



UNIwersytet
Warszawski

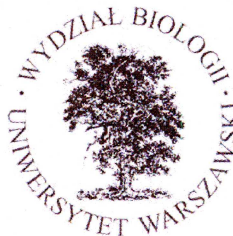
Wydział Biologii

Instytut Biochemii, Zakład Regulacji Metabolizmu

prof. dr hab. Maciej Garstka

Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e-mail: m.garstka@uw.edu.pl



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

Uwagi ogólne

Rozprawa doktorska Pani mgr Soni Krysiak została wykonana w Katedrze Zastosowań Fizyki Jądrowej, Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie pod kierunkiem Pani prof. dr. hab. Květoslavy Burdy we współpracy z Panią prof. dr hab. Nika Spiridis. Badania zostały wykonane w ramach Programu POWER, projekt nr POWR.03.02.00-00-I004/16, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.

Pani Sonia Krysiak napisała rozprawę doktorską w formie klasycznej, w języku angielskim. 155 stronicowy manuskrypt zawiera streszczenie po polsku i angielsku, przedstawienie założeń i celów pracy (*Background and motivation, The aim of the studies*) i 18 stronicowy wstęp (*Introduction to oxygenic photosynthesis, Inorganic semiconductive systems*). Rozdziały te są dobrze zredagowane, w streszczeniu Autorce udało się jasno przedstawić założenia pracy i wskazać najważniejsze wyniki. W pierwszej części wstępu, dotyczącej fotosyntezy oksygenicznej, Doktorantka skupiła się na opisie II układu fotosyntezy, dokładnie opisując budowę superkompleksu LHCII-PSII, kompleksu rdzeniowego PSII, a szczególnie kompleksu wydzielającego tlen (OEC - *oxygen evolving complex*). Jednak muszę wytknąć Autorce niektóre wyrażenia, jak “*thylakoids comprise highly specific complexes of proteins, lipids and pigments activated by light, called photosystems*” zamiast “*pigment-protein complexes*”, czy “*excited electrons*”. Także opis funkcjonalny PSII nie uwzględnia procesów transferu energii wzbudzenia (*excitation energy transfer, EET*) i stanów przeniesienia ładunku (*charge transfer, CT*), a zaczyna się od procesów transferu elektronów (*electron transfer, ET* lub *charge separation, CS*), co może nie jest kluczowe w świetle tematyki pracy, ale poprawniej opisywałoby procesy zachodzące w PSII. Druga, znacznie krótsza, część wstępu opisuje właściwości nanoczątek z tlenku wolframu (WO₃ NPs), będących nieorganicznym półprzewodnikiem zdolnym do utleniania wody w obecności jonów Fe³⁺/Fe²⁺ jako akceptorów elektronów.

Rozdział “*Materials & methods*” jest bardzo rozbudowany (26 stron) i zawiera nie tylko opis techniczny metod, ale także podstawy teoretyczne i zasady analizy otrzymanych wyników. Rozdział ten jest zredagowany bardzo przejrzysto, opis poszczególnych metod jest podzielony na podrozdziały (*experimental setup, measurement protocol, data analysis*), prezentujące fotografie sprzętu i schematy doświadczalne. W tym rozdziale przedstawiono także wyniki niektórych pomiarów, np. analizę WO₃ NPs, ściśle związane z zagadnieniami opisywanymi w rozdziale “*Results and discussion*” i tam dyskutowanych.

Wyniki badań zostały połączone z ich dyskusją w rozdziale “*Results and discussion*”. Nie ułatwia to percepcji pracy, szczególnie w części dotyczącej wpływu białek zewnątrz błonowych OEC na kinetykę wydzielania tlenu. W tym rozdziale Autorka w 21 stronicowym ciągłym tekście nie wyszczególnia swoich

wyników, ale włącza je w bardzo rozbudowaną dyskusję. Tekst ten niesie bardzo duży ładunek merytoryczny, co świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w tematyce badań, lecz brak wyraźnie sformułowanych, wyodrębnionych wniosków/podsumowań, częściowych i ogólnych, jest wyraźnym niedoborem tego rozdziału. Brak też jest w tekście odwoływań do własnych danych prezentowanych na rycinach czy w tabelach, za to są liczne odwołania do literatury. Liczę, że w trakcie obrony Doktorantka przedstawi wynik w bardziej przejrzysty sposób.

Druga część wyników dotycząca oddziaływań między nanocząstkami wolframowymi a cząstkami PSII BBY jest znacznie bardziej uporządkowana, wyniki są podzielona na podrozdziały odnoszące się do poszczególnych metod pomiarowych, a całość zakończona jest podsumowującym rozdziałem „Discussion”.

Praca zakończona jest dwoma rozdziałami „Conclusions” i „Prospects for the future” w którym Autorka wskazała najważniejsze osiągnięcia swojej pracy, podkreślając perspektywy przeprowadzonych badań.

Praca jest napisana językowo poprawnie, choć nieraz miałem trudności za zrozumieniem intencji Autorki. Ryciny są graficznie bardzo ładne, a opisy pod rycinami czytelne, nieco za obszerne. Pewną wadą rozprawy, wynikające z prawdopodobnie z przyjętego schematu – rozbudowana o wyniki metodyka, połączenie wyników z dyskusją, są powtórzenia. W zasadzie taka forma jest przydatka dla czytelnika, ale z pewnością zwiększyła objętość manuskryptu. Także jest trochę literówek i błędów edytorskich (powtórzenie tej samej frazy), ale nie wpływa to na ogólną, dobrą redakcję tekstu.

Doktorantka zacytowała 422 pozycje literatury, co jest liczbą imponującą, ale także trochę szaloną. Związane jest to zapewne z faktem, że Doktorantka zajęła się dwoma zagadnieniami, analizą OEC i nieorganicznymi układami półprzewodnikowymi oraz starannie cytowała odnośniki do stosowanych metod.

Ocena merytoryczna

Kluczowym wydarzeniem w ewolucji Ziemi było powstanie fotosyntezy tlenowej, a wzrost stężenia tlenu w biosferze ukierunkował ewolucję gatunków. Związany z II układem fotosyntezy (PSII) kompleks wydzielający tlen (OEC - oxygen evolving complex) jest układem katalitycznym którego podstawą jest kompleks Mn_4CaO_5 , stabilizowany przez białka rdzenia PSII i trzy białka zewnątrz błonowe, PsbO, PsbP i PsbQ. Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w poznaniu struktury i działania OEC, jednak nadal nie opracowano jednoznacznego modelu działania tego układu. Trudnością jest uzyskania spójnych danych doświadczalnych zgodnych z założonymi modelami teoretycznymi i opracowanie jednoznacznego schematu przebiegu stanów katalitycznych. Także nie zostało w pełni wyjaśnione znaczenie otoczenia białkowego kompleksu manganowo-wapniowego, a w szczególności znaczenia kanałów utworzonych z udziałem podjednostek PsbO, PsbP i PsbQ, dzięki którym możliwy jest transfer wodoru i wody do kompleksu katalitycznego. W rezultacie klasyczny kinetyczny model Koka $S_0 \rightarrow S_4$ nie musi pokrywać się z danymi doświadczalnymi.

Doktorantka w analizie danych przyjęła heterogeniczny model kinetyczny (*5S-state model*) uwzględniający istnienie metastabilnego stanu S_4' oraz wolne i szybkie przejścia między stanem $S_4 \rightarrow S_0$, oraz założyła, że usunięcie poszczególnych białek zewnątrz błonowych, zmieni przebieg kinetyki procesu. Ogólnym celem tej części rozprawy było zbadanie czy heterogeniczna reakcja wydzielania tlenu zależy od białek stabilizujących klastę Mn_4CaO_5 i czy heterogenność klastra Mn_4CaO_5 na poszczególnych etapach cyklu Koka jest związana z optymalizacją procesu czy też są to niezależne drogi wydzielania tlenu.

Badania dotyczące OEC zostały przeprowadzone z użyciem cząstek PSII BBY, czyli izolowanych fragmentów gran zawierających głównie superkompleksy LHCII-PSII. Pomiar wydzielania tlenu doktorantka wykonała stosując elektrodę tlenową typu Joliot i dwa schematy pomiarowe, pozwalające wyznaczyć oscylacje wydzielania tlenu pod wpływem krótkich wysycających błysków światła. Znaczenie peptydów zewnątrz błonowych w tym procesie badano usuwając białka PsbP i PsbQ lub PsbO, PsbP i PsbQ przemywając preparat PSII BBY odpowiednio roztworami NaCl lub $MgCl_2$.

Na rys. 15 przedstawiono rozdziały elektroforetyczne PSII BBY po odpłukaniu peptydów zewnątrzłonowych jako jedyną metodę sprawdzenia jakości preparatu. W preparatach po działaniu $MgCl_2$ widać ślady prążka na poziomie 30 kDa, także spada intensywność prążków odpowiadających masie białek D1 i D2. Uważam, że dodatkowo skład białkowy preparatu PSII BBY powinien zostać potwierdzony analizą Western blot, dającą jednoznaczną informację o jego budowie. Także nie znalazłem w pracy bezpośredniej informacji opisującej stopień stabilności klastra Mn_4CaO_5 po odpłukaniu podjednostek zewnątrzłonowych. Dlatego prosiłbym Doktorantkę o omówienie tych zagadnień w czasie obrony. Czy podana na str. 79 informacja, że odpłukanie trzech peptydów zmniejsza intensywność przy 3 błysku o 70-80% nie może wynikać z uszkodzenia klastra?

Także nie znalazłem nigdzie wyjaśnienia, dlaczego w badaniach dotyczących udziału PsbO, PsbP i PsbQ użyto tytoń, a w badaniach z zastosowaniem WO_3 NPs liście szpinaku? Czy cząstki PSII BBY izolowane z tych dwóch gatunków różniły się między sobą?

Także prosiłbym o dokładne wyjaśnienie stwierdzenia, że wymycie białek 16, 23 kDa redukuje dostępną pulę plastochinonu podczas gdy usunięcie wszystkich trzech peptydów nie ma takiego znaczenia w spadku wydzielania tlenu zależnego od PQ (*signal quenching due to PQ deficiency is much less pronounced*). Prosiłbym także Autorkę o doprecyzowanie jaki jest udział fazy szybkiej i wolnej wydzielania tlenu, gdyż w manuskrypcie podawane są różne wartości.

Analiza oscylacji wydzielania tlenu normalizowanych do wartości amplitudy wydzielania O_2 przy trzecim błysku w PSII BBY wykazała heterogeniczność tej reakcji, gdzie faza szybka uwalniania tlenu stanowiła 35% a faza wolna 65% ze stałymi czasowymi poniżej 1 ms i 20 ms. Odpłukanie PsbP i PsbQ obniżała wydajności przejść między stanami S oraz powodowało czterokrotny spadek udziału szybkiej fazy wydzielania O_2 . Usunięcie wszystkich trzech peptydów nie wpływało na prawdopodobieństwa przejść $S_i \rightarrow S_{i+1}$ ale zmieniało początkowe zajęcie stanów S_i i całkowity zanik szybkiej fazy wydzielania O_2 . Oznaczałoby to, że w tym przypadku wydzielanie O_2 odbywałoby się wyłącznie na według schematu fazy wolnej, z udziałem metastabilnego stanu S_4' . Brak peptydów zewnątrzłonowych miał także wpływ na stałe czasowe szybkiej fazy wydzielania tlenu, z 4 ms wzrastała ona do 6 ms w PSII – 16, 23. Faza wolna wynosząca w próbie kontrolnej ok. 60 ms wzrastała 2 i 4-krotnie odpowiednio w PSII – 16, 23 i PSII – 16, 23, 33. Autorka efekt oddysocjowania PsbP i PsbQ tłumaczy głównie zaburzeniem działania kanału protonowego, zaś w przypadku dodatkowego usunięcia PsbO efekt na wydzielanie tlenu może wiązać się ze udziałem tego białka w stabilizacji klastra Mn_4CaO_5 i jego otoczenia, m.in. Tyrz.

Jak już wspominałem, wyniki są dyskutowane bardzo szczegółowo, w odniesieniu i do kinetyki wydzielania O_2 , zmian w strukturze klastra i jego bezpośredniego otoczenia oraz znaczenia kanałów tworzonych z udziałem białek zewnątrzłonowych. Otrzymane wyniki są głosem w dyskusji dotyczącej heterogenności cyklu Koka, dostarczając argumentów za jego istnieniem. Nie jest to na pewno zakończeniem tej dyskusji. Dlatego prosiłbym Doktorantkę o wskazanie perspektywicznych kierunków badań kinetyki cyklu wydzielania tlenu oraz o opinię czy w tego typu badaniach możliwe byłoby użycie mutantów ze zmodyfikowanymi białkami PsbP, PsbQ czy PsbO.

Drugim zagadnieniem przedstawionym w rozprawie doktorskiej, są badania związane z projektowaniem systemów nano-biohybrydowych będących połączeniem II układu fotosyntezy, dokładnie mówiąc cząstek PSII BBY, z nanocząstkami wolframowymi, WO_3 NPs. Badania te przeprowadzono w układzie koloidalnym i część wyników została już opublikowana w czasopiśmie *Microscopy Research and Technique*. Doktorantka w tym przypadku postanowiła zrealizować kilka celów badawczych, po pierwsze (i) otrzymanie WO_3 NPs o wielkości umożliwiającej bezpośrednią interakcję z PSII, (ii) sprawdzenie wpływu NPs na strukturę kompleksów (iii) ocenienie funkcjonalności układu biohybrydowego.

Stosując szereg technik (*TEM, X – ray photon spectroscopy, dynamic light scattering, absorption spectroscopy*) Doktorantka scharakteryzowała nanocząstki, zoptymalizowała otrzymywanie NPs o wielkości 1-3 nm oraz wyznaczyła wartość ich przerwy energetycznej (*energy gap*). Badania strukturalne oddziaływań

z PSII BBY z WO_3 NPs wykonane zostały z użyciem mikroskopii AFM i TEM. Analiza obrazów z AFM wskazała na bezpośrednie interakcje NPs z kompleksami błonowymi a mikroskopia TEM pokazała, że struktura cząstek BBY nie ulegała naruszeniu w obecności NPs. Jednak nie ryzykowałbym na podstawie uzyskanych obrazów TEM określania typu kompleksów zlokalizowanych w błonach PSII BBY.

Szczegółowa analiza widm absorpcji i wzbudzeniowych/emisyjnych widm fluorescencji w temperaturze pokojowej wskazuje, że obecność NPs wpływa na wzrost agregacji kompleksów LHCII i zaburzenie transferu energii z anten LHCII do anten wewnętrznych CP47 przy zachowanym przepływie energii z LHCII do PSII RC z udziałem CP43. Zmiany oddziaływań NPs z kompleksami barwnikowo-białkowymi zależą istotnie od stosowanego stężenia nanocząstek. Wyniki te są bardzo ciekawe i szkoda, że nie zostały wykonane także w temperaturze 77K, co ułatwiłoby interpretację danych.

Analizę oddziaływań funkcjonalnych między PSII a WO_3 NPs Doktorantka wykonała stosując pomiar fluorescencji modulowanej i wydzielania tlenu. Analiza krzywej Kautsky'go, wskazuje na oddziaływania NPs z akceptorową stroną PSII, z plastochinonem związanym z miejscem Q_A . Dokładne wyliczenia parametrów fotochemicznych pozwala także wnioskować o możliwości oddziaływań NPs z miejscem Q_B i wolną pulą PQ. Autorka przedstawiła w pracy zmiany wyliczonych parametrów fotochemicznych w zależności od stężenia NPs, ale prezentacja wybranych krzywych OJ dostarczyłaby informacji o dynamice redukcji Q_A . Czy Autorka rozważała badanie przebiegu pełnej krzywej OJIP?

Badanie kinetyki wydzielania tlenu wykazały, że wraz ze wzrostem stężeń WO_3 NPs następuje wzrost udziału fazy szybkiej wydzielania O_2 przy jednoczesnym spadku udziału fazy wolnej. W zakresie stężeń 0,001 do 0,7 μg NPs/ μg Chl udział fazy szybkiej wzrastał dwukrotnie, jednocześnie powodując spadek wydzielania tlenu do 70% wartości kontrolnej. Wskazuje to na oddziaływania WO_3 NPs z donorową stroną PSII. Łącząc wyniki z analiz kinetyki fluorescencji i wydzielania tlenu Autorka sugeruje, że WO_3 NPs mogą tworzyć łańcuch przenoszący elektrony z OEC do chinonów po stronie akceptorowej PSII. Jest to bardzo ciekawa hipoteza i prosiłbym o dokładne jej omówienie w czasie obrony.

Otrzymane wyniki dla układu biohybrydowego zasługują na szczególną uwagę, gdyż wskazują, że działanie WO_3 NPs prawdopodobnie ma charakter lokalny i dotyczy zarówno wygaszanie wzbudzenia w kompleksach antenowych jak i transferu elektronów w PSII. Czy Autorka rozważała eksperymenty mogące rozgraniczyć efekt wygaszania wzbudzenia od efektu redukcji NPs?

Ocena dorobku naukowego

Pani mgr Sonia Krysiak jest współautorką dwóch publikacji (Materials 2021 <https://doi.org/10.3390/ma14144057>; Microscopy Research Technique 2023 <https://doi.org/10.1002/jemt.24394>). W obu przypadkach autorem korespondencyjnym jest prof. Kvetoslava Burda, a w jednym wśród współautorów wymieniona jest prof. Nika Spiridis.

W pracy w Microscopy Research Technique Pani mgr Krysiak jest pierwszą autorką i według opisu udziału wykonawców, Jej udział w powstaniu tej publikacji był kluczowy. Wyniki zamieszczone w tej publikacji są tożsame z większością danych umieszczonych w rozdziale dotyczącym oddziaływań WO_3 NPs z PSII BBY. Według deklaracji Doktorantki praca dotycząca znaczenie peptydów zewnątrz błonowych OEC na kinetykę wydzielania O_2 jest przygotowana do publikacji.

Pani mgr Sonia Krysiak jest autorką 16 doniesień konferencyjnych, w tym 8 doniesień ustnych (2 zagraniczne). Otrzymała także dwa wyróżnienia za te wystąpienia, w tym jedno na międzynarodowej konferencji w Lizbonie. Doktorantka wymienia także szereg krótkoterminowych wyjazdów (Austria, Hiszpania). Badania wykonane w czasie tych wyjazdów w grupie Prof. Gerardo Goya (Uniwersytet Saragossa) weszły w skład rozprawy doktorskiej. Ponadto Doktorantka brała udział w trzech szkołach letnich.

Dorobek naukowy Pani mgr Soni Krysiak oceniam jako bardzo dobry.

Podsumowanie

Doktorantka podjęła się badań o wysokim stopniu ryzyka. Analiza na poziomie molekularnym złożonych zjawisk biofizycznych jest bardzo zależna od typu użytego preparatu i ograniczeń aparaturowych. Materiał biologiczny potrafi być zróżnicowany, a Autorka użyła cząstek PSII BBY których skład białkowy powinien być stały, ale wielkość i skład lipidowy może bardzo zależeć od materiału wyjściowego.

W tego typu badaniach, aby uniknąć błędnej interpretacji wyników, stosuje się wiele, wzajemnie uzupełniających się metod badawczych. I z taką sytuacją mamy do czynienia w przedstawionej rozprawie. Zróżnicowanie stosowanych metod wymagało od Doktorantki opanowania szerokiego warsztatu laboratoryjnego. Także analiza danych nie jest sprawą oczywistą i wymaga dobrego rozumienia podstaw teoretycznych analizy.

Doktorantka uzyskała wiele interesujących wyników, zarówno w części opisującej wpływ podjednostek zewnątrz błonowych OEC na heterogeniczny model kinetyczny wydzielania tlenu jak i działania układu biohybrydowego LHCII- WO_3 NPs. Otrzymane wyniki nie zamykają podjętych zagadnień, a raczej są mocnym punktem wyjścia do dalszych badań. Wyniki są bardzo gruntownie przedyskutowane, można powiedzieć, że Autorka w dyskusji rozważyła wszystkie możliwe warianty interpretacji danych. To niestety nie ułatwiało percepcji pracy. Ostatecznie przedstawiła wiele spójnych i przekonujących interpretacji.

Moje uwagi odnoszą się albo do nie do końca wyjaśnionych w rozprawie kwestii metodycznych albo mają charakter dyskusyjny. Pracę uważam za bardzo wartościową, a Doktorantkę należy docenić za szeroką, interdyscyplinarną wiedzę teoretyczną. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań w obszarze biologii i biofizyki, a otrzymane rezultaty stanowią oryginalne rozwiązanie problemu badawczego jakim jest analiza heterogenności kinetyki wydzielania tlenu przez kompleks PSII w zależności od struktury OEC lub obecności egzogennej nanocząstek.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez Panią mgr Sonię Krysiak spełnia ustawowe warunki zgodnie z art. 187 ustawy z 20 lipca 2018 „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2021 r. z późniejszymi zmianami) i dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie o dopuszczenie pani mgr Soni Krysiak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie biorąc pod uwagę bardzo szeroki zakres przeprowadzonych badań, ich zróżnicowanie metodyczne i niezwykle staranne omówienie oraz opublikowanie części wyników, wnoszę o rozważenie możliwości wyróżnienia ocenianej rozprawy.

Maciej Garstka