierają najprawdopodobniej kanały wodne, tlenowe i protonowe niezbędne dla sprawnego funkcjonowania PSII. Jako czynnik egzogeny dla zbadania heterogeniczności cyklu Koka Doktorantka zastosowała nanocząstki  $WO_3$ , ze względu na ich zdolność utleniania wody i odporność na środowisko wodne. Utworzyła Ona innowacyjny system biohybrydowy do produkcji tlenu w świetle widzialnym i pH bliskim neutralnego poprzez z jednej strony, wydajną fotosensybilizację nanocząstek  $WO_3$  przez PSII dla wydajnej fotokatalizy, a z drugiej strony utworzenie swoistych molekularnych złączy na bazie tych samych nanocząstek  $WO_3$  pomiędzy stroną donorową i akceptorową PSII.

### Opis formalny rozprawy

Niniejsza praca doktorska została napisana według tradycyjnego układu na 155 stronach maszynopisu, zawierając typowe rozdziały, takie jak Wstęp i motywacja (4 strony), Cel badań (nieco ponad 1 strona), Przegląd wiedzy na temat zagadnień będących przedmiotem niniejszej rozprawy (rozdziały 3 i 4), rozdziały opisujące Materiały i Metody (w sumie 26 stron), Wyniki i dyskusja (44 strony), Konkluzje (4 strony) oraz półstronicowe Przyszłe badania (ang. Prospects for the future). Kończącą sekcją jest Spis literatury (alfabetyczna lista). Proporcje poszczególnych rozdziałów są bardzo dobrze zachowane, tworząc logiczną całość.

W rozdziałach przeglądowych (rozdziały 3 i 4), w ciekawy i przejrzysty sposób wprowadzone zostały zagadnienia będące przedmiotem pracy w tym: opis stanu wiedzy na temat oksygenicznej fotosyntezy, w szczególności reakcji jasnych, opis struktury i funkcji kompleksu PSII i jego centrum katalitycznego oraz opis systemów półprzewodnikowych na bazie  $WO_3$ . Rozdział 5 opisuje szczegółowo metodologię zastosowaną w rozprawie, w tym oczyszczanie i biochemiczną charakterystykę tylakoidów typu BBY (wzbogaconych w PSII), syntezę nanocząstek  $WO_3$ , spektroskopię XPS, pomiary DLS, stacjonarną spektroskopię absorpcyjną i fluorescencyjną, fluorescencję PAM, szybką polarografię trójelektrodową oraz zaawansowane techniki mikroskopowe (TEM i AFM).

Z najważniejszych osiągnięć badawczych rozprawy warto wymienić:

1. Pokazanie, że usunięcie białek PsbP i PsbQ powoduje spadek wydajności przejścia stanów S w cyklu Koka (oprócz przejścia S2 → S3) oraz znaczące ograniczenie szybkiej fazy wydzielania tlenu z OEC.
2. Pokazanie, iż usunięcie wszystkich trzech białek lumenalnych (PsbO, PsbP i PsbQ) zmieniło wyjściową dystrybucję stanów S oraz spowodowało eliminację szybkiej fazy wydzielania tlenu z OEC oraz odwrócenie kinetyki obu faz, najprawdopodobniej z powodu niekontrolowanej dystrybucji cząsteczek substratowych wody oraz ograniczeń w ekstrakcji protonów do kanałów protonowych częściowo tworzonych przez te białka lumenalne.
3. Utworzenie prostego i wydajnego systemu biohybrydowego wydzielania tlenu działającego w świetle widzialnym, pH bliskim neutralnego i bez zastosowania mediatorów redox, bazującym na nanocząstkach półprzewodnika typu *n*, WO<sub>3</sub>, oraz tylakoidach BBY.
4. Pokazanie subtelnej dynamiki w zakresie kinetyki i zmian redoks dla układu biohybrydowego PSII BBY/WO<sub>3</sub> w zależności od zastosowanego stężenia nanocząstek. W szczególności pokazanie, że przy pewnych stężeniach nanocząstki te tworzą złącza przewodzące pomiędzy donorową i akceptorową stroną PSII poprzez zmiany organizacji błon tylakoidowych BBY.

Otrzymane wyniki mają istotne znaczenie nie tylko dla lepszego zrozumienia mechanizmu regulacji biofotokatalizy PSII, ale mają też potencjalnie duże znaczenie dla racjonalnego projektowania prostych koloidalnych układów biohybrydowych opartych na PSII i nanocząstkach półprzewodnikowych o potencjalnym wykorzystaniu w fotokatalizie i innych obszarach.

Ciekawe spostrzeżenia do dalszej dyskusji:

1. Jestem ciekawa opinii Doktorantki na temat możliwych przyczyn i ewolucyjnego znaczenia zaobserwowanej przez Nią heterogeniczności cyklu Koka.
2. Jaka jest opinia Doktorantki na temat wpływu strony akceptorowej PSII na tzw. miss parameters w cyklu Koka?
3. Jakie są zdaniem Doktorantki warunki, aby wytworzone przez nią bionanohybrydy znalazły zastosowania aplikacyjne na dużą skalę?

Uwagi edytorskie

Rozprawa jest ogólnie napisana bardzo starannie, tym niemniej kilka drobnych aspektów wymaga poprawy:

str. 13: LHCII trimmers - LHCII trimers

str. 17: podczas gdy superkompleksy PSII przyswajają światło w szerokim zakresie spektralnym - podczas gdy superkompleksy PSII absorbują światło w szerokim zakresie spektralnym

str.19: Maksymalną wydajność O<sub>2</sub> - Maksymalną wydajność wydzielania O<sub>2</sub>

str. 25: 1.8 V at each photochemical step - 1.8 V (*versus which electrode?*) at each photochemical step

str.26: Photosystem II shows a much higher activity in recovering O<sub>2</sub> from water than the known anode photocatalysts. – są katalizatory molekularne bliskie aktywności PSII, np. publikacja z molekularnym kompleksem Ru w Duan et al (2012) <https://doi.org/10.1038/nchem.1301>

str.26: ... thylakoids ... oxygen evolution activity ranging from about 250 to 10000 mmol O<sub>2</sub> g Chl<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>  
Proszę zacytować prace z tak dużą aktywnością wydzielania tlenu z tylakoidów.

str. 32: Chloroplasts' inner membranes, called thylakoids (Figure 2), are flattened, interconnected sac-like structures stacked together, forming grana ... - Chloroplasts' inner membranes, called

thylakoids (Figure 2), are flattened, interconnected sac-like structures stacked together, forming grana in higher plants and some algae.

str. 40: Fig. 8: change annotation ChlZD1 in the D2 subunit to ChlZD2.

str. 44: Tyr D (tyrosine of peptide D2, Figure 8) – Tyr D (tyrosine Tyr-160 of D2 protein, Figure 8)

str. 58: Fig. 15 i jej opis powinny znaleźć się w rozdziale Results and discussion.

str. 58: second column – second lane; third column – third lane

str. 58: wszystkie trzy białka lumenalne powinny być zaznaczone na żelach SDS-PAGE w Fig. 15.

str. 61: Fig. 18 & 19 i ich opis powinny znaleźć się w rozdziale Results and discussion.

str. 64: Fig. 21 jej opis powinny znaleźć się w rozdziale Results and discussion.

str. 66: Fig. 23 jej opis powinny znaleźć się w rozdziale Results and discussion.

str. 67 i 69: Fig. 24 & 26 (literówka w legendzie) ich opis powinny znaleźć się w rozdziale Results and discussion.

str. 71: Fig. 28 jej opis powinny znaleźć się w rozdziale Results and discussion.

str. 74: Fig. 31 jej opis powinny znaleźć się w rozdziale Results and discussion.

str. 79: tyrosine Tyr160 of peptide D2 – tyrosine Tyr160 of polypeptide D2

str. 81: Proszę dodać stopkę do Tabeli 7 z opisem parametrów w tabeli.

str. 82: EXAFS experiments implied significant structural changes during the S2 to S3 transition, observing the Mn-Mn and Mn-Ca distances – EXAFS experiments implied significant structural changes during the S2 to S3 transition, observing the lengthening of Mn-Mn and Mn-Ca distances

Powyższe uwagi edytorkie nie umniejszają cennych walorów poznawczych pracy.

### **Konkluzja**

Formułując konkluzję chciałabym stwierdzić, iż Pani mgr Sonia Krysiak przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach szczegółowo zaprojektowanych eksperymentów przeprowadzonych z wyjątkową precyzją i starannością pomiarową. Badania te wymagały ogromu wiedzy i umiejętności praktycznych w zakresie zaawansowanych pomiarów spektroskopowych. Wyniki badawcze uzyskane w ramach projektu doktorskiego zostały dotychczas opublikowane w jednej oryginalnej publikacji naukowej, tym niemniej jest wysoce prawdopodobne, iż pozostałe wyjątkowo wartościowe wyniki dotyczące fundamentalnych badań nad mechanizmem przejścia stanów S zostaną opublikowane w najbliższym czasie w reputowanym czasopiśmie naukowym (praca w recenzji). Ponadto Doktorantka jest współautorem innej oryginalnej publikacji naukowej, jak również licznych doniesień konferencyjnych prezentujących wyniki realizacji projektów badawczych i staży zagranicznych i krajowych, w ramach których kształtowała Ona i doskonaliła swój warsztat badawczy.

Moim zdaniem, przedstawiona przez Panią mgr Sonię Krysiak rozprawa doktorska zawiera rozwiązania interesujących, aktualnych i ważnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej istotny postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, uprzejmie wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Soni Krysiak do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę ogrom włożonej pracy przy realizacji projektu doktorskiego, jej wybitnie mechanistyczny charakter, jak również rangę, interdyscyplinarność i nowatorskość podejścia eksperymentalnego dla uzyskania tak cennych wyników badawczych, chciałabym postawić wniosek o uznanie przedmiotowej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.