

Załącznik 2

Autoreferat

**przedstawiający życiorys naukowy wnioskodawcy oraz osiągnięcie
naukowe, zgłaszane jako przedmiot postępowania habilitacyjnego oraz
pozostałe osiągnięcia naukowe**

Dr Ewa Janik

**Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Lublin**

2017

Dr Ewa Janik

Zakład Biologii Komórki

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

tel: 81-537-59-41

email: ewa.janik@poczta.umcs.lublin.pl

AUTOREFERAT

Imię i nazwisko

Ewa Maria Janik

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Tytuł magistra - 2003 r.: magister fizyki, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, specjalność: biofizyka

Tytuł pracy: "Struktura molekularna antybiotyku Amfoterycyny B w świetle badań spektroskopii fluorescencyjnej"

Promotor: prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki

Stopień doktora - 2009 r.: doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii (obecnie Instytut Biologii i Biochemii) Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii), Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Tytuł pracy: „Wpływ metali ciężkich na molekularne mechanizmy fotoprotekcyjne u roślin *Secale cereale*”

Promotor: dr hab. Waldemar Maksymiec

Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2003 - 30.09.2010 asystent, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

01.10.2010 - 31.10.2011 adiunkt, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

01.11.2011 - 30.06.2015 asystent ds. naukowo-technicznych, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, staż doktorski, stypendysta projektu naukowego TEAM pt.: "Molecular Spectroscopy for BioMedical Studies" finansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej

01.10.2015 – 30.09.2017 adiunkt, Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

W 1998 r. rozpoczęłam studia wyższe magisterskie na kierunku fizyka w Instytucie Fizyki Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej. Wybraną przeze mnie specjalnością była biofizyka. Poprzez uczestnictwo w zajęciach specjalizacyjnych miałam możliwość zapoznania się z tematyką badawczą Zakładu Biofizyki Instytutu Fizyki. Obejmowała ona badania z wykorzystaniem technik spektroskopowych nad organizacją molekularną w roztworach oraz w środowisku lipidowym takich cząsteczek, jak: barwniki karotenoidowe, antybiotyk Amfoterycyna B, czy też kompleks białkowo-barwnikowy LHCI (ang. Light Harvesting Complex of Photosystem II). Pracę magisterską zatytułowaną: "Struktura molekularna antybiotyku Amfoterycyny B w świetle badań spektroskopii fluorescencyjnej", wykonaną w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki, obroniłam pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława I. Gruszeckiego w czerwcu 2003 r. Przedstawione w niej wyniki badań dotyczyły wpływu Amfoterycyny B na właściwości strukturalne i dynamiczne błon lipidowych, w szczególności na temperaturę głównego przejścia fazowego błon lipidowych

uformowanych odpowiednio z lipidów: dimirystylofosfatydylocholiny (DMPC), distearylofosfatydylocholiny (DSPC) oraz dipalmitylofosfatydylocholiny (DPPC). Otoczenia lipidowe cząsteczek Amfoterycyny B wpływały na organizację molekularną antybiotyku, która wpływała na kształt widm fluorescencji. Wykazałam, że Amfoterycyna B nie zmienia wartości temperatury głównego przejścia fazowego błon lipidowych uformowanych z DPPC, natomiast zwiększa sztywność błony uformowanej z DMPC oraz zmienia wartość temperatury głównego przejścia fazowego błony utworzonej z DSPC.

1 października 2003 r. zostałam zatrudniona w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, w grupie pracowników naukowo-dydaktycznych, na stanowisku asystenta. Profil badań Zakładu Fizjologii Roślin od wielu lat obejmował strukturę i aktywność aparatu fotosyntetycznego roślin wyższych w warunkach stresu fizjologicznego wywołanego metalami ciężkimi. Jako pracownik Zakładu Fizjologii Roślin, pracę swą rozpoczęłam od badań nad karboksylacyjną oraz oksigenacyjną aktywnością Rubisco w stresie metalami ciężkimi: nadmiarem miedzi oraz kadmem. Materiałem badawczym były rośliny *Arabidopsis thaliana* odm. w.t. Columbia, w.t. RLD i mutanta RLD 100 RCA-antisense.

Od 2004 roku prowadziłam badania nad strukturą oraz funkcjonowaniem aparatu fotosyntetycznego u roślin żyta ozimego (*Secale cereale*, L. odm. Pastar) w warunkach jednoczesnego wystąpienia w środowisku stresu metali ciężkich oraz stresu świetlnego. Badania te prowadzone były na poziomie całych liści żyta traktowanego kadmem lub nadmiarem miedzi oraz oświetlanego światłem o wysokim natężeniu, a także izolowanych z nich kompleksów białkowo-barwnikowych LHCII oraz chlorofilowych i ksantofilowych barwników fotosyntetycznych. Badania obejmowały, między innymi, pomiar parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu *a* w liściach żyta, co umożliwiło wyjaśnienie molekularnych mechanizmów oddziaływania czynników szkodliwych (metale ciężkie oraz silne światło) na strukturę oraz funkcjonowanie fotoukładu II (PSII) u *Secale cereale*. Współpraca z Zakładem Regulacji Metabolizmu Instytutu Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego umożliwiła analizy z użyciem technik: immunodetekcji oraz identyfikacji białek metodą spektrometrii masowej w celu określenia zmian frakcji białkowej kompleksów antenowych LHCII w stresie metali ciężkich. We współpracy z prof. dr. hab. W. I. Gruszeckim z Zakładu Biofizyki Instytutu Fizyki UMCS prowadziłam badania spektroskopowe molekularnego mechanizmu agregacji kompleksów LHCII oraz wpływu kadmu i miedzi na wydajność oraz mechanizm tej agregacji. W badaniach tych

wykorzystywałam technikę spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis oraz w podczerwieni (FTIR), fluorescencyjnej, ramanowskiej. Do badań monowarstw uformowanych z LHCII metodą Langmuira-Blodgett stosowałam metodę mikroskopii sił atomowych (AFM). Analizy dotyczyły również charakteru oddziaływania metali ciężkich na fotoprotekcyjny mechanizm formowania się struktur odpowiedzialnych za niefotochemiczne rozpraszanie nadmiaru energii wzbudzenia w aparacie fotosyntetycznym. Wykazałam, że charakter oraz intensywność oddziaływania kadmu oraz miedzi na PSII zależy od właściwości metalu oraz jego stężenia w podłożu. Ponadto, przeprowadzone przez mnie pomiary wskazały, że oddziaływanie metali ciężkich na molekularne mechanizmy fotoprotekcyjne, funkcjonujące w warunkach długotrwałego oświetlenia liści żyta światłem o wysokim natężeniu, nie ma charakteru uniwersalnego. Kadm, znany jako pierwiastek zbędny dla wzrostu i rozwoju roślin, ogranicza wydajność mechanizmów obronnych. Przejawia się to obniżeniem wydajności deepoksydacji anteraksantyny do zeaksantyny w cyklu ksantofilowym oraz ograniczeniem udziału kompleksów antenowych w nieradiacyjnym rozpraszaniu nadmiaru energii, spowodowanym hamowaniem agregacji kompleksów LHCII. Miedź, która jest mikroelementem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania roślin, podana w nadmiarze zwiększa wydajność cyklu ksantofilowego oraz efektywność powstawania struktur gaszących nadmiar energii wzbudzenia (agregatów LHCII). Sprawne funkcjonowanie mechanizmów fotoprotekcyjnych z udziałem miedzi pozwala na wydajne, niefotochemiczne rozpraszanie energii na skutek oddziaływań ekscytonowych pomiędzy cząsteczkami chlorofilu oraz ksantofilami w obrębie kompleksów antenowych. Prowadzi to do ograniczenia przekazywania nadmiaru zaabsorbowanej energii świetlnej ze struktur antenowych PSII do centrum reakcji, w celu ochrony aparatu fotosyntetycznego przed uszkodzeniem w warunkach stresu świetlnego. Część opisanych powyżej badań realizowałam w ramach zespołowego projektu interdyscyplinarnego Prorektora UMCS d/s Badań Naukowych i Współpracy z Zagranicą pt.: „Cykl ksantofilowy – protekcyjne mechanizmy molekularne w warunkach stresu metali ciężkich i stresu świetlnego”.

Rezultaty przedstawionych powyżej badań zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

(Przy każdej pozycji podano *impact factor* zgodnie z rokiem opublikowania oraz za rok 2015, a także punktację MNiSW wg wykazu czasopism zgodnie z rokiem opublikowania oraz z dn. 09.12.2016)

- 1) **Janik E.**, Grudziński W., Gruszecki W.I., Krupa Z. 2008. The xanthophyll cycle pigments in *Secale cereale* leaves under combined Cd and high light stress conditions. J. Photochem. Photobiol. B: Biol 90, 47-52. **IF₂₀₀₈: 1,838 / IF₂₀₁₅: 3,035; pkt₂₀₀₈: 15 / pkt₂₀₁₆: 30**, autor korespondencyjny
- 2) Gruszecki W.I, **Janik E.**, Luchowski R., Kern P., Grudziński W., Gryczyński I., Gryczyński Z. 2009. Supramolecular organization of the main photosynthetic antenna complex LHCII: A monomolecular study. Langmuir 25, 9384-9391. **IF₂₀₀₉: 3,898 / IF₂₀₁₅: 3,993; pkt₂₀₀₉: 24 / pkt₂₀₁₆: 35**
- 3) **Janik E.**, Maksymiec W. Mazur R., Garstka M., Gruszecki W.I. 2010. Structural and functional modifications of the major light-harvesting complex II in cadmium or copper-treated *Secale cereale*. Plant Cell Physiol. 51, 1330-1340. **IF₂₀₁₀: 4,257 / IF₂₀₁₅: 4,319; pkt₂₀₁₀: 35 / pkt₂₀₁₆: 40**, (opublikowano po doktoracie) autor korespondencyjny
- 4) **Janik E.**, Maksymiec W., Gruszecki W.I. 2010. The photoprotective mechanisms in *Secale cereale* leaves under Cu and high light stress condition. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 101, 47-52. **IF₂₀₁₀: 2,116 / IF₂₀₁₅: 3,035; pkt₂₀₁₀: 20 / pkt₂₀₁₆: 30**, (opublikowano po doktoracie) autor korespondencyjny,

były tematem 1 publikacji w recenzowanych materiałach konferencyjnych (z bazy WoS):

- 1) Gruszecki W.I., **Janik E.**, Grudziński W., Kern P., Gospodarek M., Maksymiec W., Krupa Z. 2008. Specific molecular aggregation of photosynthetic pigment-protein complex LHCII. Single Molecule Spectroscopy and Imaging Conference-Progress in Biomedical Optics and Imaging, San Jose, USA, Proceedings of SPIE 6862, 68620W. **IF: 0; pkt₂₀₀₈: 2 / pkt₂₀₁₆: 15**

oraz 10 komunikatów konferencyjnych, a także zostały wykorzystane w tworzeniu bazy widm absorpcyjnych UV-Vis barwników pochodzenia biologicznego (VPL Biological Pigments Database) przygotowanej przez NASA Astrobiology Institute, University of Washington, dostępnej na stronie internetowej pod adresem: <http://vplapps.astro.washington.edu/pigments>.

W 2009 roku, wraz z innymi pracownikami Zakładu Fizjologii Roślin, uczestniczyłam w przygotowaniu monografii zagranicznej pod redakcją dr. hab. Waldemara Maksymca na temat odpowiedzi roślin na różne czynniki stresowe. Jestem autorem rozdziału: **Janik E., Maksymiec W. 2009.** The chloroplast reaction on abiotic and biotic stress factors. Compartmentation of responses to stresses in higher plants, true or false. Maksymiec W. (red.), Transworld Research Network, Kerla, India 125-147. **pkt₂₀₀₉: 7 / pkt₂₀₁₆: 25**

Dnia 15.12.2009 na mocy uchwały Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi uzyskałam stopień doktora z dziedziny nauk biologicznych. Pracę doktorską zatytułowaną „Wpływ metali ciężkich na molekularne mechanizmy fotoprotekcyjne u roślin *Secale cereale*” wykonałam w Zakładzie Fizjologii Roślin, Instytutu Biologii pod kierunkiem dr. hab. Waldemara Maksymca.

Łączny *impact factor* ww. opublikowanych prac eksperymentalnych zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **12,109**. Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **96 pkt**.

Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora stanowi:

- 14 prac eksperymentalnych z listy WoS
- 37 doniesień zjazdowych

Łączny *impact factor* opublikowanych prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **52,477**. Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **454 pkt**.

Spośród artykułów naukowych opublikowanych po doktoracie 5 prac eksperymentalnych weszło w skład osiągnięcia naukowego, będącego przedmiotem habilitacji. Łączny *impact factor* tych prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **22,662**. Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **180 pkt**.

Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie do postępowania habilitacyjnego wskazuję monotematyczny cykl 5 publikacji zatytułowany:

**„Organizacja molekularna kompleksu białkowo-barwnikowego
LHCII w warunkach zmiennego oświetlenia”**

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

(Przy każdej pozycji podano *impact factor* zgodnie z rokiem opublikowania oraz za rok 2015, a także punktację MNiSW wg wykazu czasopism zgodnie z rokiem opublikowania oraz z dn. 09.12.2016)

Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego to 5 oryginalnych prac eksperymentalnych:

- 1) **Janik E.**, Bednarska J., Zubik M., Puzio M., Luchowski R., Grudziński W., Mazur R., Garstka M., Maksymiec W., Kulik A., Dietler G., Gruszecki W.I. 2013. Molecular architecture of plant thylakoids under physiological and light stress conditions: A study of lipid-light-harvesting complex II model membranes. *Plant Cell*. 25, 2155-2170. **IF₂₀₁₃: 9,575 / IF₂₀₁₅: 8,538; pkt₂₀₁₃: 45 / pkt₂₀₁₆: 45**
- 2) **Janik E.**, Bednarska J., Zubik M., Sowiński K., Luchowski R., Grudziński W., Gruszecki W.I. 2015. It is beneficial for the major photosynthetic antenna complex of plants to form trimers? *J. Phys. Chem. B* 116, 8501-8508. **IF₂₀₁₅: 3,187; pkt₂₀₁₅: 30 / pkt₂₀₁₆: 30**
- 3) **Janik E.**, Bednarska J., Zubik M., Sowiński K., Luchowski R., Grudziński W., Matosiuk D., Gruszecki W.I. 2016. The xanthophyll cycle pigments, violaxanthin and zeaxanthin, modulate molecular organization of the photosynthetic antenna complex LHCII. *Arch. Biochem. Biophys.*, 592, 1-9. **IF₂₀₁₅: 2,807; pkt₂₀₁₆: 30**
- 4) **Janik E.**, Bednarska J., Zubik M., Luchowski R., Mazur R., Sowiński K., Garstka M., Grudziński W., Gruszecki W.I. 2017. A chloroplast “wake up”

mechanism: Illumination with weak light activates the photosynthetic antenna function in dark-adapted plants. J. Plant Physiol. 210, 1-8. **IF₂₀₁₅: 2,971; pkt₂₀₁₆: 35**

- 5) **Janik E.**, Bednarska J., Sowiński K., Luchowski R., Zubik M., Grudziński W., Gruszecki W.I. 2017. Light-induced formation of dimeric LHCII. Photosynth. Res. DOI: 10.1007/s11120-017-0387-6. **IF₂₀₁₅: 4,122; pkt₂₀₁₆: 40**, autor korespondencyjny

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie

W środowisku naturalnym warunki oświetlenia roślin wyższych mogą zmieniać się w skali czasowej od minut do godzin, dni a nawet miesięcy. Zmiany te powodowane są przez różne czynniki środowiskowe, jak: ruch chmur po niebie, zmiany pogodowe, czy też wzajemne zasłanianie się przez sąsiadujące ze sobą rośliny (1). Intensywność oświetlenia może zmieniać się od wartości niskich ($\sim 100 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) do wysokich ($\sim 1000 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Zaobserwowano, że oświetlenie roślin światłem o niskiej intensywności uruchamia proces fosforylacji tyrozyny końca N polipeptydu LHCII (2). Uważa się, że indukuje on regulację dystrybucji energii pomiędzy fotoukładami w warunkach zmiennego oświetlenia, w zakresie niskich intensywności światła. Mechanizm ten określany jest jako state-transition (3). Krótco-, jak również długotrwale oświetlanie roślin światłem o wysokiej intensywności może prowadzić do procesu fotoinhibicji, objawiającego się uszkodzeniem struktury białka D1 należącego do PSII, barwników fotosyntetycznych, czy też nienasyconych kwasów tłuszczowych lipidów błon tylakoidów (4). Na drodze ewolucji rośliny wykształciły mechanizmy fotoprotekcyjne, funkcjonujące na różnym poziomie ich organizacji. Ochrona przed fotoinhibicją może odbywać się poprzez zmianę ułożenia liści w stosunku do kierunku padania promieni świetlnych (5), czy też foto-translokację chloroplastów w komórkach liści (6). Niestety, mechanizmy te zmniejszają wydajność absorpcji światła w warunkach stresu świetlnego tylko o około 10–20 % (7). Efektywna protekcja aparatu fotosyntetycznego przed wystąpieniem fotouszkodzenia zachodzi na poziomie molekularnym. Ma ona miejsce w błonie tylakoidu chloroplastów, gdzie zlokalizowane są części rdzeniowe kompleksów białkowo-barwnikowych PSI i PSII wraz z kompleksami antenowymi. Tworzą one system

dynamicznie regulujący wydajność absorpcji, a następnie fotochemicznego wykorzystania, czy też fotoprotekcyjnego rozproszenia energii świetlnej.

LHCII jest największym kompleksem białkowo-barwnikowym PSII. W warunkach optymalnego oświetlenia forma trimeryczna LHCII pełni funkcję antenową, odpowiedzialną za absorpcję energii świetlnej, wykorzystanej następnie w procesach fotochemicznych fotosyntezy. Jak wykazały analizy struktury krystalograficznej (8), każdy monomer w trimerze stanowi polipeptyd zbudowany z około 232 aminokwasów, uformowany w trzy transmembranowe α -helisy A, B i C oraz dwie krótkie α -helisy D i E. Łańcuch polipeptydowy wiąże 8 cząsteczek chlorofilu *a*, 6 cząsteczek chlorofilu *b* oraz ksantofile: wiolaksantynę, neoksantynę i dwie cząsteczki luteiny (8). Nadmiar energii docierającej do aparatu fotosyntetycznego powoduje przełączenie funkcji kompleksu LHCII z antenowej na fotoprotekcyjną (9). Te zmiany w funkcjonowaniu LHCII związane są ze zmianą jego organizacji molekularnej (10). Pula trimerów LHCII nie związanych trwale z PSII może w błonie tylakoidu formować struktury oligomeryczne, odpowiedzialne za fotoprotekcyjne gaszenie nadmiaru energii wzbudzenia w warunkach silnego oświetlenia (11-18). W fotoprotekcji na poziomie molekularnym uczestniczy proces zwany cyklem ksantofilowym. Zachodzi on w błonie tylakoidu w warunkach silnego oświetlenia i polega na enzymatycznej, dwuetapowej deepoksydacji barwnika ksantofilowego LHCII - wiolaksantyny, poprzez anteraksantynę, do zeaksantyny (19, 20). Reakcja ta ulega odwróceniu pod wpływem oświetlenia roślin światłem o niskiej intensywności lub w ciemności. Rola barwników cyklu ksantofilowego w fotoprotekcji była tematem licznych badań na przestrzeni wielu lat (11, 21-39). Wyniki tych badań wskazały, że obecność zeaksantyny skorelowana jest z funkcjonowaniem w błonie tylakoidu procesu opartego na wydajnym, niefotochemicznym gaszeniu nadmiaru energii w warunkach stresu świetlnego. Ponadto, fizjologiczne znaczenie cyklu ksantofilowego przypisywane jest powstawaniu specyficznych struktur supramolekularnych kompleksów LHCII charakteryzujących się wydajnym rozpraszaniem energii.

Szczegółowe poznanie organizacji molekularnej i funkcjonowania kompleksu antenowego LHCII jest więc istotne dla zrozumienia mechanizmów fotoprotekcyjnych odpowiedzialnych za wydajne funkcjonowanie procesu fotosyntezy w zmieniających się warunkach oświetlenia. Interesująca wydaje się odpowiedź na pytanie: jaki mechanizm odpowiada za udział kompleksów LHCII w tak przeciwstawnych procesach jak, z jednej strony absorpcja i transfer energii wzbudzenia, z drugiej jej rozproszenie termiczne.

Cel badań

Badania, których wyniki przedstawiono jako osiągnięcie naukowe, realizowałam będąc stypendystą Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, w ramach projektu naukowego Team pt.: „Molecular Spectroscopy for BioMedical Studies”. Mój udział w tym projekcie związany był także z opieką naukową nad magistrantami oraz doktorantami, w szczególności nad panią mgr Joanną Bednarską, dla której byłam promotorem pomocniczym pracy doktorskiej. Celem moich działań było zaplanowanie i wykonanie eksperymentów prowadzących do wyjaśnienia, jak organizacja molekularna kompleksu białkowo-barwnikowego LHCII zmienia się w odpowiedzi na zmieniające się warunki oświetlenia oraz jak te zmiany wpływają na organizację błony tylakoidu w chloroplastach. Starałam się poznać związek pomiędzy uwarunkowaniami strukturalnymi kompleksu LHCII i mechanizmami fizycznymi związanymi z procesami transferu i rozpraszania nadmiaru energii wzbudzenia. Badania prowadziłam na poziomie całych liści, w obrębie pojedynczego chloroplastu, a także z wykorzystaniem kompleksów LHCII izolowanych z zaciemnianych oraz oświetlanych światłem o niskiej ($100 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lub wysokiej ($1200 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) intensywności liści szpinaku. Przeprowadziłam analizę spektralną różnych form molekularnych LHCII w środowisku detergentu oraz sztucznych i naturalnych błon lipidowych.

Cele szczegółowe

- 1) charakterystyka molekularnych form kompleksów LHCII utworzonych w błonach lipidowych z udziałem barwników cyklu ksantofilowego;
- 2) wyodrębnienie struktur molekularnych kompleksów LHCII zdolnych do wydajnego gaszenia nadmiaru energii;
- 3) określenie roli zeaksantyny w mechanizmie niefotochemicznego rozproszenia energii;
- 4) poznanie zależności pomiędzy fosforylacją kompleksów LHCII a ich organizacją molekularną;
- 5) określenie zmian w organizacji błon lipidowych tylakoidów wywołanych fosforylacją kompleksów LHCII;

- 6) analiza organizacji przestrzennej błon tylakoidów w warunkach oświetlenia światłem o niskiej oraz wysokiej intensywności.

Wyniki

Aktywacja funkcji fotosyntetycznej kompleksów LHCII światłem o niskiej intensywności

Wyniki te przedstawiono w publikacji: **Janik E., Bednarska J., Zubik M., Luchowski R., Mazur R., Sowiński K., Garstka M., Grudziński W., Gruszecki W.I. 2017. A chloroplast “wake up” mechanism: Illumination with weak light activates the photosynthetic antenna function in dark-adapted plants. J. Plant Physiol. 210, 1-8.**

Kompleksy białkowo-barwnikowe zajmują około 80 % powierzchni błony tylakoidu (40). Tak duże ich zagęszczenie mogłoby prowadzić do niepożądanego tracenia zaabsorbowanej energii świetlnej na skutek silnego termicznego rozpraszania energii wzbudzenia, typowego dla struktur zagregowanych LHCII. Proces ten byłby wysoce niekorzystny w warunkach oświetlenia roślin słabym światłem, kiedy to funkcja aparatu fotosyntetycznego nastawiona jest na jak najbardziej wydajne pochłanianie energii, w celu sprawnego przeprowadzania procesu fotosyntezy. Problem ten analizowany był w eksperymentach przeprowadzonych na nienaruszonym pojedynczym chloroplaście z wykorzystaniem techniki obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM). Chloroplast, umiejscowiony w skrawku dolnej skórki liścia szpinaku, oświetlano światłem o różnej intensywności (od 9 do 600 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Podczas oświetlania chloroplastu światłem z zakresu niskich intensywności (poniżej poziomu wysycenia procesów fazy jasnej fotosyntezy) zaobserwowano wydłużenie średniego czasu życia fluorescencji chlorofilu *a*. Szczegółowe analizy obrazów FLIM wykazały, że efekt ten występował głównie w obszarze gran tylakoidów. Ponadto, wzrost wartości średniego czasu życia fluorescencji skorelowany był z reorganizacją błon tylakoidów w chloroplaście, obserwowaną podczas analizy przekrojów poprzecznych sygnału fluorescencji w obrazach FLIM. Zmiany te polegały na destabilizacji struktury gran tylakoidów podczas oświetlania chloroplastu światłem o intensywności z zakresu 9-110 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Ponieważ w przedziale tym zaobserwowano największą wydajność procesu fosforylacji kompleksów LHCII, obserwowaną reorganizację błon tylakoidów można powiązać z procesem fosforylacji tych kompleksów. Aby potwierdzić tą hipotezę przeprowadzono analogiczne eksperymenty dla pojedynczego chloroplastu z liścia *Arabidopsis thaliana* w.t. oraz mutantu *stn7*, w którym proces fosforylacji LHCII jest zablokowany. Wydłużenie

średniego czasu życia fluorescencji w zakresie niskich intensywności światła obserwowano dla chloroplastu *Arabidopsis thaliana* w.t., natomiast nie zaobserwowano tego efektu w chloroplaście mutantu *stn7*. Wzrost wartości średniego czasu życia fluorescencji bezpośrednio związany był ze zmniejszeniem się amplitudy składowej średniego czasu życia fluorescencji o wartości 1,0 ns i wzrostem amplitudy składowej średniego czasu życia fluorescencji o wartości 1,8 ns. Składowe te przypisać można odpowiednio formom trimerycznym LHCII w środowisku błony lipidowej oraz kompleksom LHCII w formie monomerycznej. W chloroplaście mutantu *stn7* nie zaobserwowano zmian amplitudy tych składowych.

W celu głębszego poznania mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za zmianę organizacji molekularnej LHCII oraz struktury gran tylakoidów, regulowanego fosforylacją kompleksów LHCII, zaprojektowano wieloskładnikowe układy modelowe, odpowiadające naturalnym błonom tylakoidów. Stanowiły je dwuwarstwy lipidowe uformowane z lipidów chloroplastowych MGDG oraz DGDG, do których inkorporowano kompleksy LHCII izolowane z zaciemnianych liści szpinaku lub liści oświetlanych światłem o intensywności $100 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Immunodetekcja wykazała duży stopień ufosforylowania kompleksów izolowanych z liści oświetlanych. Dodatkowo, badania z zastosowaniem elektroforezy natywnej wskazały na zmianę organizacji molekularnej kompleksów LHCII wraz ze zmianą intensywności oświetlenia. Kompleksy izolowane z liści zaciemnianych występowały głównie w formie trimerycznej ($T/M = 5,92 \pm 1,10$), natomiast w puli kompleksów izolowanych z liści oświetlanych obecna była duża ilość form monomerycznych LHCII ($T/M = 2,20 \pm 0,28$). Ponadto, znacznie większa ilość monomerów występowała w postaci ufosforylowanej, w porównaniu do ilości trimerów. Analizy obrazów FLIM modelowych błon lipidowo-białkowych wykazały wydłużenie średniego czasu życia fluorescencji w przypadku błon lipidowych utworzonych z ufosforylowanymi kompleksami LHCII w stosunku do błon z wbudowanymi kompleksami nieufosforylowanymi. Efekt ten wskazał na mniejszy stopień zagregowania nieufosforylowanych kompleksów LHCII oraz ich homogeniczny rozkład w obszarze sztucznej błony lipidowej.

Fosforylacja kompleksów LHCII może prowadzić do elektrostatycznego odpychania się naładowanych ujemnie grup fosforanowych kompleksów znajdujących się w obrębie jednego trimera, a także osłabienia oddziaływania pomiędzy trimerami zlokalizowanymi w sąsiadujących ze sobą błonach tylakoidów. Tym samym fosforylacja LHCII może powodować monomeryzację trimerów. Jak wiadomo, formy trimeryczne

kompleksów stabilizują struktury gran tylakoidów (41). Wzrost puli monomerów w błonie może więc prowadzić do destabilizacji gran oraz zwiększenia ruchliwości kompleksów LHCII w płaszczyźnie błony. Poprzez taki mechanizm, indukowana słabym światłem fosforylacja kompleksów LHCII może regulować funkcję fotosyntetyczną kompleksów w warunkach słabego oświetlenia. Rozpad form zagregowanych LHCII, charakteryzujących się wydajnym gaszeniem energii, skutkuje homogennym rozkładem form LHCII, zapewniającym warunki do wydajnej absorpcji i transferu energii świetlnej w warunkach słabego oświetlenia.

Indukowana światłem monomeryzacja kompleksów LHCII

Wyniki te przedstawiono w publikacji: **Janik E., Bednarska J., Zubik M., Sowiński K., Luchowski R., Grudziński W., Gruszecki W.I. 2015. It is beneficial for the major photosynthetic antenna complex of plants to form trimers? J. Phys. Chem. B 116, 8501-8508.**

Podstawową funkcją fizjologiczną formy trimerycznej LHCII jest absorpcja światła słonecznego w celu wykorzystania go w procesach fazy jasnej fotosyntezy. Zastanawiające jest, dlaczego obecność takiej formy molekularnej LHCII w błonie tylakoidu jest korzystna dla roślin biorąc pod uwagę fakt, że inne kompleksy antenowe związane z PSII występują natywnie tylko jako monomery. Problem ten badany był przy wykorzystaniu nienaruszonych chloroplastów oraz izolowanych z liści szpinaku kompleksów LHCII, z zastosowaniem spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis oraz stacjonarnej oraz czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej.

Określono, że forma trimeryczna LHCII może pełnić funkcję antenową, polegającą na wydajnym dostarczaniu energii do centrum reakcji PSII, ponieważ wydajnie zachodzi w niej transfer energii wzbudzenia z chlorofilu *b* na chlorofil *a*. Wniosek ten wysunięto na podstawie porównania widma 1-Transmisja (1-T) oraz widma wzbudzenia fluorescencji chlorofilu *a* zmierzonych dla formy trimerycznej. Większe (w stosunku do trimery) niedopasowanie widma wzbudzenia fluorescencji z widmem 1-T w obszarze spektralnym Soreta w przypadku monomeru LHCII wskazało na częściowe gaszenie energii na drodze rozproszenia termicznego przez barwniki fotosyntetyczne w tym paśmie spektralnym w monomerze. Osłabiony, w stosunku do trimery, transfer energii wzbudzenia z chlorofilu *b* na chlorofil *a* w monomerze LHCII jest potwierdzony obecnością pasma położonego przy 656 nm, przypisanego chlorofilowi *b*, w niskotemperaturowym widmie emisji fluorescencji tej formy kompleksu. Wydajne energetyczne sprzężenie pomiędzy chlorofilem *b* oraz chlorofilem *a* w strukturze trimerycznej wynika ze specyficznej

przestrzennej organizacji cząsteczek chlorofilu. W monomerze LHCII cząsteczki chlorofilu *a* oraz *b* są zgrupowane, a grupy te są względnie odseparowane od siebie. Dopiero połączenie monomerów w strukturę trimeryczną umożliwia cząsteczkom chlorofilu *b* jednego monomeru znaleźć się na tyle blisko cząsteczki chlorofilu *a* w sąsiednim monomerze, by mógł zajść wydajny transfer energii z chlorofilu *b* na chlorofil *a*. Ta specyficzna organizacja chlorofilu tłumaczy wysoką wydajność kwantową fluorescencji w trimerze w porównaniu z formą monomeryczną. Określono, że wydajność kwantowa fluorescencji monomeru LHCII (dla wzbudzenia emisji fluorescencji przy 440 nm) stanowi tylko $0,55 \pm 0,03$ wartości tego parametru dla trimery LHCII. Łączenie się monomerów w strukturę trimeryczną LHCII wiąże się także ze zmianą wartości średniego czasu życia fluorescencji. Parametr ten (liczony po intensywności, ze wzbudzeniem fluorescencji przy 470 nm) dla monomeru LHCII w roztworze detergentu wynosi $2,74 \pm 0,05$ ns, natomiast dla trimery LHCII wynosi $3,50 \pm 0,05$ ns.

Charakterystyczne dla monomeru gaszenie energii wzbudzenia na sposób termiczny jest typowe dla mechanizmu obronnego roślin przed stresem świetlnym. Pojawia się więc pytanie, czy forma monomeryczna LHCII mogłaby bezpośrednio uczestniczyć w fotoprotekcji. Proces indukowanego światłem przejścia LHCII z formy trimerycznej do monomerycznej obserwowany był wcześniej przez Garabą i wsp. (42) w układzie zawierającym izolowane kompleksy LHCII oraz całe błony tylakoidów. Przeprowadzone w moich badaniach oświetlanie światłem zawiesiny detergentowej kompleksów LHCII skutkowało wzrostem puli monomerów kosztem puli trimerów LHCII. W celu sprawdzenia, czy indukowana światłem monomeryzacja kompleksów LHCII ma miejsce także *in vivo*, wykonano obrazowanie czasów życia fluorescencji metodą FLIM nienaruszonego, pojedynczego chloroplastu w dolnej skórce liścia szpinaku. Pomiar przeprowadzano z użyciem trzech różnych częstotliwości lasera, co odpowiadało następującym intensywnościom światła białego: 9, 45 oraz 1200 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Analiza czasów życia fluorescencji chlorofilu *a* w chloroplastie wykazała obecność składowej średniego czasu życia fluorescencji o wartości 1,8 ns, którą można przypisać formie monomerycznej LHCII oraz innym monomerycznym kompleksom antenowym aparatu fotosyntetycznego. Wartość amplitudy tej składowej wzrastała (z 22 do 32 %) w odpowiedzi na wzrastającą intensywność światła, ale tylko w obszarze niskich intensywności (45 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Przy wysokich intensywnościach (1200 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) amplituda tej składowej była względnie niska (14 %). Jednocześnie, obserwowano pojawienie się składowej o wartości 0,8 ns i amplitudzie

70 %. Wyniki te sugerują, że przy niskich intensywnościach światła w błonie tylakoidu uruchamiany jest mechanizm monomeryzacji trimerów LHCII. Przy wyższych intensywnościach światła z monomerów tworzą się supramolekularne struktury LHCII charakteryzujące się wydajnym gaszeniem energii, odpowiedzialne za ochronę aparatu fotosyntetycznego przed nadmiarem wzbudzeń. Tym samym można wnioskować, że indukowana światłem monomeryzacja może regulować funkcjonowanie kompleksów LHCII w zmieniających się warunkach oświetlenia.

Organizacja molekularna kompleksu LHCII a barwniki cyklu ksantofilowego: wiolaksantyna oraz zeaksantyna

Wyniki te przedstawiono w publikacji: **Janik E., Bednarska J., Zubik M., Sowiński K., Luchowski R., Grudziński W., Matosiuk D., Gruszecki W.I.** 2016. *The xanthophyll cycle pigments, violaxanthin and zeaxanthin, modulate molecular organization of the photosynthetic antenna complex LHCII.* Arch. Biochem. Biophys., 592, 1-9.

Badania nad organizacją molekularną kompleksu LHCII indukowaną barwnikami cyklu ksantofilowego: wiolaksantyną oraz zeaksantyną prowadzono z użyciem układów modelowych. Do dwuwarstw lipidowych, utworzonych z lipidów chloroplastowych MGDG oraz DGDG, wbudowywano kompleksy LHCII izolowane z zaciemnianych liści szpinaku oraz egzogenne barwniki ksantofilowe (w ilości 3 cząsteczki/monomer LHCII), odpowiednio wiolaksantynę oraz zeaksantynę. Analizy z zastosowaniem spektroskopii fluorescencyjnej oraz elektroforezy natywnej wskazały, że wiolaksantyna oraz zeaksantyna wpływają na organizację kompleksu LHCII w błonie lipidowej w odmienny sposób. Obecność wiolaksantyny w kompleksie indukuje głównie jego formę trimeryczną, natomiast zeaksantyny promuje występowanie kompleksu LHCII w postaci monomeru oraz dimeru. Ten interesujący efekt badany był dodatkowo w eksperymencie, w którym wiolaksantyna oraz zeaksantyna były wbudowywane do kompleksów LHCII w środowisku detergentu. Badania te przeprowadzono w celu sprawdzenia, czy wpływ barwników cyklu ksantofilowego na organizację molekularną LHCII jest specyficzny tylko dla środowiska błony lipidowej. Jak zaobserwowano, obecność wiolaksantyny zwiększa pulę trimerów, natomiast zeaksantyny, pulę monomerów, również w środowisku detergentu. Analizy chromatograficzne dowiodły, że oba ksantofile są słabo związane z monomerem LHCII, natomiast wiolaksantyna jest silnie związana z formą trimeryczną. W celu określenia mechanizmu molekularnego leżącego u podłoża łączenia się kompleksów LHCII w trimery z udziałem wiolaksantyny oraz rozpadu na monomery w obecności zeaksantyny

wykorzystano modelowanie molekularne. Wskazało ono, że wiązanie się barwników cyklu ksantofilowego do monomeru LHCII ma charakter konkurencyjny oraz, że barwniki te wiążą się do kompleksu z różną siłą. Może to wynikać z innej orientacji pierścieni względem łańcucha wiązań sprzężonych w cząsteczkach barwników, a także z obecności dwóch dodatkowych grup polarnych w wiolaksantynie, co czyni ją zdolną do tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych w porównaniu do zeaksantyny. Wiolaksantyna może tworzyć cztery, natomiast zeaksantyna dwa miejsca wiązania z kompleksem LHCII. Określono, że wiolaksantyna oraz zeaksantyna konkurują ze sobą o miejsce wiązania z fosfatydyloglicerolem, który umiejscowiony jest na granicy dwóch monomerów w trimerze LHCII. Ponadto, zeaksantyna łączy się silniej do cząsteczki chlorofilu *a* 610 (zgodnie z nomenklaturą (41)) niż wiolaksantyna, co sterycznie utrudnia łączenie się monomerów LHCII w trimery w obecności zeaksantyny.

Kolejnym ważnym wnioskiem uzyskanym na podstawie analiz rozdziałów układów lipidowo-białkowo-barwnikowych metodą elektroforezy natywnej jest tworzenie się supramolekularnych struktur LHCII (n-LHCII) w błonie lipidowej przy udziale barwników cyklu ksantofilowego. Średni czas życia fluorescencji chlorofilu *a* liczony po intensywności, zmierzony dla struktur n-LHCII wynosi ~2,5 ns. Jest on krótszy niż średni czas życia formy trimerycznej (~3,5 ns w detergencie) oraz formy monomerycznej (~2,7 ns w detergencie), ale jednocześnie dłuższy niż formy zagregowanej LHCII (~0,2 ns w niskim stężeniu detergentu). Widmo emisji fluorescencji chlorofilu *a* w LHCII zmierzone w temp. 77 K dla form n-LHCII w środowisku detergentu charakteryzuje się maksimum fluorescencji przy 680 nm, jak w przypadku widma emisji trimery LHCII w detergencie. Wyniki te wskazują na to, że formy n-LHCII, chociaż utworzone z więcej niż jednego trimery, nie są typowymi strukturami oligomerycznymi, dla których maksimum emisji fluorescencji występuje przy 700 nm. Na podstawie niskotemperaturowych widm emisji fluorescencji chlorofilu *a* określono, że struktury n-LHCII indukowane barwnikami cyklu ksantofilowego w środowisku błony lipidowej mają pasmo emisji fluorescencji z maksimum przy 715 nm. Rozpatrując możliwość fizjologicznego znaczenia występowania struktur n-LHCII w błonach tylakoidów, należy postawić pytanie, czy w fazie lipidowej błony tylakoidu występuje pula wiolaksantyny nie związanej bezpośrednio z kompleksami antenowymi, która mogłaby stabilizować takie struktury. Jak wykazały analizy chromatograficzne tylakoidów izolowanych z zaciemnianych liści szpinaku, w błonie lipidowej znacząca pula wiolaksantyny nie wiąże się bezpośrednio do białek kompleksów LHC. Cząsteczki barwnika należące do tej frakcji mogą więc uczestniczyć w stabilizacji

struktur n-LHCII oddziałując z grupami hydroksylowymi cząsteczek neoksantyny w sąsiadujących ze sobą trimerach LHCII.

Jak wspomniano wcześniej, duże zagęszczenie kompleksów LHCII w błonie tylakoidów mogłoby skutkować niepożądaną utratą zaabsorbowanej energii świetlnej. Na podstawie niskotemperaturowych widm emisji fluorescencji oraz czasów życia fluorescencji chlorofilu *a* form n-LHCII można stwierdzić, że trimery w takiej strukturze są odseparowane od siebie na tyle, aby zapobiec samoistnemu gaszeniu energii wzbudzenia, wywołanemu agregacją kompleksów antenowych. Obecność struktur n-LHCII w błonie tylakoidów w warunkach słabego lub optymalnego oświetlenia, kiedy w puli barwników cyklu ksantofilowego przeważa wiolaksantyna, może mieć znaczenie regulacyjne w maksymalnym wykorzystaniu energii wzbudzenia w procesach fotochemicznych fotosyntezy. Średni czas życia fluorescencji chlorofilu *a* zmierzony dla pojedynczego chloroplastu oraz liścia w obecności w nich wiolaksantyny wynosi 2,23 oraz ~2,5 ns, odpowiednio. Podobieństwo tych wartości do wartości czasów życia fluorescencji struktur n-LHCII stabilizowanych barwnikami cyklu ksantofilowego potwierdza możliwość wystąpienia takich struktur *in vivo*.

Biorąc pod uwagę fakt, iż wartości czasów życia fluorescencji struktur n-LHCII (w detergencie) w obecności wiolaksantyny oraz zeaksantyny są takie same, można wnioskować, że molekularna forma tych struktur jest podobna. Jednak, zależność wartości stosunku składowej gaussowskiej odpowiadającej pasmu emisji fluorescencji przy 715 nm do składowej odpowiadającej pasmu przy 684 nm w widmie emisji zmierzonym dla układu lipidowo-białkowego od ilości zeaksantyny w tym układzie ma charakter periodyczny a nie liniowy, jak w przypadku wiolaksantyny. Parametr periodyczności obliczony, jako 1,31 cząsteczki zeaksantyny przypadającej na monomer LHCII wskazuje, że struktura supramolekularna stabilizowana przez zeaksantynę składa się minimalnie z 4 cząsteczek barwnika i 3 monomerów LHCII (4 cząsteczki zeaksantyny/trimer LHCII). Związanie kolejnej cząsteczki zeaksantyny prowadzić może do destabilizacji trimery i rozpadu struktury supramolekularnej. Można by oczekiwać, że struktury molekularne LHCII stabilizowane zeaksantyną w błonie lipidowej będą charakteryzowały się zdolnością do wydajnego gaszenia energii wzbudzenia. Wiedząc, że obecność zeaksantyny w kompleksie LHCII promuje jego monomeryzację oraz dimeryzację, można się spodziewać, że to z monomerów i dimerów w błonie tylakoidów będą formować się struktury oligomeryczne o charakterze gaszącym nadmiar energii w warunkach stresu świetlnego.

Dimer LHCII – potencjalna struktura fotoprotekcyjna

Wyniki te przedstawiono w publikacji: **Janik E., Bednarska J., Sowiński K., Luchowski R., Zubik M., Grudziński W., Gruszecki W.I.** 2017. *Light-induced formation of dimeric LHCII. Photosynth. Res.* DOI: 10.1007/s11120-017-0387-6.

W celu analizy jakościowej oraz ilościowej form oligomerycznych LHCII w liściach w warunkach oświetlenia światłem o wysokiej intensywności wykonano rozdziały elektroforetyczne preparatów LHCII izolowanych z liści szpinaku zaciemnianych oraz oświetlanych światłem o intensywności $1200 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Wykazano, że w liściach zaciemnianych LHCII występuje głównie w formie trimerycznej, natomiast w liściach oświetlanych silnym światłem pojawia się duża pula monomerów oraz niewielka frakcja dimerów. Aby rozstrzygnąć, czy struktura dimeryczna LHCII jest indukowana bezpośrednio przez światło, przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem kompleksów LHCII izolowanych z adaptowanych do ciemności liści szpinaku. Zawiesinę detergentową takich kompleksów oświetlano światłem o różnych intensywnościach z zakresu $11\text{--}1240 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Zaobserwowano, że ilość dimerów LHCII w preparacie silnie zależy od intensywności światła. Im większa intensywność światła, tym większa frakcja struktur dimerycznych. Dodatkowo wykazano, że w przedziale niskich intensywności światła ($11\text{--}95 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) pula trimerów LHCII malała wraz ze wzrostem puli monomerów oraz dimerów. Natomiast, światło z zakresu wysokich intensywności ($682\text{--}1240 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) powodowało wzrost puli dimerów kosztem puli monomerów. Wzrost ilości dimerów LHCII wraz ze wzrostem intensywności światła obserwowano także dla detergentowej zawiesiny błon tylakoidów izolowanych z liści szpinaku. Indukowaną światłem strukturę dimeryczną LHCII wykryto również przy użyciu metody FCS (ang. Fluorescence Correlation Spectroscopy). Metoda ta umożliwia detekcję fluorescencji pojedynczych cząsteczek w bardzo małej objętości fokalnej oraz określenie ich współczynnika dyfuzji. Zaobserwowano, że w zaciemnianej zawieszynie LHCII w roztworze detergentu obecne są dwie formy molekularne kompleksu: trimeryczna oraz monomeryczna. Ponadto, określono wartości współczynników dyfuzji trimera oraz monomeru LHCII w roztworze DM: $7 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ i $35 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, odpowiednio. Oświetlanie takiej zawiesiny światłem o intensywności $100 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ skutkowało pojawieniem się w roztworze dodatkowej formy LHCII o współczynniku dyfuzji o wartości $22 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, którą to formę zidentyfikowano jako dimer LHCII.

Aby stwierdzić, czy dimery LHCII indukowane silnym światłem pełnią funkcję odmienną od funkcji dimerów pojawiających się przy niskich intensywnościach światła,

zmierzono wartości średnich czasów życia fluorescencji chlorofilu *a* w kompleksie LHCII uorganizowanego w strukturę dimeryczną pod wpływem słabego lub wysokiego światła oraz na skutek podstawienia do kompleksu cząsteczki zeaksantyny. Wartość średniego czasu życia fluorescencji (liczona po amplitudach) dla dimerów LHCII zmieniała się od 2 do 0,6 ns, co wskazało na to, że struktury dimeryczne charakteryzują się wartościami czasów życia fluorescencji mniejszymi niż wartości tego parametru formy trimerycznej oraz monomerycznej LHCII. Największe wartości średnich czasów życia fluorescencji wykazywały dimery indukowane zeaksantyną (1–2 ns). Dimery LHCII utworzone pod wpływem niskich intensywności światła charakteryzowały się wartościami czasów życia fluorescencji ~1 ns. Najkrótsze czasy życia fluorescencji (0,6–0,9 ns) przypisano dimerom indukowanym silnym światłem. Dodatkowo, amplituda składowej średniego czasu życia fluorescencji o wartości 0,3 ns wzrastała z 41 ± 11 % dla dimerów indukowanych zeaksantyną do 74 ± 3 % dla dimerów pojawiających się na silnym świetle. Wyniki te wskazują na to, że dimery LHCII powstające pod wpływem światła o wysokiej intensywności gaszą energię wzbudzenia wydajniej niż dimery indukowane słabym światłem. Można więc wnioskować, że dimery obserwowane w warunkach słabego oświetlenia są jedynie elementem rozpadu trimerów LHCII w procesie monomeryzacji, natomiast dimery indukowane silnym światłem powstają *de novo* z istniejących już monomerów. Są one tym samym specyficzną formą molekularną LHCII pojawiającą się w odpowiedzi na oświetlenie roślin silnym światłem. Wniosek ten znalazł silne poparcie w wynikach pomiarów dimerów LHCII metodą spektroskopii fluorescencyjnej oraz dichroizmu kołowego (CD). Obecność pasma emisji fluorescencji przy 656 nm w widmie emisji zmierzonym w temp. 77 K dla dimerów indukowanych silnym światłem, typowego dla monomerów LHCII, wskazuje na większe podobieństwo tych form dimerycznych do monomerów LHCII niż do trimerów. Specyficzna organizacja molekularna dimerów LHCII zdolnych do gaszenia energii została wydedukowana także na podstawie porównania widm CD zmierzonych dla różnych form molekularnych LHCII. Widmo CD dimerów indukowanych silnym światłem charakteryzuje się obecnością pasma przy 690 nm, którego nie obserwowano w widmach trimerów oraz monomerów LHCII oświetlanych silnym światłem.

Wiadomo, że zdolność do gaszenia energii wzbudzenia przez odpowiednie formy molekularne LHCII wynika ze specyficznej organizacji w nich cząsteczek chlorofilu. Jak udowodniono wcześniej, fotoprotekcyjne rozproszenie energii związane jest z oddziaływaniem cząsteczek chlorofilu znajdujących się ze sobą w bliskim kontakcie oraz

odpowiedniej konformacji przestrzennej (8, 41, 43). Na tej podstawie zaproponowano strukturę dimeru LHCII zdolnego do wydajnego gaszenia energii wzbudzenia, w której to Chl 14 oraz Chl 8 (zgodnie z nomenklaturą wg (41) chlorofil *b* oraz chlorofil *a*), oddalone od siebie w strukturze pojedynczego monomeru, zlokalizowane są w odległości mniejszej niż 1 nm. Ta nowo powstała para chlorofili mogłaby być potencjalnym kandydatem na specyficzną strukturę molekularną umożliwiającą dimerom fotoprotekcyjne gaszenie energii w warunkach silnego oświetlenia.

Indukowana światłem monomeryzacja trimerów LHCII umożliwia więc powstawanie struktur dimerycznych zdolnych do wydajnego gaszenia energii wzbudzenia w warunkach zmiennego oświetlenia. Z drugiej strony nie można wykluczyć, że dimery LHCII mogą łączyć się ze sobą w większe struktury supramolekularne (makrodomeny, agregaty lamellarne (44, 45)) zdolne do jeszcze sprawniejszego gaszenia energii w warunkach nadmiaru wzbudzeń.

Molekularna organizacja kompleksów LHCII w warunkach silnego oświetlenia

Wyniki te przedstawiono w publikacji: **Janik E., Bednarska J., Zubik M., Puzio M., Luchowski R., Grudziński W., Mazur R., Garstka M., Maksymiec W., Kulik A., Dietler G., Gruszecki W.I.** 2013. *Molecular architecture of plant thylakoids under physiological and light stress conditions: A study of lipid-light-harvesting complex II model membranes.* *Plant Cell*. 25, 2155-2170.

Jak dyskutowano wcześniej, fosforylacja kompleksów LHCII prowadzi do zmiany ich organizacji molekularnej, a także do reorganizacji struktury gran tylakoidów. Podczas oświetlania liści szpinaku światłem o wysokiej intensywności ($\sim 1200 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) tylko 30 % puli kompleksów LHCII ulega fosforylacji (46). W celu określenia, jakie formy molekularne LHCII tworzą się w błonie tylakoidu podczas oświetlania roślin światłem o wysokiej intensywności oraz w jaki sposób wpływają one na organizację błon lipidowych, przeprowadzono badania na lipidowo-białkowych układach modelowych. Do ich utworzenia wykorzystano lipidy chloroplastowe MGDG oraz DGDG, a także kompleksy LHCII izolowane z zaciemnianych oraz oświetlanych światłem o intensywności $1200 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ liści szpinaku. Analizy z wykorzystaniem metody immunodetekcji wskazały, że 30-minutowe oświetlanie liści szpinaku światłem o wysokiej intensywności powodowało fosforylację 35 % puli kompleksów LHCII. Ponadto określono, że kompleksy izolowane z liści oświetlanych silnym światłem zawierały zeaksantynę w ilości $0,16 \pm 0,01$ cząsteczki na monomer LHCII. Do badań organizacji otrzymanych wielodwuwarstw lipidowo-białkowych wykorzystano technikę dyfrakcji

rentgenowskiej. Obecność nieufosforylowanych kompleksów LHCII w wielodwuwarstwach lipidowych zwiększała periodyczność układu z 4,1 nm, typową dla wielodwuwarstw utworzonych tylko z lipidów chloroplastowych, na 6,0 nm. Wbudowanie do błon lipidowych puli kompleksów ufosforylowanej w 35 %, zmniejszało wartość parametru periodyczności na 5,3 nm. Zastosowanie techniki AFM-IR do pomiaru układów lipidowo-białkowych wykazało, że w wielodwuwarstwach lipidowych zawierających kompleksy nieufosforylowane obecne są obszary charakteryzujące się dużą zawartością kompleksów LHCII, oddzielone obszarami zawierającymi głównie lipidy. Dla układów zawierających kompleksy ufosforylowane rozkład lipidów i kompleksów LHCII był jednorodny. Te obserwacje wskazały na tworzenie się transmembranowych struktur LHCII z udziałem kompleksów nieufosforylowanych. Powstawanie takich struktur w badanych układach modelowych potwierdzone było badaniami z wykorzystaniem technik mikroskopii TEM oraz CLSM. Pomiar widm absorpcji w podczerwieni wykazał, że struktury te stabilizowane są wiązaniami wodorowymi, co umożliwia powstawanie struktur białkowych o charakterze antyrównoległych β -katek. Ufosforylowane kompleksy LHCII, na skutek oddziaływania ze sobą w płaszczyźnie błony lipidowej, tworzyły formy zagregowane. Powstawanie tych lamellarnych agregatów związane było ze wzrostem intensywności pasma emisji fluorescencji z maksimum przy 700 nm oraz skróceniem średniego czasu życia fluorescencji chlorofilu *a* w badanym układzie.

Brak agregatów lamellarnych LHCII w próbkach utworzonych z kompleksów nieufosforylowanych można wytłumaczyć tworzeniem się struktur transmembranowych, które w sposób naturalny ograniczają swobodę ruchu kompleksów LHCII i tym samym ich oddziaływanie ze sobą w płaszczyźnie błony. Jak wykazano wcześniej, za stabilizację struktury gran tylakoidów w chloroplastach odpowiedzialne są oddziaływania van der Waalsa oraz oddziaływania kulombowskie spowodowane różnym rozkładem ładunku na powierzchni sąsiadujących ze sobą błon tylakoidów. W omawianych badaniach wykazaliśmy, że tylakoidy gran mogą być stabilizowane przez struktury transmembranowe LHCII wzmacniane wiązaniami wodorowymi tworzącymi się pomiędzy polarnymi fragmentami części białkowej LHCII zlokalizowanego w sąsiadujących ze sobą błonach lipidowych.

Ponadto wykazano, że fosforylacja kompleksów LHCII może mieć nie tylko znaczenie regulacyjne dla fotosyntezy w warunkach oświetlania roślin światłem o niskiej intensywności, ale także może pełnić rolę w ochronie aparatu fotosyntetycznego przed nadmiarem światła. Niski poziom fosforylacji oraz proces deepoksydacji wiolaksantyny

indukują powstawanie w płaszczyźnie błony lipidowej form zagregowanych LHCII charakteryzujących się wysoką wydajnością gaszenia nadmiaru energii wzbudzenia w warunkach stresu świetlnego.

Podsumowanie najważniejszych prezentowanych osiągnięć:

Wykazano, że:

- 1) światło o niskiej intensywności aktywuje funkcję fotosyntetyczną kompleksów LHCII w chloroplastach;
- 2) trimery LHCII tworzą w błonach lipidowych transmembranowe struktury stabilizowane wiązaniami wodorowymi. Ponadto zapewniają wydajny transfer energii wzbudzenia w aparacie fotosyntetycznym;
- 3) fosforylacja kompleksów LHCII zmienia jego formę molekularną z trimerycznej na monomeryczną, co indukuje reorganizację błon tylakoidów;
- 4) indukowana światłem monomeryzacja kompleksów LHCII ma znaczenie regulacyjne w przystosowaniu roślin do zmiennych warunków oświetlenia;
- 5) monomery LHCII mogą uczestniczyć w fotoprotekcyjnym rozproszeniu nadmiaru energii wzbudzenia;
- 6) wiolaksantyna stabilizuje strukturę trimery LHCII;
- 7) stabilizowane wiolaksantyną struktury n-LHCII zapobiegają niepożądanemu traceniu energii w warunkach słabego i optymalnego oświetlenia;
- 8) zeaksantyna promuje monomeryzację i dimeryzację kompleksów LHCII;
- 9) dimery LHCII indukowane silnym światłem mogą pełnić funkcję fotoprotekcyjną;
- 10) kompleksy LHCII mogą tworzyć agregaty w płaszczyźnie błony tylakoidu, charakteryzujące się wydajnym gaszeniem nadmiaru energii w warunkach oświetlania roślin silnym światłem. Mechanizm ten regulowany jest stopniem fosforylacji puli kompleksów LHCII.

Wyniki prowadzonych przeze mnie badań przyczyniły się do lepszego zrozumienia funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego w zmiennych warunkach oświetlenia. Dostarczyły one nowych informacji na temat form molekularnych kompleksu białkowo-barwnikowego LHCII indukowanych światłem o słabej oraz wysokiej intensywności. Ponadto, powiązałam proces fosforylacji kompleksu LHCII ze zmianą jego formy

molekularnej oraz reorganizacją struktury błon tylakoidów. W szczególności określiłam i scharakteryzowałam spektroskopowo formy molekularne kompleksu LHCII pełniące rolę fotoprotekcyjną w warunkach nadmiaru energii świetlnej. Po raz pierwszy wskazałam na fotoprotekcyjną funkcję monomerów LHCII oraz zidentyfikowałam i scharakteryzowałam spektralnie formę dimeryczną kompleksu. Wiedza o właściwościach spektroskopowych formy trimerycznej, monomerycznej, dimerycznej oraz zagregowanej kompleksu LHCII, zarówno w środowisku błony lipidowej, jak i w roztworze detergentu umożliwiła szczegółową analizę roli kompleksu LHCII w procesach fotoprotekcyjnych, funkcjonujących w komórce na poziomie molekularnym.

Wyniki badań stanowiących osiągnięcie naukowe były także tematem 18 komunikatów zjazdowych.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałam badania na temat wpływu metali ciężkich na aparat fotosyntetyczny roślin wyższych. Zaplanowałam eksperymenty, które miały na celu wyjaśnienie, jak ołów – metal ciężki, którego toksyczność dla roślin określono jako mniejszą w porównaniu do kadmu, miedzi czy cynku, wpływa na absorpcję, transfer oraz wykorzystanie energii świetlnej w procesach fotochemicznych fotosyntezy. Pomiary przeprowadzono na poziomie całych liści żyta ozimego traktowanego ołowiem oraz na poziomie izolowanych z nich błon tylakoidów. Wykazałam, że stres metalem ciężkim powoduje monomeryzację antenowych kompleksów białkowo-barwnikowych błon tylakoidów oraz obniżenie w nich zawartości barwników fotosyntetycznych. Szczegółowe analizy spektroskopowe oraz badania nad fotochemią PSII dowiodły, że zmiany w molekularnej organizacji kompleksów antenowych skutkują zmniejszeniem wydajności absorpcji energii świetlnej oraz transferu energii wzbudzenia przez aparat fotosyntetyczny. Efekt ten skorelowany jest ze wzrostem wydajności procesów niefotochemicznego wykorzystania energii wzbudzenia przez kompleksy antenowe w obecności ołowiu.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy:

Janik E., Szczepaniuk J., Maksymiec W. 2013. Organization and functionality of chlorophyll-protein complexes in thylakoid membranes isolated from Pb-treated

Secale cereale. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 125, 98-104. **IF₂₀₁₃: 2,803 / IF₂₀₁₅: 3,035; pkt₂₀₁₃: 25 / pkt₂₀₁₆: 30**, autor korespondencyjny

Badania nad wpływem metali ciężkich na aparat fotosyntetyczny wykazały obecność w roślinach cząsteczek chlorofilu zawierających atom metalu ciężkiego w miejscu wiązania magnezu (47, 48). W celu poznania szczegółowego mechanizmu reorganizacji kompleksów antenowych LHCII pod wpływem metali ciężkich, zaplanowałam eksperyment z kompleksami izolowanymi, do których wbudowywano cząsteczki chlorofilu *a* posiadające odpowiednio atom cynku lub miedzi zamiast atomu magnezu. Zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej oraz absorpcyjnej UV-Vis wykazało zmianę organizacji cząsteczek chlorofilu *b* oraz cząsteczek barwników ksantofilowych w kompleksie LHCII na skutek podstawienia do niego modyfikowanego metalami ciężkimi chlorofilu *a*.

Wyniki tych badań były tematem 1 komunikatu zjazdowego.

We współpracy z pracownikami Zakładu Biotechnologii Przemysłowej UMCS prowadziłam badania nad wykorzystaniem barwników pochodzenia naturalnego: chlorofilu *a*, chlorofilu *b*, feofityny *a* oraz feofityny *b* w indukowanej światłem biotransformacji α -pinenu. Eksperyment miał na celu określenie możliwości zastosowania barwników chlorofilowych i ich odpowiedników pozbawionych atomu magnezu – feofityn do produkcji cennych terpenoidowych związków jak *trans*-pinokarweol, pinokarwon czy myrtenal, szeroko wykorzystywanych w przemyśle kosmetycznym oraz spożywczym, a jednocześnie występujących w przyrodzie w małych ilościach. Związki te uzyskuje się z monoterpenów powszechnie występujących i tanich, jak α -pinen i limonen. Określono, że feofityny, a przede wszystkim feofityna *b*, są bardziej stabilne jako fotokatalizatory reakcji biotransformacji w porównaniu do chlorofilu w homogenicznym układzie organicznym (chloroformie). Ponadto, dokonano próby immobilizacji chlorofilu *a* w żelu silikonowym, w celu sprawdzenia wydajności reakcji biotransformacji oraz stabilności fotokatalizatora w układzie, gdzie cząsteczki barwnika są ze sobą w bliskim kontakcie, zapewniającym łatwy transfer energii. Badania dowiodły, że cząsteczki chlorofilu *a* mogą być skutecznie immobilizowane w żelu silikonowym, gdzie kolejno ulegają one transformacji do feofityny *a*. Określono, że formy dimeryczne chlorofilu oraz nowo powstałej feofityny mogą wydajnie katalizować reakcję biotransformacji α -pinenu. Jak wykazano, dodatkową zaletą zastosowania żelu silikonowego jest możliwość ponownego wykorzystania cząsteczek

fotokatalizatora w reakcjach biotransformacji, w przeciwieństwie do środowiska rozpuszczalnika organicznego, gdzie następuje szybki rozpad cząsteczek barwnika na drodze fotoutlenienia.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach:

- 1) Trytek M., **Janik E.**, Maksymiec W., Fiedurek J., Lipke A., Majdan M. 2011. The spectral and catalytic studies of chlorophylls and pheophytins in mimetic biotransformation of α -pinene. J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 223, 14-24. **IF₂₀₁₁: 2,421 / IF₂₀₁₅: 2,477; pkt₂₀₁₁: 25 / pkt₂₀₁₆: 25**
- 2) Lipke A., Trytek M., Fiedurek J., Majdan M., **Janik E.** 2013. Spectroscopic and biocatalytic properties of a chlorophyll-containing extract in silica gel. J. Mol. Struct. 1052, 158-164. **IF₂₀₁₃: 1,599 / IF₂₀₁₅: 1,780; pkt₂₀₁₃: 20 / pkt₂₀₁₆: 20**

oraz były tematem 3 komunikatów zjazdowych.

Mechanizmy fotoprotekcyjne, których funkcjonowanie w roślinach wyższych w obecności metali ciężkich stanowiło temat mojej pracy doktorskiej, były także tematem mojej współpracy naukowej z prof. W. I. Gruszeckim i innymi pracownikami Zakładu Biofizyki Instytutu Fizyki UMCS, kontynuowanej po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora. Celem badań było lepsze zrozumienie mechanizmów fotoprotekcyjnych funkcjonujących na poziomie molekularnym, związanych z reorganizacją i zmianami funkcjonalnymi kompleksu antenowego LHCII w warunkach zmiennego oświetlenia. Badania te realizowane były w ramach dwóch projektów badawczych: interdyscyplinarnego projektu zespołowego Prorektora UMCS d/s Badań Naukowych i Współpracy z Zagranicą pt.: „Molekularny mechanizm protekcyjny warunkujący adaptację liści żyta do światła o wysokim natężeniu” oraz projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego NN303285034 pt.: „Regulacja fotosyntetycznej funkcji antenowej roślin na poziomie molekularnym”. Część eksperymentów przeprowadziłam na całych błonach tylakoidów izolowanych z liści żyta oświetlanego światłem o niskiej ($150 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) oraz wysokiej ($1200 \mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$) intensywności. Zastosowanie elektroforezy natywnej oraz spektroskopii fluorescencyjnej wykazało agregację form monomerycznych oraz trimerycznych LHCII w odpowiedzi na oświetlenie światłem o wysokiej intensywności.

Pojawienie się agregatów w badanych układach powiązałam z tworzeniem się długofalowych (powyżej 700 nm) pasm emisji fluorescencji chlorofilu *a* oraz wzrostem rezonansowego rozpraszania światła (RLS) w obszarze 500-600 nm. Pomiar widm wzbudzenia fluorescencji chlorofilu *a* błon tylakoidów izolowanych z liści oświetlanych wskazał, że barwniki cyklu ksantofilowego: wiolaksantyna oraz zeaksantyna mogą brać udział w indukowanej światłem reorganizacji molekularnej kompleksów LHCII.

Fotoprotekcja związana z funkcjonowaniem cyklu ksantofilowego analizowana była z wykorzystaniem sztucznych błon lipidowych utworzonych z lipidu chloroplastowego DGDG, zawierających kompleksy LHCII, do których wbudowywano egzogenną wiolaksantynę lub zeaksantynę. Zaobserwowano, że w układzie modelowym barwniki te, a w szczególności zeaksantyna, indukują powstawanie supramolekularnych struktur LHCII wydajnie gaszących wzbudzenia singletowe na skutek tworzących się oddziaływań ekscytonowych pomiędzy cząsteczkami ksantofilu i chlorofilu lub cząsteczkami chlorofilu w sąsiadujących ze sobą kompleksach.

W ramach współpracy z prof. W. I. Gruszeckim oraz jego zespołem naukowym uczestniczyłam także w badaniach nad znaczeniem światła niebieskiego dla procesów fotoprotekcyjnych. Pomiar czasów życia fluorescencji chlorofilu *a* pojedynczego trimery, monomeru oraz form zagregowanych LHCII, przy wzbudzeniu światłem o długości fali 470 lub 635 nm dowiódł, że mechanizm fotoprotekcyjnego gaszenia wzbudzeń singletowych jest wybiórczo indukowany światłem niebieskim. Jednocześnie zaobserwowano intensywne gaszenie energii na drodze rozproszenia termicznego w obszarze spektralnym „Soret”, odpowiedzialnym za absorpcję światła niebieskiego. Prawdopodobnie, światło to może być wykorzystywane do uruchomienia istotnych dla fotoprotekcji reakcji foto-chemicznych, związanych z izomeryzacją cząsteczek ksantofilowych kompleksu.

Wiolaksantyna jest barwnikiem fotosyntetycznym zlokalizowanym pomiędzy sąsiadującymi ze sobą monomerami w trimerze LHCII. Jeden z mechanizmów fotoprotekcyjnych u roślin jest bezpośrednio związany z deepoksydacją wiolaksantyny, prowadzącą do nagromadzenia się w błonie tylakoidu zeaksantyny istotnej dla ochrony aparatu fotosyntetycznego przed nadmiarem światła. Ta reakcja cyklu ksantofilowego przebiega bezpośrednio w błonie tylakoidu, dlatego też dla jej uruchomienia wymagane jest odłączenie się wiolaksantyny od struktury kompleksu LHCII. Doświadczenie w pracy eksperymentalnej z kompleksami fotosyntetycznymi, zdobyte przez mnie podczas realizacji projektu naukowego TEAM pt.: „Molecular Spectroscopy for BioMedical

Studies”, pozwoliło na wykorzystanie form trimerycznych oraz monomerycznych kompleksów LHCII immobilizowanych w żelu poliakrylamidowym w badaniach nad reorganizacją trimery LHCII. Szczegółowe badania z zastosowaniem spektroskopii ramanowskiej wykazały, że światło indukuje rekonfigurację cząsteczki wiolaksantyny i że mechanizm ten jest charakterystyczny dla struktury trimerycznej LHCII. Związany jest on ze skręceniem się łańcucha polienowego cząsteczki barwnika i przejściem jej z formy *trans* do *cis*. Przypuszcza się, że ta indukowana światłem fotoizomeryzacja wiolaksantyny uruchamiana jest poprzez wzbudzenie jej do stanu tripletowego, na skutek transferu energii wzbudzenia typu triplet-triplet pomiędzy cząsteczką wiolaksantyny i chlorofilu w kompleksie LHCII. Wykazano, że zmiana konfiguracji cząsteczki łączącej poszczególne monomery w trimerze LHCII prowadzi do destabilizacji trimery określonej jako przejście trimer–monomer. Izomeryzacja wiolaksantyny i monomeryzacja trimery LHCII umożliwiają odłączenie się cząsteczki ksantofilu od kompleksu i tym samym jej dostępność dla enzymatycznej deepoksydacji w błonie tylakoidu.

Supramolekularne struktury n-LHCII utworzone z udziałem wiolaksantyny, obserwowane przez mnie w układach lipidowych, stały się inspiracją do badań prowadzonych przez innych członków zespołu w projekcie TEAM nad organizacją kompleksów LHCII oraz barwników ksantofilowych w układach monowarstw. Układy te były także wykorzystane do badań nad kontrolą transferu energii w kompleksie LHCII przez barwniki ksantofilowe.

Neoksantyna jest jedynym barwnikiem ksantofilowym należącym do LHCII, którego część cząsteczki wystaje poza strukturę białkową kompleksu. Tym samym, możliwe jest tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi cząsteczek neoksantyny zlokalizowanych w sąsiadujących ze sobą trimerach LHCII. W ramach projektu TEAM uczestniczyłam w eksperymencie nad rolą neoksantyny w tworzeniu się struktur fotoprotekcyjnych LHCII. Badania wykazały indukowaną światłem izomeryzację neoksantyny z formy 9'-*cis* do formy di-*cis* (9',13' oraz 9',13). Zastosowanie spektroskopii FTIR oraz wykorzystanie teorii Arrheniusa dowiodły, że proces fotokonwersji neoksantyny może prowadzić do zerwania wyżej wspomnianych wiązań wodorowych, co ułatwia kontakt sąsiadujących ze sobą trimerów LHCII i w konsekwencji umożliwia oddziaływanie van der Waalsa pomiędzy cząsteczką chlorofilu *b* zlokalizowaną bezpośrednio pod neoksantyną jednego trimery z taką samą cząsteczką chlorofilu *b* należącą do trimery sąsiedniego. Z oddziaływaniem tym wiąże się tworzenie niskoenerygetycznego stanu chlorofilowego, którego obecność objawia się wzrostem

intensywności emisji fluorescencji przy 700 nm w temperaturze 77 K. Poziom ten charakteryzuje się wydłużeniem czasu życia fluorescencji chlorofilu *a* w temperaturze 77 K, w stosunku do czasu życia fluorescencji pasm emisji z maksimum fluorescencji przy 680 oraz 740 nm. Ten niskoenergetyczny stan został zdefiniowany jako akceptor energii z innych singletowych stanów energetycznych chlorofilu. Wykazano, że energia tego stanu może być efektywnie rozpraszana poprzez drgania struktury białkowej w kompleksie LHCII.

W celu określenia, które cząsteczki chlorofilu w fotoprotekcyjnych formach molekularnych LHCII uczestniczą w nieradiacyjnym rozproszeniu energii, podczas realizacji projektu TEAM, prowadzono badania z wykorzystaniem rekonstruowanych kompleksów LHCII pozbawionych cząsteczki chlorofilu *a* 614 lub chlorofilu *b* 608 (wg (41)). W ramach tych badań wykonywałam pomiar składu barwnikowego oraz własności spektroskopowych rekonstruowanych monomerów oraz trimerów LHCII.

Badania nad strukturą oraz funkcjonowaniem biocząsteczek często wymagają zastosowania metod opartych na precyzyjnym obrazowaniu organizacji molekularnej badanych układów. Niestety, rozdzielczość konwencjonalnych metod obrazowania, jak np. obrazowania w podczerwieni, obarczona jest limitem dyfrakcyjnym i, w zależności od długości fali, mieści się w przedziale 2.5–30 μm . Rozdzielczość przestrzenna obrazowania w podczerwieni może zostać zwiększona (~100 nm), jeśli detekcja ciepła będzie odbywać się przy zastosowaniu mikroskopii sił atomowych. Dzięki wykorzystaniu układów modelowych złożonych z wielodwuwarstw lipidowych oraz wbudowanych w nie kompleksów LHCII, nad którymi praca stanowiła dużą część moich badań w projekcie TEAM, udało się obniżyć granicę rozdzielczości do około 10 nm. Sukces ten możliwy był dzięki takim właściwościom badanego układu, jak duża różnica w przewodnictwie cieplnym lipidów i kompleksów białkowo-barwnikowych oraz względnie wysoka zdolność do absorpcji światła podczerwonego przez struktury zorganizowane prostopadle do płaszczyzny próbki. Wyniki tych badań zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie „Nanoscale”.

Wyniki przedstawionych badań zostały opublikowane w pracach:

- 1) Gruszecki W.I., Zubik M., Luchowski R., **Janik E.**, Grudziński W., Gospodarek M., Goc J., Fiedor L., Gryczyński Z., Gryczyński I. 2010. Photoprotective role of the xanthophyll cycle studied by means of modeling of the xanthophyll-LHCII

interactions. Chem. Phys. 373, 122-128. **IF₂₀₁₀: 2,017 / IF₂₀₁₅: 1,758; pkt₂₀₁₀: 27 / pkt₂₀₁₆: 25**

- 2) Gruszecki W.I., Luchowski R., Zubik M., Grudziński W., **Janik E.**, Gospodarek M., Goc J., Gryczyński Z., Gryczyński I. 2010. Blue light activates the molecular switch between utilization and dissipation of radiation energy in plants. J. Plant Physiol. 167, 69-73. **IF₂₀₀₉: 2,500 / IF₂₀₁₅: 2,971; pkt₂₀₀₉: 32 / pkt₂₀₁₆: 35**
- 3) **Janik E.**, Maksymiec W., Grudziński W., Gruszecki W.I. 2012. Strong light-induced reorganization of pigment-protein complexes of thylakoid membranes in rye (spectroscopic study). J. Plant Physiol. 169, 65-71. **IF₂₀₁₂: 2,699 / IF₂₀₁₅: 2,971; pkt₂₀₁₂: 35 / pkt₂₀₁₆: 35**, autor korespondencyjny
- 4) Zubik M., Luchowski R., Puzio M., **Janik E.**, Bednarska J., Grudziński W., Gruszecki W.I. 2013. The negative feedback molecular mechanism which regulates excitation level in the plant photosynthetic complex LHCII: Towards identification of the energy dissipative state. Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics 1827, 355-364. **IF₂₀₁₃: 4,829 / IF₂₀₁₅: 4,864; pkt₂₀₁₃: 40 / pkt₂₀₁₆: 35**
- 5) Gruszecki W.I., Kulik A., **Janik E.**, Bednarska J., Luchowski R., Grudziński W., Dietler G. 2015. Nanoscale resolution in infrared imaging of protein-containing lipid membranes. Nanoscale. 7, 14659-14662. **IF₂₀₁₅: 7,760; pkt₂₀₁₅: 40 / pkt₂₀₁₆: 40**
- 6) Grudziński W., **Janik E.**, Bednarska J., Welc R., Zubik M., Sowiński K., Luchowski R., Gruszecki W.I. 2016. Light-driven reconfiguration of a xanthophyll violaxanthin in the photosynthetic pigment-protein complex LHCII: a resonance Raman study. J. Phys. Chem. B 120, 4373-4382. **IF₂₀₁₅: 3,187; pkt₂₀₁₆: 30**

oraz stanowiły temat 14 komunikatów zjazdowych.

O publikacji wyników badań, prowadzonych w ramach projektu TEAM, dotyczących organizacji molekularnej kompleksu LHCII w dwuwarstwach lipidowych oraz metody obrazowania molekularnego z użyciem techniki AFM-FTIR, w prestiżowych czasopismach: „Plant Cell” oraz „Nanoscale” poinformowano na stronie Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej:

- <http://www.fnp.org.pl/sukces-laureata-programu-team/>
- <http://www.fnp.org.pl/naukowcy-z-lublina-odkryli-nowe-mozliwosci-obrazowania-molekularnego/>

portalu Polskiej Agencji Prasowej:

- <http://naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news,396296,uczeni-juz-wiedza-jak-rosliny-chronia-sie-przed-nadmiarem-swiatla.html>
- <http://naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news,407017,polacy-odkryli-nowa-metode-obrazowania-molekularnego.html>

stronie UMCS:

- <http://www.umcs.pl/pl/aktualnosci,57,publicacja-zespolu-prof-wieslawa-gruszeckiego-w-prestizowym-czasopismie,1767.htm>
- <http://www.umcs.pl/pl/aktualnosci,57,sukces-zespolu-naukowego-prof-wieslawa-gruszeckiego,27144.htm>

oraz stronach internetowych:

- <http://dolinabiotechnologiczna.pl/category/biotechnologia-nowosci/page/10/?print=print-search>
- <http://www.dziennikwschodni.pl/lublin/naukowcy-z-umcs-z-rekordem-swiate-i-nowym-odkryciem,n,1000169547.html>
- <http://lublin.com.pl/artykuly/pokaz/25642/naukowcy,z,lublina,odkryli,jak,rosliny,ra-dza,sobie,z,nadmiarem,swiatla/>
- <http://moje.radio.lublin.pl/wielki-sukces-lubelskich-naukowcow-fizycy-z-umcs-pobili-rekord-swiate.html>,

a także w Wiadomościach Uniwersyteckich UMCS, nr 7/197 wrzesień 2013 oraz nr 9/218 listopad 2015.

Jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny jest rozwiązanie problemu chorób nowotworowych. W związku z tym poszukuje się nowych farmaceutyków, które wykazywałyby dużą aktywność farmakologiczną oraz małą szkodliwość względem komórek zdrowych w porównaniu do istniejących już leków. Będąc zatrudnioną w Zakładzie Biologii Komórki, na stanowisku adiunkta, dołączyłam do grupy pracowników zajmujących się badaniem właściwości antynowotworowych oraz przeciwgrzybiczych związków syntetyzowanych sztucznie. W ramach tych badań

współuczestniczyłam w pomiarach oraz analizie widm FTIR homogenatów uzyskanych z mózgu oraz osocza szczurów (w modelu hipoksji), którym podawano związek 4-(5-heptylo-1,3,4-tiadiazol-2-ilo)benzeno-1,3-diol, w celu weryfikacji jego działania neuroprotektynowego. Ponadto, wykonywałam badania spektroskopowe mające na celu określenie właściwości spektroskopowych różnych form molekularnych związku 4-([1,2,4]triazolo[4,3-a]pirydyno-3-ilo)-6-metylobenzeno-1,3-diol (TPBD) należącego do grupy triazoli. Obecnie, staram się także określić rodzaj oddziaływań tego związku ze sztuczną dwuwarstwą lipidową uformowaną z DPPC.

Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacji: Matwijczuk A., Janik E., Luchowski R., Niewiadomy A., Gruszecki W.I., Gagoś M. 2017. Spectroscopic studies of molecular organization of 4-([1,2,4] triazolo [4,3-*a*] pyridin-3-yl)-6-methylbenzene-1,3-diol in selected solvents. *J. Phys. Chem A* (wysłane do druku) oraz były tematem 1 komunikatu zjazdowego.

Plany przyszłych badań

W najbliższej przyszłości planuję kontynuować badania nad indukowanymi światłem procesami molekularnymi mającymi miejsce w komórce roślinnej. Ponadto, moje zainteresowania chcę skierować w stronę określenia właściwości spektroskopowych związków z grupy triazoli. Chciałabym scharakteryzować rodzaj oddziaływania triazoli z komórką zwierzęcą, co mogłoby przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za antynowotworowe oraz przeciwgrzybicze właściwości tych związków. W badaniach tych zamierzam wykorzystać dobrze znane mi techniki spektroskopii molekularnej, a także mikroskopii elektronowej, czy też obrazowania w podczerwieni.

Literatura

1. Owens, T. (1994) Excitation energy transfer between chlorophylls and carotenoids. A proposed molecular mechanism for non-photochemical quenching., In *Photoinhibition of Photosynthesis* (Baker NR, B. J., Ed.), pp 95-110, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
2. Rintamaki, E., Salonen, M., Suoranta, U. M., Carlberg, I., Andersson, B., and Aro, E. M. (1997) Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation in vivo. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins, *J Biol Chem* 272, 30476-30482.
3. Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J. D. (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7, *Nature* 433, 892-895.

4. Marshall, G., Geider, R., and Flynn, K. (2000) A mechanistic model of photoinhibition, *New Phytol* 145, 347-359.
5. Koller, D. (1990) Light-driven leaf movements., *Plant, cell & environment* 13, 615-632.
6. Chow, W. S., Anderson, J. M., and Hope, A. B. (1988) Variable stoichiometries of photosystem II to photosystem I reaction centres, *Photosynth Res* 17, 277-281.
7. Brugnoli, E., and Bjorkman, O. (1992) Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy, *Planta* 187, 335-347.
8. Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., and Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution, *Nature* 428, 287-292.
9. Ruban, A. V. (2009) Plants in light, *Communicative & integrative biology* 2, 50-55.
10. Ruban, A. V., Johnson, M. P., and Duffy, C. D. P. (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna, *Bba-Bioenergetics* 1817, 167-181.
11. Ruban, A. V., Calkoen, F., Kwa, S. L. S., van Grondelle, R., Horton, P., and Dekker, J. P. (1997) Characterisation of LHC II in aggregated state by linear and circular dichroism spectroscopy, *Biochimica et biophysica acta* 1321, 61-70.
12. Dekker, J. P., van Roon, H., and Boekema, E. J. (1999) Heptameric association of light-harvesting complex II trimers in partially solubilized photosystem II membranes, *FEBS Lett.* 449, 211-214.
13. Holm, J. K., Varkonyi, Z., Kovacs, L., Posselt, D., and Garab, G. (2005) Thermo-optically induced reorganizations in the main light harvesting antenna of plants. II. Indications for the role of LHCII-only macrodomains in thylakoids, *Photosynth. Res.* 86, 275-282.
14. Horton, P., Wentworth, M., and Ruban, A. (2005) Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching, *FEBS Lett.* 579, 4201-4206.
15. Ruban, A. V., Horton, P., and Robert, B. (1995) Resonance Raman spectroscopy of the photosystem II light-harvesting complex of green plants: a comparison of trimeric and aggregated states, *Biochemistry* 34, 2333-2337.
16. Gruszecki, W. I., Janik, E., Luchowski, R., Kernén, P., Grudzinski, W., Gryczynski, I., and Gryczynski, Z. (2009) Supramolecular organization of the main photosynthetic antenna complex LHCII: a monomolecular layer study, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 25, 9384-9391.
17. Gruszecki, W. I., Grudzinski, W., Matula, M., Kernén, P., and Krupa, Z. (1999) Light-induced excitation quenching and structural transition in light-harvesting complex II, *Photosynth. Res.* 59, 175-185.
18. Miloslavina, Y., Wehner, A., Lambrev, P. H., Wientjes, E., Reus, M., Garab, G., Croce, R., and Holzwarth, A. R. (2008) Far-red fluorescence: a direct spectroscopic marker for LHCII oligomer formation in non-photochemical quenching, *Febs Lett* 582, 3625-3631.
19. Sapozhnikov, D. I. T., Kransovskaya, T. A., and Maevskaya, A. N. (1957) Change in the interrelationship of the basic carotenoids of the plastids of green leaves under the action of light, *Doklady Akademii Nauk SSSR* 113, 465-467.
20. Yamamoto, H. Y., Nakayama, T. O. M., and Chichester, C. O. (1962) Studies on the light and dark interconversion of leaf xanthophylls, *Arch. Biochem. Biophys.* 97, 168-173.
21. Gruszecki, W. I., Sujak, A., Strzałka, K., Randunz, A., and Schmid, G. H. (1999) Organisation of xanthophyll-lipid membranes studies by means of specific pigment antisera, spectrophotometry and monomolecular layer technique lutein and zeaxanthin, *Z. Naturforsch.* 54c, 517-525.
22. Gruszecki, W. I. (2004) Carotenoid Orientation: Role in Membrane Stabilization, In *Carotenoids in health and disease* (Krinsky, N. I., Mayne, S. T., and Sies, H., Eds.), pp 151-163, Marcel Dekker AG, New York.
23. Gruszecki, W. I., Gospodarek, M., Grudzinski, W., Mazur, R., Gieczewska, K., and Garstka, M. (2009) Light-induced change of configuration of the LHCII-bound xanthophyll (tentatively assigned to violaxanthin): a resonance Raman study, *J Phys Chem B* 113, 2506-2512.

24. Gruszecki, W. I., Grudzinski, W., Banaszek-Glos, A., Matula, M., Kernen, P., Krupa, Z., and Siewiesiuk, J. (1999) Xanthophyll pigments in light-harvesting complex II in monomolecular layers: localisation, energy transfer and orientation, *Biochimica et biophysica acta* 1412, 173-183.
25. Gruszecki, W. I., Grudzinski, W., Gospodarek, M., Patyra, M., and Maksymiec, W. (2006) Xanthophyll-induced aggregation of LHCII as a switch between light-harvesting and energy dissipation systems, *Biochim Biophys Acta* 1757, 1504-1511.
26. Gruszecki, W. I., Kernen, P., Krupa, Z., and Strasser, R. J. (1994) Involvement of xanthophyll pigments in regulation of light-driven excitation quenching in light-harvesting complex of Photosystem II, *Biochimica et biophysica acta* 1188, 235-242.
27. Gruszecki, W. I., Matula, M., Mysliwa-Kurdziel, B., Kernen, P., Krupa, Z., and Strzalka, Z. (1997) Effect of xanthophyll pigments on fluorescence of chlorophyll a in LHC II embedded to liposomes, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 37, 84-90.
28. Gruszecki, W. I., Matula, M., Naomi, K. C., Koyama, Y., and Krupa, Z. (1997) Cis-trans-isomerization of violaxanthin in LHC II: Violaxanthin isomerization cycle within the violaxanthin cycle, *Biochimica et biophysica acta* 1319, 267-274.
29. Gruszecki, W. I., and Strzalka, K. (1991) Does the xanthophyll cycle take part in the regulation of fluidity of the thylakoid membrane, *Biochimica et biophysica acta* 1060, 310-314.
30. Gruszecki, W. I., Zelent, B., Tajmir-Riahi, H. A., Wang, G., Taleb, T., Veeranjanyulu, K., and Leblanc, R. M. (2000) Chlorophyll a - violaxanthin interactions in monolayers at air-water interface and in Langmuir-Blodgett films, *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 19, 117-125.
31. Gruszecki, W. I., Zubik, M., Luchowski, R., Janik, E., Grudzinski, W., Gospodarek, M., Goc, J., Fiedor, L., Gryczynski, Z., and Gryczynski, I. (2010) Photoprotective role of the xanthophyll cycle studied by means of modeling of xanthophyll-LHCII interactions, *Chem. Phys.* 373, 122-128.
32. Latowski, D., Grzyb, J., and Strzalka, K. (2004) The xanthophyll cycle - molecular mechanism and physiological significance, *Acta Physiol. Plant.* 26, 197-212.
33. Latowski, D., Kruk, J., Burda, K., Skrzynecka-Jaskier, M., Kostecka-Gugala, A., and Strzalka, K. (2002) Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers, *Eur. J. Biochem.* 269, 4656-4665.
34. Ruban, A. V., and Horton, P. (1999) The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach, *Plant Physiol* 119, 531-542.
35. Ruban, A. V., Lee, P. J., Wentworth, M., Young, A. J., and Horton, P. (1999) Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes, *J. Biol. Chem.* 274, 10458-10465.
36. Ruban, A. V., Pascal, A. A., and Robert, B. (2000) Xanthophylls of the major photosynthetic light-harvesting complex of plants: identification, conformation and dynamics, *Febs Lett* 477, 181-185.
37. Ruban, A. V., Pascal, A. A., Robert, B., and Horton, P. (2001) Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes, *J. Biol. Chem.* 276, 24862-24870.
38. Ruban, A. V., Pascal, A. A., Robert, B., and Horton, P. (2002) Activation of Zeaxanthin Is an Obligatory Event in the Regulation of Photosynthetic Light Harvesting, *J. Biol. Chem.* 277, 7785-7789.
39. Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochimica et biophysica acta* 1020, 1-24.
40. Kirchoff, H. (2008) Molecular crowding and order in photosynthetic membranes., *Trends Plant Sci.* 13, 201-207.
41. Standfuss, R., van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M., and Kuhlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5Å resolution, *The EMBO journal* 24, 919-928.

42. Garab, G., Cseh, Z., Kovacs, L., Rajagopal, S., Varkonyi, Z., Wentworth, M., Mustardy, L., Der, A., Ruban, A. V., Papp, E., Holzenburg, A., and Horton, P. (2002) Light-induced trimer to monomer transition in the main light- harvesting antenna complex of plants: Thermo-optic mechanism, *Biochemistry* 41, 15121-15129.
43. Duffy, C. D., Ruban, A. V., and Barford, W. (2008) Theoretical investigation of the role of strongly coupled chlorophyll dimers in photoprotection of LHCII, *J Phys Chem B* 112, 12508-12515.
44. Jennings, R., Garlaschi, F., and Zucchelli, G. (1991) Light-induced fluorescence quenching in the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex, *Photosynth Res* 27, 57-64.
45. Barzda, V., Istokovics, A., Simidjiev, I., and Garab, G. (1996) Structural flexibility of chiral macroaggregates of light-harvesting chlorophyll *a/b* pigment-protein complexes. Light-induced reversible structural changes associated with energy dissipation, *Biochemistry* 35, 8981-8985.
46. Tikkanen, M., and Aro, E. M. (2012) Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants, *Bba-Bioenergetics* 1817, 232-238.
47. Kupper H., K. F., Spiller M. (1996) Enviromental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants., *J. Exp. Bot* 47, 259-266.
48. Kupper H., S. I., Spiller M., Kupper F., Prasil O. (2002b) Heavy-metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in in vivo heavy metal chlorophyll formation., *J. Phycol.* 38, 429-441.

Ewa Jenik