



UNIwersytet Jagielloński
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Kłodawskiej
pt. 'Oligomeryzacja fotosystemu I jako czynnik regulujący procesy fazy świetlnej
fotosyntezy w komórkach sinicy *Synechocystis* PCC6803'

Sinice są pierwszymi autotroficznymi organizmami, prowadzącymi oksygeniczną fotosyntezę, które pojawiły się na Ziemi i w prawdopodobnie niewiele zmienionej postaci od miliardów lat żyją do dzisiaj zasiedlając różnorodne nisze ekologiczne na naszej planecie. Dały początek chloroplastom roślin wyższych i można stwierdzić, że bez nich ewolucja organizmów żywych byłaby niemożliwa. Są one obecnie klasycznym obiektem badań nad fotosyntezą. Wystarczy wspomnieć, że struktury przestrzenne 3 najważniejszych kompleksów fotosyntetycznych (oba fotosystemy, kompleks cytochrom *b₆f*) zostały uzyskane w oparciu o kompleksy wyizolowane z sinic termofilnych. *Synechocystis* PCC6803 jest klasycznym modelem badań genetycznych w tej grupie, bowiem jest to szczep ulegający stosunkowo łatwej transformacji i można uzyskiwać w ten sposób mutanty typu 'knock-out'. W przeciwieństwie do roślin wyższych, fotosystem I występuje w sinicach zwykle w postaci trimery, jednak fizjologiczna funkcja trimeryzacji jest słabo poznana mimo szeregu przeprowadzonych już badań w tej dziedzinie i wielu stawianych hipotez. Wykorzystując mutant *Synechocystis* PCC6803, gdzie dezaktywowano gen kodujący białko odpowiedzialne za trimeryzację PSI, doktorantka podjęła badania zmierzające do pogłębienia naszej wiedzy w tym temacie.

Recenzowana praca liczy 131 strony, posiada klasyczny układ ze streszczeniem i wstępem (15 str.), celami pracy, rozdziałem dotyczącym materiałów i metod (12 str.), wynikami (56 str.), dyskusją (16 str.) oraz literaturą obejmującą 196 pozycji. Praca jest napisana zwięźle i interesująco, czyta się ją płynnie, jest odpowiednio ilustrowana, nie zawiera zbędnych informacji nie dotyczących tematu rozprawy oraz niepotrzebnych powtórzeń. Proporcja rozdziałów jest w miarę należycie zachowana.

Wstęp zawiera najbardziej istotne informacje wprowadzające czytelnika w zagadnienia dotyczące współczesnej wiedzy na temat sinic, ich aparatu fotosyntetycznego, a w szczególności fotosystemu I, z uwzględnieniem procesu trimeryzacji tego kompleksu. Przystawiono też rolę karotenoidów w komórkach sinic. Rozdział ten jest bogato ilustrowany.

Do streszczenia oraz wstępu mam następujące uwagi:

- w streszczeniu pojęcie takson jest niewłaściwie użyte: takson to jednostka systematyczna najniższej rangi (gatunek, podgatunek, odmiana, itp.) a tutaj chodziło autorce o coś wręcz przeciwnego,
- 'kaseta oporności na antybiotyki': chodzi tu raczej o jeden konkretny antybiotyk – streptomycynę,
- słowo 'tempo' w streszczeniu i całej pracy, powinno być zastąpione polskim odpowiednikiem 'szybkość',
- polska wersja rozwinięcia skrótów FPLC i FRAP nie odpowiada wersji angielskiej,
- str. 13, 'mogą dzielić te same podjednostki' - niezrozumiałe,
- str. 13, rys. 1.2, oksydaza PQ utlenia PQ a nie PC,
- str. 13, 'struktura fotosystemu jest niemal identyczna u sinic, glonów i roślin wyższych' – zdecydowanie nie można się z tym zgodzić, np. PSII sinic zawiera białka PsbU oraz PsbV zamiast PsbP i PsbQ. Poza tym nie znana jest dokładnie struktura PSII u glonów i roślin wyższych,
- str. 14, wers 6, 'atomów' a nie 'cząsteczek żelaza hemowego',
- str. 14, fikocjanina, fikoerytryna, itp. to białka, natomiast ich chromofory to fikocjanobilina, fikocjanoerytryna, przy czym dane białko może zawierać kilka typów chromoforów (więcej na ten temat w 'Fizjologia Roślin', aut. Zurzycki, Michniewicz)
- str. 23, karotenoidy nie działają ochronnie przez gaszenie stanów singletowych chl,
- str. 23, w reakcji inaktywacji ROO[•] z pewnością nie wydziela się tlen cząsteczkowy,

Następnie przedstawiono główne **cele pracy** polegające na wyjaśnieniu fizjologicznego znaczenia procesu trimeryzacji fotosystemu I.

Sekcja '**Materiały i metody**' jest napisana przejrzystie, zawiera w miarę dokładnie opisane procedury metodyczne stosowane w pracy, pozwalające w większości przypadków odtworzyć przeprowadzone doświadczenia. Z uwag dotyczących tej części wymienię następujące:

Biorąc pod uwagę proporcjonalnie bardzo krótki rozdział M&M, nie widzę zupełnie uzasadnienia podawania składu buforów, itp. w 'dodatku', informacje te powinny znaleźć się w M&M, ponadto:

- str. 28, wzór do wyznaczania stęż. Chl powinien być umieszczony w pracy,
- podanego wsp. ekstynkcji nie znalazłem w cytowanej pracy,
- str. 29, MV nie jest inhibitorem kompetycyjnym, takie sformułowanie odnosi się do enzymów i ich centrum aktywnego, MV jest akceptorem PSI,
- str. 30, natęż. Światła aktywniczego – 20000 $\mu\text{mol fotonów/m}^2/\text{s}$, czy to nie pomyłka? Tak duża intensywność może powodować fotooksydację barwników i zaburzenia w transporcie elektronów,
- str. 32, bezpośrednim akceptorem elektronów jest NADP^+ a nie CO_2 , akceptorem elektronów z NADPH może być wiele związków innych niż CO_2 ,
- str. 34, 'benzamidyna, stęż. na $\mu\text{g chl}$ ', niepoprawne określenie,
- str. 35, 7,5-3600 mm, co to oznacza?
- str. 37, 'o wielkości ziaren a nie cząsteczek 5 μm ',
- str. 37, stęż. karotenoidów na podstawie powierzchni pików w chromatogramach HPLC nie można wyznaczyć w oparciu o wsp. Ekstynkcji. Zwykle takie obliczenia przeprowadza się w odniesieniu do powierzchni pików standardów o znanym stężeniu.

Rozdział prezentujący **wyniki** jest należyście ilustrowany, analizuje szczegółowo uzyskane rezultaty doświadczeń, z których warto wymienić:

- wyraźną zależność temperaturową procesu trimeryzacji PSI u typu dzikiego,
- podniesioną zawartość karotenoidów (głównie miksoksantofilu) u mutantu niezdolnego do tworzenia trimerów,
- zwiększoną zdolność wydzielania tlenu u mutantu w 15 i 30°C,
- odmienną kinetykę reakcji redoks P700 i wydajności konwersji energii w PSI u mutantu niż w typie dzikim.

Godna podkreślenia jest różnorodność stosowanych technik badawczych w omawianej pracy, takich jak: mikroskopia konfokalna, HPLC, filtracja żelowa, chromatografia jonowymienna, fluorescencja steady-state, spektroskopia absorpcyjna, pomiar wydzielania tlenu elektrodą Clarka, chromatografia gazowa, spektroskopia EPR, fluorymetria dual PAM, czy dichroizm kołowy. Czyni to pracę doktorską bardzo wszechstronną metodycznie.

Do rozdziału tego mam niemniej jednak następujące uwagi:

- str. 42, rys. 4.2. i wiele innych w pracy, podobnie jak w wielu Tabelach, zamiast pisać słownie 'symbole gwiazdek...' wystarczyło napisać w legendzie ** oznacza $P < 0,01$, itp., brak ilości pomiarów n ,
- Tab. 4.1, brak n oraz nie wiadomo czy podany błąd to SD czy SE, takie dane powinny się znaleźć przy każdym rys. i tabeli, a nie tylko w M&M,
- str. 45, rys. 4.3 i inne w pracy, absorbancja jest bezwymiarowa, nie można jej wyrażać w j.w.,

- str. 46, rys. 4.4 i inne, normalizacja jest zbyteczna przy chromatogramach,
- str. 50, rys. 4.7, widma powinny mieć rozmiar kwadratowy co uwydatniłoby bardziej maksima absorpcji,
- str. 53, jak mierzono białko? Czy to frakcja rozpuszczalna?
- str. 54, analiza karotenoidów, przykładowy rozdział HPLC byłby przydatny,
- str. 61, rys. 4.11, w opisie skali Y '1' niepotrzebna,
- str. 62, tab. 4.5, kompleks manganowy nie jest zasocjowany z PSII tylko jest jego integralnym składnikiem, nie wiadomo czy pomiary były wykonywane na całych komórkach czy tylakoidach, izolowanych fotosystemach, itp.,
- rys. 4.15 i 4.16, w tekście mowa o istotnych statystycznie różnicach natomiast nie wynika to z rysunków (nie zaznaczono istotności),
- rys. 4.17, amplitudy na tym rysunku nie korelują z amplitudami uzyskanymi w pomiarach EPR,
- str. 88, 'specjalnej pary chlorofili', na czym polega 'specjalność tej pary?', jest to po prostu dimer centrum reakcji,
- str. 96, rys. 4.26, brak jednostek skali y, (mdeg) oraz stęż. chl w próbce,

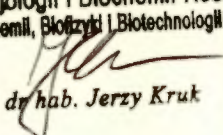
W części poświęconej **dyskusji** autorka zwięźle i krytycznie interpretuje uzyskane wyniki w konfrontacji z danymi literaturowymi i wyciąga odpowiednie wnioski bez zbędnych spekulacji, choć niektóre rozdziały wyników są zupełnie pominięte w dyskusji takie jak analiza kwasów tłuszczowych. Generalnie rozdział ten czyta się z przyjemnością i łatwością. Podobnie jak autorka, można się zastanawiać nad fizjologiczną rolą trimeryzacji PSI u sinic. Skoro występuje u tych organizmów to z pewnością ma dla nich korzystne znaczenie. Brakuje natomiast bardziej dogłębnych rozważań, choć są zasygnalizowane we wstępie, dlaczego mechanizm ten został wyeliminowany w procesie ewolucji u roślin wyższych. Warto też byłoby kilka słów poświęcić roli fosfatydyloglicerolu w trimeryzacji PSI, tym bardziej, że doktorantce zagadnienie to jest z pewnością bliskie.

Podsumowując, wyniki pracy doktorskiej są wartościowe i nowatorskie, zastosowano w niej szereg technik biochemicznych jak też spektroskopowych, wyniki są zinterpretowane w oparciu o gruntowną znajomość tematu i wnoszą istotny wkład w poznanie mechanizmu i znaczenia fizjologicznego trimeryzacji fotosystemu I u sinic. Materiał ten może stać się z pewnością podstawą niejednej publikacji. Szereg uwag krytycznych ma charakter dyskusyjny i nie umniejsza wartości merytorycznej pracy.

Stwierdzam więc, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie pani mgr Kingi Kłodawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 15.01.13

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ


prof. dr hab. Jerzy Kruk