

Załącznik nr 3 do Wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

Opis osiągnięć i dorobku naukowego

Dr Maksymilian Zienkiewicz

Zakład Molekularnej Fizjologii Roślin

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

Uniwersytetu Warszawskiego

Warszawa 05. 05. 2017r

1. **Imię i Nazwisko:** Maksymilian Zienkiewicz

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

**1999 Stopień naukowy magistra w zakresie biotechnologii.** Praca magisterska pt. „Wpływ światła halogenowego na bakterie *Escherichia coli* z mutacją w genie hemH” wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Opiekun pracy prof. dr hab. Celina Janion. Promotor prof. dr hab. Jacek Bielecki

**2005 Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii.** Praca doktorska pt. „Kompletna sekwencja nukleotydowa plazmidu p1658/97 i analiza regionu odpowiedzialnego za amplifikację genu  $\beta$ -laktamazy SHV<sub>5s</sub>”, wykonana w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Opiekun pracy docent dr hab. Piotr Ceglowski, Promotor docent dr hab. Jacek Bardowski.

1. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.**

**1999** (10 miesięcy) – stanowisko biologa w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów Instytutu Biochemii i Biofizyki Państwowej Akademii Nauk.

**2005 – obecnie** - adiunkt w Zakładzie Molekularnej Fizjologii Roślin Instytutu Botaniki na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

2. **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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

a) **tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:**

„Szybkie zmiany aklimatyzacyjne chloroplastów w odpowiedzi na zmiany natężenia i jakości światła u roślin typu C4 podtypu NADP-ME.”

b) **(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy):**

1. Romanowska E., Buczyńska A., Wasilewska W., Krupnik T., Drożak A., Rogowski P., Parys E., **Zienkiewicz M.** (2017) Differences in photosynthetic responses of NADP-ME type C4 species to high light. *Planta* 245(3):641-657 (IF<sub>2017</sub>=3,239, MNiSW=40)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w opracowaniu założeń i koncepcji pracy, współudziale w napisaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz współudziale w końcowej redakcji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 45%.*

2. **Zienkiewicz M.**, Drożak A., Wasilewska W., Baclawska I., Przedpeńska-Wąsowicz E., Romanowska E. (2015) The short-term response of *Arabidopsis thaliana* (C3) and *Zea mays* (C4) chloroplasts to red and far red light. *Planta* 242(6):1479-93 (IF<sub>2015</sub>=3,239, MNiSW=40)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w opracowaniu założeń i koncepcji pracy, samodzielnym wykonaniu większej części doświadczeń oraz współpracy w trakcie wykonywania eksperymentów obejmujących obrazowanie zawartości białek chloroplastowych techniką elektroforezy 2D, współudziale w napisaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz współudziale w końcowej redakcji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

3. **Zienkiewicz M.**, Kokoszka N., Baclawska I., Drożak A., Romanowska E. (2013) Light intensity and quality stimulated Deg1-dependent cleavage of PSII components in the chloroplasts of maize. *Plant Physiol. Biochem.* 67:126-36 (IF<sub>2013</sub>=2,252, MNiSW=35)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na kierowaniu projektem badawczym N N303 605438 finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego jak również na udziale w opracowaniu założeń i koncepcji pracy, samodzielnym wykonaniu większej części doświadczeń oraz współpracy w trakcie wykonywania eksperymentów obejmujących określenie ilości mRNA proteaz Deg w liściach kukurydzy, współudziale w napisaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz końcowej redakcji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

4. **Zienkiewicz M.**, Ferenc A., Wasilewska W., Romanowska E. (2012) High light stimulates Deg1-dependent cleavage of the minor LHCII antenna proteins CP26 and CP29 and the PsbS protein in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 235(2):279-288 (IF<sub>2012</sub>=3,347, MNiSW=40)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na kierowaniu projektem badawczym N N303 605438 finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego jak również na udziale w opracowaniu założeń i koncepcji pracy, współudziale w napisaniu pierwotnej wersji manuskryptu samodzielnym wykonaniu większej części doświadczeń oraz współpracy w trakcie wykonywania eksperymentów określających aktywność fotoukładów I i II oraz końcowej redakcji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

**Sumaryczny *impact factor* powyższych prac zgodnie z rokiem opublikowania: 12,267**

**Łączna punktacja MNiSW dla wszystkich prac: 155**

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

Osiągnięcie naukowe stanowią cztery oryginalne prace eksperymentalne opublikowane w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny *impact factor* (zgodny z rokiem opublikowania) tych prac wynosi 12,267, natomiast sumaryczna liczba punktów MNiSW to 155. We trzech pracach eksperymentalnych jestem pierwszym autorem, w jednej ostatnim jednakże powstała ona przy znaczącym moim współudziale. Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe koncentrują się wokół problematyki szybkich zmianach aklimatyzacyjnych chloroplastów roślin typu C<sub>4</sub> w odpowiedzi na zmiany w natężeniu i jakości światła. Pomimo, że aklimatyzacja roślin w odniesieniu do warunków świetlnych badana jest od wielu lat to wciąż wiele jej aspektów nie zostało dobrze poznanych, zwłaszcza w odniesieniu do roślin typu C<sub>4</sub>. Rośliny typu fotosyntetycznego C<sub>4</sub> charakteryzują się serią zmian anatomicznych i biochemicznych zwiększających stężenie CO<sub>2</sub> w miejscu działania Rubisco, w celu ograniczenia/wyeliminowania procesu fotoodychania. Skutkuje to zwiększeniem produktywności fotosyntetycznej roślin C<sub>4</sub>, która zwykle jest 1,5-2 razy wyższa niż u roślin C<sub>3</sub>. Z tego powodu prowadzone są intensywne badania nad wykorzystaniem roślin C<sub>4</sub> jako źródła energii oraz w inżynierii genetycznej na przykład do uzyskania ryżu „C<sub>4</sub> -like” ważnego w produkcji żywności (Hibberd i wsp. 2008; Tanigushi i wsp. 2008). Uważa się, że rośliny C<sub>4</sub> wyewoluowały w roślin C<sub>3</sub> w odpowiedzi na spadek zawartości dwutlenku węgla w atmosferze przy jednoczesnym wzroście zawartości atmosferycznego tlenu. Ewolucja roślin od C<sub>3</sub> do C<sub>4</sub> zachodziła niezależnie ponad 60 razy w co najmniej 19 rodzinach roślin zarówno jednoliściennych jak i dwuliściennych (Sage 2004) Jest przystosowaniem do wysokich natężeń światła, podwyższonej temperatury i suszy. U roślin C<sub>4</sub> występują zwykle dwa typy komórek otaczających radialnie wiązkę przewodzącą i uczestniczących w fotosyntezie – komórki mezofilu (M) i komórki pochew

okołowiązkowych (BS). Procesy asymilacji i redukcji CO<sub>2</sub> rozdzielone są przestrzennie i katalizowane są przez dwa różne enzymy. Jedynie w chloroplastach komórek pochw okołowiązkowych zachodzi cykl Calvina i występuje Rubisco, natomiast pierwotne wiązanie CO<sub>2</sub> odbywa się w komórkach mezofilu przy udziale karboksylazy fosfoenolopirogronianowej, gdzie w chloroplastach zachodzą tylko reakcje świetlne fotosyntezy. Różnice te prowadzą również do zmian potencjału redoks w komórkach. W zależności od enzymu przeprowadzającego proces dekarboksylacji, miejsca dekarboksylacji w komórkach pochw okołowiązkowych, a także od rodzaju transportowanego kwasu karboksylowego, w fotosyntezie typu C<sub>4</sub> wyróżniono trzy podtypy metaboliczne: NADP-ME, NAD-ME i PEP-CK (Hatch i wsp. 1975). Badania opisane w prezentowanych pracach koncentrowały się na roślinach podtypu NADP-ME, którego przedstawicielami są istotne gospodarczo rośliny m. in.: kukurydza (*Zea mays*), trzcina cukrowa (*Saccharum officinarum*) i sorgo (*Sorghum Moench*). Do tego podtypu zalicza się również chwastnicę jednostronną (*Echinochloa crus-galli*) oraz palusznika krwawego (*Digitaria sanguinalis*). Jako punkt odniesienia prowadzono analogiczne badania na modelowym przedstawicielu roślin C<sub>3</sub> *Arabidopsis thaliana*. U roślin podtypu NADP-ME powstały w reakcji karboksylacji fosfoenolopirogronianu szczawiooctan, redukowany jest do jablczanu. Reakcja ta zachodzi w chloroplastach komórek mezofilu (M) i katalizowana jest przez enzym dehydrogenazę jablczanową, zależną od NADPH. Następnie jablczan transportowany jest do chloroplastów komórek pochw okołowiązkowych (BS), gdzie następuje jego dekarboksylacja, katalizowana przez enzym jablczanowy zależny od NADP. W wyniku tej reakcji powstaje CO<sub>2</sub> i NADPH, które są włączane do cyklu Calvina-Bensona oraz pirogronian, który transportowany jest do chloroplastów komórek mezofilowych. Tam dikinaza fosfopirogronianowa, zużywając ATP, przekształca pirogronian do fosfoenolopirogronianu. W ten sposób cykl ulega zamknięciu (Hatch 1987). Chloroplasty u podtypu NADP-ME charakteryzują się odmienną budową - te zlokalizowane w mezofilu mają budowę granową i są mniejsze od chloroplastów komórek pochw okołowiązkowych, które są bezgranowe lub posiadają szczątkowe grana (Laetsch 1971; Yoshimura i wsp. 2004). Chloroplasty dwóch typów komórek różnią się także udziałem poszczególnych fotosystemów w błonach tylakoidowych. Dominującym fotoukładem w chloroplastach BS jest fotoukład I (PSI). Fotoukład II (PSII) jest w tych komórkach obecny, ale jest go znacznie mniej niż w chloroplastach granowych komórek mezofilowych (Bassi i wsp. 1995). Aktywność PSII wciąż jest dyskutowana chociaż wykazano, iż posiada wszystkie podjednostki kompleksu utleniającego wodę i jest w stanie transportować elektrony z H<sub>2</sub>O (Romanowska i wsp. 2006). Mimo małej zawartości PSII, chloroplasty BS zawierają znaczne ilości systemów antenowych LHCII (Vainstein 1989). PSII w chloroplastach BS może

występować w formie dimeru, a nawet wraz z kompleksem antenowym LHCII, może tworzyć superkompleksy (Romanowska i wsp. 2008). Rola PSII w chloroplastach pochew okołowiązkowych nie jest jeszcze dokładnie poznana, ale uważa się, że chroni PSI przed fotooksydacją. Rośliny C4 występują głównie w strefie tropikalnej, subtropikalnej oraz strefach o podwyższonej temperaturze, czyli wszędzie tam gdzie występuje wysokie natężenie światła co w połączeniu z wysoką temperaturą i/lub ograniczoną dostępnością wody może prowadzić do uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego i spadku wydajności fotosyntezy (fotoinhibicji) (Aro i wsp. 1993; Nishiyama i wsp. 2006). Aparat fotosyntetyczny roślin musi dostosowywać się nie tylko do zmiennych natężeń światła, ale także do jego zmian jakościowych. Wykazano np., że do roślin rosnących pod drzewami dociera głównie światło z zakresu dalekiej czerwieni (FR) (Corre 1983). Aklimatyzację roślin do zmieniających się warunków świetlnych obserwuje się na poziomie morfologicznym np. poprzez zmiany w ustawieniu blaszek liściowych., na poziomie komórki obserwuje się ruchy chloroplastów, a na poziomie biochemicznym – rearanżację aparatu fotosyntetycznego (Anderson i wsp. 1988; Caffarri i wsp. 2005). Strategie przystosowujące do zmiennych warunków świetlnych różnią się w zależności od gatunku rośliny i środowiska jej występowania (Yin i Johnson 2000). Mechanizmy aklimatyzacyjne aparatu fotosyntetycznego pomimo intensywnych badań wciąż nie zostały dostatecznie poznane. Wykazano, że ekspozycja liści roślin typu C3 na światło o różnej jakości powodowała zróżnicowaną wydajność PSII zależną od stosowanego światła, a w mniejszym stopniu od miejsca występowania chloroplastów w liściu (Terashima i wsp. 2009). Odmienna anatomia liścia roślin typu C4 powoduje, że światło dociera najpierw do komórek mezofilowych a następnie do głębiej usytuowanych komórek pochew okołowiązkowych (Evans i wsp. 2007). Światło docierające do komórek BS różni się zatem nieco zarówno pod względem natężenia jak i docierającego spectrum co może być powodem występowania różnic w procesie absorpcji energii świetlnej w obu typach komórek. Uważa się, że jakość światła wywiera większy wpływ na fotosyntezę roślin typu C4 niż ma to miejsce u roślin typu C3 (Evans i wsp. 2007), ponadto wykazano, że metabolizm roślin C4 jest bardzo wrażliwy na limitujące go światło o niskim natężeniu (Bellasio i Griffiths 2014). Jednym z głównych mechanizmów regulacyjnych w komórkach eukariotycznych jest fosforylacja białek. Jest to mechanizm regulujący podstawowe procesy zachodzące na terenie komórek. W chloroplastach pełni on istotną funkcję regulacyjną i zależy bezpośrednio od stanu oksydoredukcyjnego w chloroplastach, a pośrednio wpływają na nią takie czynniki środowiskowe, jak np.: natężenie oraz jakość światła, temperatura oraz metale ciężkie. W chloroplastach odwracalnej fosforylacji i defosforylacji podlegają na przykład białka fotoukładów: PSI i PSII, białka TSP9 i CaS, podjednostka  $\beta$  syntazy ATP. Zmieniające się warunki środowiska najbardziej

wpływają na zmiany w obrębie PSII. Czynniki środowiskowe mogą, poprzez fosforylację białek, powodować szybkie zmiany strukturalne w obrębie tylakoidów (Aro i Ohad 2003). Wykazano, że białka tylakoidów roślin wyższych oraz glonów mogą ulegać zależnej od światła fosforylacji (Bennett 1977; Turkina 2008). Stwierdzono, że fosforylowane są głównie białka PSII: D1, D2, CP43, PsbH oraz CP29 (Lhcb4), Lhcb1, Lhcb2 z kompleksów antenowych (Bergantino i in. 1998; Rintamaki, Aro 2001). Fosforylacja białek rdzeniowych PSII jest ściśle powiązana z utrzymaniem aktywnego fotoukładu II (Aro i wsp. 1993 ) podczas gdy fosforylacja białek antenowych PSII (LHCII) jest powiązana z procesem przejścia stanów „state transition” redystrybuującym energię świetlną pomiędzy PSII i PSI (Allen 2002). W warunkach niskiego natężenia światła preferowane jest wzbudzenie fotoukładu II. Dochodzi wówczas do zredukowania puli plastochinonowej w tylakoidach, jest to sygnałem aktywującym kinazę(y) fosforylujące białka anten LHCII, które mogą wówczas odłączać się od PSII i przyłączać do PSI, warunkując bardziej korzystną dystrybucję energii pomiędzy dwoma fotoukładami („state transitions”). Anteny te mogą również w stanie hiperfosforylacji pozostawać nie związane z fotoukładami. Maksymalną fosforylację białek LHCII obserwuje się przy niższych niż wzrostowe natężeniach światła, a wraz ze wzrostem natężenia światła są one defosforylowane. Natomiast fosforylacja rdzenia PSII (białka D1/D2), zależy od natężenia światła i zwiększa się wraz z jego natężeniem. Ufosforylowane dimery PSII są bardziej stabilne, brak jest degradacji białka D1/D2 (gdyż degradowane jest po defosforylacji) nawet w warunkach działania wysokiego natężenia światła. Anteny CP43 są ufosforylowane na świetle i w ciemności, i nie jest znana rola tej fosforylacji. Zatem ilość światła docierająca do chloroplastów M i BS nie tylko warunkuje transport elektronów, ale też pełni funkcję protekcyjną. Preferencyjne działanie światła czerwonego (wzbudzenie PSII) lub dalekiej czerwieni (wzbudzenie PSI) może zatem pełnić ważną funkcję regulacyjną. Oba procesy kontrolowane są poprzez stan oksydoredukcyjny w chloroplastach (Pfannschmidt 2005). Dynamiczna odpowiedź aparatu fotosyntetycznego na zmiany jakościowe światła realizowana poprzez stechiometryczne zmiany zawartości fotoukładów sugeruje istnienie mechanizmów zdolnych do rozpoznania braku odpowiedniego zbalansowania spectrum docierającego światła. Mechanizmy te jednak wciąż nie zostały dobrze poznane i wydaje się, że mogą one być specyficzne dla danego typu chloroplastu. Ponadto o ile wpływ jakości światła na aktywność fotosyntetyczną został dobrze udokumentowany, zasadniczo nie ma informacji na temat zależności pomiędzy organizacją i funkcją kompleksów tylakoidowych w różnych typach chloroplastów. Dlatego też w jednym z aspektów pracy składającej się na osiągnięcie habilitacyjne było określenie czy chloroplasty rośliny typu C4 (chloroplasty w komórkach BS i M) i typu C3 podlegają takiemu samemu mechanizmowi

indukcji odpowiedzi na zmianę jakości światła, i czy te mechanizmy pozwalają na utrzymanie wysokiej aktywności fotosyntetycznej. Do badań wybrano *Arabidopsis thaliana* (Col-0) jako przedstawiciela roślin typu C3 oraz *Zea mays* jako przedstawiciela fotosyntezy C4 podtypu NADP-ME. Oświetlając liście *A. thaliana* i kukurydzy światłem czerwonym (R, 670 nm, 200  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), daleką czerwienią (FR, 720 nm, 200  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) lub białym wzrostowym (W, 250  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) wykazano korelację pomiędzy poziomem fosforylacji białek rdzeniowych PSII i antenowych LHCII a funkcjonalną organizacją kompleksów PSII i PSI, jak również korelację fosforylacji białek rdzeniowych PSII i LHCII z poziomem integralności tylakoidowych komponentów. Światło R i FR stosowano w natężeniu 200  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$  co wydaje się imitować warunki naturalne – ocenia się, że pełnym spektrum słonecznym światło białe może docierać nawet w natężeniu 2100  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) z czego około 250 - 280  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$  stanowi światło czerwone. Na początkowym etapie badań wykonano pomiar maksymalnej wydajności kwantowej PSII ( $F_v/F_m$ ) oświetlając liście *A. thaliana* i *Z. mays* światłem białym, czerwonym i daleką czerwienią. Pozwoliło to na ocenę *in vivo* stresu wywołanego przez oświetlanie światłem monochromatycznym z zakresu czerwieni i dalekiej czerwieni. Wyniki maksymalnej wydajności kwantowej PSII skorelowano z pomiarami aktywności PSII i PSI mierzonymi na tylakoidach z komórek mezofilowych *A. thaliana* i kukurydzy oraz z tylakoidów komórek pochw okołowiązkowych kukurydzy. Liście aklimatyzowane do ciemności (D) lub światła wzrostowego (W) naświetlano przez okres jednej godziny światłem czerwonym R (warianty D→R i W→R) lub daleką czerwienią FR (warianty D→FR i W→FR). Obserwowano, że maksymalna wydajność kwantowa PSII była wyższa u *A. thaliana* niż u kukurydzy a różnica ta była najwyraźniejsza w wariacie W→R. W takich warunkach ( $F_v/F_m$ ) dla *A. thaliana* wyniosło średnio 0,84 w stosunku do 0,75 dla kukurydzy. Podobne wyniki uzyskano już wcześniej (Pfundel i wsp. 1998). Największą stymulację aktywności PSII obserwowano w komórkach BS u kukurydzy po oświetlaniu liści światłem czerwonym (D→R i W→R) – transport elektronów był odpowiednio 1,7 i 2,6 krotnie wyższy. Dla porównania aktywność PSII w komórkach M kukurydzy była podobna we wszystkich wariantach. Aktywność PSII w komórkach mezofilowych *A. thaliana* była średnio dwukrotnie wyższa w stosunku do tej uzyskanej dla PSII z komórek mezofilowych kukurydzy i była stymulowana zarówno przez R jak i FR, ale tylko w chloroplastach pochodzących z liści ze światła wzrostowego (W). Nie obserwowano tego efektu w wariacie D→R, ponadto daleka czerwień obniżyła aktywność PSII u *A. thaliana* w liściach po okresie ciemności (wariant D→FR). Wykonane pomiary aktywności PSI wykazały że aktywność PSI w komórkach mezofilowych kukurydzy i w komórkach *A. thaliana* jest znacząco, bo około 4 krotnie niższa w porównaniu do



aktywności PSI w komórkach BS kukurydzy. Aktywność PSI w komórkach mezofilowych kukurydzy utrzymywała się na stałym poziomie niezależnie od zastosowanego oświetlenia liści, w komórkach pochw okółowiązkowych kukurydzy zanotowano znaczący wzrost aktywności PSI w wariacie W→FR, podobnie miało to miejsce w komórkach *A. thaliana*.

Podsumowując można było stwierdzić, że światło z zakresu dalekiej czerwieni indukuje bardzo silny wzrost aktywności PSI, ale tylko w komórkach BS u kukurydzy, efekt ten był również zauważalny, chociaż w mniejszym stopniu, w komórkach *A. thaliana*. Sugerowało to odmienną odpowiedź dostosowawczą aparatu fotosyntetycznego realizowaną w różnych typach komórek być może ze względu na nierównomierne docieranie światła w głąb liści. W celu dalszego potwierdzenia tej teorii określono wzór fosforylacji białek PSII. Jak wspomniano profil fosforylacji białek PSII jest pochodną stanu oksyoredukcyjnego w chloroplastach, którego wskaźnikiem jest stopień zredukowania/utlenienia puli plastochinonowej. W pośredni więc sposób pokazuje stan oksyoredukcyjny chloroplastu. Wykazano odmienny wzór fosforylacji białek: anten LHCII, rdzenia D1/D2 oraz CP43 w komórkach *A. thaliana* oraz w komórkach M i BS *Z. mays*. W szczególności zaobserwowano bardzo silną fosforylację anten LHCII w komórkach BS kukurydzy przy oświetlaniu liści daleką czerwienią (FR), co korelowało z wykazaną wcześniej silną indukcją aktywności PSI w tych komórkach. W obu typach komórek kukurydzy światło czerwone aplikowane na liście zaadaptowane do ciemności (D→R) indukowało fosforylację białek rdzeniowych D1/D2, podczas gdy anteny LHCII były słabo ufosforylowane tylko w komórkach BS. Światło czerwone aplikowane na liście zaadaptowane do światła wzrostowego (W→R) indukowało fosforylację białek D1/D2 w obu typach komórek, podczas gdy anteny LHCII były silnie ufosforylowane tylko w komórkach BS. Obserwowany wzór fosforylacji LHCII w komórkach BS był charakterystyczny dla niskich natężeń światła co sugerowało, że do chloroplastów komórek BS dociera mniej światła niż do komórek mezofilowych, gdzie anteny LHCII ulegały defosforylacji. Światło czerwone wywołało odmienny efekt w komórkach *A. thaliana*. Światło czerwone w chloroplastach liści adaptowanych do światła wzrostowego (W→R) powodowało spadek fosforylacji białek D1/D2 i anten LHCII w porównaniu do chloroplastów liści adaptowanych do ciemności (D→R) co sugerowało, że światło czerwone docierające do tych komórek miało stosunkowo wysokie natężenie – wskazywała na to częściowa defosforylacja białek rdzeniowych PSII (D1/D2). Daleka czerwień (FR), odmiennie niż u *A. thaliana*, wywoływała całkowitą defosforylację białka D1 w komórkach M i BS kukurydzy, ponadto ufosforylowanie białka CP43 również ulegało zmniejszeniu. Uzyskane wyniki sugerują nierównomierny dostęp światła do chloroplastów M i BS i ułatwiają zrozumienie mechanizmów umożliwiających roślinom utrzymanie wysokiej aktywności

PSII w warunkach zmieniającego się jakościowo i ilościowo światła. Postawiono hipotezę, że być może fosforylacja w mniejszym stopniu związana jest z intensywnością transportu elektronów, jednak może potencjalnie wywierać istotny wpływ na stabilizację białek w poszczególnych kompleksach fotosyntetycznych co może prowadzić do ich rearanzacji. Postanowiono więc sprawdzić stopień ufosforylowania anten LHCII, białek rdzeniowych D1/D2 oraz CP43 w poszczególnych kompleksach fotosyntetycznych stosując elektroforezę dwukierunkową na którą składały się elektroforeza BN-PAGE (natywna, pierwszy kierunek) i SDS-PAGE (denaturująca, drugi kierunek). Do kompleksów fotosyntetycznych należą m.i. superkompleksy złożone z PSII-LHCII, PSI-LHCI, PSI-LHCI-LHCII, dimery PSII, PSI, monomeryczna forma PSII, kompleksy wolnych anten LHCII w postaci trimerów i monomerów. Analizowano wzór fosforylacji białek kompleksów fotosyntetycznych z liści *A. thaliana* i *Z. mays* adaptowanych do światła wzrostowego (W) a następnie oświetlanych światłem czerwonym (W→R) lub daleką czerwienią (W→FR). U *A. thaliana* światło czerwone (R) powodowało zwiększoną fosforylację D1/D2 głównie w monomerach PSII i indukowało defosforylację anten LHCII. Daleka czerwień (FR) powodowała wyraźną defosforylację D1/D2 w superkompleksach, dimerach i monomerach PSII, podczas gdy LHCII ulegały w większości defosforylacji w superkompleksach PSII i trimerach. Stopień fosforylacji CP43 u *A. thaliana* był bardzo podobny we wszystkich wariantach świetlnych, obserwowano jednak nieco obniżoną fosforylację CP43 w monomerach PSII po zastosowaniu dalekiej czerwieni. Wzór fosforylacji w komórkach M kukurydzy był zasadniczo podobny do tego otrzymanego dla komórek *A. thaliana* co sugeruje, że zastosowane światło nie zaburza organizacji kompleksów tylakoidowych, jednakże w komórkach BS z liści poddanych oświetleniu daleką czerwienią wzór fosforylacji sugerował, że FR może wpływać na organizację superkompleksów. Ponadto zaobserwowano, że u kukurydzy, inaczej niż u *A. thaliana*, CP43 był słabo ufosforylowany w komórkach M i BS, a fosforylacja dotyczyła głównie białek PSII tworzących superkompleksy i formy monomeryczne PSII. Analiza potwierdziła wcześniej już zaobserwowany brak defosforylacji LHCII w BS po oświetleniu FR, a CP43 był w większym stopniu ufosforylowany w BS w stosunku do M. Te wyniki dobrze korespondowały z zaobserwowaną stymulacją aktywności PSI indukowaną przez daleką czerwień. Analiza wyników sugerowała, że jakość światła nie wpływa na organizację kompleksów u *A. thaliana*, ale może wpływać na organizację fotosystemów u kukurydzy zwłaszcza w komórkach pochw okółowiązkowych. Postawiono, więc hipotezę, że mechanizm modulowania organizacji fotosystemów pod wpływem jakości światła wydaje się być jednym z prawdopodobnych mechanizmów obserwowanej mniejszej czułości na stres świetlny roślin C4 w stosunku do roślin C3. Aby potwierdzić zmiany w organizacji kompleksów fotosyntetycznych wykonano analizy

zawartości białka D1 rdzenia PSII oraz jednego z białek antenowych LHCII - Lhcb1 w poszczególnych kompleksach fotosyntetycznych. Analiza nie wykazała istotnych różnic zarówno u *A. thaliana* jak i w obu typach komórek *Z. mays*. Pozwoliło to stwierdzić, że obserwowana odmienna fosforylacja anten LHCII w komórkach BS w odpowiedzi na oświetlenie liści daleką czerwienią nie zmienia istotnie kompozycji aparatu fotosyntetycznego, a być może pełni funkcję o nieznanym mechanizmie w transferze energii do PSI. Podsumowując wykazaliśmy, że już krótkie oświetlenie liści światłem z zakresu dalekiej czerwieni indukuje bardzo silną fosforylację anten LHCII w komórkach BS kukurydzy oraz znaczną aktywność PSI. Dodatkowo, stosując dwukierunkową elektroforezę BN-PAGE/SDS-PAGE dowiedliśmy, że defosforylacja dotyczy głównie anten LHCII w superkompleksach, ale nie ma miejsca w trimerach LHCII.

**Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje, że chloroplasty u roślin typu C3 i C4 (w komórkach mezofilowych i pochw okołowiązkowych) są naświetlane w nierównomierny sposób generując odmienną odpowiedź zależną nie tylko o natężenia, ale i jakości światła.**

Obserwowane różnice w aklimatacji do światła w chloroplastach roślin C3 i C4 zasugerowały nam dalsze badania mechanizmów redystrybucji energii świetlnej oraz reorganizacji błon tylakoidowych w chloroplastach granowych i bezgranowych roślin C4, w odniesieniu do funkcji tych chloroplastów. Do badań wybrano trzy gatunki C4 z podtypu NADP-ME: *Zea mays*, *Digitaria sanguinalis* i *Echinochloa crus-galli*. Gatunki te różnią się między innymi ilością gran w tylakoidach komórek pochw okołowiązkowych (BS). Nasze badania wykazały, że rośliny te charakteryzują się różną wrażliwością na fotoinhibicję w warunkach wysokiego natężenia światła. Uzyskane wyniki pokazały, że wynika to z różnego wzbudzenia fotoukładów w komórkach M i BS ze względu na dostępność światła dla chloroplastów w tych komórkach. Różnice w dystrybucji energii pomiędzy komórkami M i BS pokazały, że warunkuje to lepszą kooperację pomiędzy tymi metabolicznymi systemami, determinując wysoką aktywność fotosyntetyczną i ochronę przed aktywnymi formami tlenu w warunkach wysokiego natężenia światła. Badania wykazały, że *E. crus-galli* była najbardziej odporna na stres oksydacyjny, wynikający ze wzmożonej fosforylacji PSII, większego wygaszania nadmiernego wzbudzenia w postaci ciepła (NPQ), wyższej aktywności fotoukładów, lepszej energizacji liści (ATP/ADP) i wysokiego natężenia oddychania. Przejawiało się to jako szybka reaktywacja natężenia fotosyntezy po fotoinhibicji. Natomiast kukurydza okazała się być najbardziej wrażliwa na stres świetlny, Fotosynteza po reaktywacji pozostawała obniżona ok. 50% w porównaniu z warunkami wzrostowymi. Wykazano również, że NPQ nie zależy od zawartości karotenoidów u badanych gatunków oraz, że enzymy antyoksydacyjne nie są odpowiedzialne w warunkach stresu świetlnego za różnice we wrażliwości

na fotoinhibicję i stąd różne mechanizmy protekcyjne muszą występować u badanych gatunków. **Wydaje się, że natężenie światła docierające do chloroplastów kontroluje fosforylację białek (fosforylacja D1), i stąd fotoinhibicję. Różnice w aktywności PSI i PSII w obu typach chloroplastów wskazywały na różną produkcję energii u badanych gatunków podczas cyklicznego i niecyklicznego transportu elektronów, i stąd wynikała różna produkcja ATP i NADPH potrzebnych do wiązania CO<sub>2</sub>.**

Rearanżacja aparatu fotosyntetycznego jest tylko jednym z mechanizmów aklimatyzacji aparatu fotosyntetycznego do zmiennych warunków środowiskowych. W celu sprawnego działania aparatu fotosyntetycznego konieczne jest istnienie mechanizmów naprawy uszkodzonych komponentów. Wykazano, że na uszkodzenia najbardziej wrażliwy jest fotoukład II (Aro i wsp. 1993, Adir i wsp. 2003). W celu przywrócenia pełnej funkcjonalności PSII konieczna jest degradacja uszkodzonych komponentów oraz ich synteza *de novo*. Proces ten jest precyzyjnie regulowany, a fosforylacja białek pełni tutaj jedną z kluczowych funkcji sygnałowych. Przykładem tego jest najlepiej poznany mechanizm naprawy białka rdzeniowego D1 fotoukładu II, w którego degradację zaangażowane są proteazy z rodziny FtsH (1-2-5-8) oraz proteazy z rodziny Deg (1-2-5-8) (Lindahl i wsp. 2000, Sakamoto 2003, Kapri Perdes i wsp. 2007, Sun i wsp. 2007a i b, Pokorska i wsp. 2009). Proces degradacji białka D1 jest przykładem procesu ściśle regulowanego przez fosforylację - degradacji mogą ulegać tylko białka nieufosforylowane. Bardzo niewiele jest jednak wiadomo o procesach naprawczych innych komponentów PSII. Postuluje się udział proteazy Deg7 w degradację białka D2, CP47 i CP43 u *A. thaliana* (Sun i wsp. 2010a). Niewiele jest danych o protezach zaangażowanych w degradację białek anten LHCII. Luciński i wsp. (2011) wykazali degradację białka antenowego Lhcb6 przez proteazę Deg2 u *A. thaliana*, podczas gdy Lhcb1 i Lhcb3 może być w pewnych warunkach degradowana przez proteazę FtsH6 (Żelisko i wsp. 2004 i 2005.). Większość dostępnych informacji na temat udziału proteaz w mechanizmach aklimatyzacji i naprawy aparatu fotosyntetycznego pochodzi z roślin typu C3, głównie z modelowego organizmu *A. thaliana*. Niemal nic nie wiadomo jak mechanizmy naprawy i aklimatyzacji aparatu fotosyntetycznego przebiegają u roślin typu C4. Z tego też powodu jednym z aspektów pracy składającej się na osiągnięcie habilitacyjne było określenie profilu substratowego proteazy Deg1 w zależności od jakości i natężenia światła u *A. thaliana* jako przedstawiciela roślin C3 oraz u *Z. mays* przedstawiciela roślin C4. Chronologicznie prace wykonane zostały jako pierwsze w prezentowanym osiągnięciu habilitacyjnym.

Proteaza Deg1 u *A. thaliana* jest członkiem rodziny proteaz DegP, które oryginalnie zostały zidentyfikowane u bakterii *Escherichia coli*. W bakterii tej wykazano jej kluczową rolę w degradacji peryplazmatycznych białek o zdeformowanej strukturze w procesie adaptacji do stresu

termicznego (wysoka temperatura) (Lipińska i wsp. 1990). Wykazano, że w bakteriach posiada ona dwie funkcje: białka opiekuńczego (białko chaperonowe) w niskich temperaturach oraz funkcję proteolityczną (proteaza) w wysokich temperaturach (Krojer i wsp. 2002). Genom jądrowy *A. thaliana* zawiera 16 genów kodujących białka ortologiczne względem proteaz Deg z *E. coli*, określanych jako Deg1-16 (Husgen i wsp. 2009). Proteaza Deg1 u *A. thaliana* została zidentyfikowana jako białko związane peryferycznie z błonami tylakoidowymi chloroplastów od strony światła tylakoidu (Itzhaki i wsp. 1988, Chassin i wsp. 2002). Jest to niezależna od ATP serynowa endopeptydaza zawierająca podobną do trypsyny (trypsin-like) domenę na N końcu białka i domenę PDZ odpowiedzialną za rozpoznawanie substratu na C końcu białka. Badania Kley i wsp. (2011) wykazały, że aktywną formą proteazy Deg1 jest heksamer. Biochemiczne badania Deg1 u *A. thaliana* (Chassin i wsp. 2002) sugerowały, że proteaza ta może być zaangażowana w degradację termicznie uszkodzonych białek w lumen tylakoidów w tym PsbO z kompleksu utleniającego wodę w PSII jak również plastocyjaninę. Badania Sun i wsp. (2010b) oraz Li i wsp. (2010) również sugerowały udział proteazy Deg1 w degradacji PsbO, ponadto ustalono że białko D2 z rdzenia PSII także jest substratem tej proteazy. Co więcej w pracy Sun i wsp. (2010b) wykazano chaperonową aktywność Deg1. W naszej pracy będącej częścią osiągnięcia habilitacyjnego wykorzystaliśmy technikę "pull down" w celu określenia profilu substratowego proteazy Deg1 w *A. thaliana*. Technika wykorzystuje zdolność wiązania się rekombinowanego (w tym przypadku była to proteaza Deg1) z sekwencją 6 histydyn białka do złoża niklowego (Ni-NTA). Złoże ze związaną proteazą inkubowano z ekstraktem z błon tylakoidowych izolowanych z liści *A. thaliana*. Niezwiązane specyficznie z proteazą białka wyplukiwano, a związane specyficznie białka identyfikowano z wykorzystaniem spektroskopii masowej, której wyniki potwierdzano z użyciem specyficznych przeciwciał. W ten sposób udało się ustalić że proteaza Deg1 z *A. thaliana* zdolna jest do specyficznego wiązania białek z PSII: D1, D2, CP22 (PsbS), CP26(Lhcb5), CP29 (Lhcb4), PsbO z kompleksu utleniającego wodę a także Cytb6 z kompleksu cytochromowego b6/f. Ponadto zidentyfikowano jeszcze dwa białka TLP 18.3-kDa i Ptac 16-kDa oba z terenu lumen o nieznannej funkcji. Są doniesienia, które sugerują, że TLP jest fosfatazą, która może być zaangażowana w naprawę PSII (Sirpio i wsp. 2007). Brak dostępnych przeciwciał do tych dwóch białek nie pozwolił jednak na dodatkową weryfikację uzyskanego wyniku. Izolowane tylakoidy pochodziły z liści roślin z warunków wzrostowych (ze światła o natężeniu 250  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) jak również z roślin poddanych działaniu światła o natężeniu 900  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$  przez okres 1,5 godziny co prowadziło do fotoinhibicji wyrażającej się spadkiem wydajności fotochemicznej o około 20%. Założono, że fotoinhibicja jest objawem uszkodzeń białek aparatu fotosyntetycznego, które mogą stać się

substratem dla proteazy Deg1. Co interesujące, wykazano że profil substratowy Deg1 z warunków wzrostowych i po zastosowaniu wysokiego natężenia światła był taki sam co sugeruje, że proteaza Deg1 ma zdolność rozpoznawania specyficznych dla siebie białek, które nie uległy uszkodzeniu.

W celu weryfikacji uzyskanych wyników metodą „pull-down” wykonano cykl doświadczeń w którym testowano degradację zidentyfikowanych substratów proteazy Deg1 *in vitro*. W tym celu oczyszczoną na złożu Ni-NTA proteazę Deg1 inkubowano z tylakoidami *A. thaliana* w formie odwróconych pęcherzyków (ang. inside-out vesicles). Tak przygotowane tylakoidy eksponowały na zewnątrz białka obecne po stronie lumen tylakoidów umożliwiając dostęp egzogennej proteazie Deg1. Dodatkową kontrolę stanowił wariant, w którym tylakoidy w formie odwróconej inkubowano z proteazą Deg1, w której inaktywowano funkcję katalityczną poprzez wymianę seryny (z pozycji 280) z triady katalitycznej na glicynę. Trawienia *in vitro* przez okres 1 godziny prowadzono w monitorowanych warunkach temperaturowych (temperatura nie przekraczała 25°C) w dwóch natężeniach światła – oświetlając mieszaniny reakcyjne podczas inkubacji światłem wzrostowym (250  $\mu\text{mol}$  fotonów  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) oraz wywołującym fotouszkodzenia o natężeniu 2000  $\mu\text{mol}$  fotonów  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Nie obserwowano degradacji białek w obecności proteazy pozbawionej funkcji katalitycznej, obserwowano jednak spadek zawartości białek rdzeniowych D1 i D2, oraz anten CP22 (PsbS), CP26 (Lhcb5) i CP29 (Lhcb4), ale tylko w przypadku zastosowania wysokiego natężenia światła indukującego uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego. Nie obserwowano zidentyfikowanej wcześniej techniką "pull-down" degradacji potencjalnych substratów Deg1: białek PsbO i Cytb6. Brak degradacji PsbO był jednak zgodny z obserwacjami Li i wsp. (2010), którzy wykazali, że degradacja PsbO musi zostać zapoczątkowana przez inne niż Deg1 proteazy. Nie badano degradacji białek 18.3-kDa i PtaC 16-kDa z powodu braku komercyjnie dostępnych przeciwciał.

O selektywności zastosowanej metody świadczył fakt, że nie obserwowano degradacji pozostałych anten LHCI – CP24 (Lhcb6), Lhcb1, Lhcb2 i Lhcb3, które nie zostały zidentyfikowane jako potencjalne substraty Deg1 w technice "pull-down".

Wydaje się więc, że Deg1 ma zdolność do rozpoznawania i wiązania specyficznych białek niezależnie od stopnia ich uszkodzenia, jednakże proteolityczną aktywność wykazuje tylko wobec białek uszkodzonych. Możemy przypuszczać że uszkodzenia te powodują zmiany konformacyjne substratów umożliwiające Deg1-zależną degradację. Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że Deg1 u *A. thaliana* może być zaangażowana w proces naprawy białek rdzeniowych PSII (D1/D2), ale też w proces rozpraszania nadmiaru energii poprzez zdolność do degradacji niemal wszystkich białek zaangażowanych w tym procesie (CP22, CP26 i CP29) De Bianchi i wsp.

(2008). Co więcej, nie jest wykluczone, że Deg1 może być również zaangażowana w proces "state transition" gdyż jej substraty w postaci białek CP29 i CP26 pełnią funkcję łącznika (dokera) pomiędzy antenami LHCI a PSI (Takahashi i wsp. 2006; Tokutsu i wsp. 2009; Kargul i wsp. 2005) Uwidoczniona specyficzność substratowa zdaje się przeczyć teorii, że proteaza Deg1 jest niespecyficzną proteazą degradującą termicznie uszkodzone białka, może zaś być zaangażowana w procesy utrzymujące maksymalną wydajność aparatu fotosyntetycznego.

Analogiczne badania przeprowadzone dla kukurydzy jako przedstawiciela roślin o fotosyntezie typu C4 wykazały zbliżoną funkcję proteazy Deg1. Dowiedziono, że zakres substratowy jest bardzo zbliżony do tego u *A. thaliana* i obejmuje białka D1 i D2, CP22 (PsbS), CP26, CP29, PsbO i Tlp 18,3 kDA. Ukazanie się komercyjnie dostępnego przeciwciała anty-Tlp 18,3 kDA umożliwiło wykazanie, że pomimo wiązania i rozpoznania białka Tlp 18,3 kDa przez proteazę Deg1 nie ulega ono Deg1-zależnej degradacji w zastosowanych warunkach doświadczalnych. Analiza bioinformatyczna wykazała ponadto obecność dwóch izoform proteaz Deg1 u kukurydzy kodowanych przez geny zlokalizowane odpowiednio na chromosomie 6 i 8 (Ch6 i CH8). Obie izoformy zdolne były do rozpoznawania tego samego zestawu potencjalnych substratów, jednakże tylko proteaza z chromosomu 8 wykazywała aktywność proteolityczną. Prawdopodobną przyczyną braku aktywności proteolitycznej izoformy Deg1 z chromosomu 6 była modyfikacja triady katalitycznej HDS – w lizoformie z chromosomu 6 histydyna została zastąpiona przez argininę tworząc triadę RDS. Analiza zawartości Deg1 w chloroplastach komórek BS i M z użyciem przeciwciała anty-Deg1 wykazała jej obecność w obu typach chloroplastów, co więcej jej ilość była niemal dwukrotnie większa (średnio 1,7 razy) w komórkach BS. Jest to zaskakujący wynik jako że zawartość PSII w BS ocenia się na około 20% tego co znajduje się w chloroplastach mezofilowych. Pomimo niższej zawartości PSII w BS jest on łatwiej dostępny z powodu braku gran. Może to częściowo tłumaczyć zwiększone zapotrzebowanie na białka uczestniczące w naprawie PSII. Potwierdzeniem tego są nasze badania na kukurydzy, w których wykazano szybszą degradację (i tym samym naprawę) białka D1 z PSII w komórkach BS w stosunku do komórek M (Pokorska i wsp. 2009). Zastosowane przeciwciało anty-Deg1 wiązało obie izoformy Deg1 ze względu na bardzo wysokie ich podobieństwo sekwencji aminokwasowej. Nie mogliśmy zatem ustalić czy obie izoformy były obecne w chloroplastach M i BS oraz nie znany pozostał ich wzajemny udział ilościowy. Wykazano jednak, że oba geny kodujące dwie izoformy są aktywne transkrypcyjnie przy czym zawartość mRNA izoformy z chromosomu 8 była o około 1,5 razy większa w stosunku do izoformy z chromosomu 6. Sens istnienia izoformy nieaktywnej proteolitycznie jest nieznan,

jednakże zachowana zdolność rozpoznawania substratów przez proteazę Deg1 z chromosomu 6 sugeruje, że może ona pełnić funkcję białka opiekuńczego.

Oświetlanie liści kukurydzy światłem wywołującym efekt fotoinhibicji (światłem białym o natężeniu 900  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$  przez okres 1 godziny) nie prowadziło do zwiększenia zawartości Deg1, co pozwala wnioskować, że ich zawartość utrzymuje się na stałym poziomie, chociaż nie można wykluczyć, że wyższe natężenia światła czy dłuższy czas oświetlania doprowadził by do zmian w zawartości Deg1. Tak jak w przypadku określania specyficzności substratowej Deg1 z *A. thaliana* stwierdzono, że potencjalne substraty Deg1 z kukurydzy nie są degradowane w warunkach wzrostowych, degradację białek obserwowano po zastosowaniu wysokiego natężenia światła podczas inkubacji egzogennej proteazy Deg1 z odwróconymi tylakoidami (światło białe 2000  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$  przez okres 1 godziny). Deg1–zależnej degradacji ulegały białka D1 i D2, CP22 (PsbS) CP26 i CP 29. Wykazaliśmy również, że Deg1–zależna degradacja może zostać zapoczątkowana przez zmiany w jakości światła. Zastosowano światło czerwone absorbowane preferencyjnie przez PSII (R, 670 nm) i daleką czerwień absorbowaną przez PSI (FR, 720 nm) oba o natężeniu 200  $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Deg1 zależną degradację obserwowano tylko w przypadku oświetlania światłem czerwonym. Korelowało to z zaobserwowanymi obniżonymi wartościami maksymalnej wydajności fotochemicznej PSII (Fv/Fm) po oświetlaniu liści światłem białym o wysokim natężeniu i światłem czerwonym. Daleka czerwień nie wywoływała spadku wartości Fv/Fm. Wydawało się więc, że światło czerwone również indukuje fotouszkodzenia białek PSII umożliwiając ich Deg1–zależną degradację.

Mechanizm powstawania fotouszkodzeń nie został jak dotąd dokładnie poznany, powszechnie uznaje się, że warunki stresowe indukują wzmożoną produkcję aktywnych form tlenu (ang. ROS), które mogą utleniać, indukując uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego (Nishiyama i wsp. 2006). Dlatego postanowiono sprawdzić czy w zastosowanych warunkach świetlnych dochodzi do wzmożonej produkcji ROS. Zawartość  $\text{H}_2\text{O}_2$  w liściach kukurydzy w badanych wariantach świetlnych zasadniczo nie ulegała zmianom, jedynie niewielki wzrost zaobserwowano po zastosowaniu oświetlania liści wysokim natężeniem światła białego (900  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Nie obserwowano również istotnych zależnych od światła zmian w zawartości utlenionych białek w M i BS monitorowanych przy użyciu kitu Oxy blot, który identyfikuje powstałe na skutek utleniania grupy karbonylowe w białkach. Jednakże, różnorodność powstających na skutek działania ROS uszkodzeń białek jest bardzo duża co niemal uniemożliwia monitorowanie ich wszystkich (Shacter 2000). Dlatego nie można



wykluczyć, że zarówno światło czerwone jak i białe o dużym natężeniu wywołuje uszkodzenia PSII o typie nie monitorowanym w naszej pracy.

**Podsumowując po raz pierwszy została zidentyfikowane izoformy proteazy Deg1 u kukurydzy rośliny typu C4, Wykazano, że aktywność proteolityczną wykazuje tylko jedna z nich, pomimo, że oba geny są aktywne transkrypcyjnie. Nieoczekiwanie stwierdzono że ilość proteazy Deg1 w komórkach BS jest około 1,5 raza większa w stosunku do chloroplastów komórek M. Profil substratowy protez Deg1 z *A. thaliana* i *Z. mays* jest bardzo zbliżony jeśli nie identyczny co pozwala sądzić, że pełnią one podobne funkcje, wykazana specyficzność substratowa dowodzi, że nie mogą one być postrzegane jako niespecyficznym działające proteazy degradujące uszkodzone termicznie białka.**

## Literatura

1. Allen J.F. (2002) Plastoquinone redox control of chloroplast thylakoid protein phosphorylation and distribution of excitation energy between photosystems: discovery, background, implications. *Photosynth Res* 73:139–148.
2. Anderson J.M., Chow W.S., Goodchild D.J. (1988) Thylakoid membrane organisation in sun/shade acclimation. *Aust J Plant Physiol* 15: 11-26.
3. Aro E.M., McCaffery S., Anderson J.M. (1993) Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol* 103:835–843.
4. Aro E.M., Ohad I. (2003) Redox regulation of thylakoid protein phosphorylation. *Antioxid Redox Signal* 5:55-67.
5. Bassi R., Marquardt J., Lavergne J. (1995) Biochemical and functional properties of photosystem II in agranal membranes from maize mesophyll and bundle sheath chloroplasts. *Eur J Biochem* 233: 709-719.
6. Bellasio C., Griffiths H. (2014) The operation of two decarboxylases (NADPME and PEPCK), transamination and partitioning of C4 metabolic processes between mesophyll and bundle sheath cells allows light capture to be balanced for the maize C4 pathway. *Plant Physiol* 164:466–480.
7. Bennett J. (1977) Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature* 269: 344-346.
8. Bergantino E., Sandona D., Cugini D., Bassi R. (1998) The photosystem II subunit CP29 can be phosphorylated in both C3 and C4 plants as suggested by sequence analysis. *Plant Mol Biol* 36:11-22.
9. Caffarri S., Frigerio S., Olivieri E., Righetti P.G., Bassi R. (2005) Differential accumulation of *Lhcb* gene products in thylakoid membranes of *Zea mays* plants grown under contrasting light and temperature conditions. *Proteomics* 5: 758-768.
10. Chassin Y., Kapri-Pardes E., Sinvany G., Arad T., Adam Z. (2002) Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 130 857e864.
11. Corre W.J. (1983) Growth and morphogenesis of sun and shade plants. II The influence of light quality. *Acta Bot Neerl* 32:185–202.
12. De Bianchi S., Dall'Osto L., Tognon G., Morosinotto T., Bassi R. (2008) Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:1012–1028.

13. Drożak A., Romanowska E. (2006) Acclimation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize to different irradiances during growth. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1539-1546.
14. Evans J.R., von Caemmerer S., Vogelmann T.C. (2007) Balancing light capture with distributed metabolic demand during C<sub>4</sub> photosynthesis. In: Sheehy JE, Mitchell PL, Hargy B (eds) Charting new pathways to C<sub>4</sub> rice. Int Rice Research Institute, Philippines, pp 127–143.
15. Hatch M.D. (1987) C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim Biophys Acta* 895: 81-106.
16. Hatch M.D., Kagawa T., Craig S. (1975) Subdivision of C<sub>4</sub>-pathway species based on differing C<sub>4</sub> acid decarboxylating systems and ultrastructural features. *Aust J Plant Physiol* 2: 111-128.
17. Hibberd J.M., Sheehy J.E., Langdale J.A. (2008) Using C<sub>4</sub> photosynthesis to increase the yield of rice - rationale and feasibility. *Curr Opin Plant Biol* 11: 228- 231.
18. Itzhaki H., Naveh L., Lindahl M., Cook M., Adam Z. (1998) Identification and characterization of DegP, a serine protease associated with the luminal side of the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 273:7094–7098.
19. Kargul J., Turkina M.V., Nield J., Benson S., Vener A.V., Barber J. (2005) Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under state 2 transition. *FEBS J* 272:4797–4806.
20. Kley J., Schmidt B., Boyanov B., Stolt-Bergner P.C., Kirk R., Ehrmann M., Knopf R.R., Naveh L., Adam Z., Clausen T. (2011) Structural adaptation of the plant protease Deg1 to repair photosystem II during light exposure. *Nat Struct Mol Biol* 18:728–731.
21. Laetsch W.M. (1971) Chloroplast structural relationships in leaves of C<sub>4</sub> plants. In: Hatch MD, Osmond CB, Slatyer RO (red) Photosynthesis and Photorespiration, Wiley-Interscience, New York, pages 323-349.
22. Li J., Sun X.W., Zhang L.X. (2010) Deg1 is involved in the degradation of the PsbO oxygen-evolving protein of photosystem II in *Arabidopsis*. *Chin Sci Bull* 55:3145–3148.
23. Lindahl M., Spetea C., Hundal T., Oppenheim A.B., Adam Z., Andersson B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the lightinduced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12:419–431.
24. Luciński R., Misztal L., Samardakiewicz S., Jackowski G. 2011, The thylakoid protease Deg2 is involved in stress-related degradation of the photosystem II light-harvesting protein Lhcb6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 192: 74-86.
25. Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I., Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1757 742e749.
26. Pfannschmidt T. (2005) Acclimation to varying light qualities: toward the functional relationship of state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry. *J Phycol* 41:723–725.
27. Pfundel E.E. (1998) Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res* 56:185–195.
28. Pokorska B., Zienkiewicz M., Powikrowska M., Drożak A., Romanowska E. (2009) Differential turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Biochim Biophys Acta* 1787 1161e1169.
29. Rintamaki E., Aro E.M. (2001) Phosphorylation of Photosystem II Proteins. In: Aro E. M., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 11: 395-418.
30. Romanowska E., Drożak A., Pokorska B., Shiell B.J., Michalski W.P. (2006) Organization and activity of photosystems in the mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *J Plant Physiol* 163: 607-618.

31. Romanowska E., Kargul J., Powikrowska M., Finazzi G., Nield J., Drożak A., Pokorska B. (2008) Structural organization of photosynthetic apparatus in agranal chloroplasts of maize. *J Biol Chem* 283: 26037-26046.
32. Sage R.F. (2004) The evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341-370.
33. Shacter E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32 307e326.
34. Sirpio S., Allahverdiyeva Y., Suorsa M., Paakkarinen V., Vainonen J., Battchikova N., Aro E.M. (2007) TLP18.3 a novel thylakoid lumen protein regulating photosystem II repair cycle. *Biochem J* 406 415e425.
35. Sun X., Fu T., Chen N., Guo J., Ma J., Zou M., Lu C., Zhang L. (2010a) The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152:1263–1273.
36. Sun X., Ouyang M., Guo J., Ma J., Lu C., Adam Z., Zhang L. (2010b) The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem II assembly in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 62:240–249.
37. Sun X., Peng L.W., Guo J.K., Chi W., Ma J.F., Lu C.M., Zhang L.X. (2007a) Formation of Deg5 and Deg8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19:1347–1361.
38. Sun X., Wang L.Y., Zhang L.X. (2007b) Involvement of Deg5 and Deg8 proteases in the turnover of the photosystem II reaction center D1 protein under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Chin Sci Bull* 52:1742–1745.
39. Takahashi H., Iwai M., Takahashi Y., Minagawa J. (2006) Identification of the mobile light-harvesting complex II polypeptides for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:477–482.
40. Tanigushi Y., Ohkawa H., Masumoto C., Fukuda T., Tamai T., Lee K., Sudoh S., Tshida H., Sasaki H., Fukayama H., Miyao M. (2008) Overproduction of C<sub>4</sub> photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C<sub>4</sub>-like photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot* 59: 1799-1809.
41. Terashima I., Fujita T., Inoue T., Chow W.S., Oguchi R. (2009) Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiol* 50:684–697.
42. Tokutsu R., Iwai M., Minagawa J. (2009) CP29, a monomeric light-harvesting complex II protein, is essential for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 284:7777–7782.
43. Turkina M. (2008) Functional proteomics of protein phosphorylation in algal photosynthetic membranes. *Linköping University Medical Dissertations* No. 1038.
44. Vainstein A., Ferreira P., Peterson C.C., Verbeke J.A., Thornber J.P. (1989) Expression of the major light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein and its import into thylakoids of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Plant Physiol* 89: 602-609.
45. Yin Z.H., Johnson G.N. (2000) Photosynthetic acclimation of higher plants to growth in fluctuating light environments. *Photosynth Res* 63:97–107.
46. Yoshimura Y., Kubota F., Ueno O. (2004) Structural and biochemical bases of photorespiration in C<sub>4</sub> plants: quantification of organelles and glycine decarboxylase. *Planta* 220: 307-317.
47. Zelisko A., Garcia-Lorenzo M., Jackowski G., Jansson S., Funk C. (2005) AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13699–13704
48. Zelisko A., Jackowski G. (2004) Lhca polypeptides are maintained during dark-induced senescence of leaves. *J Plant Physiol* 161:1157–1170.

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

Poza publikacjami składającymi się na osiągnięcie naukowe przedstawione powyżej, dorobek mój składa się z 14 publikacji których jestem współautorem, z czego 10 znajduje się w bazie Journal Citation Reports (JRC) (łącznie **IF: 29,861**).

Poniżej znajduje się krótkie omówienie tych prac.

### 5.1.1. Zakres tematyczny: Opracowanie systemu stabilnej transformacji ekstremofilnego jednokomórkowego krasnorostu *Cyanidioschyzon merolae* 10D.

1. **Zienkiewicz M.**, Krupnik T., Drożak A., Golke A., Romanowska E. (2017) Transformation of the *Cyanidioschyzon merolae* chloroplast genome: prospects for understanding chloroplast function in extreme environments. *Plant Mol Biol* 93(1-2):171-183.
2. **Zienkiewicz M.**, Krupnik T., Drożak A., Golke A., Romanowska E. (2017) Chloramphenicol acetyltransferase-a new selectable marker in stable nuclear transformation of the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma* 254(1):587-596.

W cyklu dwóch wymienionych powyżej publikacji przedstawiono wyniki badań dotyczące uzyskania stabilnych jądrowych i chloroplastowych transformantów *C. merolae*. Krasnorost *C. merolae* jest jednokomórkowym ekstremofilem zdolnym do funkcjonowania w warunkach silnego zakwaszenia (pH= 0,2-4) i w wysokiej temperaturze (40-56°C). Organizm ten uważana jest za jeden z najprymitywniejszych alg posiadających tylko jeden nukleus, jedno mitochondrium i jeden chloroplast (Nozaki i wsp. 2003). Podział plastydów może być synchronizowane przez światło (Terui i wsp. 1995) co w połączeniu z prostotą budowy *C. merolae* czyni ten krasnorost doskonałym organizmem modelowym użytecznym w zrozumieniu podstawowych mechanizmów podziału plastydów (Kuroiwa i wsp. 1998; Miyagishima i wsp. 2003). W porównaniu do roślin wyższych i zielonych alg *C. merolae* posiada szereg wyróżniających je cech, które czynią ją świetnym modelowym organizmem do badań z zakresu molekularnej biologii, biotechnologii, strukturalnej biologii i biochemii. Ekstremofil ten stanowi doskonały modelowy system do badania komponentów fotosyntetycznego transportu elektronów ze względu na jego nadzwyczajną stabilność i aktywność (Kargul i wsp. 2012). Aparat fotosyntetyczny tego

ekstremofilnego fototrofa można określić jako typ pośredni pomiędzy sinicami i roślinami wyższymi sugerując, że stanowić on może ewolucyjny łącznik pomiędzy prokariotycznymi i eukariotycznymi fototrofami (Ohta i wsp. 2003). Podczas gdy fotoukład I (PSI) jest podobny do tych znajdujących u roślin wyższych to fotoukład II (PSII) bardziej przypomina jego odpowiedniki znajdujące u sinic: tak jak u nich charakteryzuje go obecność fikobilisomów funkcjonujących jako anteny zbierające światło zamiast białek antenowych wiążących chlorofil spotykanych u zielonych alg i roślin wyższych.

Przystępując do badań znanych było zaledwie kilka przykładów transformacji *C. merolae*. Pierwsze doniesienia pochodzą od Minoda i wsp. (2004), którzy wprowadzili gen typu dzikiego URA5.3 do wcześniej uzyskanego spontanicznie mutantu pozbawionego tej funkcjonalnej UMP syntazy. Ohnuma i wsp. (2008) uzyskali przejściową ekspresję  $\beta$ -tubuliny u tego krasnorostu podczas gdy rok później uzyskano przejściowe wyciszenie wprowadzonego do jądra na wektorze plazmidowym genu *cat* kodującego katalazę (Ohnuma i wsp. 2009). Jednakże, wszystkie wymienione przykłady dotyczą transformacji genomu jądrowego i z wyjątkiem genu *URA5.3* uzyskiwano jedynie przejściową ekspresję wprowadzanych genów.

W naszym podejściu zdecydowaliśmy się na wykorzystanie niestosowanego dotąd w transformacji *C. merolae* markera selekcyjnego genu oporności na chloramfenikol. Gen ten koduje acetylotransferazę chloramfenikolu inaktywującą cząsteczki antybiotyku. Mechanizm działania chloramfenikolu opiera się na blokowaniu translacji białek poprzez inhibicję aktywności transferazy peptydowej podjednostki 23S rRNA z podjednostki 50S bakteryjnego kompleksu rybosomalnego. Rybosomy mitochondrialne i chloroplastowe, ze względu na prokariotyczne pochodzenie, swoją budową przypominają te obecnie znajdujące się w bakteriach. Z tego też powodu chloramfenikol okazał się być toksyczny dla *C. merolae*. W konstrukcji wektorów transformacji wykorzystano bakteryjne plazmidy, sekwencja nukleotydowa genu oporności na chloramfenikol został poddana procesowi optymalizacji kodonów, ekspresja genu *cat* zachodziła dzięki zastosowaniu endogenego promotora genu *apcC* *C. merolae*. Przeprowadzono optymalizację metody wprowadzania obcego DNA do komórki z wykorzystaniem glikolu polietylowego (PEG), ale też, po raz pierwszy w tym organizmie, zastosowano strzelbę genową. W wyniku tego uzyskano stabilne mutanty jądrowe. Tym samym wykazano, że obecność acetylotransferazy chloramfenikolu na terenie cytoplazmy zapewnia wydajną ochronę rybosomów chloroplastowych i mitochondrialnych. Ponadto, poprzez dodanie sekwencji do genu *cat* kierującej acetylotransferazę chloramfenikolową do chloroplastu wykazano, że białko to zapewnia wydajną ochronę znajdując się również na terenie chloroplastu gdzie panują niesprzyjające warunki (niskie i zmienne pH, obecność aktywnych form tlenu). Uzyskany wynik sugerował, że

możliwe jest uzyskanie stabilnych transformantów chloroplastowych wykorzystując gen *cat* jako marker selekcyjny. Dowodził pośrednio, że rybosomy mitochondrialne w *C. merolae* różnią się od chloroplastowych na tyle, że nie stanowią celu dla cząsteczek chloramfenikolu. W kolejnym etapie badań skonstruowano wektory transformacji z wykorzystaniem promotorów chloroplastowych i genem *cat* z sekwencją nukleotydową poddaną procesowi optymalizacji kodonów właściwą dla maszynerii translacyjnej w chloroplastach *C. merolae*. Optymalizując metody wprowadzania DNA do chloroplastów udało się, po raz pierwszy dla tego organizmu uzyskać stabilne linie mutantów chloroplastowych. Jest to istotne osiągnięcie umożliwiające w przyszłości dokonywania mutagenyzy genów chloroplastowych w celu badania ich funkcji. Jak dotąd transformacja genomu chloroplastowego udała się tylko kilkakrotnie dla bardzo wąskiej grupy organizmów.

**Podsumowując, opracowano wydajne metody uzyskiwania mutantów w obrębie genomu jądrowego i chloroplastowego, które stanowiąc będą cenne narzędzie w badaniu wszelkich zagadnień biologicznych w modelowym organizmie jakim *C. merolae*.**

#### Literatura

1. Kargul J., Boehm M., Morgner N., Robinson C.V., Nixon P.J., Barber J. (2012) Compositional and structural analyses of the photosystem II from the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. In: "Photosynthesis: Research for Food, Fuel and Future" (ed. C Lu, L Zhang, T Kuang), pp. 59-63, Zhejiang Univ. Press, Springer-Verlag.
2. Miyagishima S., Nishida K., Mori T., Matsuzaki M., Higashiyama T., Kuroiwa H., Kuroiwa T. (2003) A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the plastid division site. *Plant Cell* 15:655–665.
3. Kuroiwa T., Kuroiwa H., Sakai A., Takahashi H., Toda K., Itoh R. (1998) The division apparatus of plastid and mitochondria. *Int Rev Cytol* 181:1–41.
4. Minoda A., Sakagami R., Yagisawa F., Kuroiwa T., Tanaka K. (2004) Improvement of culture conditions and evidence for nuclear transformation by homologous recombination in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol* 45:667–671.
5. Nozaki H., Matsuzaki M., Takahara M., Misumi O., Kuroiwa H., Hasegawa H., Shin-I T., Kohara Y., Ogasawara N., Kuroiwa T. (2003) The phylogenetic position of red algae revealed by multiple nuclear genes from mitochondria-containing eukaryotes and an alternative hypothesis on the origin of plastids. *J Mol Evol* 56:485–497.
6. Ohnuma M., Yokoyama T., Inouye T., Sekine Y., Tanaka K. (2008) Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol* 49:117–120.
7. Ohnuma M., Misumi O., Fujiwara T., Watanabe S., Tanaka K., Kuroiwa T. (2009) Transient gene suppression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Protoplasma* 236:107–112.
8. Ohta H., Suzuki T., Ueno M., Okumura A., Yoshihara S., Shen J.R., Enami I. (2003) Extrinsic proteins of photosystem II: an intermediate member of PsbQ protein family in red algal PSII. *Eur J Biochem* 270: 4156–4163.

9. Terui S., Suzuki K., Takahashi H., Itoh R., Kuroiwa T. (1995) High synchronization of plastid division in the ultramicro-alga *Cyanidioschyzon merolae* by treatment with both light and aphidicolin. *J Phyco* 31:958–961.

5.1.2. Zakres tematyczny: Metale ciężkie, wpływ na metabolizm i fotosyntezę- aklimatyzacja aparatu fotosyntetycznego.

1. Parys E., Wasilewska W., Siedlecka M., **Zienkiewicz M.**, Drożak A., Romanowska E. (2014) Metabolic responses to lead of metalicolous and nonmetallicolous populations of *Armeria maritima*. *Arch Environ Contam Toxicol* 67(4):565-577.
2. Wasilewska W., **Zienkiewicz M.**, Fristedt R., Vener V.A., Romanowska E. (2013) Phosphorylation of PSII Proteins in Low Light Grown Maize in Response to the Pb Ions. *In: Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future. Advanced Topics in Science and Technology in China. Springer, Berlin, Heidelberg* pp 572-575.
3. Romanowska E., Wasilewska W., Fristedt R., Vener AV, **Zienkiewicz M.** (2012) Phosphorylation of PSII proteins in maize thylakoids in the presence of Pb ions. *J Plant Physiol.* 169(4):345-352 (IF<sub>2012</sub>=2,699, MNiSW=35)
4. Romanowska E., Wróblewska B., Drożak A., **Zienkiewicz M.**, Siedlecka M. (2008) Effect of Pb ions on superoxide dismutase and catalase activities in leaves of pea plants grown in high and low irradiance *Biologia Plantarum* 52(1):80-86.

W cyklu prezentowanych publikacji przedstawiono wyniki badań, których celem była charakterystyka funkcjonalna i strukturalna aparatu fotosyntetycznego roślin poddanych działaniu jonów ołowiu, tolerancyjnych oraz wykazujących różny stopień wrażliwości na metale ciężkie. Od dawna wiadomo, że fotosynteza jest najbardziej podatnym procesem na szkodliwe oddziaływanie metali ciężkich (Bertrand i Poirier 2005). Ołów (Pb) lub kadm (Cd) zakłócają biosyntezę chlorofilu, fotosyntetyczny transport elektronów, aktywność enzymów cyklu Calvina, gospodarkę wodną, tym samym wiązanie CO<sub>2</sub> (Sharma i Dubey 2005; Lyubenova i Schroder 2011). Uważa się również, że oddychanie jest mniej wrażliwe na stres metali ciężkich i obserwuje się wzrost wydzielania CO<sub>2</sub> i pobierania O<sub>2</sub> (Lamoreaux i Chaney 1978; Parys wsp. 1998; Romanowska i wsp. 2002). Metale ciężkie indukują również powstawanie wolnych rodników tlenowych (ROS), które mogą utleniać lipidy i uszkadzać aparat fotosyntetyczny. Z tego też powodu rośliny żyjące w środowisku skażonym metalami ciężkimi musiały wykształcić mechanizmy ochronne. Przeprowadzone przez nas badania dostarczyły informacji o strategiach ochronnych istniejących u różnych gatunków roślin zróżnicowanych metabolicznie,

pochodzących z różnych warunków wzrostu. Wykazano, że dodatkowe czynniki wpływające na wzrost roślin tj. np. światło (natężenie i jakość) istotnie modyfikują działanie metali ciężkich.

Doświadczenia wykonano na liściach roślin reprezentujących różne typy fotosyntezy: C4 kukurydza (*Zea mays*), oraz o fotosyntezie typu C3 - z dwóch populacji/ekotypów roślin zawiągu pospolitego (*Armeria maritima*): metalofitu (MP wyhodowanego z nasion pochodzących z hałd ze stanowiska skażonego metalami ciężkimi (w tym związkami soli ołowiu) oraz niemetalofitów (NMP), tj. roślin ze stanowiska nieskażonego. Wszystkie hodowle były prowadzone na podłożu nie zawierającym metali ciężkich. Prowadzono również badania na indukcji stresu oksydacyjnego w roślinach grochu rosnących przy różnych natężeniach światła i poddanych działaniu jonów Pb.

W pracy poświęconej tolerancji na ołów populacji *Armeria maritima* porównano szereg cech fizjologicznych i biochemicznych liści *A. maritima* pochodzących z metalofitowej (MP) i niemetalofitowej (NMP) populacji po podaniu ołowiu. Wstępna charakterystyka fizjologiczna i biochemiczna liści obu populacji obejmowała pomiar 20 parametrów. W warunkach braku metali ciężkich obie populacje roślin *Armeria* nie wykazywały istotnych różnic w większości z badanych parametrów fizjologicznych i biochemicznych. Wyjątkiem było dość znaczne obniżenie zawartości jablczanu (o około 25%) i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (o około 35%) oraz nieco zwiększone (o około 15%) oddychanie i obniżona fotosynteza (o około 10%) w populacji MP w stosunku do NMP. W następnym kroku oceniono szereg parametrów fizjologicznych i biochemicznych w obu populacjach po podaniu ołowiu. Z krótkotrwałego (2 – 4 godz.) podawania jonów Pb, zwłaszcza w stężeniu niższym (5 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ), stwierdzono iż w ciągu pierwszych 2 godzin liście obu populacji *A. maritima*, wykazywały wzrost natężenia wiązania  $\text{CO}_2$  (o około 10-15%). Tylko w przypadku populacji MP wyższe stężenie Pb (10 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) powodowało wzrost natężenia fotosyntezy o około 30%. Co więcej, nawet wysokie stężenie Pb (20 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) nie powodowało natychmiastowego spadku fotosyntezy liści obu populacji roślin *Armeria*. Mikroskopowe badania epidermy z liści *Armeria* traktowanych jonami Pb zarówno krótkotrwanie (przez 4 godz.), jak i długotrwanie (przez 24 godz.) ujawniły, iż większości szparek była maksymalnie rozwarta i było to zapewne główną przyczyną zwiększonego wiązania  $\text{CO}_2$ . Wyniki tych badań sugerowały, że w interpretacji stymulacji fotosyntezy i wzrostu roślin pod wpływem niskiego (lub bardzo niskiego) stężenia metalu, o czym donosi szereg publikacji, należy również uwzględnić wpływ metalu na ruchy szparek. Stwierdzono, że traktowanie liści obu populacji *Armeria*, roztworem 5 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (24 godz.) nie miało wpływu na aktywność karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC). Zarejestrowano spadek natężenia wydzielania  $\text{O}_2$  proporcjonalny do stężenia ołowiu (10 i 20



mM) i identyczny dla obu populacji *A. maritima* po uprzednim traktowaniu odciętych liści wodą lub roztworem  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  przez 24 godziny.

Okolo 70% spadkowi fotosyntezy pod wpływem 20 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  towarzyszył prawie 60% wzrost stosunku ATP/ADP, najprawdopodobniej spowodowany przez zmniejszone zużywanie ATP w reakcjach ciemniowych. Liście obu populacji *Armeria* traktowane ołowiem nie wykazywały istotnych zmian w parametrach fluorescencji chlorofilu a oraz w aktywności PSII, w stosunku do liści traktowanych wodą. Nawet wysokie 20 mM stężenie  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  powodowało tylko 3-krotne obniżenie natężenia fotosyntezy krążków pochodzących z liści z obu populacji *Armeria*, co wskazuje na znacznie mniejszą wrażliwość tego procesu na toksyczne działanie jonów ołowiu, niż na przykład u roślin C4. Uzyskane wyniki nie pozwalały jednak wyjaśnić, dlaczego populacja MP roślin *Armeria* może egzystować przy nadmiarze metali ciężkich w podłożu, a ponadto, co zostało stwierdzone na liściach roślin ze stanowisk naturalnych, asymilować  $\text{CO}_2$  z takim samym natężeniem jak populacja NMP. Istotne różnice wykazano w aktywności enzymów antyoksydacyjnych po podaniu ołowiu. Zanotowano 25 i 35% spadek (w zależności od zastosowanego stężenia jonów ołowiu) aktywności peroksydazy askorbinianowej (APX) w populacji MP, podczas gdy spadek aktywności APX w populacji NMP był bardzo nieznaczny (5 i 15%). Sama zawartość APX była bardzo podobna w obu populacjach i nie zanotowano spadku ilości APX po inkubacji liści z ołowiem. Oznaczało to, że wrażliwość APX na ołów znacząco się różni w obu populacjach. Odwrotny wpływ ołowiu zanotowano w przypadku badania aktywności dysmutaz ponadtlenkowych SOD (manganowej, żelazowej, miedziowo cynkowej). Już w warunkach kontrolnych (bez ołowiu) aktywność SOD była o około 35% niższa w MP w stosunku do NMP. Jony ołowiu miały bardzo nieznaczny wpływ na aktywność w populacji NMP, podczas gdy w MP aktywność SOD wzrosła o około 35%. Zawartość wszystkich rodzajów SOD (Mn-,Fe-,Cu/Zn-SOD) była podobna w obu populacjach. Uzyskane wyniki sugerowały istnienie odmiennych mechanizmów regulujących system antyoksydacyjny w populacjach NMP i MP.

Badano również czy natężenie światła podczas wzrostu ma wpływ na wrażliwość roślin na jony Pb. Badano aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) w liściach grochu (*Pisum sativum* L), roślin rosnących przy niskich (LL) i wysokich (HL) natężeniach światła (50 lub 600  $\mu\text{moli fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) i poddanych działaniu 5 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  przez 24 h. Oznaczano również aktywność PSI i PSII w chloroplastach izolowanych z liści tych roślin. Niskie natężenie światła podczas wzrostu obniżało aktywność PSI a zmiany indukowane przez  $\text{Pb}^{2+}$  były widoczne tylko w chloroplastach z LL. Natomiast aktywność PSII była obniżona zarówno w chloroplastach izolowanych z LL jak i HL po działaniu jonami Pb.

Aktywność obu enzymów zwiększała się w odpowiedzi na LL i nie obserwowano wpływu jonów Pb. Wyniki te pokazały, że liście roślin rosnących w HL są mniej wrażliwe na ołów niż liście z LL. Zmiany transportu elektronów były głównym czynnikiem indukującym powstawanie ROS i aktywność enzymów antyoksydacyjnych. **Wyniki te pokazały, że niskie natężenie światła podczas wzrostu roślin zwiększa ich wrażliwość na metale ciężkie i zmienia odpowiedź na stres oksydacyjny.**

W celu wyjaśnienia jakie mechanizmy odpowiedzialne są za odpowiedź roślin C4 w warunkach działania jonów Pb prowadzono również badania na odciętych liściach kukurydzy, do których ołów w postaci rozpuszczalnej soli azotanowej podawano przez dobę wraz z prądem transpiracyjnym. Jony ołowiu stymulowały fosforylację białka D1 rdzenia PSII oraz niskocząsteczkowego białka PsbH, stabilizującego strukturę dimeryczną aktywnej postaci fotoukładu II (Vener 2007). Fosforylacja białka D1 pod wpływem jonów Pb zwiększała się z czasem działania metalu, podobnie jak ze wzrostem natężenia światła, i białko D1 po silnej fosforylacji pod wpływem ołowiu nie było defosforylowane. Ponadto białkiem silnie fosforylowanym w warunkach działania jonów ołowiu było niskocząsteczkowe białko wchodzące w skład PSII- PsbH. Podstawową funkcją tego białka jest stabilizacja struktury dimerycznej fotoukładu II. Można zatem sądzić, że prawidłowa struktura dimeru PSII w obecności jonów Pb (obserwowany brak zmian w obrazie elektroforezy natywnej BN-PAGE oraz aktywności PSII) jest zachowana dzięki silnej fosforylacji białka PsbH, które nie podlega degradacji proteolitycznej. Fosforylację badano metodą immunodetekcji oraz spektroskopii masowej (badania te przeprowadzono przy współpracy z prof. A. Venerem z Uniwersytetu Linköping (Szwecja) światowej sławy specjalistą od fosforylacji białek). Prawdopodobnie fosforylacja białka D1 w obecności metali ciężkich stanowi jeden z mechanizmów ochrony przed proteazami, gdyż białka ufosforylowane nie są degradowane, co warunkuje zachowanie aktywności fotosyntetycznej roślin. Po raz pierwszy pokazano zatem, że wzmożona fosforylacja białek PSII w warunkach działania metalu ciężkiego może pełnić funkcję ochronną.

Zmiany dotyczące wpływu jonów Pb na fosforylację białek PSII obserwowano również dla roślin grochu i zawciagu.

**Charakterystyka funkcjonalna i strukturalna aparatu fotosyntetycznego roślin poddanych działaniu ołowiu (rosnących w różnych warunkach), tolerancyjnych oraz wykazujących różny stopień wrażliwości na metale ciężkie dostarczyły informacji o strategiach ochronnych roślin różnych gatunków i zróżnicowanych metabolicznie, pochodzących z różnych warunków wzrostu. Badania pokazały, że mechanizmy ochronne u roślin odpornych na wysokie stężenie metali w środowisku (zawciag) są**

podobne jak u roślin poddanych krótkotrwałemu ich działaniu (kukurydza i gatunki z terenów nieskażonych metalami np. zawciąg). Ponadto, wykazano, że dodatkowe czynniki wpływające na wzrost roślin tj. np. światło (natężenie i jakość) istotnie modyfikują działanie metali ciężkich.

#### Literatura

1. Bertrand M., Poirier I. (2005) Photosynthetic organisms and excess of metals. *Photosynthetica* 43: 345-353.
2. Lamoreaux R.J., Chaney W.R. (1978) The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration, and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiol Plant* 43: 231-236
3. Lyubenova L., Schröder P. (2011) Plants for waste water treatment - Effects of heavy metals on the detoxification system of *Typha latifolia*. *Biores Tech* 102: 996-1004.
4. Parys E., Romanowska E., Siedlecka M., Poskuta J.W. (1998) The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiol Plant* 20: 313-322.
5. Romanowska E., Igamberdiev A.U., Parys E., Gardeström P. (2002) Stimulation of respiration by Pb<sup>2+</sup> in detached leaves and mitochondria of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Physiol Plant* 116: 148-154.
6. Sharma P., Dubey R.S. (2005) Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17: 35-52
7. Vener A.V. (2007) Environmentally modulated phosphorylation and dynamics of proteins in photosynthetic membranes. *Biochim Biophys Acta* 1767: 449-457.

#### 5.1.3. Zakres tematyczny: Fotosynteza i aklimatyzacja aparatu fotosyntetycznego roślin C4 do zmiennych warunków środowiskowych.

1. Wasilewska W., Krupnik T., **Zienkiewicz M.**, Michalak B., Romanowska E. (2015) Rola fotooddychania w kontroli odpowiedzi roślin na zmiany środowiskowe. w: Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko – eksperyment – edukacja. Bajguz A., Ciereszko I. (red.) wyd: Eko Press, Białystok, 23-35.
2. Romanowska E., Wasilewska W., Baćławska I., Buczyńska A., **Zienkiewicz M.** (2013) Środowiskowe i metaboliczne uwarunkowania fotosyntezy typu C4. W: Różnorodność biologiczna- od komórki do ekosystemu. Rośliny i grzyby w zmieniających się warunkach środowiska. Ciereszko I, Bajguz A (red.), wyd. Eko Press, Białystok, 9-24
3. Pokorska B., **Zienkiewicz M.**, Powikrowska M., Drożak A., Romanowska E. (2009) Differential turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Biochim Biophys Acta* 1787(10):1161-1169.
4. Romanowska E., Drożak A., Powikrowska M., **Zienkiewicz M.**, Pokorska B. (2008) Mechanisms of Photosynthetic Apparatus Acclimation of C4 Plants to Different Irradiances.

In: Allen J.F., Gantt E., Golbeck J.H., Osmond B. (eds) *Photosynthesis. Energy from the Sun*. Springer, Dordrecht, pp 1039-1042.

5. Romanowska E., Powikrowska M., **Zienkiewicz M.**, Drożak A., Pokorska B. (2008) High light induced accumulation of two isoforms of the CF1 alpha-subunit in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of C4 plants. *Acta Biochim Pol* 55(1):175-182.

Budowa aparatu fotosyntetycznego jest ściśle związana z warunkami świetlnymi podczas wzrostu roślin (Anderson i wsp. 1988). Przystosowanie roślin do różnych i zmieniających się natężeń światła pociąga za sobą zmiany w strukturze i funkcjonowaniu kompleksów fotosyntetycznych (odpowiedź szybka) oraz selektywną syntezę i degradację chloroplastowych komponentów, co prowadzi do zmian w kompozycji i funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego (odpowiedź długoterminowa) (Bailey i wsp. 2004).

Do badań wykorzystano trzy gatunki roślin C4 (Kanai i Edwards 1999) reprezentujących trzy podtypy metaboliczne i rosnących przy różnych natężeniach światła (niskim, średnim i wysokim, odpowiednio 50, 350 i 1000  $\mu\text{mol}$  fotonów  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ): kukurydzę (*Zea mays*, podtyp NADP-ME), proso zwyczajne (*Panicum miliaceum*, podtyp NAD-ME) i proso olbrzymie (*Panicum maximum*, podtyp PEP-CK). Zaobserwowano różnice w przebiegu fazy jasnej fotosyntezy u tych przedstawicieli roślin C<sub>4</sub>, rosnących w jednakowych warunkach świetlnych, a zaliczanych do różnych podtypów metabolicznych. Widoczne one były nie tylko między granowymi i bezgranowymi chloroplastami kukurydzy, ale również między granowymi chloroplastami z komórek mezofilu i pochew okołowiązkowych u prosa zwyczajnego i olbrzymiego. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy tymi chloroplastami w jakościowym składzie kompleksów chlorofilowo-białkowych, lecz w ich zawartości. U kukurydzy wraz ze wzrostem natężenia światła następował spadek ilości białek kompleksu LHCII i jednocześnie wzrost białek centrum reakcji PSII. Nie pociągało to jednak zmian w ultrastrukturze chloroplastów. Natomiast u prosa olbrzymiego i u prosa zwyczajnego natężenie światła miało wpływ na ultrastrukturę chloroplastów podobnie jak u roślin C3, natomiast nie powodowało zmian w zawartości LHCII u tych roślin. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że u badanych roślin C4 reprezentujących różne podtypy metaboliczne występują różnice w przebiegu reakcji świetlnych fotosyntezy. Chloroplasty M i BS tych roślin wykazują odmienne przystosowania do natężenia światła umożliwiające sprawną asymilację CO<sub>2</sub>.

Natężenie światła ma szczególny wpływ na fotosyntezę u roślin C4. Wynika to ze zwiększonego, średnio 2-krotnie w porównaniu roślinami C3, zapotrzebowania energetycznego (ATP) podczas wiązania CO<sub>2</sub> na świetle (Hatch, 1987). Badano w jakim stopniu organizacja oraz

skład ilościowy i jakościowy kompleksów barwnikowo-białkowych w tylakoidach komórek BS i M, status energetyczny tych komórek odzwierciedla ich związek z aktywnością fotochemiczną u badanych podtypów roślin C<sub>4</sub>. Materiał badawczy stanowiły: *Zea mays* (podtyp NADP-ME), *Panicum miliaceum* (podtyp NAD-ME), *Panicum maximum* (podtyp PEP-CK). Badano różnice w zawartości podjednostki  $\alpha$  syntazy ATP pomiędzy komórkami mezofilowymi i pochew okołowiązkowych izolowanymi z roślin rosnących w warunkach niskiego (LL), średniego (ML) bądź wysokiego (HL) natężenia światła. Analizowano występowanie dodatkowej izoformy podjednostki  $\alpha$  syntazy ATP. Ponieważ poszczególne podjednostki syntazy ATP łączą się ze sobą w stosunku stechiometrycznym, uznano, że ilość podjednostki  $\alpha$  syntazy ATP odpowiada zawartości kompleksu syntazy w błonach tylakoidowych. Stwierdzono, że w przypadku wszystkich analizowanych gatunków natężenie światła przy którym hodowane były rośliny ma wpływ na zawartość syntazy ATP w chloroplastach pochodzących z komórek mezofilowych lub pochew okołowiązkowych i ilość izoformy  $\alpha$  wzrasta wraz ze wzrostem natężenia światła. Masa cząsteczkowa obu podjednostek wynosi odpowiednio 64 i 67 kDa i badana sekwencja aminokwasowa jest bardzo zbliżona. Wydaje się, że mechanizm odpowiedzialny za regulację przez światło zawartości kompleksu ATP-azy w błonach tylakoidowych jest różny dla obu typów chloroplastów i zależy od podtypu metabolicznego rośliny. Akumulacja  $\alpha$  izoformy może pełnić protekcyjną rolę w warunkach wysokich natężeń światła, zapobiegając nadmiernej protonacji lumen i fotouszkodzeniu PSII. Wcześniej (Jiao i wsp. 2004) również obserwowali pojawienie się izoformy  $\alpha$  w HL w liściach *Brassica rapa*. Powyższe prace wykazały, że mechanizmy odpowiedzialne za adaptację do światła realizowane są wg. różnych „scenariuszy”, specyficznych gatunkowo i ściśle związanych z typem metabolizmu C<sub>4</sub>.

Zależne od światła uszkodzenie fotoukładu II prowadzi do fotoinhibicji i obniżenia wydajności fotosyntezy (Nishiyama i wsp. 2006). Naprawa fotoukładu II (PSII) jest niezwykle istotnym procesem warunkującym prawidłowe działanie całego aparatu fotosyntetycznego w zmiennych warunkach środowiska (Anderson i Aro, 2001). Ponieważ niewiele jest informacji dotyczących przebiegu procesu naprawy uszkodzonego PSII u roślin C<sub>4</sub>, zawierających zróżnicowane pod względem budowy i funkcji chloroplasty przeprowadzono badania na liściach kukurydzy, w których zahamowano proces naprawy PSII poprzez podanie inhibitora syntezy białek w chloroplastach (linkomycyna). Porównując szybkości fotoinhibicji wykazano, że są one takie same dla kukurydzy i roślin typu C<sub>3</sub>. Zaobserwowano jednak, że rośliny kukurydzy hodowane w niskim i średnim natężeniu światła wykazują podobny stopień wrażliwości na fotoinhibicję, inaczej niż obserwowano to u roślin o fotosyntezie typu C<sub>3</sub>. Stwierdzono, związaną z fotouszkodzeniem PSII, degradację białka D1 w obu typach chloroplastów kukurydzy.

Równocześnie udowodniono, że szybkość degradacji białka D1 w chloroplastach BS jest znacznie szybsza niż w chloroplastach M. Wykazano, że wolne tempo degradacji białka D1 w chloroplastach mezofilu nie było związane z zahamowaniem defosforylacji tego białka, ani z szybkością dysocjacji superkompleksów i dimerów PSII. Było natomiast prawdopodobnie związane z różnicami w zawartości enzymów proteolitycznych zaangażowanych w proces naprawy PSII. Agranalna budowa chloroplastów BS, a także duża zawartość proteazy Deg1 mogły wpływać na szybkie tempo degradacji białka D1 w tych błonach. Dalsze badania nad rolą proteazy Deg1 w degradacji białek tylakoidowych wchodzi w skład dwóch prac stanowiące osiągnięcie habilitacyjne.

W artykułach przeglądowych opisano strategie występujące u roślin C<sub>4</sub>, które warunkują im wysoką aktywność fotosyntetyczną (brak/bardzo ograniczone fotooddychanie) i szybszy wzrost. Większość roślin C<sub>4</sub> jest lepiej zaadaptowana do wysokiej temperatury i suszy niż przedstawiciele roślin C<sub>3</sub>. U podtypów C<sub>4</sub>, wytworzyły się odmienne strategie zapewniające przystosowanie do środowiska. Zrozumienie mechanizmów różnicowania i rozdziału funkcji pomiędzy komórki mezofilowe i pochew okołowiązkowych jest kluczowe w wykorzystaniu potencjału fotosyntetycznego tych roślin w warunkach zmieniającego się klimatu (Gomes de Oliveira Dal` Molin i wsp. 2011).

## Literatura

1. Andersson B., Aro E.M. (2001) Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II. In: *Regulation of Photosynthesis*, Vol. XI. Aro E-M. and Andersson B. (eds.). Kluwer Academic Publishers pp. 377-393.
2. Anderson J.M., Chow W. S., Goodchild D. J. (1988) Thylakoid membrane organisation in sun/shade acclimation. *Aust. J. Plant. Physiol.* 15, 11-26.
3. Bailey S., Horton P., Walters R.G. (2004) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta* 218:793-802.
4. Gomes de Oliveira Dal` Molin C., Quek L.E., Palfreyman R. W., Brumbley S. M., Nielsen L. K., (2011) C<sub>4</sub> GEM, a Genome-Scale Metabolic Model to Study C<sub>4</sub> Plant Metabolism. *Plant Physiol* 154 (4): 1871-1885.
5. Hatch M.D. (1987) C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure *Biochim Biophys Acta* 895:81-106.
6. Jiao S., Hilaire E., Guikema J.A. (2004) Identification and differential accumulation of two isoforms of the CF1 -subunit under high light stress in *Brassica rapa*. *Plant Physiol Biochem* 42:883-890.
7. Kanai R., Edwards G. E. (1999) The biochemistry of C<sub>4</sub> photosynthesis. [W:] Sage R. F., Monson R. K. (red.), C<sub>4</sub> plant biology. Academic Press, UK, 49-87.
8. Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I, Murata N. (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1757: 742-749.

5.1.4. Zakres tematyczny: Biologia plazmidów bakteryjnych, rozprzestrzenienie się oporności na antybiotyki betalaktamowe.

1. **Zienkiewicz M.**, Kern-Zdanowicz I., Carattoli A., Gniadkowski M., Cegłowski P. (2013) Tandem multiplication of the IS26-flanked amplicon with the *bla*(SHV-5) gene within plasmid p1658/97. *FEMS Microbiol Lett* 341(1):27-36.
2. Gołębiewski M., Kern-Zdanowicz I., **Zienkiewicz M.**, Adamczyk M., Żylinska J., Baraniak A., Gniadkowski M., Bardowski J., Cegłowski P. (2007) Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*CTX-M-3. *Antimicrob Agents Chemother* 51(11):3789-3795.
3. **Zienkiewicz M.**, Kern-Zdanowicz I., Gołębiewski M., Żylinska J., Mieczkowski P., Gniadkowski M., Bardowski J., Cegłowski P. (2007) Mosaic structure of p1658/97, a 125-kilobase plasmid harboring an active amplicon with the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*SHV-5. *Antimicrob Agents Chemother* 51(4):1164-1171.

W cyklu trzech wymienionych powyżej publikacji przedstawiono wyniki badań dotyczące plazmidów pCTX-M3 i p1658/97 wyizolowanych w Polsce z klinicznych szczepów *Citrobacter freundii* i *Escherichia coli* (Gniadkowski i wsp. 1998; Pałucha i wsp. 1999). Plazmidy te okazały się być nośnikami betalaktamaz o szerokim spektrum działania (ESBL), odpowiednio *bla*<sub>CTX-M-3</sub> i *bla*<sub>SHV-5</sub>, powodując tym samym wysoką lekooporność gospodarza na większość stosowanych klinicznie antybiotyków betalaktamowych. Wstępne badania wykazały, że kliniczne szczepy zawierające plazmidy pCTX-M3 i p1658/97 charakteryzuje oporność na antybiotyki betalaktamowe penicyliny, monobaktamy (aztreonam) i ceftazydym. Ponadto oba plazmidy zawierały geny warunkujące oporność na antybiotyki aminoglikozydowe. W przypadku klinicznych szczepów *E. coli* powiązanych z plazmidem p1658/97 poziom oporności na antybiotyki betalaktamowe różnił się w poszczególnych izolatach bakteryjnych (Pałucha i wsp. 1999). Analiza restrykcyjna wyizolowanych plazmidów ze szczepów różniących się poziomem oporności na antybiotyki betalaktamowe wykazała identyczny wzór trawienia co dowodziło, że zawierają one ten sam plazmid. Jednakże niektóre z prążków DNA na żelu po trawieniu enzymatycznym były znacznie intensywniejsze w plazmidzie ze szczepu *E. coli* charakteryzującej się wyższą opornością. Sugerowało to że część plazmidu uległa powieleniu (amplifikacji). Plazmidy pCTX-M3 i p1658/97 (pochodzący z klinicznego szczepu *E. coli* o niższym poziomie oporności na betalaktamy) zostały poddane sekwencjonowaniu i adnotacji. W wymienionych

publikacjach zaprezentowano ich pełną sekwencję nukleotydową. Wykazano że plazmid pCTX-M3 jest plazmidem z grupy IncL/M (grupa charakteryzująca się szerokim spektrum gospodarza) o wielkości 89469 par zasad (numer dostępu w bazie GenBank AF550415). Wykazano doświadczalnie, że posiada on bardzo wydajny system koniugacji odpowiedzialny za łatwe rozprzestrzenianie się plazmidu wśród klinicznych szczepów bakteryjnych. Zidentyfikowanie mobilnego elementu *ISEcp1* w bliskim sąsiedztwie *bla*<sub>CTX-M-3</sub> stanowiło kolejną przesłankę potwierdzającą hipotezę że *bla*<sub>CTX-M-3</sub> mógł zostać pozyskany przez plazmid poprzez transpozycję mobilnego elementu *ISEcp1* z genomu *Kluyvera ascorbata* (Rodriguez i wsp. 2004). Analiza porównawcza sekwencji nukleotydowej plazmidu pCTX-M3 wykazała bardzo wysokie podobieństwo sekwencyjne z plazmidem pEL60 zidentyfikowanym w bakteryjnych patogenach roślin. W sekwencji DNA plazmidu pCTX-M3 można wyróżnić dwa brakujące w pEL60 dodatkowe moduły sekwencji zawierające między innymi geny oporności na antybiotyki otoczone przez mobilne elementy. Sugeruje to, że plazmid pCTX-M3 wyewoluował z pEL60 poprzez nabycie genów oporności antybiotykowej w drodze transpozycji.

Plazmid p1658/97 okazał się być plazmidem o wielkości 125491 par zasad (numer dostępu w bazie GenBank AF550679), posiadającym dwa systemy replikacji IncFIB i IncFII, operon *tra* umożliwiający koniugację. Geny oporności na antybiotyki aminoglikozydowe zgrupowane są w integronie, podczas gdy gen *bla*<sub>SHV-5</sub> otoczony jest przez dwa mobilne elementy insercyjne *IS26*. Wykazano, że region *IS26- bla*<sub>SHV-5</sub> -*IS26* (amplikon) o wielkości 8817 par zasad może ulegać spontanicznej amplifikacji układając się jeden za drugim (tandemowo) i zwiększając tym samym poziom oporności na antybiotyki betalaktamowe nawet ponad 100 krotnie. Mechanizm amplifikacji nie został do końca poznany, jednakże udowodniono, że jest on RecA - niezależny i najprawdopodobniej zachodzi przy udziale transpozaz *IS26*. Ponadto wykazano, że amplikon zdolny jest do spontanicznej transpozycji na inny plazmid, jednakże tracił on zdolność do amplifikacji w nowym otoczeniu. Sugerowało to brak niezbędnego czynnika genetycznego wymaganego do amplifikacji obecnego na plazmidzie macierzystym p1658/97. W celu identyfikacji tego czynnika skonstruowano szereg pochodnych plazmidu p1658/97 zawierających amplikon. We wszystkich testowanych pochodnych plazmidu p1658/97 amplikon utracił zdolność do amplifikacji. Brak amplifikacji obserwowano nawet w obecności 100 % sekwencji plazmidu p1658/97 podzielonej pomiędzy dwie pochodne w obrębie jednej komórki bakteryjnej. Ponadto modyfikacja sekwencji w obrębie sekwencji amplikonu w całym plazmidzie p1658/97 również doprowadzało do zahamowania amplifikacji. Sugerowało to, że niezbędny czynnik wymagana do zajścia amplifikacji nie ma charakteru genu i kodowanego przez niego białka.



Postawiono zatem hipotezę, że czynnikiem warunkującym zdolność do tandemowej amplifikacji jest topologia cząsteczki plazmidu.

#### Literatura

1. Gniadkowski M., Schneider I., Palucha A., Jungwirth R., Mikiewicz B., Bauernfeind A. (1998) Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaximehydrolyzing  $\beta$ -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 42:827–832.
2. Palucha A., Mikiewicz B., Gniadkowski M. (1999) Diversification of *Escherichia coli* expressing an SHV-type extended-spectrum-lactamase (ESBL) during a hospital outbreak: emergence of an ESBL-hyperproducing strain resistant to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 43:393–396.
3. Rodriguez M., Power P., Radice M., Vay C., Famiglietti A., Galleni M., Ayala J.A., Gutkind G. (2004) Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4895–4897.

Zienkiewicz M. K. 2010