

AUTOREFERAT

dr Beata Myśliwa-Kurdziel

Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, 25 luty 2013

1. Imię i Nazwisko: BEATA MYŚLIWA-KURDZIEL

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

VI 1993 – tytuł zawodowy magistra fizyki uzyskany na Wydziale Matematyki i Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie;
specjalność; fizyka medyczna i ochrona środowiska;
studia ukończone z wynikiem bardzo dobrym.

VI 2000 – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
tytuł rozprawy doktorskiej: "Spectral properties of the protochlorophyllide- and chlorophyllide- protein complexes in relation to the organisation of the internal plastid membranes" - praca została wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ oraz nagrodzona Nagrodą Prezesa Rady Ministrów (2001)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Od 1 października 1993 do chwili obecnej jestem zatrudniona na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii (wcześniej były to: Instytut Biologii Molekularnej oraz Wydział Biotechnologii) Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, kolejno na stanowiskach:

asystenta stażysty (1993-1994)

asystenta (1994-2003)

adiunkta (od 2003)

W latach 1995-1996; 2001-2002 i 2006-2007 przebywałam na urloпах macierzyńskich i wychowawczych (łącznie 29 miesięcy)

4. 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/artystycznego:

Moje najważniejsze osiągnięcie naukowe, stanowiące podstawę do złożenia przeze mnie wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, stanowi jednotematyczny cykl 9 publikacji z lat 2004-2013 przedstawionych pod wspólnym tytułem:

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

b) Wykaz prac (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

Prace przedstawione są w kolejności chronologicznej. Mój udział w wykonaniu poniższych prac został określony w Załączniku 4 pkt IB. Kopie prac zebrane zostały w Załączniku 6. Oświadczenia współautorów zawiera Załącznik 7.

*-autor korespondencyjny pracy

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

IF2004 - 1.145 Pkt MNiSW - 20

- H2.** B. Myśliwa-Kurdziel, J. Kruk, K. Strzałka* (2004) Fluorescence lifetimes and spectral properties of protochlorophyllide in organic solvents and their relations to the respective parameters in vivo. *Photochem. Photobiol.* 79, 62-67

IF2004 – 2.054 Pkt MNiSW - 20

- H3.** B. Myśliwa-Kurdziel and K. Strzałka* (2005) Influence of selected heavy metal ions on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide, *Agr. Ecosyst. Environ.* 106, 199-207

IF2005 - 1.495 Pkt MNiSW - 32

- H4.** K. Solymosi, B. Myśliwa-Kurdziel, K. Bóka, K. Strzałka, B. Böddi* (2006) Disintegration of the prolamellar body structure at high concentrations of Hg²⁺, *Plant Biol.* 8, 627-635

IF2006 – 2.053 Pkt MNiSW - 32

- H5.** B. Myśliwa-Kurdziel, K. Solymosi, J. Kruk, B. Böddi*, K. Strzałka (2007) Protochlorophyll aggregates with similar steady-state fluorescence characteristics differ in fluorescence lifetimes. A model study in Triton X-100, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 96, 262-271

IF2007 - 1.919 Pkt MNiSW - 20

- H6.** B. Myśliwa-Kurdziel*, K. Solymosi, J. Kruk, B. Böddi, K. Strzałka (2008) Solvent effects on fluorescence properties of protochlorophyll and its derivatives with various porphyrin side chains, *Eur. Biophys. J.* 37, 1185-1193

IF2008 - 2.409 Pkt MNiSW¹ - 27

- H7.** B. Myśliwa-Kurdziel*, K. Strzałka (2010) Indukowana światłem redukcja protochlorofilidu u okrytonasiennych, a rozwój chloroplastów. *Postępy Biochemii* 56, 418-426

IF - 0 Pkt MNiSW - 6

- H8.** B. Myśliwa-Kurdziel*, J. Kruk, K. Strzałka (2013) Protochlorophyllide and protochlorophyll in model membranes - an influence of hydrophobic side chain moiety. *Biochim. Biophys. Acta*, 1828, 1075-1082

IF2011 – 3.990 Pkt MNiSW - 32

- H9.** B. Myśliwa-Kurdziel*, J. Kruk, K. Strzałka (2013) Protochlorophyllide in model systems - an approach to *in vivo* conditions. *Biophys. Chem.* Doi: 10.1016/j.bpc.2013.02.002

IF2011 – 2.203 Pkt MNiSW - 27

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wykaz stosowanych skrótów: Chlid - chlorofilid; LPOR - zależna od światła oksydoreduktaza Pchlid:NADPH; Pchl - protochlorofil; Pchlid - protochlorofilid; PLB - ciała prolamellarne;

Wstęp:

Protochlorofilid (Pchlid) jest jednym z produktów pośrednich szlaku biosyntezy chlorofilu, podstawowego barwnika fotosyntetycznego. Jego przemiana do chlorofilidu (Chlid) u okrytonasiennych jest indukowana światłem i katalizowana przez oksydoreduktazę Pchlid:NADPH (LPOR, EC.1.3.1.33). LPOR jest jedynym enzymem katalizującym konwersję Pchlid-Chlid w roślinach okrytonasiennych. Rośliny te w toku ewolucji utraciły geny reduktazy Pchlidu, działającej niezależnie od światła i obecnej w fotosyntetyzujących organizmach od bakterii po nagonasienne. Proces biosyntezy chlorofilu w roślinach okrytonasiennych jest zatem całkowicie zależny od światła.

Reakcja fotoredukcji Pchlidu stanowi kluczowy etap regulacji rozwoju okrytonasiennych. W siewkach tych roślin pozbawionych dostępu światła synteza chlorofilu nie zachodzi,

¹ Punktacja MNiSW wg komunikatu MNiSW z dn 17 września 2012 roku.

dochodzi natomiast do nagromadzenia Pchlidu. Siewki takie rozwijają się na drodze skotomorfogenezy, wykazując różnice na poziomie morfologii, a także ultrastrukturalnym i molekularnym. Uważa się ponadto, że całkowite uzależnienie redukcji Pchlidu od światła jest jednym z elementów mechanizmu ochronnego roślin przed stresem oksydacyjnym, który rozwija się przy ekspozycji etiolowanej siewki na działanie światła, np. w początkowych etapach wzrostu.

Badania nad biosyntezą chlorofilu i rozwojem aparatu fotosyntetycznego w roślinach okrytonasiennych prowadzone są obecnie w wielu laboratoriach na świecie i obejmują między innymi:

- wyjaśnienie mechanizmu reakcji fotoredukcji Pchlidu z zastosowaniem ultraszybkich technik spektroskopowych (absorpcja i fluorescencja stanów pośrednich, czasowo-zależne spektroskopie FTIR i UV-VIS). LPOR jest obiektem zainteresowań badaczy jako modelowa oksydoreduktaza, której podstawową zaletą jako modelu jest indukcja światłem jego aktywności katalitycznej.
- poznanie struktur barwnikowo-białkowo-lipidowych charakterystycznych dla etioplastów siewek rosnących w ciemności (etiolowanych), tj. ciała prolamellarnego (PLB) i protylakoidów. Prowadzone prace mają na celu opisanie struktury i funkcji PLB oraz wyjaśnienie molekularnych mechanizmów powstawania i rozpadu tej struktury. Osobnym zagadnieniem jest opisanie końcowych etapów biosyntezy chlorofilu następujących po indukowanej światłem redukcji Pchlidu w odniesieniu do indukowanych światłem zmian w strukturze PLB zachodzących podczas początkowych etapów procesu zielenienia.
- scharakteryzowanie poszczególnych etapów rozwoju aparatu fotosyntetycznego zachodzących w czasie deetiologii tj. przejścia pomiędzy rozwojem siewki w ciemności (skotomorfogeneza), a rozwojem w świetle (fotomorfogeneza). Badania te są ukierunkowane na określenie korelacji między strukturą i funkcją w czasie rozwoju chloroplastów, jak również na opisanie mechanizmów regulacji procesu zielenienia.

Moje główne zainteresowania badawcze dotyczą procesu wykształcania aparatu fotosyntetycznego w roślinach okrytonasiennych, w szczególności wyjaśnienia molekularnych mechanizmów powstawania błon wewnętrznych etioplastów i ich rearanżacji podczas początkowych etapów deetiologii. Mimo iż proces ten jest badany już od kilkudziesięciu lat i wiele prac dotyczących różnych aspektów przemiany etioplast-chloroplast zostało opublikowanych, molekularny mechanizm tych przemian oraz ich regulacja pozostaje nadal słabo poznana. W szczególności niewyjaśnione pozostają:

mechanizm wiązania Pchlid-LPOR i składania fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH, agregacja tych kompleksów, jak również mechanizm oddziaływania składników kompleksu Pchlid:LPOR:NADPH z lipidami budującymi PLB. Opisanie mechanizmu rozpadu kompleksów Chlid:LPOR:NADPH/NADP⁺, powstałych w wyniku fotoredukcji Pchlidu również wymaga dodatkowych badań. Rozmieszczenie kompleksów Pchlid/Chlid-LPOR względem siebie i w regularnej strukturze PLB jest nadal przedmiotem dyskusji.

W większości opublikowanych prac w tym temacie, pokazano i scharakteryzowano heterogenność biochemiczną i spektralną Pchlidu zgromadzonego w etioplastach. Wykazano istnienie Pchlidu niezwiązanego z LPOR oraz wbudowanego w trójskładnikowe kompleksy Pchlid:LPOR:NADPH, które tworzą agregaty o różnej wielkości i organizacji. Ponadto opisano przemiany spektralne obserwowane w czasie pierwszych kilkudziesięciu minut po zainicjowaniu deetioloacji zarówno krótkim błyskiem światła, który powoduje natychmiastową fotoredukcję całej puli Pchlidu związanego w kompleksy Pchlid:LPOR:NADPH, jak również oświetleniem ciągłym, podczas którego obserwuje się ciągłą biosyntezą chlorofilu. W pracach tych koncentrowano się głównie na szczegółowym opisie właściwości spektralnych (absorpcyjnych i fluorescencyjnych) Pchlidu *in vivo* z zastosowaniem analizy składowych gaussowskich widm zarejestrowanych zarówno w temperaturze pokojowej jak i 77 K oraz 10 K. Z zastosowaniem mikroskopii elektronowej scharakteryzowano strukturę PLB w etioplastach roślin różnych gatunków oraz opisano zmiany strukturalne wywołane fotoredukcją Pchlidu. Aktualny stan wiedzy na temat indukowanej światłem redukcji Pchlidu u okrytonasiennych został przeze mnie przedstawiony w pracy przeglądowej opublikowanej w *Postęпах Biochemii* (publikacja H7), która stanowi jedyne podsumowanie tego tematu w języku polskim.

Cel badań

Tematyka prac przedstawianych do oceny wpisuje się w zakres badań prowadzonych w innych laboratoriach, a jednocześnie stanowi ich rozszerzenie i uzupełnienie. Celem tych prac była: charakterystyka właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych Pchlidu w wybranych układach modelowych: rozpuszczalnikach organicznych, układach symulujących naturalne układy lipidowe (micele i liposomy) oraz wewnętrznych błonach etioplastów izolowanych z etiolowanych liści. Prace te stanowią podstawę do wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania Pchlidu z jego otoczeniem molekularnym *in vivo* i określenia lokalizacji cząsteczek Pchlidu w strukturze lipidowej PLB. W przeciwieństwie do licznych prac wykonanych dla chlorofili i

ich pochodnych w różnych układach modelowych, prace dotyczące Pchlidu są nieliczne. Z uwagi na to, że ilość i geometria układu sprzężonych wiązań podwójnych w cząsteczce Pchlidu ulega zmianie w wyniku jego redukcji do Chlidu, wyniki uzyskane dla chlorofili w różnych układach modelowych nie są dobrym odniesieniem dla Pchlidu. Osobnym celem badań była analiza wpływu wybranych jonów metali ciężkich na właściwości spektralne Pchlidu i strukturę PLB izolowanych i oczyszczonych z etiolowanych siewek pszenicy. Doświadczenia te dostarczyły nowych danych do opisu zmian właściwości Pchlidu i Chlidu w PLB podczas kontrolowanego niszczenia tej struktury, a uzyskane wyniki stanowią uzupełnienie badań w układach modelowych.

Opis uzyskanych wyników:

Prace zmierzające do realizacji w/w celów rozpoczęłam od opracowania metody ekstrakcji i oczyszczania Pchlidu z etiolowanych liści pszenicy (*Triticum aestivum* L.) poddanych działaniu kwasu δ -aminolewulinowego celem zwiększenia zawartości Pchlidu. Opracowana metoda obejmowała poza wstępnym oczyszczaniem acetonowego ekstraktu roślinnego tradycyjnymi metodami chromatograficznymi, również oczyszczanie preparatywne z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). Czystość uzyskanego Pchlidu sprawdzałam za pomocą spektrometrii masowej, spektrofotometrycznie oraz przeprowadzając agregację barwnika w układzie rozpuszczalników organicznych. Opis opracowanej metody stanowi przedmiot publikacji **H1**, która ukazała się w czasopiśmie *Chromatografia*. Metoda ta pozwala na otrzymanie preparatów Pchlidu, osobno formy monowinylowej (MV-Pchlid) i diwinylowej (DV-Pchlid), wolnych od zanieczyszczeń i może być stosowana do celów analitycznych i preparatywnych. Barwniki oczyszczane tą metodą stosowano w pozostałych pracach przedstawianych do oceny.

W pierwszym etapie badań dokonałam analizy właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych Pchlidu w serii rozpuszczalników organicznych o różnych parametrach fizyko-chemicznych. Rozpuszczalniki organiczne stanowią najprostszy układ modelowy umożliwiający systematyczną analizę niespecyficznych i specyficznych oddziaływań między cząsteczkami rozpuszczonej substancji, a cząsteczkami rozpuszczalnika. W opisywanych doświadczeniach zastosowałam rozpuszczalniki różniące się stałą dielektryczną oraz współczynnikiem załamania światła. Ponadto, dobrałam je z uwagi na możliwość oddziaływań specyficznych z cząsteczką Pchlidu, w tym rozpuszczalniki protyczne oraz zdolne do koordynacji centralnego jonu magnezu. Obserwowałam niewielkie różnice w położeniu pasm absorpcji i fluorescencji Pchlidu w rozpuszczalnikach aprotycznych i większy

wpływ rozpuszczalników protycznych (alkohole) oraz zdolnych do koordynacji jonu Mg^{2+} w centrum układu tetrapirolowego (pirydyna, tetrahydrofuran). Stwierdziłam zależność między położeniem maksimum pasm Soretta i Q_y w widmie absorpcji, a polaryzowalnością rozpuszczalnika, głównie członem równania zależnym od współczynnika załamania światła ($R(n)=(n^2-1)/(n^2+2)$), chociaż obserwowałam znaczną dyspersję punktów pomiarowych. Przesunięcie Stokesa mieściło się w przedziale $50-300\text{ cm}^{-1}$, co również wskazuje na słaby wpływ oddziaływań niespecyficznych na właściwości spektralne Pchlidu. W rozpuszczalnikach protycznych, przesunięcie Stokesa było większe niż w rozpuszczalnikach aprotycznych oraz wykazywało silniejszą zależność od polaryzowalności rozpuszczalnika. Największe przesunięcie Stokesa stwierdziłam dla metanolu, którego cząsteczki mogą tworzyć zarówno wiązania koordynacyjne jak i wodorowe z cząsteczkami Pchlidu. Większe przesunięcie Stokesa było skutkiem obniżenia energii stanu S_1 Pchlidu. W przypadku pirydyny, której cząsteczki mogą koordynować centralny jon Mg^{2+} cząsteczki Pchlidu, przesunięcie Stokesa również było większe niż dla innych rozpuszczalników o podobnej polaryzowalności. Zanik fluorescencji Pchlidu w badanych rozpuszczalnikach organicznych miał charakter monoeksponencjalny, a czas zaniku fluorescencji przyjmował wartości od $5.2 \pm 0.1\text{ ns}$ do $3.5 \pm 0.1\text{ ns}$, zmierzone odpowiednio dla Pchlidu w 1,2-dioksanie i w metanolu. Dodatek wody do Pchlidu rozpuszczonego w metanolu skutkował dalszym przesunięciem maksimum fluorescencji w stronę fal dłuższych i skróceniem czasu zaniku fluorescencji w porównaniu do Pchlidu w metanolu. Opisane powyżej wyniki zostały opublikowane w pracy **H2**², która ukazała się w *Photochemistry and Photobiology*.

Podobne doświadczenia wykonałam dla protochlorofilu (Pchl), czyli Pchlidu posiadającego wielowęglowodorowy podstawnik przy reszcie kwasu propionowego. W przypadku Pchlu *in vivo* najczęściej podstawnikiem tym jest geranylogeraniol lub fitol. W tym czasie nawiązałam współpracę naukową z prof. Béla Böddi z Uniwersytetu im. Loránda Eötvösa w Budapeszcie. Część doświadczeń została wykonana pod moim nadzorem przez dr Katalin Solymosi, ówczesną doktorantkę prof. Böddi. Wyniki doświadczeń wykonanych dla Pchlu opublikowałam w *European Biophysical Journal with Biophysics Letters* (**H6**). Badania te pokazały różnice w położeniu maksimum absorpcji i fluorescencji Pchl w badanych rozpuszczalnikach podobne do obserwowanych dla Pchlidu. Ponadto wykazały one większe

² Wstępne wyniki z w/w pomiarów zostały włączone do rozprawy doktorskiej, którą obroniłam w 2000 roku. Nie zostały one opublikowane z uwagi na to, że Pchlid używany w tych badaniach był zanieczyszczony produktami rozkładu i lipidami. Ponadto stanowił mieszaninę MV i DV-Pchlidu. Całość doświadczeń powtórzono po otrzymaniu oczyszczonego MV-Pchlidu- procedura izolacji została opublikowana w pracy H1, wyniki ponownie wykonanych doświadczeń opublikowano w pracy H2.

niż dla Pchlidu przesunięcie Stokesa w pirydynie i rozpuszczalnikach protycznych oraz dłuższy czas zaniku fluorescencji Pchl (za wyjątkiem otrzymanego dla metanolu). Czas zaniku fluorescencji zarówno Pchlu i Pchlidu ulegał skróceniu ze wzrostem polaryzowalności rozpuszczalnika, a efekt był znacznie większy w przypadku rozpuszczalników protycznych. Pokazałam ponadto (H2 i H6), że liczba wiązań koordynacyjnych Mg nie wpływa na czas zaniku fluorescencji. Zależność taka była obserwowana dla chloryny i bakteriochloryny, co zostało pokazane w pracach P9 i P13³, a opisane poniżej (pkt 5).

W pracy **H5** opublikowanej w *Journal of Photochemistry and Photobiology* przedstawiłam wyniki badań Pchlu w obecności Tritonu X-100, również prowadzonych we współpracy z Prof. Böddi i Dr Solymosi. Kształt widma fluorescencji Pchlu rozpuszczonego w Tritonie X-100, który jest niejonowym detergentem, był różny dla wzbudzenia falą o długości 440 i 480 nm. Przy wzbudzeniu falą o długości 440 nm, obserwowałam pojedyncze pasmo fluorescencji z maksimum przy 631 nm, natomiast przy wzbudzeniu falą o długości 480 nm w widmie widać było pasmo przy 680 nm i drugie przy 631.5 nm, o znacznie mniejszej intensywności. Czas zaniku fluorescencji Pchlu posiadającego maksimum fluorescencji przy 631 nm wynosił 5.4 ± 0.1 ns i był porównywalny do wartości zmierzonych dla monomerów Pchl w rozpuszczalnikach organicznych, tj. eterze dietylowym i acetonie (**H6**). Czas zaniku fluorescencji Pchl w formie zagregowanej wykazującego maksimum fluorescencji przy 680 nm wynosił 2.8 ± 0.1 ns. Wyniki te pokazały tendencję Pchl do tworzenia agregatów w Triton X-100 nawet dla niskich stężeń Pchl ($\sim 10^{-5}$ M).

Intensywność i struktura widm fluorescencji Pchlu w micelarnych roztworach Tritonu X-100 silnie zależała od stężenia Pchlu i detergentu oraz ich względnych proporcji, jak również od sposobu sporządzania próbki. Dla niskich stężeń Pchlu obserwowałam monomery tego barwnika charakteryzujące się położeniem maksimum fluorescencji przy 631–634 nm i czasem zaniku fluorescencji ok. 5.5 ns. Przygotowując próbki o różnym stężeniu Pchl, lub zmieniając to stężenie poprzez rozcieńczanie micelarnych roztworów Tritonu X-100 o wysokich stężeniach Pchl buforem lub micelami Tritonu X-100 nie zawierającymi Pchlu otrzymywaliśmy różną strukturę widm fluorescencji dla porównywalnych stężeń tego barwnika. We wszystkich widmach stwierdziliśmy obecność pasm posiadających maksima przy 631–634, 645–655, 680–692 i powyżej 700 nm, ale ich względna intensywność zależała od sposobu przygotowania próbki. Pasma fluorescencji z maksimum w zakresie 645–655 nm,

³ P9: L. Fiedor, M. Stąsiek, B. Myśliwa-Kurdziel and K. Strzałka (2003) *Photosynth. Res.* 78, 47-5;

P13: L. Fiedor, A. Kania, B. Myśliwa-Kurdziel, Ł. Orzeł, G. Stochel (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 1491-1500; prace z moim udziałem spoza dorobku habilitacyjnego.

charakterystyczne dla agregatów Pchl_u, było stabilne tylko w przypadku bezpośrednio sporządzonych mieszanin w określonych proporcjach składników. Długofalowe pasmo fluorescencji Pchl_u z maksimum przy 680-692 nm było widoczne zarówno w przypadku micelarnych jak i bardzo rozcieńczonych roztworów Tritonu X-100. Zostało ono opisane jako charakterystyczne dla uwodnionych kompleksów Pchl_u, które nie ulegają rozpuszczeniu przy dodawaniu do próbki micelnego roztworu Tritonu X-100 nie zawierającego Pchl_u, ani też przy rozcieńczaniu próbek buforem. Z pomiarów czasu zaniku fluorescencji otrzymaliśmy dwie wartości, w zakresie 1.4–3.9 ns oraz 0.15–0.84 ns, charakterystyczne dla agregatów Pchl_u i silnie zależne od sposobu sporządzania próbki.

Uzyskane przez nas wyniki pokazują, że uśrednione w czasie pomiary fluorescencji (*ang. steady-state fluorescence*) są niewystarczające do opisanie dynamicznego układu zagregowanego Pchl_u. Różne wartości czasów zaniku fluorescencji otrzymane dla kompleksów Pchl_u o podobnych widmach fluorescencji odzwierciedlają różnice w ich strukturze molekularnej, geometrii układu oraz oddziaływaniach międzycząsteczkowych. Zatem dokładna charakterystyka natywnych i modelowych porfiryń i barwników chlorofilowych wymaga kompleksowej analizy.

Analiza porównawcza Pchl_{id} i Pchl_u w liposomach była kolejnym etapem badań. Jej celem było określenie lokalizacji cząsteczek tych barwników względem dwuwarstwy lipidowej oraz roli hydrofobowego łańcucha bocznego cząsteczki Pchl_u w oddziaływaniach z dwuwarstwą lipidową i w procesie wbudowywania do liposomów. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane w *Biochimica et Biophysica Acta; Biomembranes* (**H8**). W badaniach stosowałam małe jednowarstwowe liposomy (SUV) sporządzone z fosfolipidów: lecytyny jajowej (EYL) oraz dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC). Ponadto wykorzystałam liposomy przygotowane z galaktolipidów: digalaktozyłodiacyloglicerolu (DGDG) i monogalaktozyłodiacyloglicerolu (MGDG) zmieszanych w różnych proporcjach. Galaktolipidy budują błony wewnętrzne etioplastów. Liposomy używane do badań zawierały od 0.1 do 4 mol% Pchl_{id} lub Pchl_u. W badanym zakresie stężeń obserwowałam spontaniczne wbudowywanie Pchl_{id} w liposomy. Widma fluorescencji tych próbek były charakterystyczne dla monomerów Pchl_{id}. Pchl zachowywał się podobnie w przypadku liposomów zbudowanych z galaktolipidów, a w przypadku liposomów z fosfolipidów – tylko dla niskiej zawartości barwnika (~0.1 mol%). Przy wyższych stężeniach Pchl_u w liposomach z fosfolipidów obserwowałam przejściowe powstawanie agregatów tego barwnika, co było widoczne jako dodatkowe pasmo fluorescencji z maksimum przy 685 nm.

Maksimum fluorescencji obu barwników w liposomach było przesunięte w stronę fal dłuższych w porównaniu do średniego położenia odpowiednich maksimów w rozpuszczalnikach organicznych (H2, H6), a najbardziej zbliżone do wartości zmierzonych w pirydynie i rozpuszczalnikach protycznych (alkohole). Przesunięcie Stokesa obliczone dla Pchl_a i Pchl_b w liposomach było względnie duże, podobne do odpowiednich wartości otrzymanych dla tych barwników w metanolu, co wskazuje na obecność specyficznych oddziaływań badanych barwników z lipidami. Dzięki obecności reszt galaktozy w galaktolipidach lokalne otoczenie cząsteczki Pchl_b lub Pchl_a w liposomach staje się podobne do otoczenia w rozpuszczalnikach protycznych. Zwiterjonowe grupy fosfolipidów mogą również oddziaływać specyficznie z cząsteczkami Pchl_b lub Pchl_a.

Położenie maksimum fluorescencji monomerów Pchl_a w liposomach było przesunięte w stronę fal krótszych (ok. 5 nm), a jego czas zaniku fluorescencji był dłuższy w porównaniu do wyników uzyskanych dla Pchl_b. Podobne zależności obserwowałam w rozpuszczalnikach organicznych (H2 i H6). Obserwacja ta jest istotna i wskazuje na wpływ długiego hydrofobowego podstawnika w cząsteczce Pchl_a na oddziaływanie układu porfiryнового z jego otoczeniem molekularnym. Wraz z redukcją wiązania w cząsteczce Pchl_b prowadzącą do powstania Chl_b, wpływ hydrofobowego podstawnika na właściwości fluorescencyjne chlorofilu zmniejsza się; podobnie jest w przypadku bakteriochlorofilu (pokazane w pracach P9 i P13).

Badanie lokalizacji cząsteczek Pchl_a i Pchl_b względem dwuwarstwy lipidowej liposomów przeprowadziłam metodą wygaszania fluorescencji z zastosowaniem polarnych i błonowych wygaszaczy, tj. KJ oraz pochodnych nitroksylowych kwasu stearynowego (SASL). Doświadczenia te potwierdziły wbudowywanie się Pchl_b i Pchl_a w dwuwarstwę lipidową i ujawniły lokalizację układu porfiryнового tych barwników w obszarze głów polarnych lipidów. Pchl_a zanurzony jest głębiej w dwuwarstwie lipidowej w wyniku oddziaływań hydrofobowych między hydrofobowym podstawnikiem układu porfiryнового cząsteczki Pchl_a, a łańcuchami kwasów tłuszczowych lipidów. Na podstawie analizy wygaszania fluorescencji za pomocą KJ stwierdziłam, że tylko część populacji cząsteczek Pchl_a jest dostępna dla wygaszacza, a wielkość tej puli zależy od składu lipidowego liposomów. W przypadku liposomów przygotowanych z EYL i galaktolipidów wielkość puli Pchl_a dostępnego dla wygaszania KJ kształtowała się na poziomie ok. 60% i była zdecydowanie mniejsza dla liposomów z DPPC (44%). W przypadku liposomów z DPPC również część puli Pchl_b była niedostępna dla wygaszacza. Uwzględniając fakt, że w temperaturze pokojowej, w której wykonano doświadczenia dwuwarstwa lipidowa z DPPC była w stanie żelu podczas gdy liposomy z pozostałych badanych lipidów w stanie ciekłokrystalicznym należy

podkreślić, że lokalizacja badanych barwników w dwuwarstwie lipidowej liposomów może również zależeć od jej stanu fizycznego.

Kolejna praca, która ukazała się w *Biophysical Chemistry* (**H9**) również dotyczy badań Pchlidu w układach modelowych: liposomach, odwróconych micelach i rozpuszczalnikach organicznych z zastosowaniem elektronowej spektroskopii absorpcyjnej i metod fluorescencyjnych. W tej pracy przedstawiłam kompletny opis własności absorpcyjnych i fluorescencyjnych monomerów i agregatów Pchlidu oraz wpływu lipidów na oddziaływania Pchlid-Pchlid. Oprócz liposomów o składzie używanym w poprzedniej pracy (**H8**) zastosowałam liposomy z galaktolipidów zawierające fosfatydyloglicerol (PG) oraz sulfochinowozyliacyloglicerol (SQ) i naśladujące składem błony wewnętrzne etioplastów *in vivo*. Ponadto zwiększyłam zakres zawartości Pchlidu w liposomach do 17 mol%, co odpowiada proporcji Pchlid:lipidy równej 1:5.

Nie obserwowałam znaczących różnic w położeniu pasm absorpcji i fluorescencji oraz wartości czasu zaniku fluorescencji między monomerami Pchlidu w liposomach o różnym składzie. Struktura widma absorpcji i położenie pasm Soreta i Q_y pozostawały niezmiennie aż do 6 mol% zawartości Pchlidu w liposomach. W liposomach złożonych z galaktolipidów i o dużej zawartości Pchlidu zaobserwowałam proces agregacji tego barwnika. Według dostępnej mi wiedzy, jest to pierwszy opis agregacji Pchlidu w lipidowych układach modelowych. Pasma absorpcji agregatów Pchlidu posiadały maksima przy 480 i 650 nm. Przy wzbudzeniu falą o długości 480 nm obserwowałam fluorescencję agregatów Pchlidu z maksimum przy 656 nm i czasach zaniku fluorescencji równych 0.1 ns i 1-2 ns. Względna intensywność pasm pochodzących od agregatów rosła w czasie co wskazuje na to, iż proces agregacji wymaga reorganizacji układu Pchlid-lipidy. Na podstawie rozkładu widm absorpcji w zakresie pasma Q na składowe gaussowskie/lorentzowskie stwierdziłam, że w liposomach z galaktolipidów pasmo pochodzące od agregatów Pchlidu i posiadające maksimum przy 654 nm pojawia się przy zawartości 9 mol% Pchlidu. W widmach absorpcji Pchlidu w liposomach z EYL nie obserwowałam pasm charakterystycznych dla agregatów Pchlidu. Analiza składowych gaussowskich/lorentzowskich widma ujawniła jednak obecność dodatkowego pasma o niewielkiej amplitudzie z maksimum przy 642 nm, pochodzącego od agregatów Pchlidu o mniejszym stopniu agregacji w porównaniu do liposomów z galaktolipidów. Pasma to było obecne w próbkach zawierających co najmniej 9 mol% Pchlidu. Polarne reszty galaktozy w cząsteczkach galaktolipidów wydają się być istotne dla procesu agregacji Pchlidu. W porównaniu do Pchlidu w roztworach wodnych, obecność liposomów utrudniała proces

agregacji, a powstałe agregaty pozostawały związane z liposomami lub wbudowane w dwuwarstwę lipidową.

W opisywanej pracy badałam również właściwości monomerów i agregatów Pchlidu w micelarnych roztworach z dioktylosulfobursztynianu sodu (AOT) w izooktanie. Ten detergent tworzy micelle odwrócone, w których grupy polarne tworzą rdzeń miceli, a hydrofobowe łańcuchy skierowane są na zewnątrz i eksponowane do hydrofobowego środowiska rozpuszczalnika. Woda w tym układzie gromadzi się w obszarze rdzenia miceli, ponadto wyróżnić można tzw. wodę „związaną” w obszarze hydrofilowych reszt detergentu oraz wodę „swobodną” (*ang. bulk water*) wypełniającą wnętrze miceli. Stopniowe dodawanie wody prowadzi do kontrolowanego i stopniowego uwodnienia cząsteczek wbudowanych w te micelle i umożliwia symulację środowiska występującego w obszarach blisko powierzchni błony. Stopniowe dodawanie wody do miceli z AOT zawierających monomery Pchlidu skutkowało batochromowym przesunięciem położenia maximum fluorescencji z 636 nm w micelach bezwodnych do 642 nm dla udziału molowego wody: $[H_2O]/[AOT]=16$. Ta obserwacja potwierdza wpływ oddziaływań specyficznych poprzez wiązania wodorowe na właściwości fluorescencyjne Pchlidu oraz wskazuje na lokalizację monomerów Pchlidu w obszarze grup polarnych AOT. Stopniowe dodawanie wody do miceli z AOT zawierających agregaty Pchlidu indukowało proces rozpadu agregatów i pojawienie się monomerów Pchlidu już przy niskiej zawartości wody, co wskazuje na lokalizację agregatów Pchlidu również w obszarze grup polarnych AOT oraz na to, że właściwości dynamiczne wody w układzie są istotne dla formowania lub rozpadu agregatów Pchlidu.

Wykonałam również doświadczenia nad procesem agregacji Pchlidu w rozpuszczalnikach organicznych. Zaobserwowałam agregację Pchlidu zarówno w rozpuszczalnikach hydrofobowych, np. chloroform, toluen, jak i mieszaninach alkoholu izoamylowego z toluenem lub izooktanem, przy czym proporcja tych solwentów silnie wpływała na kinetykę powstawania agregatów. Ponadto, stwierdziłam, że zdolność do agregacji może być traktowana jako kryterium czystości preparatu Pchlidu, gdyż obecność produktów jego rozkładu silnie hamuje lub uniemożliwia agregację. Obecność zagregowanego Pchlidu przejawiała się jako dodatkowe pasma absorpcji w zakresie pasma Soreta i pasma Qy, z maksimum odpowiednio w zakresach 470-490 nm oraz 650-660 nm. Po raz pierwszy wykazałam fluorescencję i zmierzyłam czas zaniku fluorescencji tych agregatów w temperaturze pokojowej. Wyniki tych doświadczeń zostały włączone w prace **H1**, **H2** i **H9**.

Równolegle z badaniami prowadzonymi dla Pchlidu w układach modelowych prowadziłam doświadczenia mające na celu charakterystykę właściwości fluorescencyjnych

naturalnych błon etioplastów. Prace, które zostały opublikowane w *Agriculture, Ecosystems and Environment* (H3) i w *Plant Biology* (H4) przedstawiają wyniki badań nad wpływem jonów metali na własności spektralne i strukturę PLB. Badania zostały wykonane dla PLB izolowanych z etiolowanych liści pszenicy (*Triticum aestivum* L.). W widmie fluorescencji otrzymanych preparatów PLB zmierzonym w temperaturze 77 K wyróżnić można dwa charakterystyczne pasma opisane w literaturze. Pasma o większej intensywności posiadające maksimum przy 655-657 nm jest charakterystyczne dla Pchlidu związanego w agregatach kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH. Pasma o mniejszej intensywności, z maksimum przy 630-633 nm, pochodzi od Pchlidu niezwiązanego z LPOR, który nie ulega redukcji wywołanej błyskiem światła lecz stanowi pulę substratu wykorzystywaną w czasie oświetlania preparatu światłem ciągłym. W swojej pracy wykazałam, że inkubacja PLB w ciemności w obecności jonów Cr(VI), Fe(III), Cd(II) lub Hg(II) silnie wpływa na strukturę niskotemperaturowego widma fluorescencji. W wyniku tej inkubacji ulegała zmniejszeniu intensywność pasma przy 655 nm, zaś rosła intensywność pasma przy 633 nm. Stwierdziłam ponadto zwiększony udział składowej czasu zaniku fluorescencji charakterystycznej dla niezwiązanych z białkiem monomerów Pchlidu. Najsilniejszy efekt obserwowałam w przypadku Cd(II), a najslabszy dla Fe(III). Zakres zmian był większy dla wyższych stężeń jonów i zwiększał się z czasem inkubacji. W próbie kontrolnej inkubowanej w buforze w porównywalnych warunkach zmiany w widmie i czasach zaniku fluorescencji były zanedbywalne. Ponadto w wyniku inkubacji PLB z Cd(II) i Fe(III) maksimum fluorescencji pasma obserwowanego przy 655 nm ulegało przesunięciu w stronę fal krótszych podobnie jak maksimum fluorescencji Chlidu zmierzone bezpośrednio po redukcji Pchlidu wywołanej błyskiem światła. Obserwowany spadek intensywności pasma fluorescencji z maksimum przy 655 nm świadczy o stopniowym rozpadzie kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH, i oznacza zmniejszoną wydajność fotoredukcji Pchlidu. Intensywność pasma fluorescencji Chlidu obserwowana w zakresie 680-690 nm bezpośrednio bo błysku światłem, była zdecydowanie mniejsza w próbkach traktowanych jonami metali w porównaniu do kontrolnych. Położenie niskotemperaturowego maksimum fluorescencji Chlidu niesie informację o stopniu zagregowania kompleksów Chlid:LPOR:NADP⁺, a pośrednio dostarcza informacji o stopniu zagregowania fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH. Przesunięcie maksimum fluorescencji Chlidu w stronę fal krótszych obserwowane w preparatach PLB traktowanych jonami metali świadczy o częściowym rozagregowaniu kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH lub ich degradacji. W konsekwencji czas potrzebny na uwolnienie Chlidu z kompleksów Chlid-LPOR ulegał znacznemu skróceniu.

Pasmo fluorescencji z maksimum przy 655 nm w próbkach PLB traktowanych Cr(VI) i Fe(III) nie zniknęło całkowicie wskutek fotoredukcji indukowanej błyskiem światła, co świadczy o tym, że NADPH w kompleksach Pchlid:LPOR:NADPH ulegał utlenieniu i co również przyczyniało się do zahamowania reakcji fotoredukcji Pchlidu. W próbkach traktowanych jonami Hg(II) i Fe(III), obserwowałam ponadto degradację Pchlidu i powstanie feoforbidu. Widma fluorescencji Pchlidu i protofeoforbidu są różne, co dzięki dużej czułości metod fluorescencyjnych umożliwiło wykrycie nawet niewielkich ilości powstałego protofeoforbidu.

Badania zmian ultrastruktury PLB pod wpływem jonów Hg(II) z zastosowaniem mikroskopii elektronowej zostały wykonane we współpracy z Dr Katalin Solymosi i Prof. Béla Böddi z Uniwersytetu im. Loránda Eötvösa w Budapeszcie. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Plant Biology* (H4). W pracy tej pokazaliśmy, że inkubacja PLB z jonami Hg(II) powoduje rozluźnienie struktury parakrystalicznej i odrywanie małych fragmentów od powierzchni PLB widocznych jako niewielkie pęcherzyki. Niezmieniona pozostała regularna struktura sieci parakrystalicznej PLB, powiększyły się jednak odległości między węzłami sieci. Obserwacja zmian struktury PLB indukowanych fotoredukcją Pchlidu pokazała, że traktowanie jonami Hg(II) przyspiesza indukowany światłem rozpad struktury PLB, który wyglądał podobnie jak w początkowych etapach przesunięcia Shibaty w próbkach kontrolnych. Nadmiar NADPH w próbce tylko częściowo hamował obserwowane zmiany.

Wyniki naszych doświadczeń wykazały ponadto brak jednoznacznej korelacji między obserwowanymi zmianami własności spektralnych, a ultrastrukturą PLB. Dlatego też dokładna charakterystyka organizacji kompleksów w błonach PLB wymaga kompleksowych badań.

Najważniejsze wnioski:

W opisanych powyżej pracach, przedstawiłam charakterystykę właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych Pchlidu w różnych układach modelowych, tj. rozpuszczalniki organiczne, micelle i liposomy. Pokazałam wpływ hydrofobowego podstawnika układu porfiryнового w cząsteczce Pchlu na oddziaływanie układu porfiryнового z cząsteczkami otoczenia molekularnego.

Wyniki uzyskane w rozpuszczalnikach organicznych wskazały na znaczny wpływ wiązań wodorowych na energię stanu S_1 cząsteczki Pchlidu. Zastosowanie lipidowych układów modelowych pozwoliło na uproszczenie badanego układu w porównaniu do błon etioplastów i umożliwiło badanie oddziaływania Pchlid-Pchlid w obecności lipidów oraz oddziaływania

Pchlid-lipidy. Częsteczki Pchlidu zostały zlokalizowane w obszarze głów polarnych liposomów lub na granicy faz: woda-dwuwarstwa lipidowa. W liposomach utworzonych z galaktolipidów i o wysokiej zawartości Pchlidu zachodzi proces agregacji Pchlidu, a powstałe agregaty wykazują podobne właściwości fluorescencyjne jak agregaty kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH *in vivo*. Wyniki uzyskane dla Pchlidu w odwróconych micelach z AOT w izooktanie wskazują na istotną rolę wody związanej w obszarze hydrofilowego rdzenia tych miceli w ustaleniu równowagi monomery-agregaty Pchlidu. Woda w zależności od stężenia i właściwości dynamicznych może powodować agregację monomerów lub rozpad agregatów Pchlidu.

Cząsteczka Pchl jest zanurzona głębiej w dwuwarstwie lipidowej niż cząsteczka Pchlidu, co wskazuje na istotną rolę oddziaływań między hydrofobowym łańcuchem w cząsteczce Pchl, a łańcuchami kwasów tłuszczowych cząsteczek lipidów w błonie. Dane te mogą być istotne przy projektowaniu pochodnych porfiryn z dużym hydrofobowym podstawnikiem dla zastosowań medycznych i w bioenergetyce.

Kompletna i szczegółowa charakterystyka właściwości Pchlidu w różnych układach modelowych jest niezbędna dla zrozumienia jego właściwości, organizacji i funkcjonowania w błonach plastydów *in vivo*. Jest to szczególnie istotne dla określenia lokalizacji i wzajemnego ułożenia fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH w parakrystalicznej strukturze PLB oraz dla wyjaśnienia natury oddziaływań Pchlidu z jego otoczeniem molekularnym *in vivo*. Przedstawione wyniki wskazują na istotną rolę galaktolipidów budujących PLB *in vivo* w regulacji równowagi między agregatami i monomerami Pchlidu, co wydaje się istotne dla prawidłowego składania trójskładnikowych fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH i tym samym dla wydajnej konwersji Pchlid-Chlid. Wyniki uzyskane dla błon naturalnych dostarczyły danych do opisu właściwości spektralnych Pchlidu i Chlidu podczas rozpadu PLB obserwowanego w kontrolowanych warunkach.

Kierunki kontynuacji badań

Prezentowane badania stanowią część prac nad wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów oddziaływania Pchlidu z jego molekularnym otoczeniem *in vivo* oraz analizą czynników wpływających na powstawanie, agregację i stabilność fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH w ciałach prolamellarnych roślin okrytonasiennych. Badania te są przeze mnie kontynuowane w ramach projektu badawczego „Molekularne mechanizmy oddziaływania protochlorofilid-LPOR-lipidy w ciałach prolamellarnych i w układach modelowych” (projekt NCN Nr 2011/01/B/NZ1/00119), którego jestem kierownikiem.

Kolejnym etapem mojej pracy będzie charakterystyka oddziaływania Pchlid-LPOR, LPOR-lipidy i Pchlid-LPOR-lipidy w układach modelowych.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Poza publikacjami oznaczonymi jako H1-H9, opublikowałam 18 prac oryginalnych, 3 doniesienia w materiałach pokonferencyjnych, 5 rozdziałów w podręcznikach oraz jedną pracę przeglądową. Prace te oznaczone numerami P1-P27 zostały wymienione w Załączniku 4, p. II wraz ze szczegółowym opisem mojego udziału w ich powstanie. Kopie tych prac zawiera Załącznik 8.

Obszar moich zainteresowań badawczych obejmuje:

- (1) zagadnienia związane z procesem wykształcania aparatu fotosyntetycznego w roślinach okrytonasiennych, przebiegiem fotosyntezy oraz wpływem czynników stresowych na formowanie i funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego;
- (2) badania nad właściwościami wybranych związków biologicznie ważnych, w tym porfiryn i chloryn;
- (3) badania dotyczące białka LPOR, wiązania i oddziaływania Pchlid-LPOR oraz rekonstrukcji fotoaktywnych kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH w układach modelowych.

ad. (1) Badania dotyczące początkowych etapów formowania aparatu fotosyntetycznego w roślinach okrytonasiennych prowadzę od początku mojej działalności naukowej w grupie Prof. dr hab. Kazimierza Strzałki w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin WBBiB UJ. W tym czasie do Zakładu został zakupiony nowy spektrofluorymetr do pomiarów czasu zaniku fluorescencji, K2 firmy ISS. Było to pierwsze urządzenie tego typu w Polsce. Moim zadaniem, jako fizyka, było zapoznanie się z możliwościami tego przyrządu i opracowanie protokołów pomiarów dla preparatów roślinnych. Korzystając z tej możliwości skupiłam swoją działalność naukową wokół metod fluorescencyjnych.

Omówienie prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora

Prace nad przygotowaniem rozprawy doktorskiej rozpoczęłam od analizy zmian właściwości fluorescencyjnych izolowanych błon wewnętrznych plastydów podczas transformacji etioplast - chloroplast. Badania te były prowadzone we współpracy z Prof. Fabrice Franck z Uniwersytetu w Liege (Belgia). W badaniach tych opisaliśmy formowanie się fotosystemu II w siewkach jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) podczas deetioplacji poprzez zmiany parametrów fluorescencji

oraz analizę kompleksów chlorofilowo białkowych, z zastosowaniem metod elektroforetycznych (SDS-PAGE, IEF-PAGE). Wyróżniliśmy dwie fazy tego procesu. W pierwszej, która obejmowała 3-4 godziny deetiologii obserwowaliśmy formowanie centrum reakcji PS II i jego anten wewnętrznych. Towarzyszyło temu skrócenie obserwowanych czasów zaniku fluorescencji (3 składowych), oraz spadek intensywności składowej „długiej” pochodzącej od chlorofilidu/chlorofilu nie wbudowanego w kompleksy chlorofilowo-białkowe, i charakteryzującego się położeniem maksimum fluorescencji przy 676 nm w temperaturze pokojowej. W drugiej fazie deetiologii obserwowaliśmy pojawienie się białek LHC, wzrost wartości i amplitudy „krótkiej” składowej czasu zaniku fluorescencji i spadek wartości składowej „średniej”. W czasie stopniowego formowania się kompleksów PSII obserwowaliśmy również zmiany w proporcjach i właściwościach kinetycznych kompleksów PSII α i PSII β . Ponadto zbadaliśmy stabilność Chlidu podczas oświetlania próbek ciągłym światłem. Początkowo obserwowaliśmy wzrost ilości niezwiązanego chlorofilu w błonach etiochloroplastów, a następnie jej szybki spadek towarzyszący wbudowywaniu chlorofilu w powstające kompleksy fotosystemu II (PS II). Uzyskane wyniki zostały opublikowane w *Acta Physiologiae Plantarum* (P1) oraz *Plant and Cell Physiology* (P3).

Następnie dokonałam pomiaru i analizy parametrów fluorescencji Pchlidu w etiolowanych siewkach. Po raz pierwszy zmierzyłam czasy zaniku fluorescencji Pchlidu we frakcji błon wewnętrznych etioplastów izolowanych z etiolowanych siewek pszenicy (*Triticum aestivum* L.) w temperaturze pokojowej i w 77 K. Wyniki tych doświadczeń opublikowałam w *Photochemistry and Photobiology* (P5). Wykazałam, że zanik fluorescencji kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH charakteryzujących się występowaniem maksimum fluorescencji przy 655-657 nm w temperaturze 77 K ma charakter dwueksponencyjny, o czasach zaniku fluorescencji na poziomie 0.25 ns i 2 ns. Pchlid niezwiązany z LPOR wykazywał fluorescencję przy 630 nm z czasem zaniku rzędu 5.5-6 ns. Ponadto zmierzyłam czas zaniku fluorescencji Chlidu powstałego w wyniku fotoredukcji Pchlidu wywołanej błyskiem światła. Obserwowałam monoeksponencyjny zanik fluorescencji o czasie zaniku 5 ns, charakterystyczny dla kompleksów Chlid:LPOR:NADP⁺, które wykazują maksimum fluorescencji niskotemperaturowej przy 688 nm. Inkubacja próbek z NADPH przed oświetleniem spowodowała pojawienie się drugiej składowej (1.6 ns) charakterystycznej dla kompleksów Chlid:LPOR:NADPH, posiadających maksimum fluorescencji niskotemperaturowej w zakresie 692-696 nm. Na podstawie tych wyników obliczyłam wydajność indukowanej światłem transformacji Chlid:LPOR:NADPH →

Chlid:LPOR:NADP⁺ (70%). Reakcja ta ma znaczenie dla mechanizmów protekcji Chlidu przed fotodestrukcją.

Ponadto opisałam właściwości termotropowe błon wewnętrznych etioplastów oraz PLB metodami kalorymetryczną i fluorescencyjną (opublikowane w **P19** i **P6**). Wykazałam, że LPOR ulega denaturacji w temperaturze 314 K (41°C). Analiza widm fluorescencji podczas ogrzewania preparatów PLB pokazała, że degradacja kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH zachodzi w przedziale temperatur 293-313 K i ma charakter złożony. Proces ten rozpoczyna się wystąpieniem niewielkich zmian w proporcjach Pchlidu fotoaktywnego do nieaktywnego tj. posiadających niskotemperaturowe maksima fluorescencji odpowiednio przy 655 i 633 nm, a następnie zachodzi szybki i całkowity rozpad kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH. Podobny charakter zmian obserwowałam podczas indukowanego wzrostem temperatury rozpadu kompleksów Chlid:LPOR:NADP⁺.

Oprócz przejść endotermicznych obserwowanych w przedziale 293-318 K i odpowiadających rozagregowaniu i degradacji kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH lub Chlid:LPOR:NADP⁺, obserwowałam również przejścia w wyższych temperaturach (~333 K), stwierdzone również w błonach tyłakoidów i charakterystyczne dla denaturacji chloroplastowej syntazy ATP.

W czasie prowadzenia w/w badań kilkakrotnie przebywałam w laboratorium w Liege dzięki wsparciu fundacji „Wood Whelan Foundation” oraz „European Science Foundation”, jak również w ramach wymiany bilateralnej między Uniwersytetem Jagiellońskim, a Uniwersytetem w Liege. Pobyt w laboratorium w Liege umożliwił mi poznanie metod izolacji i oczyszczania PLB z etiolowanych siewek i przyczynił się do rozwinięcia warsztatu metodycznego. W latach 2000 – 2001 byłam beneficjentką krajowego stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla młodych naukowców.

Oprócz głównego nurtu moich badań uczestniczyłam w badaniach prowadzonych przez Prof. dr hab. Wiesława I. Gruszeckiego z Uniwersytetu im. M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie nad wyjaśnieniem mechanizmu oddziaływania barwników cyklu ksantofilowego z chlorofilem w izolowanych kompleksach LHCII wbudowanych w liposomy (opublikowane w *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **P4**). Ponadto byłam zaangażowana w badania nad określeniem funkcji α -tokoferylochinonu w fotosystemie II prowadzone przez Prof. George H. Schmid z Uniwersytetu w Bielefeld (Niemcy) (praca opublikowana w *Z. Naturforschung*; **P2**).

Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam prace nad wyznaczeniem stałych kinetycznych transformacji Pchl_{id}-Chl_{id} w etioplastach. W ramach współpracy naukowej między Prof. dr hab. Kazimierzem Strzałką, a Prof. Christerem Sundqvistem z Uniwersytetu w Goteborgu (Szwecja) zostałam zaproszona do laboratorium Prof. Sundqvista w celu wykonania pomiarów i przeszkolenia jego doktorantów w zakresie technik pomiarów czasów zaniku fluorescencji.

We współpracy z Prof. Sundqvistem wykonaliśmy kompleksowe pomiary czasów zaniku fluorescencji wraz z widmami absorpcji i fluorescencji w siewkach roślin o różnej zawartości poszczególnych form spektralnych Pchlidu ocenianych na podstawie niskotemperaturowych widm fluorescencji. Do badań wykorzystaliśmy siewki pszenicy (*Triticum aestivum* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) o znaczącej zawartości Pchlidu fotoaktywnego, charakteryzującego się położeniem maksimum fluorescencji przy 655 nm, oraz grochu (*Pisum sativum* L.) i jego mutantu fotomorfogenetycznego (*lip1*), w których dominują formy krótkofalowe Pchlidu z maksimum przy 633 nm, nie ulegające fotoredukcji indukowanej błyskiem światła. Na podstawie rozkładu otrzymanych widm fluorescencji na składowe gaussowskie wyznaczyliśmy udział pasm pochodzących od poszczególnych form spektralnych Pchlidu w całkowitej fluorescencji. Następnie, porównaliśmy te wyniki z wynikami analizy czasu zaniku fluorescencji. Stwierdziliśmy, że zanik fluorescencji zarówno długofalowych jak i krótkofalowych form Pchlidu ma charakter dwueksponencyjny. Otrzymaliśmy czasy zaniku fluorescencji w zakresach 0.3-0.8 ns i 5.1-7.1 ns dla krótkiej i długiej składowej, przy czym wartości te różniły się dla poszczególnych gatunków roślin. Wyniki tych prac zostały opublikowane w *Photochemistry and Photobiology* (P10). Potwierdziły one złożony charakter oddziaływań Pchlidu z jego otoczeniem molekularnym *in vivo*. Analiza tych wyników zaowocowała pomysłem scharakteryzowania właściwości Pchlidu w układach modelowych, uproszczonych w porównaniu do naturalnych błon etioplastów i stała się podstawą prac (H1-H9) przedstawionych do oceny jako dorobek habilitacyjny.

Następnie rozszerzyłam swoje zainteresowania badawcze i wykonałam szereg doświadczeń nad określeniem wpływu różnych czynników, w tym jonów metali ciężkich na wydajność fotoredukcji Pchlidu i proces zielenienia, jak również na funkcjonowanie wybranych fragmentów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. Doświadczenia prowadziłam z wykorzystaniem siewek *in situ* oraz izolowanych błon etiochloroplastów i chloroplastów, białek i kompleksów białkowo-barwnikowych. Wykazałam spadek ilości fotoaktywnego Pchlidu w

wyniku działania kadmu, chromu i żelaza w etiolowanych siewkach pszenicy i homogenatach siewek. Wyniki tych doświadczeń zostały zaprezentowane na 12 – tym Międzynarodowym Kongresie Fotosyntetycznym w Brisbane (Australia, 2001) i opublikowane w materiałach pokonferencyjnych (P20). Kontynuowałam te badania we współpracy z Prof. Böddi i Dr Solymosi z Uniwersytetu im. Loránda Eötvösa w Budapeszcie. W pracy opublikowanej w *Plant Biology* (P11) pokazaliśmy hamowanie fotoredukcji Pchlidu w homogenatach etiolowanych siewek pszenicy (*Triticum aestivum* L.) poddanych działaniu chlorku rtęci. Na podstawie analiz widm fluorescencji, czasów zaniku fluorescencji i analiz acetonowych ekstraktów barwników zaproponowaliśmy, że w zależności od stężenia, Hg^{2+} może oddziaływać z każdym ze składników kompleksów Pchlid:LPOR:NADPH powodując degradację tych kompleksów.

W kolejnej pracy, która ukazała się z moim udziałem w *Journal of Biological Physics* (P16) wykazaliśmy zmiany struktury oksydoreduktazy ferredoksyna:NADP⁺ (FNR), jednego z kluczowych enzymów aparatu fotosyntetycznego, poddanego działaniu kadmu. Wykonaliśmy kompleksowe badania z użyciem dichroizmu kołowego (CD), spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FTIR) oraz metod fluorescencyjnych celem opisanie zmian w strukturze drugo- i trzeciorzędowej tego białka. Zaobserwowaliśmy delikatne rozfałdowanie struktury, prawdopodobnie związane z niespecyficznym oddziaływaniem Cd^{2+} z łańcuchami bocznymi aminokwasów, oraz zahamowanie jego aktywności katalitycznej, będące wynikiem wiązania Cd^{2+} do ważnej dla tej aktywności białka reszty cysteiny.

Zainteresowania te zaowocowały również napisaniem czterech rozdziałów w podręcznikach dotyczących wpływu metali ciężkich na biosyntezę chlorofilu i funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego (pozycje P22-P25). W trzech z nich jestem pierwszym autorem.

Ponadto brałam udział w badaniach prowadzonych przez dr Petra Ilika z Uniwersytetu Palackiego w Ołomuńcu, (Czechy) nad indukowaną wzrostem temperatury degradacją chlorofilu. Wykonałam pomiary fluorescencyjne, których wyniki zostały włączone do publikacji w *Photochemistry and Photobiology* (P8).

W ostatnich latach zainteresowały mnie również zagadnienia dotyczące regulacji procesu deetioloacji w roślinach okrytonasiennych. Badania w tym obszarze prowadzę we współpracy z dr hab. Przemysławem Malcem (ZFiBR WBBiB UJ). Aktualnie badania te są prowadzone w ramach grantu NCN otrzymanego przez dr Malca. Ich celem jest m.in. uzyskanie odpowiedzi na pytanie o mechanizm regulacji równowagi między ilością Pchlidu zgromadzonego podczas etioloacji, a wielkością puli Pchlidu fotoaktywnego, tj. wbudowanego w kompleksy

Pchli:LPOR:NADPH. Do badań używamy etiolowane siewki mutantów fotoreceptorowych *A. thaliana* i odpowiednich dzikich ekotypów. W przypadku mutantów *phyA*, *phyB* oraz *phot2* zaobserwowaliśmy zmniejszoną pulę Pchlidu fotoaktywnego, natomiast niezmienną w przypadku mutantów *cry1*, *cry2* w porównaniu do odpowiednich wyjściowych ekotypów dzikich. Wyniki te jednoznacznie wskazują na udział fitochromów i fototropiny 2 w regulacji stanu równowagowego pomiędzy Pchlidem związanym i niezwiązanym z LPOR. Wyniki te zaprezentowałam na 15-tym Międzynarodowym Kongresie Fotosyntetycznym w Pekinie (Chiny, 2010) i opublikowałam w materiałach pokonferencyjnych (P21). W kolejnej pracy, opublikowanej w *Acta Biochimica Polonica* (P17) wykazaliśmy istotne statystycznie różnice w ilości zgromadzonego Pchlidu i składzie karotenoidów w etiolowanych siewkach trzech ekotypów *Arabidopsis thaliana*: Columbia (*Col-0*), Landsberg erecta (*Ler*) i Wassiliowska (*Ws*). Zwiększona akumulacja Pchlidu obserwowana w ekotypie *Ler* korelowała z podwyższoną zawartością luteiny, co sugeruje rolę enzymów szlaku biosyntezy luteiny w regulacji wzajemnej szlaku biosyntezy karotenoidów i chlorofilu.

Zoptymalizowaną w czasie swoich doświadczeń procedurę izolacji PLB i opis doświadczenia, w którym można pokazać indukowaną światłem transformację Pchlid - Chlid oraz przemiany spektralne Chlidu opisałam w rozdziale, który ukazał się w *Spectroscopic Methods of Analysis* (P26).

ad. (2) Analiza własności porfiryn, chloryn i bakteriochloryn w układach modelowych interesuje mnie jako rozszerzenie i dopełnienie badań nad właściwościami Pchlidu. Analiza porównawcza wyników uzyskanych dla tych związków umożliwi sformułowanie wniosków dotyczących roli poszczególnych elementów budowy cząsteczek tych tetrapiroli w ich oddziaływaniu z mikrootoczeniem molekularnym, w tym podczas agregacji tych związków.

Uczestniczyłam w badaniach prowadzonych przez dr hab. Leszka Fiedora (WBBiB UJ) i dotyczących analizy właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych chlorofili i bakteriochlorofili w rozpuszczalnikach organicznych. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane w *Photosynthesis Research* (P9) i *Biochimica Biophysica Acta* (P13). Stwierdziliśmy, że elektronowe widma absorpcji chlorofilu *a* i chlorofilidu *a* różnią się oraz wykazują inną zależność od natury rozpuszczalnika. Fitol wpływa na właściwości absorpcyjne cząsteczki chlorofilu poprzez oddziaływanie z cząsteczkami solwatujących rozpuszczalników oraz zaburzenie wiązania ligandów metalu centralnego w cząsteczce chlorofilu. Na podstawie badań z użyciem bakteriochlorofili i ich pochodnych pozbawionych metalu centralnego lub fitolu, wyjaśniliśmy dokładnie rolę Mg i fitolu w oddziaływaniach cząsteczek tych barwników z

cząsteczkami rozpuszczalnika. Oba podstawniki mają wpływ na utrzymanie odpowiedniej konformacji i sztywności pierścienia tetrapirolowego.

Wzięłam też udział w badaniach prowadzonych przez Dr Gabrielę Csik z Uniwersytetu Medycznego w Budapeszcie (Węgry) nad określeniem właściwości zsyntetyzowanych przez jej grupę badawczą nowych koniugatów białkowych dwóch porfiryn kationowych. Obecnie uważa się, że takie koniugaty mogą zwiększyć efektywność pobierania porfiryn na poziomie komórkowym oraz mogą być stosowane do dostarczania określonych peptydów w okolice kwasów nukleinowych. Badania w których uczestniczyłam miały na celu charakterystykę wiązania tych nowych związków z DNA i były prowadzone z zastosowaniem różnych metod spektroskopowych. Mój wkład w te badania polegał na pomiarze i analizie czasu zaniku fluorescencji tych związków. Udało mi się potwierdzić istnienie dwóch populacji porfiryn związanych z DNA, co było też sugerowane na podstawie wyników uzyskanych innymi metodami. Uzyskane przeze mnie wyniki zostały włączone do publikacji w *Biophysical Chemistry* (P15).

Uczestniczyłam również w badaniach prowadzonych w grupie Prof. dr hab. Kazimierza Strzałki nad właściwościami prenylochinonów. W badaniach, których wyniki zostały opublikowane w *Chemistry and Physics of Lipids* (P7) analizowaliśmy wpływ plastochinonów (PQ) i ubichinonów (UQ) na właściwości termotropowe modelowych błon z dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC). Pokazaliśmy, że wpływ badanych związków na parametry przejść fazowych błony zależy przede wszystkim od długości łańcucha prenylowego, a w mniejszym stopniu od stanu redoks jego głowy polarnej. W drugiej pracy dotyczącej prenylochinonów, która została opublikowana w *Photochemistry and Photobiology* (P12) przedstawiliśmy wyniki badań właściwości fluorescencyjnych tych związków w rozpuszczalnikach organicznych o różnych parametrach. Ponadto na podstawie wyników pomiarów czasu zaniku fluorescencji prenylochinonów w liposomach o różnym składzie lipidowym została określona lokalizacja cząsteczek badanych prenylochinonów w dwuwarstwie lipidowej.

Ponadto wzięłam udział w badaniach nad amfoterycyną B prowadzonych przez Prof. dr hab. W.I. Gruszeckiego. Amfoterycyna jest polienowym antybiotykiem przeciwgrzybiczym stosowanym w leczeniu ciężkich zakażeń. Działanie lecznicze oraz efekty toksyczne tej substancji silnie zależą od jej organizacji molekularnej. Mój wkład w te badania dotyczył charakterystyki czasu zaniku fluorescencji monomerów i agregatów tego związku w różnych

układach modelowych. Wyniki tych prac zostały włączone do publikacji w *Biophysical Chemistry* (P14).

ad. (3) Badania nad białkiem LPOR rozpoczęłam niedawno od porównania znanych sekwencji tego białka z sekwencjami podjednostek niezależnej od światła oksydoreduktazy Pchlidu (DPOR) *in silico*. DPOR jest enzymem złożonym z trzech podjednostek: L, B i N i występuje we wszystkich organizmach fotosyntetycznych, za wyjątkiem roślin okrytonasiennych. W naszych badaniach pokazaliśmy obecność fragmentów zawierających reszty aminokwasowe o podobnych właściwościach fizyko-chemicznych w łańcuchu LPOR i podjednostce L białka DPOR. Jest to pierwsze doniesienie o istnieniu podobieństwa między LPOR i DPOR, które są filogenetycznie niespokrewnione, choć katalizują tę samą reakcję. Ponadto opracowaliśmy homologiczny model struktury jednego z izoenzymów: LPOR A dla *A. thaliana*. Wyniki te zostały opublikowane w *Photosynthetica* (P18). Natomiast aktualny stan wiedzy na temat obydwu enzymów został podsumowany w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Kosmos* (P27).

Podsumowanie

Mój dorobek naukowy obejmuje:

25 prac eksperymentalnych i **1** badania *in silico*, opublikowanych w czasopismach z listy JCR (łącznie **IF= 52.701** zgodnie z rokiem opublikowania,

h-index: 11; cytowań 218 (bez autocytowań) – dane z dn 10.02.2013)

3 doniesienia w materiałach pokonferencyjnych,

5 rozdziałów w podręcznikach

2 prace przeglądowe.

Ponadto wygłosiłam 3 wykłady na seminariach na zaproszenie z innych ośrodków, tj. IBB PAN w Warszawie, Uniwersytetu im. Loránda Eötvösa w Budapeszcie i Uniwersytetu w Goeteborgu oraz 5 wykładów na konferencjach tematycznych (na zaproszenie organizatorów). Wyniki moich prac zostały zaprezentowane w formie posterów na 38 konferencjach międzynarodowych i krajowych; w 16 konferencjach brałam udział jako osoba prezentująca poster. W czasie mojej pracy byłam promotorem 7 prac magisterskich i 6 prac licencjackich.

Kurdziel 1.03.2013 B. Myśliwa-Kurdziel