



Kraków, 14.09.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej p. Stanisława Nizińskiego

z tytułu

„Exploring the photoresponse of Orange carotenoid Protein: a subpicosecond to minute time-resolved absorption studies”

Fotosynteza jest najbardziej fundamentalnym procesem biologicznym na Ziemi, który na przestrzeni miliardów lat przyczynił się do przeobrażenia naszej planety w skali globalnej, dał podstawę do eksplozji liczby form życia, i nadal stanowi główne i odnawialne źródło energii dla biosfery. Istotnym czynnikiem umożliwiającym organizmom fotosyntetycznym opanowanie wszelkich nisz i stanowiącym o ich sukcesie ewolucyjnym są mechanizmy regulacyjne i ochronne, zapobiegające uszkodzeniom aparatu fotosyntetycznego powodowanych nadmiarem pochłoniętej energii świetlnej. Niniejsza rozprawa poświęcona jest badaniom jednego z takich fascynujących procesów fotoprotekcyjnych u sinic, angażującego receptorowy kompleks karotenoidowo-białkowy – ang. Orange Carotenoid Protein (OCP). Mechanizm funkcjonowania tego kompleksu pozostaje jeszcze nie w pełni wyjaśniony i należy do tzw. „gorących zagadnień”. Rozprawa wpisuje się więc w tę gorącą debatę naukową. Rozprawa p. Nizińskiego została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Gotarda Burdzińskiego w renomowanym Zakładzie Elektroniki Kwantowej na Wydziale Fizyki UAM w Poznaniu. Promotorem pomocniczym rozprawy jest dr Michel Sliwa, Dyrektor Naukowy ośrodka CNRS w Lille, Francja.

Przygoda pana mgr Stanisława Nizińskiego z "poważną Nauką" rozpoczęła się w 2012 r. poprzez podjęcie studiów licencjackich na kierunku Fizyka Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Ten wstępny etap zakończył się złożeniem pracy licencjackiej opisującej właściwości fotofizyczne miraksantyny V a przygotowanej pod opieką prof. dr hab. Gotarda Burdzińskiego. Kolejny etap, praca magisterska (lata 2015-2017), będąca kontynuacją pracy licencjackiej, odbywał się w tym samym zespole badawczym, pod okiem tego samego Opiekuna. Następnie, p. Niziński, w 2017 r. rozpoczął studia doktoranckie na tym samym Uniwersytecie, pod kierunkiem dotychczasowego Opiekuna. Studia w Poznaniu, ewidentnie nie sprawiające żadnych trudności p. Nizińskiemu (dowodem kilka nagród za osiągnięcia naukowe i uzyskanie grantu Preludium (NCN), przeplatane były licznymi krótkoterminowymi stażami w zagranicznych ośrodkach naukowych oraz wyjazdami szkoleniowymi. Uwieńczeniem tych studiów jest rozprawa doktorska, będąca przedmiotem obecnej recenzji.

Opis formalny

Rozprawa jest złożeniem czterech artykułów naukowych, wraz z ich suplementami. Opatrzono ją obszernym, 115-to stronicowym, Wprowadzeniem (Introduction), napisanym w języku angielskim, kończącym się omówieniem najważniejszych wyników, oraz charakteru udziału p. Nizińskiego w publikacjach składających się na recenzowaną rozprawę. W tym fragmencie precyzyjnie wskazany został wkład autora rozprawy w każdą z tych prac. W dwóch z nich p. Niziński jest pierwszym autorem. Wprowadzenie jest bogato ilustrowane na 52 rysunkach; obszerne jest również bibliograficznie – autor odnosi się do 298 pozycji literaturowych. Zawarto w nim także opisy układów eksperymentalnych i metod wykorzystywanych podczas przygotowania rozprawy.

Kwestie stylistyczne i językowe

Wprowadzenie napisane jest w dobrym stylu i niezłym językiem angielskim; widoczne jest bogactwo leksykalne i znajomość języka fachowego. Choć autor nie ustrzegł się licznych błędów. Być może najbardziej irytujące jest notoryczne stawianie przecinka przed „that”, co jest kalką z języka polskiego. W wielu miejscach brak też rodzajników lub są niewłaściwie użyte. Pojawia się także nieprawidłowe użycie słów, np. w kontekście symetrii w użyciu jest „alternancy” a nie „alternacy”. Niepotrzebnie kapitalizowane są nazwy związków chemicznych. W sumie jednak są to drobne niedociągnięcia, i mimo że liczne, to nie stanowią żadnej przeszkody w odbiorze tekstu. Błędy takie były jednak łatwe do uniknięcia, gdyby tekst przeszedł tzw. English proofreading przez natywnie anglojęzycznego korektora tekstów.

Opis wyników składających się na rozprawę

Praca nr 1

W pracy wykorzystano femtosekundową spektroskopię absorpcyjną w zakresie światła widzialnego i bliskiej podczerwieni w celu uwidocznienia ultraszybkich zmian właściwości chromoforu kompleksu OCP, indukowanych ultrakrótkimi impulsami światła, z wykorzystaniem impulsów wzbudzających o zmiennej intensywności oraz zmiennej długości fali. Wykazano tworzenie się formy kationorodnikowej karotenoidu w OCP, nawet przy niskich intensywnościach impulsu wzbudzającego. Obecność tej formy dość skutecznie przeszkadza w określeniu wydajności kwantowej tworzenia formy P_1 - jednej z form przejściowych fotocyklu OCP. Ważniejsze jednak jest ujawnienie kolejnego stanu wzbudzonego chromoforu OCP, oznaczonego jako „S⁻”, stosunkowo długożyciowego (kilkudziesiąt ps). Stan „S⁻” wydaje się nie mieć udziału w przejściu $OCP^O \rightarrow OCO^R$. W pracy określono również wpływ N/C-końcowej metki histydynowej w OCP na dynamikę przejścia $OCP^O \rightarrow OCO^R$. Wbrew wcześniejszym stwierdzeniom, metka histydynowa dość istotnie może wpływać na właściwości OCP.

Praca nr 2

Praca poświęcona jest kompleksowej charakterystyce kompleksu OCP pochodzącego z sinicy *Planktothrix* (szczep PCC7805), w którym modyfikowano chromofor karotenoidowy (kantaksantyna *versus* echinenon) oraz pozycję metki histydynowej, a następnie poddano szczegółowej analizie pod kątem funkcjonalnym, spektralnym i strukturalnym. W badanym OCP wykazano wyższe szybkości fotokonwersji i relaksacji, oraz silniejszą zdolność wygaszania nadmiaru energii wzbudzenia w fikobilisomach, w porównaniu do OCP innych gatunków sinic. Kluczowe właściwości badanego wariantu OCP w znaczący sposób zależą od rodzaju wiązanego karotenoidu, jak też od terminalnej pozycji metki. Dzięki przeprowadzeniu krystalizacji wariantów OCP i ich wysokorozdzielczej analizie krystalograficznej, możliwe było określenie korelacji struktura-funkcja w OCP. W szczególności, wskazuje ona na istotny wpływ (liczby) terminalnych grup funkcyjnych chromoforu na fotocykl OCP i jego sprawność fotoprotekcyjną. Ponadto wykazano wyższą wrażliwość C-końca niż N-końca polipeptydu OCP na metkowanie.

Praca nr 3

W pracy analizowano zależność efektywności funkcjonowania kompleksu OCP od jego stanu agregacyjnego. W celu scharakteryzowania szybkich zmian strukturalnych i konformacyjnych, zachodzących w kompleksie pod wpływem światła, wykorzystano szereg zaawansowanych metod spektroskopowych, z uwzględnieniem czasowo-rozdzielczego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego oraz spektroskopii optycznej przy pomiarach absorpcji przejściowej. Uzyskane wyniki jasno uwiaryściły udział oligomeryzacji w regulacji fotocyklu OCP. Określono także skalę czasową pierwszych istotnych zmian konformacyjnych, prowadzących do fotoaktywacji OCP. Zmiany te zachodzą już w ciągu kilku setek nanosekund po absorpcji pierwszego fotonu przez OCP.

Praca nr 4

W pracy analizowano mechanizm i kinetykę fotoaktywacji OCP w warunkach oświetleniowych zbliżonych do tych, które panują w naturalnym środowisku akwenów wodnych zasiedlanych przez sinice (*Synechocystis*). Szybkie etapy fotokonwersji OCP, wywoływane ciągłym strumieniem fotonów, badane były z użyciem impulsów laserowych w zakresie nanosekundowym. W eksperymencie wykorzystano "ometkowane" warianty kompleksu OCP pochodzący z sinicy *Synechocystis* (szczep PCC 6803). Wyznaczona kinetyka fotoaktywacji OCP wskazuje na sekwencyjny mechanizm jego funkcjonowania, do działania którego wymagana jest absorpcja dwóch fotonów. Taki sekwencyjny mechanizm fotoaktywacji OCP wydaje się być bardziej efektywny w odpowiedzi układu na gęstość strumienia światła niż mechanizm jednofotonowy.

Uwagi merytoryczne

Na szczęście dla recenzującego, Wprowadzenie jest oryginalnym i autorskim tekstem p. Nizińskiego. Napisałem "na szczęście", ponieważ trudno się podjąć recenzowania i krytyki czterech oryginalnych i dojrzałych artykułów, już zrecenzowanych przez specjalistów i opublikowanych w szeroko rozpoznawalnych czasopiśmie, a przyjętych przez środowisko naukowe, na co wskazuje szybko rosnąca liczba cytowań tych prac. Wprowadzenie daje mi choć odrobinę szansy na krytyczną i być może konstruktywną analizę. Zaczę więc od stwierdzenia, że ten fragment rozprawy został napisany bardzo wnikliwie i dojrzałe, przedstawiając znakomity skondensowany obraz współczesnej wiedzy na temat ochronnej roli karotenoidów w rozmaitych układach fotosyntetycznych, a szczególności fotofizycznych i fotochemicznych mechanizmów procesów w których uczestniczą te barwniki. Omówiono szczegółowo m.in. kwestie symetrii polienów i karotenoidów, która przez ostatnie dekady stanowiła podstawę do zrozumienia struktury elektronowej tych układów chromoforowych oraz wyjaśniania ich fotofizycznych właściwości. Uwieńczeniem jest opis aktualnego stanu wiedzy dotyczącej właściwości i funkcjonowania kompleksu OCP, będącego głównym obiektem badań prowadzonych przez p. Nizińskiego. Doceniam również aktualność i zakres tego opracowania, obejmującego tak klasyczne, jak też najnowsze publikacje i wyniki. W sumie omówiono wyniki zawarte w 298 pracach! Świadczy to o tym, że autor na bieżąco śledzi rozwój swojej dziedziny, starając się przy tym poznawać fundamenty badanych zjawisk. Wprowadzenie jest bogato ilustrowane, rysunki i schematy są przejrzyste, a pomimo znacznej objętości, czyta się je z przyjemnością i zainteresowaniem. Stanowi ono bardzo dobry materiał do opublikowania, po pewnych modyfikacjach i korektach, jako obszerna praca przeglądowa lub nawet monografia. Życzyłbym sobie częściej mieć do czynienia z tak dobrymi opracowaniami dot. karotenoidów!

A teraz bardziej krytycznie...otóż uświadamiając sobie gruntowne fizyczne wykształcenie p. Nizińskiego, ze zdziwieniem znajduję w w/w tekście liczne nieścisłości i uproszczenia, a wręcz sprzeczności. Nie można tego traktować jako mój zarzut przeciwko autorowi, ponieważ przedstawia on, za licznie cytowanymi źródłami literaturowymi, aktualny „zastany” obraz wiedzy. Intencją moją jest wyłącznie chęć skłonienia autora do wnikliwszej refleksji nad czytаныmi pracami naukowymi.

Najbardziej reprezentatywne przykłady „jawnej sprzeczności”

strona 55

Tu najpierw omawiane są zakazy wynikające z tzw. „alternancy symmetry”, które miałyby obowiązywać karotenoidy (wszystkie i o najróżniejszych konformacjach!), po czym stwierdza, że warunkiem wystąpienia stanów zakazanych jest płaskość układu pi-elektronowego. Jest to w jaskrawej sprzeczności z faktycznymi konformacjami karotenoidów (odsyłam tu np. do krystalograficznych danych opublikowanych w Pracy nr 2). Będąc konsekwentnym, powinno się przywołać dwa inne

podstawowe założenia metody Parisera-Parra-Popla, które nie są spełnione w cząsteczkach karotenoidów. Pierwsze to przybliżenie Borna-Oppenheimera (*vs* silne sprzężenie wibronowe w karotenoidach!). A drugie, to obowiązkowa i ścisła separacja pi-sigma. Od kilkudziesięciu lat chemicy już wiedzą, że takowej separacji być nie może a indeksy parzystości są nierzeczywiste. W tym kontekście, są to główne mankamenty półempirycznej metody PPP rozwijanej w latach 50-tych XX wieku.

strona 60

Wpierw pokazano tu schemat poziomów elektronowych barwników karotenoidowych (Figure 30), z precyzyjnym wskazaniem, za pomocą indeksów, symetrii odpowiadającym im orbitali, a tuż poniżej dyskutowane są wysokie wartości stałego momentu dipolowego karotenoidów (konkretnie perydyniny) w stanie podstawowym oraz dramatycznie wysoka wartość tej wielkości w stanie wzbudzonym barwnika S_1 . Czy jako młodego fizyka, nie powinna autora zastanowić ta uderzająca sprzeczność?

Kolejne przykłady niespójności (delikatnie mówiąc):

i) "Distorted C_{2h} symmetry" (nagłówek paragrafu na str. 55). Według mojej najlepszej wiedzy, zwichrowana symetria C_{2h} nie istnieje, bo to po prostu inna symetria: C_1 w przypadku większości karotenoidów, C_2 w nielicznych przypadkach. To fundament teorii grup, który pozwala na łatwe przewidywanie zerowania momentów przejść (bez konieczności stosowania żmudnych obliczeń kwantowo-mechanicznych). Używanie sformułowań typu "distorted symmetry" to w istocie rezygnacja z teorii grup. Przy tej okazji, nieprawdą jest następujące stwierdzenie (str. 52): "The presence of any molecular symmetry usually implies, that some electronic transitions may be forbidden due to zeroing of the transition dipole moment.". Czy rzeczywiście chodzi o dowolną symetrię cząsteczki ("any molecular symmetry")?

ii) Symetria cząsteczek w stanach wzbudzonych. Skąd autor (lub ktokolwiek inny, na dobrą sprawę) czerpie wiedzę na temat dokładnej symetrii obsadzonego stanu S_1 i wyższych, S_n , itd.? Albo stanu S_2 , który relaksuje (IC) do stanu S_1 ? Według mojej wiedzy, nie ma dobrych narzędzi umożliwiających precyzyjne określenie symetrii cząsteczki karotenoidu w stanie wzbudzonym (dowolnym). Można jednak twierdzić, że w roztworze prawdopodobieństwo zachowania symetrii stanu podstawowego w stanie wzbudzonym barwnika jest bliskie zeru.

Z konsekwencją więc nie zgadzam się ze stwierdzeniem autora, że dla jasności opisu należy stosować dla stanów elektronowych karotenoidów etykietowanie symetrii orbitalnej, która nie istnieje. Wprost przeciwnie, wprowadza to kompletny a niepotrzebny chaos. W szczególności dotyczy to chiralnych cząsteczek (duża większość wśród co najmniej kilkaset znanych karotenoidów to cząsteczki chiralne), a których stopień chiralności jest doskonale mierzalny w postaci dichroizmu kołowego. Przy tej okazji, ciekawi mnie dlaczego autor we Wprowadzeniu nie wspomina o widmach dichroizmu

kołowego kompleksu OCP, które znane są w literaturze. Widma CD dostarczają przecież bezpośredniej informacji o typie symetrii cząsteczek chromoforów w kompleksach OCP. Co ciekawe, karotenoidy te w stanie wolnym są achiralne. I już bardziej retorycznie - gdzie w strukturach krystalograficznych widać symetrię chromofora karotenoidowego?

Proszę autora o komentarz w tej kwestii, a w szczególności o zwięzłe wyjaśnienie relacji symetria cząsteczkowa - chiralność.

Chciałbym także zapytać na czym oparta jest wiara autora w niezłomną moc symetrii. Przejawem tej wiary jest obfite stosowanie indeksów symetrii w większość ilustracji zawartych we Wprowadzeniu. W szczególności, **proszę o wskazanie fizycznych czynników odpowiedzialnych za zakazy narzucone na stany elektronowe cząsteczki barwnika a wynikające z jej symetrii (np. C_{2h}).**

Podsumowanie i ocena końcowa

Recenzowana rozprawa to wieloaspektowe badania właściwości kompleksu barwnikowo-białkowego OCP z użyciem zaawansowanych czasowo-rozdzielczych metod spektroskopowych, w szczególności femtosekundowej spektroskopii absorpcyjnej. Do najważniejszych wyników należą: i) identyfikacja stanu S_1 karotenoidu jako prekursora formy P_1 kompleksu OCP, ii) wykazanie efektu oligomeryzacji na funkcjonowanie OCP, iii) określenie wpływu rodzaju karotenoidu i metki histydynowej na funkcjonowanie OCP, oraz iv) wykazanie udziału dwóch fotonów w fotocyklu OCP. Udział p. Nizińskiego w uzyskaniu powyższych wyników jest bezsprzeczny i kluczowy. Autor wykazuje się dojrzałością badawczą, zaawansowaną wiedzą, samodzielnością i kreatywnością. Przedstawiona do recenzji rozprawa ze sporą nawiązką spełnia wszelkie wymogi stawiane tego typu opracowaniom. **Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021, poz. 478. Wnioskuje zatem o dopuszczenie pana mgr Stanisława Nizińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Co więcej, biorąc pod uwagę jej stopień zaawansowania, wagę zawartych w niej wyników, a także imponujący dorobek publikacyjny autora, spełnia ona równie dobrze kryteria dla dysertacji wyższego szczebla. Z wielkim przekonaniem uprzejmie wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o **jej wyróżnienie.**

prof. dr hab. Leszek Fiedor