



Dr hab. Grażyna Bialek-Bylka prof. nadzw. PP
E-mail: grazyna.bialek-bylka@put.poznan.pl
Tel. +48 61 665 3185

Poznań 2013-05-27

RECENZJA

osiągnięcia naukowego

**„Charakterystyka właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych protochlorofilidu
w wybranych układach modelowych i naturalnych”**

oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego

Pani dr Beaty Myśliwej-Kurdziel

Przedstawione do recenzji materiały, dotyczące osiągnięcia naukowego „Charakterystyka właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych protochlorofilidu w wybranych układach modelowych i naturalnych” oraz dorobku naukowego Pani dr Beaty Myśliwej-Kurdziel, zawierają odpowiednio: 9 publikacji z lat 2004-2013 (8 prac doświadczalnych i 1 praca przeglądowa) oraz 26 prac opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR). Także Habilitantka załączyła autoreferat, autorski komentarz oraz 21 oświadczeń współautorów publikacji dotyczących osiągnięcia naukowego.

Łączny Impact Factor dorobku naukowego Habilitantki wynosi 52,701, Indeks Hirscha 11, liczba cytowań 218 (bez autocytowań). W skład dorobku naukowego Habilitantki, oprócz prac eksperymentalnych, wchodzi 5 rozdziałów w podręcznikach, 2 prace przeglądowe i materiały konferencyjne.

Pani dr Beata Myśliwa-Kurdziel wyższe wykształcenie zdobyła na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. W 1993 r. ukończyła z wynikiem bardzo dobrym Wydział Matematyki i Fizyki UJ uzyskując tytuł zawodowy magistra (specjalność- fizyka medyczna i ochrona środowiska). W 2000 r. obroniła, na Wydziale BiNoZ Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pracę doktorską „Spectral properties of the protochlorophyllide- and chlorophyllide- protein complexes in relation to the organisation of the internal plastid membranes” (promotor: Prof. dr hab. Kazimierz Strzałka) uzyskując stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii. Należy podkreślić, że praca została wyróżniona przez



Radę Naukową Instytutu Biologii Molekularnej na Wydziale BiNoZ UJ oraz nagrodzona Nagrodą Prezesa Rady Ministrów (w 2001 r.).

Szczegóły dotyczące sylwetki Habilitantki oraz przebiegu zatrudnienia na Uniwersytecie Jagiellońskim zawarte są w starannie opracowanym autoreferacie i załączonych materiałach dotyczących habilitacji.

Ocena osiągnięcia naukowego

„Charakterystyka właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych protochlorofilidu w wybranych układach modelowych i naturalnych”

Według Habilitantki celem prac przedstawianych do oceny jest: charakterystyka właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych protochlorofilidu oraz protochlorofilu w wybranych układach modelowych: rozpuszczalnikach organicznych, układach symulujących naturalne układy lipidowe (micele i liposomy) oraz wewnętrznych błonach etioplastów izolowanych z etiolowanych liści.

Dlaczego protochlorofilid? Molekuła ta jest jednym z produktów pośrednich szlaku biosyntezy chlorofilu - podstawowego barwnika układów fotosyntetyzujących. W roślinach okrytonasiennych (będących na szczycie ewolucyjnym roślin) przemiana protochlorofilidu do chlorofilidu jest indukowana światłem i katalizowana, ponieważ podczas ewolucji okrytonasienne utraciły geny enzymu katalizującego reakcję bez udziału światła. Całkowite uzależnienie redukcji protochlorofilu od światła jest jednym z elementów mechanizmu ochronnego roślin przed stresem oksydacyjnym, który występuje przy ekspozycji etiolowanej siewki na działanie światła.

Przedstawione mi do recenzji osiągnięcie naukowe jest ważnym przyczynkiem do wyjaśnienia mechanizmu reakcji fotoredukcji protochlorofilidu do chlorofilidu i do zrozumienia bardzo złożonego procesu wzrostu roślin oraz wpływu otoczenia na ten proces.

To osiągnięcie naukowe stanowi 8 monotematycznych prac opublikowanych w renomowanych czasopismach z listy JCR oraz 1 pracy przeglądowej:

- H1. J. Kruk* and B. Myśliwa-Kurdziel (2004) Separation of monovinyl and divinyl protochlorophyllides using C30-reverse phase high-performance liquid chromatography column: analytical and preparative applications *Chromatographia*, 60, 117-123



- H2. B. Myśliwa-Kurdziel, J. Kruk, K. Strzałka* (2004) Fluorescence lifetimes and spectral properties of protochlorophyllide in organic solvents and their relations to the respective parameters in vivo. *Photochem. Photobiol.* 79, 62-67
- H3. B. Myśliwa-Kurdziel and K. Strzałka* (2005) Influence of selected heavy metal ions on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide, *Agr. Ecosyst. Environ.* 106, 199-207
- H4. K. Solymosi, B. Myśliwa-Kurdziel, K. Bóka, K. Strzałka, B. Böddi* (2006) Disintegration of the prolamellar body structure at high concentrations of Hg²⁺, *Plant Biol.* 8, 627-635
- H5. B. Myśliwa-Kurdziel, K. Solymosi, J. Kruk, B. Böddi*, K. Strzałka (2007) Protochlorophyll aggregates with similar steady-state fluorescence characteristics differ in fluorescence lifetimes. A model study in Triton X-100, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 96, 262-271
- H6. B. Myśliwa-Kurdziel*, K. Solymosi, J. Kruk, B. Böddi, K. Strzałka (2008) Solvent effects on fluorescence properties of protochlorophyll and its derivatives with various porphyrin side chains, *Eur. Biophys. J.* 37, 1185-1193
- H7. B. Myśliwa-Kurdziel*, K. Strzałka (2010) Indukowana światłem redukcja protochlorofilidu u okrytonasiennych, a rozwój chloroplastów. *Postępy Biochemii* 56, 418-426
- H8. B. Myśliwa-Kurdziel*, J. Kruk, K. Strzałka (2013) Protochlorophyllide and protochlorophyll in model membranes - an influence of hydrophobic side chain moiety. *Biochim. Biophys. Acta*, 1828, 1075-1082
- H9. B. Myśliwa-Kurdziel*, J. Kruk, K. Strzałka (2013) Protochlorophyllide in model systems - an approach to *in vivo* conditions. *Biophys. Chem.* Doi: 10.1016/j.bpc.2013.02.002

W 7 pracach spośród 9, Habilitantka jest pierwszym autorem a w 2 pracach drugim autorem, ponadto w 4 pracach jest autorem korespondencyjnym (*). Załączone oświadczenia współautorów potwierdzają jej wiodącą rolę w powyższych pracach.

Omawiając najważniejsze aspekty tego osiągnięcia naukowego zakładam, że prace opublikowane w renomowanych czasopismach, były recenzowane przez wysokiej klasy specjalistów. Szczegóły dotyczące każdej publikacji zostały starannie omówione w komentarzu autorskim habilitantki, więc w recenzji skupię się na: ocenie istotnych wniosków i nurtujących mnie pytaniach.

Prace wchodzące w skład habilitacyjnego osiągnięcia naukowego są wynikiem logicznie zaprojektowanych badań z dobrą znajomością literatury.



Praca H1, dotyczy preparatyki (oczyszczania i analizy) protochlorofilidu nową, szybką metodą HPLC z zastosowaniem komercyjnej kolumny C₃₀ z fazą odwróconą. Zaletą tej metody jest użycie, z dobrym rezultatem, tej samej kolumny, jako preparatywnej i analitycznej. Użycie HPLC świadczy o profesjonalnym przygotowywaniu materiału badawczego. Oprócz otrzymania powtarzalnych czasów retencji, bardzo słusznie dokonano pomiaru widm wzbudzenia fluorescencji i elektronowej absorpcji w celu potwierdzenia czystości otrzymanych preparatów, co świadczy o rzetelności pomiarów.

Publikacja H2 to wynik badań spektroskopowych (czasy życia, elektronowa absorpcja, fluorescencja) protochlorofilidu *in vitro* (rozpuszczalniki). Wykonano pomiary dla protochlorofilidu w 15 rozpuszczalnikach o różnych stałych dielektrycznych (od 2,21 do 46,45). Wyniki czasów życia *in vitro* próbowano dyskutować w kontekście zachowania się protochlorofilidu *in vivo*. Myślę, że Rysunek 3 (liczba falowa maksimum pasma Soreta i pasma Q_y protochlorofilidu w funkcji polaryzowalności rozpuszczalników) wzbogacony danymi pomiaru protochlorofilidu w mieszaninie wody z metanolem (z zawartością wody 0,25%, 75% i 85%) (Rysunek 6) oraz danymi dla protochlorofilidu *in vivo*, pomógłby w korelacji wyników *in vitro* z *in vivo* przez np. pokazanie lokalnego współczynnika załamania światła protochlorofilidu *in situ*.

Prace H3 i H4 dotyczą wpływu metali (Cd²⁺, Cr₂O₇²⁻, Fe³⁺) oraz Hg²⁺ o dużym stężeniu, odpowiednio, na różne etapy biosyntezy chlorofilu. Praca H3 dotyczy próby odpowiedzi na pytania: jak ciężkie metale wpływają na stabilność fotoaktywnego protochlorofilu, wydajność fotoredukcji protochlorofilidu do chlorofilidu oraz przesunięcie Shibaty. Fotoredukcja protochlorofilidu spowodowana błyskiem (w tym eksperymencie lampa błyskowa: 70 J; 450-700 nm) związana jest z zanikaniem pasma fluorescencji z maksimum 656 nm (77K) i pojawieniem się nowego pasma z maksimum 688 nm (77K) związanego z powstawaniem chlorofilidu. Po szybkim, małym przesunięciu tego nowego piksu w stronę długofalową następuje przesunięcie krótkofalowe do 680 nm nazywane przesunięciem Shibaty. Z literatury wiadomo, że szybkość tego procesu zależy od temperatury powyżej 0 °C i jest hamowana w niskich temperaturach oraz, że *in vitro* proces ten zależy od lepkości i stężenia NADPH. Wykorzystanie tych informacji może dać w przyszłości nowe możliwości badań, zwłaszcza temperaturowych.



Prace H5 i H6 dotyczą badań spektroskopowych (fluorescencja, czasy życia) protochlorofilu *in vitro* (model z Tritonem X-100 i micelami z Tritonem X-100 oraz rozpuszczalnikami, odpowiednio). W publikacji H5 z uwagi na sugerowany wzrost prawdopodobieństwa przejść niepromienistych, dla wzmocnienia tej tezy można w przyszłości wykonać pomiary widm fotoakustycznych. Z widm fotoakustycznych i absorpcji będzie można wyliczyć termiczną dezaktywację. W publikacji H6 pokazano pomiary czasu życia fluorescencji protochlorofilu i protochlorofilidu w tym samym rozpuszczalniku w funkcji temperatury. W ośrodku o dużej lepkości widać, jaki wpływ ma fitol - czas życia fluorescencji protochlorofilu (fitol) jest wyższy niż protochlorofilidu.

Praca H7 przedstawia najnowsze (do 2010 r.) dane literaturowe na temat fotoenzymu LPOR i indukowanej światłem reakcji redukcji protochlorofilidu oraz relacji między akumulacją tego związku w wewnętrznych błonach etioplastów, a strukturą tych błon i właściwościami protochlorofilidu. Autorzy tej pracy, także zaprezentowali w niej wyniki badań *in vitro* dotyczące właściwości foto-fizycznych protochlorofilidu w układach modelowych. Publikacja ta świadczy o tym, że projekty naukowe habilitantki w temacie, skrótowo mówiąc protochlorofilidu, były na każdym kroku precyzyjnie planowane z uwzględnieniem dobrze monitorowanej bazy literaturowej.

Publikacja H8 dotyczy właściwości fizyko-chemicznych protochlorofilidu i protochlorofilu (fitol) w błonach modelowych (liposomach) z lipidów. W pracy stosowano galaktolipidy, które są obecne *in vivo* w PLB (prolamellar body) i w PT (prothylacoid) oraz także fosfolipidy. Autorzy pracy byli zainteresowani odpowiedzią na pytanie, jaką rolę pełni hydrofobowy fitol protochlorofilu na wbudowywanie się tej molekuly w lipidową dwu-warstwę oraz jaki jest efekt oddziaływania z lipidami. Badania prowadzono metodą wygaszania fluorescencji stosując różne wygaszacze. Otrzymano bardzo ciekawe wyniki. Moje pytania dotyczą preparatyki liposomów, powtarzalności wyników i kontroli jednorodności populacji. Ciekawa jestem, czy wykonano np. zdjęcia z mikroskopu elektronowego w celu ustalenia, czy w preparacie nie ma liposomów wielowarstwowych, co zadecydowało o wyborze metody otrzymywania liposomów, czy próbowano otrzymać liposomy inną metodą np. ultradźwiękową, żeby porównać trwałość otrzymanych liposomów?



Ostatnia H9 z serii monotematycznych prac stanowiących habilitacyjne osiągnięcie naukowe dotyczy protochlorofilidu w formie monomerycznej i zagregowanej w układach modelowych. Między innymi pokazano, że liposomy zmniejszają wydajność tworzenia form zagregowanych. Autorzy wyniki tej pracy dyskutują w kontekście roli lipidów w agregacji protochlorofilidu w etioplastach i związku z fotoredukcją protochlorofilidu. Wyniki wskazują na ważną rolę galaktolipidów *in vivo* w procesie regulacji frakcji zagregowanej do monomerycznej protochlorofilidu, co ma istotny wpływ na wydajność fotoredukcji protochlorofilidu.

Stwierdzam, że w omówionym cyklu monotematycznych prac zawarty jest aktualny, ważny, wartościowy i interesujący materiał eksperymentalny inspirujący do dalszych badań. Podsumowując tę część recenzji należy podkreślić spójność tematyki wybranych prac.

Ocena dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego

Dorobek naukowy, który nie wchodzi w skład osiągnięcia naukowego Habilitantki to: 18 prac oryginalnych, 1 praca przeglądowa, 5 rozdziałów w podręcznikach oraz 3 doniesienia w materiałach pokonferencyjnych, czyli w sumie 27 pozycji literaturowych (P1-P27).

Od początku działalności naukowej, pod kierunkiem Prof. dr hab. Kazimierza Strzałki, habilitantka podjęła badania dotyczące początkowych etapów formowania aparatu fotosyntetycznego w roślinach okrytonasiennych. Przed uzyskaniem stopnia doktora badania prowadziła także we współpracy z Prof. Fabrice Franck (Uniwersytet w Liege), wyniki badań są w pracach P1 i P3. Pomiary i analizę parametrów fluorescencji protochlorofilidu w etiolowanych siewkach pokazano w pracy P5. Właściwości termotropowe błon wewnętrznych etioplastów oraz PLB opisane są w pracach P19 i P6. Habilitantka uczestniczyła w badaniach, we współpracy z Prof. dr hab. Wiesławem Gruszeckim z UMCS w Lublinie, dotyczących wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania cyklu ksantofilowego z chlorofilem w izolowanych kompleksach LHCI w liposomach P4.

Po uzyskaniu stopnia doktora, habilitantka miała okazję pracować na Uniwersytecie w Geteborgu, z którym współpracę nawiązał Prof. dr hab. Kazimierz Strzałka. Pozwoliło to na kontynuację badań nad wyznaczeniem stałych kinetycznych protochlorofilid-chlorofilid w etioplastach. Złożony charakter oddziaływań protochlorofilidu z jego otoczeniem molekularnym *in vivo* pokazano w pracy P10.



W przypadku 9 publikacji (P1, P5, P6, P10, P11, P17, P18, P21, P27) tematyka badawcza dotyczy protochlorofilidu w układach *in vivo*, natomiast cykl 6 prac (P16, P20, P22, P23, P24 i P25) związany jest z badaniami wpływu metali ciężkich na układ fotosyntetyzujący. Wpływ hydrofobowego podstawnika na właściwości fluorescencyjne chlorofilu i bakteriochlorofilu pokazano w pracach P9 i P13.

O randze prowadzonych badań naukowych i uzyskanych wynikach świadczy liczba 218 cytowań w literaturze światowej oraz indeks Hirscha 11. Aktywność naukowa Habilitantki przejawia się także w uczestniczeniu w 38 konferencjach zagranicznych i krajowych, gdzie prezentowała wyniki w formie posterów i 5 wykładów na zaproszenie organizatorów.

Siedmiokrotnie przebywała za granicą wykonując badania naukowe, wygłaszając wykłady i pracując ze studentami w ramach stypendiów Socrates/Erasmus. Z przedłożonych do recenzowania prac wynika, że Pani dr Beata Myśliwa-Kurdziel prowadziła współpracę naukową z renomowanymi ośrodkami krajowymi i zagranicznymi.

Habilitantka uczestniczyła w 7 grantach oraz kierowała 3 grantami KBN (NCN). Była wielokrotnie nagradzana prestiżowymi nagrodami indywidualnymi i zespołowymi: otrzymała stypendium krajowe dla młodych naukowców w 2000 r. (Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej); stypendia naukowe Rektorskiego Funduszu Stypendialnego UJ (w 2004 r. oraz 2005 r.); nagrodę II stopnia indywidualną (w 2000 r.) J.M. Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego za wyróżniającą się rozprawę doktorską oraz nagrodę II stopnia zespołową J.M. Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego, za wyróżniający się dorobek naukowy (w 2007 r.).

Z przedstawionej dokumentacji wynika, że Habilitantka wykazuje dojrzałość do samodzielnej pracy naukowej na każdym jej etapie tzn.: planowania, realizacji, opracowania wyników i ich dyskusji.

Także oceniam wysoko zaangażowanie Habilitantki w pracę dydaktyczną i organizacyjną Uczelni, np. była promotorem 7 prac magisterskich i 6 prac licencjackich oraz jest opiekunem naukowym kolejnych kilku prac magisterskich.

Podsumowanie

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawione mi do recenzji osiągnięcie naukowe Habilitantki i jej dorobek naukowy stanowią istotny wkład do literatury światowej. Uważam, że Habilitantka jest w pełni gotowa do prowadzenia samodzielnych badań naukowych, które



de facto już prowadzi, jak wynika z załączonej dokumentacji, z którą miałam przyjemność zapoznać się.

Pozytywnie oceniam zarówno osiągnięcie naukowe, jak i dorobek naukowy niewchodzący w jego zakres oraz dorobek dydaktyczny i organizacyjny Habilitantki.

Osiągnięcie naukowe „Charakterystyka właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych protochlorofilidu w wybranych układach modelowych i naturalnych” i dorobek naukowy, dydaktyczny i organizacyjny spełniają warunki określone w art. 16 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i uzasadniają nadanie Pani dr Beacie Myśliwej-Kurdziel stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk biologicznych w zakresie dyscypliny biochemia.

Z wyrazami szacunku

(dr hab. Grażyna Białek-Bylka, prof. nadzw. PP)