

Autoreferat

Opis osiągnięć i dorobku naukowego

Dr Robert Luciński

Zakład Fizjologii Roślin

Wydział Biologii

Uniwersytet im. A. Mickiewicza

Poznań, 17.02.2016r.

1. Imię i Nazwisko: Robert Luciński

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. „Charakterystyka aktywności reduktazy azotanowej i azotynowej w układzie symbiotycznym łubinu żółtego i *Bradyrhizobium lupini*.” Wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin UAM w Poznaniu. Promotor: prof. dr hab. Lech Ratajczak.

2003 - Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – fizjologii roślin. Praca doktorska pt. „Udział dysymilacyjnej reduktazy azotanowej w metabolizmie beztlenowym *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).” Wykonana w Zakładzie Fizjologii Roślin UAM w Poznaniu. Promotor: prof. dr hab. Lech Ratajczak.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:

- **1999-2003:** doktorant w ramach studium doktoranckiego na Wydziale Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Adiunkt:

- 01.11.2003 – 30.09.2004: umowa o pracę na czas określony

- 01.10.2004 – 30.09.2008: umowa o pracę na czas określony

- 01.10.2008 – 31.10.2013: mianowanie na czas określony

- 01.11.2013 – 30.09.2018: umowa o pracę na czas określony

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:**

Nowe funkcje fizjologiczne proteaz chloroplastowych

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

1. **Luciński R**, Jackowski G. 2013, AtFtsH heterocomplex-mediated degradation of apoproteins of the major light harvesting complex of photosystem II (LHCII) in response to stresses. *J. Plant. Physiol.* 170: 1082-1089. (IF₂₀₁₃=2,770, MNiSW=35)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w opracowaniu założeń i koncepcji pracy, samodzielnym wykonaniu wszystkich doświadczeń, napisaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz współudziale w końcowej redakcji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

2. **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. (IF₂₀₁₁=6,645, MNiSW=45)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w opracowaniu koncepcji i założeń eksperymentalnych pracy, samodzielnym wykonaniu większej części doświadczeń oraz współpracy w trakcie wykonywania eksperymentów obejmujących techniki PCR oraz mikroskopowe. Ponadto współuczestniczyłem w pisaniu manuskryptu oraz przygotowywaniu końcowej redakcji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

3. **Luciński R**, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G. 2011, Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. *Plant Physiol. Biochem.*: 49: 311-320. (IF₂₀₁₁=2,838; MNiSW=35)

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na udziale w tworzeniu koncepcji pracy, samodzielnym wykonaniu większości doświadczeń oraz współpracy przy wykonywaniu doświadczeń wykorzystujących techniki PCR oraz mikroskopowe. Ponadto współuczestniczyłem w pisaniu manuskryptu oraz końcowej redakcji pracy. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

4. Grabsztunowicz M, **Luciński R**, Baranek M, Sikora B, Jackowski G. 2011, Proteazy chloroplastowe Deg. *Postępy. Biochemii* 57: 109-114. (MNiSW=8)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracy z pierwszym autorem przy pisaniu rozdziału poświęconego proteazie Deg1, samodzielnym napisaniu rozdziałów poświęconych proteazom Deg2, Deg5 oraz Deg8, przygotowaniu ryciny nr 2 oraz współpracy w zestawieniu literatury i redakcji całej pracy. Brałem także udział (wraz z pierwszym autorem) w tworzeniu ostatecznej wersji pracy. Mój udział udział procentowy szacuję na 40%.

Sumaryczny impact factor powyższych prac zgodnie z rokiem opublikowania: 12,253

Łączna punktacja MNiSW dla wszystkich prac: 123

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

Osiągnięcie naukowe stanowią trzy oryginalne prace eksperymentalne opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports oraz jedna praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie polskim spoza w/w bazy. Sumaryczny impact factor (zgodny z rokiem opublikowania) tych prac wynosi 12,253, natomiast sumaryczna liczba punktów MNiSW to 123. We wszystkich pracach eksperymentalnych jestem pierwszym autorem, natomiast w pracy przeglądowej jestem drugim współautorem.

Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe koncentrują się wokół problematyki funkcji fizjologicznych proteaz chloroplastowych. Jest to ciągle stosunkowo słabo poznany obszar zagadnień, zarówno w aspekcie roli jaką odgrywają poszczególne proteazy w procesach rozwojowych roślin, jak również w obszarze dotyczącym poszukiwań białek chloroplastowych będących, w określonych sytuacjach fizjologicznych, substratami dla ich aktywności proteolitycznej.

Powszechnie wiadomym jest, że procesy degradacji białek roślinnych podlegają bardzo dokładnej regulacji i mają charakter enzymatyczny (Clark i wsp. 2005). Co więcej degradacja białek może być również istotnym elementem jednego z trzech podstawowych procesów, a mianowicie: może być elementem systemu kontroli jakości białek, polegającym na usuwaniu białek uszkodzonych w wyniku działania czynników środowiskowych lub mutacji. Po drugie może być istotną częścią obrotu metabolicznego białek, wyrażającego się w usuwaniu białek „niepotrzebnych” w danym momencie i zastępowaniu ich innymi i wreszcie proteoliza może

być ważnym elementem szlaków sygnalizacyjnych, uruchamianych przez komórkę w odpowiedzi na działanie różnych wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowych bodźców i regulujących szereg ważnych procesów komórkowych takich jak ekspresja genów, cykl komórkowy, różnicowanie, sortowanie białek, czy też „egzekucja” programowanej śmierci komórki. Procesy degradacji białek są często związane z układem ubikwityna-proteasom 26S, procesami o charakterze autofagicznym lub też zachodzą dzięki aktywności autonomicznych proteaz komórkowych (Grabsztunowicz i wsp. 2011, Baranek i wsp. 2011).

Informacje zwarte w proteazowej bazie Merops (wersja: 9.13; www.merops.sanger.ac.uk) wskazują, że proteom *Arabidopsis thaliana* zawiera 745 białek, uznanych za enzymy proteolityczne. Znaczna część z nich to ortologi białek należących do 8 różnych rodzin proteaz występujących u sinic i bakterii (Schuhmann i Adamska 2011). Do tej pory największą ilość informacji zgromadzono odnośnie białek zaliczanych do proteaz AtClp, AtFtsH oraz AtDeg.

Głównym przedmiotem zainteresowania prac badawczych składających się na osiągnięcie habilitacyjne są proteazy AtDeg oraz AtFtsH.

Roślinne proteazy AtDeg należą, zgodnie z nomenklaturą przyjętą w bazie Merops, do rodziny S1, proteaz podobnych do chymotrypsyny, podrodziny S1B. Genom *Arabidopsis thaliana* zawiera 16 genów kodujących białka ortologiczne względem białek Deg z *Escherichia coli* (Grabsztunowicz i wsp. 2011). Białka te (określane numerami od AtDeg1 do AtDeg16), kierowane są do różnych przedziałów komórkowych, i tak: AtDeg1, AtDeg2, AtDeg5 oraz AtDeg8 są proteazami chloroplastowymi, Deg15 jest proteazą peroksysomalną, a AtDeg9 jest prawdopodobnie zlokalizowana w jądrze komórkowym. Nieznana jest subkomórkowa lokalizacja białek AtDeg4 i AtDeg16. Proteazy AtDeg3, AtDeg6, AtDeg11, AtDeg12 i AtDeg14 są – jak pokazały ostatnie prace - kierowane do mitochondriów (Schuhmann i Adamska 2011, Tanz i wsp. 2014), przy czym AtDeg3 jest prawdopodobnie kodowane przez pseudogen (Tanz i wsp. 2014). Ciekawe wyniki uzyskano odnośnie lokalizacji subkomórkowej proteaz AtDeg3 i AtDeg10. Prawdopodobnie są one kierowane zarówno do plastydów, jak i do mitochondriów (Tanz i wsp. 2014). Dodatkowo w przypadku proteazy AtDeg3, w badaniach proteomicznych, stwierdzono jej niewielkie ilości w obrębie tylakoidów stromy, co uwiarygodnia jej chloroplastową lokalizację (Tomizioli i wsp. 2014). Kontrowersje wzbudziła ostatnio również lokalizacja proteazy AtDeg7. Do tej pory istniały dane świadczące o jej chloroplastowej lokalizacji (Sun i wsp. 2010). Najnowsze badania sugerują z kolei jej podwójną lokalizację, na terenie mitochondriów i jądra komórkowego ale nie na terenie chloroplastów (Tanz i wsp. 2014). W obrębie chloroplastów proteazy AtDeg lokalizowane są jako białka związane z błoną tylakoidową od strony stromy (AtDeg2 i ewentualnie AtDeg7), lub też od

strony światła tylakoidu (AtDeg1, AtDeg5 oraz AtDeg8; Peltier i wsp. 2002, Schubert i wsp. 2002, Sun i wsp. 2010).

Wszystkie proteazy AtDeg są to niezależne od ATP, endopeptydazy typu serynowego posiadające w swej strukturze charakterystyczną domenę katalityczną zlokalizowaną bliżej N-końca łańcucha polipeptydowego. W obrębie tej domeny znajduje się, typowa dla proteaz serynowych, triada katalityczna tworzona przez aminokwasy His-Asp-Ser (Claussen i wsp. 2002, Rawlings i wsp. 2010). Drugą charakterystyczną dla tych białek domeną jest tzw. domena PDZ, zlokalizowana jest bliżej C-końca cząsteczki. Odpowiada ona za oddziaływania pomiędzy cząsteczkami białek tworzących oligomeryczne kompleksy, rozpoznawanie substratów oraz za aktywację domeny proteazowej. Ilość domen PDZ w obrębie cząsteczki białka proteazy jest różna i waha się od 0 do 4. AtDeg1 i AtDeg8 dysponują jedną domeną PDZ (Schuhmann i wsp. 2012), AtDeg2 posiada dwie takie domeny (Haussuehl i wsp. 2001, Sun i wsp. 2012), natomiast AtDeg7 aż cztery. Wyjątek stanowi proteaza AtDeg5, w której strukturze w ogóle nie zidentyfikowano domeny PDZ (Schuhmann i wsp. 2012).

W ostatnim czasie zanotowano dość znaczny postęp wiedzy dotyczący przestrzennej struktury chloroplastowych proteaz AtDeg. Ukazały się prace przedstawiające analizę struktury krystalicznej białek AtDeg1 i AtDeg2. Wykazano, że domena proteazowa białka AtDeg1 zawiera dwa odcinki o strukturze β -harmonijki, pomiędzy którymi zlokalizowana jest triada katalityczna His173, Asp203, Ser282. Na obu końcach tej domeny znajdują się natomiast odcinki H1 i H2 o strukturze α -helisy. Aktywne fizjologicznie są heksamery AtDeg1 złożone z dwu trimerycznych pierścieni ułożonych jeden na drugim. Centrum aktywne enzymu mieści się w środku całej struktury. AtDeg1 charakteryzuje się również zdolnością do oligomeryzacji, zależną od pH środowiska. W pH ok. 8 istnieje jedynie forma monomeryczna, natomiast w pH ok. 6 przeważa heksamer, przy czym aktywność proteolityczną wykazują obie formy białka (Kley i wsp. 2011). Ponadto aktywność tego białka zależna jest również od temperatury i pH. Wykazano wyraźny wzrost aktywności AtDeg1 w zakresie temperatur 15-42°C, przy optimum pH wynoszącym 6.0 (Chassin i wsp. 2002). Jak wynika z badań krystalograficznych heksamery tworzy również proteaza AtDeg2, jednakże stabilność tej formy nie jest zależna od pH środowiska. Prawdopodobne jest, że heksamery proteazy AtDeg2 *in vivo* łączą się, tworząc aktywne proteolitycznie duże oligomery (Sun i wsp. 2012). Znana struktura krystaliczna Deg1 posłużyła również jako swoista „matryca” dla wymodelowania *in silico* struktur przestrzennych proteaz AtDeg5 i AtDeg8. Wykazano, że obie te proteazy posiadają swoje triady katalityczne (His147, Asp188, Ser266 dla AtDeg5 oraz His171, Asp214, Ser292 dla AtDeg8) zlokalizowane pomiędzy dwoma odcinkami o strukturze β -harmonijki. Domena PDZ proteazy AtDeg8

zlokalizowana jest w pobliżu C-końca cząsteczki (Chen i wsp. 2014). Sądzi się również, że obie te proteazy tworzą *in vivo* heterooligomeryczny kompleks o masie około 460kDa, w którym oba białka występują w stosunku ilościowym 1:1. Prawdopodobnie AtDeg5 i AtDeg8 tworzą homoheksamery, które następnie łączą się formując heterododekamer (Sun i wsp. 2007a).

Z kolei proteaza AtDeg7 tworzy prawdopodobnie trimeryczne kompleksy, w formowaniu których istotną rolę odgrywa jedna z domen PDZ (Schuhmann i wsp. 2012).

W ostatnich latach pojawiły się także informacje dotyczące aktywności opiekuńczej białek AtDeg1 i AtDeg2. W obu przypadkach są to wyniki eksperymentów przeprowadzanych *in vitro* z wykorzystaniem rekombinowanych wersji AtDeg1 i AtDeg2. Wykazano mianowicie, że rekombinowane AtDeg1 zdolne było do renaturacji białka MalS (Sun i wsp. 2010), natomiast rekombinowana AtDeg2 hamowała agregację lizozymu zachodzącą w obecności DTT (Sun i wsp. 2012, Jagodzicki i wsp. 2014).

O funkcjach fizjologicznych chloroplastowych proteaz AtDeg wiadomo stosunkowo niewiele. Za fizjologiczny substrat proteazy AtDeg1 najczęściej uważa się apobiałko PsbA, uszkodzone na skutek ekspozycji roślin na podwyższone natężenie światła. Prawdopodobnie proteaza AtDeg1 rozcina uszkodzone PsbA w dwu miejscach: w obrębie pętli CD, znajdującej się w świetle tylakoidu oraz w obrębie C-końcowej pętli. Rozcięcie pętli CD powoduje uwolnienie C-końcowego odcinka białka o masie 16kDa, natomiast przecięcie C-końcowej pętli wiąże się z powstaniem fragmentu 5,2kDa (Kapri-Perdes i wsp. 2007). Ponadto wcześniejsze prace pokazywały zależność wzrostu aktywności proteazy AtDeg1 od wzrostu temperatury, co pozwalało przypuszczać, że enzym ten uczestniczy w odpowiedzi rośliny na podwyższoną temperaturę, a jego fizjologicznym substratem może być jeden z polipeptydów PS II – PsbO oraz plastocyanina, których degradację przez rekombinowane białko AtDeg1 obserwowano w układach doświadczalnych *in vitro* (Chassin i wsp. 2002, Schuhmann i Adamska 2011). Udało się także uzyskać linię roślin *Arabidopsis thaliana* z obniżonym poziomem białka proteazy AtDeg1. W porównaniu z roślinami typu dzikiego, rośliny o obniżonym poziomie AtDeg1 okazały się być mniejsze i bardziej wrażliwe na fotoinhibicję. Zaobserwowano u nich niższy poziom akumulacji produktów degradacji białka PsbA oraz niższy poziom metaloproteaz chloroplastowych AtFtsH, co może sugerować współdziałanie proteazy AtDeg1 z AtFtsH w degradacji uszkodzonego polipeptydu PsbA. Możliwą rolę proteazy Deg1 w procesach fotoprotekcyjnych sugerują także wyniki prac pokazujących udział Deg1 w degradacji prawie wszystkich białek biorących udział w procesie rozpraszania energii (białka PsbS, CP29 i CP26; Zielenkiewicz i wsp. 2011).

Zaangażowanie w inicjację degradacji uszkodzonego przez nadmiernie wysokie natężenie światła białka PsbA sugerowano również w przypadku proteazy AtDeg2 (Haussuhl i wsp. 2001). Późniejsze badania pokazały jednak, że degradacja białka PsbA u roślin pozbawionych funkcjonalnego genu proteazy AtDeg2 przebiega podobnie jak u roślin typu dzikiego. Obraz taki pozwala sądzić, że obserwowana *in vitro*, inicjacja degradacji polipeptydu PsbA przez proteazę AtDeg2 nie ma odzwierciedlenia w układzie *in vivo* (Huesgen i wsp. 2006).

Równie skromna jest wiedza dotycząca fizjologicznych funkcji proteaz AtDeg5 oraz AtDeg8. Wykazano, że AtDeg5 oraz AtDeg8 zaangażowane są degradację uszkodzonego nadmiernym natężeniem światła białka PsbA, co pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami na dotyczącymi wzrostu poziomu transkrypcji genu proteazy AtDeg8 w warunkach wysokiego natężenia światła (Sun i wsp. 2007b).

Proteazie AtDeg7 przypisywano istotną rolę w cyklu naprawczym fotouszkodzonego fotosystemu II, co związane jest z wynikami doświadczeń pokazującymi zdolność tego enzymu do degradacji fotouszkodzonych białek PsbA, PsbD, PsbB oraz PsbC (Sun i wsp. 2010). Należy jednak pamiętać, że wyniki te uzyskano w doświadczeniach *in vitro* z wykorzystaniem białka rekombinowanego.

Widać więc, że większość badań dotyczących funkcji chloroplastowych proteaz z AtDeg skupia się na kwestiach związanych z naprawą fotouszkodzonego fotosystemu II, w szczególności zaś na degradacji białka PsbA. Jak do tej pory nie udało się jednoznacznie wyjaśnić tego zagadnienia. Co więcej nie dysponujemy wiedzą pozwalającą na wskazanie, który z polipeptydów wchodzących w skład PS II jest fizjologicznym substratem dla konkretnej proteazy z rodziny Deg w określonej sytuacji fizjologicznej.

Druga rodzina proteaz będąca przedmiotem zainteresowania prac składających się na osiągnięcie habilitacyjne to proteazy AtFtsH. Są to zależne od ATP metaloproteazy zawierające w centrum katalitycznym jony Zn^{2+} . W genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano 12 genów kodujących enzymy z rodziny AtFtsH, a białkowe produkty 9 spośród nich kierowane są do chloroplastów (AtFtsH 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 oraz 12; Sakamoto i wsp. 2003). Istotne jest, że białka AtFtsH1, 2, 5 i 8 są integralnymi białkami błony tylakoidowej, w której tworzą pary AtFtsH1/2 oraz AtFtsH5/8, które z kolei składają się na funkcjonalny heterokompleks zwany heterokompleksem AtFtsH. Uważa się, że funkcją heterokompleksu AtFtsH jest udział w degradacji polipeptydu PsbA, uszkodzonego w warunkach wysokiego natężenia światła (Sakamoto i wsp. 2003, Moldavki i wsp. 2012). Ponadto istnieją doniesienia informujące o tym, że proteaza FtsH6 może degradować polipeptyd Lhcb1 podczas aklimatyzacji roślin do

podwyższonego natężenia światła oraz polipeptyd Lhcb3 w trakcie starzenia się liści (Żelisko i wsp. 2005). Dodatkowo mutanty pozbawione prawidłowo funkcjonujących genów *FtsH2* oraz *FtsH5* charakteryzują się mozaikowatym wybarwieniem liści, co wskazuje na udział tych enzymów w biogenezie chloroplastów (Sakamoto i wsp. 2002, 2003).

Widać zatem, że większość dotychczasowych prac poświęconych funkcjom fizjologicznym chloroplastowych proteaz AtDeg oraz heterokompleksu AtFtsH skupiała się wokół ich ewentualnemu udziałowi w degradacji polipeptydu PsbA, w warunkach wysokiego natężenia światła. Co więcej nie prowadzono badań mających na celu poznanie innych białek będących substratami dla wspomnianych proteaz w określonych sytuacjach fizjologicznych innych niż stres związany z wysokim natężeniem światła.

W obliczu takiego stanu wiedzy głównym celem prac składających się na osiągnięcie habilitacyjne było poszukiwanie fizjologicznych substratów dla chloroplastowych proteaz AtDeg oraz heterokompleksu AtFtsH w warunkach stresowych. Z drugiej zaś strony, z uwagi na brak informacji na temat znaczenia chloroplastowych proteaz AtDeg w ontogenezie chloroplastów jak i całej rośliny, postawiono sobie za cel fenotypową charakterystykę mutantów pozbawionych wybranych białek AtDeg rosnących w warunkach komfortowych.

Badania prowadzone były na roślinach *Arabidopsis thaliana* zarówno szczepu dzikiego, jak również na mutantach pozbawionych białka proteazy AtDeg2 (mutanty *deg2-2* oraz *deg2-3*), AtDeg5 (mutant *deg5-1*) oraz AtFtsH5 (mutant *var1-1*).

Rośliny pozbawione białka AtDeg2 oraz AtDeg5 były mutantami insercyjnymi z insercją T-DNA w obrębie odpowiedniego genu. Nasiona tych roślin zakupiono w Nottingham Arabidopsis Stock Center i sprawdzono homozygotyczność wyhodowanych roślin, wykorzystując technikę PCR. W przypadku braku homozygotyczności rośliny poddawano samozapyleniu i sprawdzano ponownie homozygotyczność w kolejnym pokoleniu. Wszystkie mutanty AtDeg używane w doświadczeniach zostały ponadto dokładnie scharakteryzowane pod względem zawartości białek chloroplastowych AtDeg. Wykorzystano do tego celu technikę typu Western-blot stosując przeciwciała skierowane przeciwko białkom AtDeg1, AtDeg2, AtDeg5 oraz AtDeg8.

Ostatecznie uzyskano i scharakteryzowano dwie, niezależne linie mutantów *deg2-2* oraz *deg2-3*, charakteryzujące się brakiem białka AtDeg2 oraz nieznacznie obniżonym poziomem proteazy AtDeg1, przy niezmiennych poziomach białek AtDeg5 i AtDeg8 (Luciński R i wsp. 2011. *New Phytol.*: 192: 74-86). Ponadto wyhodowano jedną linię mutantu *deg5-1*, pozbawioną białka AtDeg5, przy niezmiennym poziomie AtDeg1, AtDeg2 i AtDeg8 (Luciński R i wsp. 2011. *Plant Physiol. Biochem.*: 49: 311-320).

Z kolei w pracy poświęconej funkcjom heterokompleksu AtFtsH użyto dobrze już scharakteryzowanego w literaturze, pstrolistnego mutantu *var1-1*, pozbawionego proteazy AtFtsH5 (Luciński i Jackowski 2013, *J. Plant Physiol.* 170: 1082-1089).

Poszukując substratów dla proteaz chloroplastowych w warunkach stresowych postanowiono zawęzić obszar badań do białek wchodzących w skład fotosystemu II oraz jego głównej anteny energetycznej – LHCII. Zdecydowano się także na wybór określonych czynników stresowych takich jak: zasolenie, susza, wysoka oraz niska temperatura, zranienie tkanki liścia, a także wysokie natężenie światła.

W pierwszej fazie prac model eksperymentalny stanowiły odcięte liście dzikiego szczepu *Arabidopsis thaliana*, poddawane wspomnianym powyżej czynnikom stresowym. Z liści tych izolowano następnie tylakoidy i – stosując technikę wetsern-blot – analizowano zmiany poziomu wybranych białek, odnosząc uzyskiwane wyniki do wariantu kontrolnego, który stanowiły odcięte liście inkubowane przez czas adekwatny do badanego wariantu na szalkach z wodą przy zachowaniu komfortowych warunków naświetlenia, temperatury i wilgotności otoczenia. Na podstawie tak przeprowadzonych doświadczeń udało się wyselekcjonować pulę białek, których poziom obniżał się w trakcie inkubacji w określonych warunkach stresowych w sposób istotny statystycznie. Wykazano mianowicie, że poziom polipeptydów budujących główną antenę energetyczną PSII – LHCII, tj. Lhcb1 oraz Lhcb2 obniża się w warunkach suszy, niskiej temperatury oraz wysokiego natężenia światła, a poziom polipeptydu Lhcb3 spada w warunkach wysokiego natężenia światła (Lucinski R i Jackowski G 2013, *J. Plant. Physiol.* 170: 1082-1089). Zawartość apobiałek stanowiących mniejsze anteny energetyczne PSII tj. Lhcb5 i Lhcb6 obniża się pod wpływem zasolenia, suszy, niskiej i wysokiej temperatury oraz wysokiego natężenia światła, natomiast polipeptyd Lhcb4 wykazywał istotny statystycznie spadek jedynie w warunkach wysokiej temperatury (Luciński R i wsp. 2011. *New Phytol.* 192: 74-86). Z kolei spośród białek wchodzących w skład rdzenia PSII istotny statystycznie spadek wykazywały polipeptydy PsbA i PsbC (w warunkach zasolenia, suszy, zranienia tkanki liścia i niskiej temperatury), PsbD (w warunkach zranienia) oraz PsbF (w warunkach suszy, zranienia i niskiej temperatury; Luciński R i wsp. 2011, *Plant Physiol. Biochem.*: 49: 311-320).

Aby wykazać, że obserwowany *in vivo* spadek poziomu wyselekcjonowanych białek jest procesem enzymatycznym i sprawdzić, która z klas proteaz może być w ten proces zaangażowana przeprowadzono serię doświadczeń w odpowiednio skonstruowanym układzie *in vitro*. Do inkubacji *in vitro* używano tylakoidów wyizolowanych z liści roślin szczepu dzikiego, które poddane były wcześniej działaniu takich spośród stosowanych czynników

stresowych, które *in vivo* wywoływały zanik badanego polipeptydu. W tym celu skonstruowano układ, w którym tylakoidy były inkubowane w odpowiednim buforze z dodatkiem ATP przez 6 godzin, w ciemności. Po tym czasie oznaczano (wykorzystując technikę western-blot) poziom odpowiednich polipeptydów, przyjmując za 100% poziom badanego białka na początku inkubacji. Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej odpowiedniego inhibitora proteaz (aprotyniny dla proteaz serynowych lub fosforamidonu dla metaloproteaz) pozwoliło ustalić, czy w obserwowaną degradację polipeptydów zaangażowana jest proteaza typu serynowego, czy też metaloproteaza.

W efekcie wykazano, że w degradację polipeptydów Lhcb1 i Lhcb2, która *in vivo* zachodziła w warunkach suszy, niskiej temperatury oraz wysokiego natężenia światła, a także Lhcb3 degradowanego *in vivo* w warunkach wysokiego natężenia światła zaangażowana jest metaloproteaza, gdyż fosforamidon powodował zahamowanie obserwowanej degradacji (Lucinski R i Jackowski G 2013, *J. Plant. Physiol.* 170: 1082-1089). Z kolei w proteolizę apobiałka Lhcb6, ulegającego *in vivo* degradacji pod wpływem suszy, zasolenia, zranienia tkanki liścia, wysokiej temperatury i wysokiego natężenia światła okazała się być zaangażowana proteaza typu serynowego, ponieważ w tych przypadkach aprotynina prowadziła do zahamowania procesu jego degradacji (Luciński R i wsp. 2011, *New Phytol.* 192: 74-86). Również aprotynina hamowała degradację polipeptydów PsbA oraz PsbF, co oznacza, że degradacja tych białek zachodząca *in vivo* w warunkach zasolenia, suszy, i niskiej temperatury (PsbA) oraz zranienia tkanki liścia (PsbA i PsbF) także związana była z aktywnością proteaz typu serynowego (Luciński R i wsp. 2011, *Plant Physiol. Biochem.*: 49: 311-320).

Podsumowując ten etap prac można było stwierdzić, że możliwy jest udział jednej z chloroplastowych proteaz Deg w degradacji polipeptydu PsbF, uszkodzonego w efekcie zranienia tkanki liścia oraz polipeptydu Lhcb6, uszkodzonego na skutek ekspozycji liści roślin na stres suszy, zasolenia, zranienia tkanki liścia, wysokiej temperatury i wysokiego natężenia światła. Natomiast heterokompleks AtFtsH może być potencjalnie zaangażowany w degradację polipeptydów Lhcb1 i 2, zachodzącą w warunkach suszy, niskiej temperatury oraz wysokiego natężenia światła, a także Lhcb3 degradowanego w warunkach wysokiego natężenia światła.

Aby ostatecznie zweryfikować powyższe hipotezy porównano zachowanie wymienionych wyżej polipeptydów w szczepie dzikim i mutantach pozbawionych białka AtDeg2 (mutanty *deg2-2*, i *deg2-3*), AtDeg5 (mutant *deg5-1*) oraz AtFtsH5 (mutant *var1-1*) w stosownych warunkach stresowych.

Ostatecznie wykazano, że w degradację apobiałka Lhcb6, będącą następstwem uszkodzenia tego polipeptydu przez stres zasolenia, zranienia tkanki liścia, wysokiej temperatury i wysokiego natężenia światła zaangażowana jest proteaza AtDeg2 (Luciński R i wsp. 2011, *New Phytol.* 192: 74-86). Proteaza AtDeg5 z kolei odpowiada za degradację polipeptydu PsbF uszkodzanego w następstwie zranienia tkanki liścia (Luciński R i wsp. 2011, *Plant Physiol. Biochem.*: 49: 311-320). Z kolei heterokompleks AtFtsH uczestniczy w degradacji apobiałek Lhcb1 i Lhcb2 uszkodzanych w trakcie stresu suszy, niskiej temperatury i wysokiego natężenia światła oraz Lhcb3 w warunkach nadmiernie wysokiego natężenia światła (Lucinski R i Jackowski G 2013, *J. Plant. Physiol.* 170: 1082-1089).

Wykorzystując uzyskane informacje dotyczące degradacji polipeptydów Lhcb1 i 2, ale nie polipeptydu Lhcb3 w warunkach stresu suszy sprawdzono, w jaki sposób to zróżnicowanie degradacji apobiałek budujących główne anteny energetyczne PSII wpływać może na ewentualne zmiany w kompozycji składu białkowego trimerycznych subkompleksów wchodzących w skład LHCII. Stosując technikę niedenaturującego ogniskowania izoelektrycznego rozdzielono preparaty zespolonych błon tylakoidowych wyizolowanych z liści roślin szczepu dzikiego i mutantu *var1-1* poddanych wcześniej działaniu stresu suszy. W efekcie przeprowadzonego rozdziału uzyskano prążki różniące się wartością punktu izoelektrycznego i odpowiadające trzem różnym trimerycznym subkompleksom budującym LHCII. Subkompleksy te, oznaczone jako A, B i C zbudowane są z apobiałek Lhcb1 i Lhcb2 (subkompleksy A i B) lub z apobiałek Lhcb1, Lhcb2 i Lhcb3 (subkompleks C). Wykazano, że stres suszy nie powoduje zmian w składzie jakościowym owych subkompleksów, natomiast wyraźnie wpływa na zmianę stosunków ilościowych pomiędzy nimi, prowadząc do nadreprezentowania subkompleksu posiadającego w swojej budowie polipeptyd Lhcb3. Zgodnie z przyjmowaną koncepcją, u roślin wyższych anteny LHCII tworzą z rdzeniem PSII tzw. Superkompleksy PSII-LHCII, w których wyróżnić można dwa zasadnicze miejsca wiązania cząstek LHCII: S (od angielskiego strong) oraz M (moderate). Superkompleksy PSII-LHCII tworzą *in vivo* dimery, w ten sposób, że najpowszechniej występującą jego formą jest struktura typu C₂S₂M₂. Trimeryczne subkompleksy złożone jedynie z polipeptydów Lhcb1 i 2 zlokalizowane są w obrębie superkompleksów PSII-LHCII w miejscach S, natomiast subkompleks zawierający polipeptydy Lhcb1, 2 oraz 3 jest prawdopodobnie zlokalizowany w miejscu M. Z uzyskanych wyników wyłania się zatem obraz, zgodnie z którym stres suszy uszkodza jedynie polipeptydy Lhcb1 i 2, które budują subkompleksy LHCII-S, natomiast nie uszkodza tych które tworzą subkompleks LHCII-M. W efekcie dochodzi do rearanżacji superkompleksów PSII-LHCII w taki sposób, że subkompleksy LHCII-M są

nadreprezentowane w stosunku do subkompleksów LHCII-S. Ponieważ w mutancie *var1-1* nie dochodzi do degradacji polipeptydów Lhcb1 i Lhcb2, nie obserwuje się również powyższych rearanżacji. (Lucinski R i Jackowski G 2013, *J. Plant. Physiol.* 170: 1082-1089).

Drugim aspektem badań podejmowanym w pracach składających się na osiągnięcie habilitacyjne było poznanie roli jaką mogą odgrywać proteazy AtDeg w ontogenezie chloroplastów i całych liści *A. thaliana*. W ramach realizacji tego celu badawczego przeprowadzono szereg eksperymentów stosując podejście zwane odwrotna genetyką, w którym z charakterystyki roślin pozbawionych badanego białka wnioskuje się o jego fizjologicznych funkcjach. Badania prowadzone były na roślinach rosnących (szczep dziki oraz mutanty *deg2-2* i *deg2-3* oraz *deg5-1*) w komfortowych warunkach zarówno fotoperiodu krótkiego (8 godzin światła na dobę) jak i długiego (16 godzin światła na dobę). Zaznaczyć tutaj należy, że w trakcie rozwoju *Arabidopsis thaliana* w warunkach dnia długiego powstaje 9 liści w trakcie wegetatywnej fazy wzrostu, podczas gdy w warunkach dnia krótkiego liści takich jest zdecydowanie więcej. Liście te można ponumerować w kolejności ich pojawiania się, w związku z czym im niższy jest numer liścia tym jest on starszy. W badaniach nad roślinami rosnącymi w warunkach dnia krótkiego analizowane były jedynie liście od 1 do 9, podobnie jak w przypadku roślin rosnących w warunkach dnia długiego. Uzyskane wyniki dowodzą, że rośliny pozbawione proteazy AtDeg5 posiadają wyraźnie większe liście numer 5 i 6 niż rośliny szczepu dzikiego. Cecha ta jest niezależna od fotoperiodu, w którym hodowane były rośliny. Jednocześnie te większe liście mutantów *deg5-1* charakteryzowały się mniejszą powierzchnią przekroju komórek miękiszu palisadowego. Drugą charakterystyczną cechą mutantów *deg5-1* było wyraźne zaburzenie w dobowym metabolizmie skrobi. Manifestowało się ono obecnością dużych ilości skrobi w liściach mutantu pod koniec nocy, podczas gdy liście roślin szczepu dzikiego w tym samym czasie były już jej pozbawione. (Luciński R i wsp. 2011, *Plant Physiol. Biochem.*: 49: 311-320).

Wykazano także, że brak proteazy AtDeg2 u mutantów *deg2-2* i *deg2-3* skutkuje zwiększoną powierzchnią liści nr 3 i 4, co jest również efektem niezależnym od fotoperiodu, w którym rosły rośliny. Ponadto chloroplasty mutantów *deg2-2* oraz *deg2-3* z liści roślin 4-tygodniowych charakteryzowały się istotnie większą ilością tylakoidów przypadających na poszczególne grana w porównaniu do roślin szczepu dzikiego, a także zdecydowanie mniejszym polem przekroju plastoglobul i brakiem charakterystycznych dla tylakoidów roślin szczepu dzikiego pofałdowań i wpukleń błon tylakoidów. Dane te świadczą o tym, że u roślin pozbawionych proteazy AtDeg2 dochodzi do opóźnienia wejścia chloroplastów w początkowe etapy starzenia. Ponadto starsze liście (numer 3 i 4) mutantów *deg2*

charakteryzowały się wyraźnie większą wrażliwością na fotoinhibicję, co wskazuje na udział proteazy AtDeg2 w procesach związanych z obroną rośliny przed skutkami nadmiernie wysokiego natężenia światła (Luciński R i wsp. 2011, *New Phytol.* 192: 74-86).

Podsumowując, prace składające się na moje osiągnięcie habilitacyjne wnoszą, w mojej ocenie, istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczący funkcji proteaz chloroplastowych. Za szczególnie istotne uznałbym:

1. Wskazanie na nowe substraty fizjologiczne dla proteazy AtDeg2 (polipeptyd Lhcb6), proteazy AtDeg5 (polipeptyd PsbF) oraz dla heterokompleksu AtFtsH (apobiałka Lhcb1, 2, i 3).
2. Opisanie roli, jaką odgrywają proteazy AtDeg w ontogenezie *A. thaliana*, a mianowicie:
 - proteazy AtDeg2 oraz AtDeg5 pełnią istotną rolę w prawidłowym wzroście starszych liści,
 - proteaza AtDeg2 pełni istotną rolę w przebiegu ontogenezy chloroplastów, a także znacząco wpływa na fotoinhibicję starszych liści w warunkach stresu świetlnego,
 - obecność funkcjonalnej proteazy AtDeg5 jest ważna dla prawidłowego przebiegu dobowego metabolizmu skrobi,
 - proteaza AtDeg5 istotnie wpływa na wielkość komórek miękiszu palisadowego.

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

Poza publikacjami składającymi się na osiągnięcie habilitacyjne (wymienionymi w punkcie 3 autoreferatu) jestem współautorem 13 publikacji, z których 12 zostało opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, a jedna jest polskojęzyczną pracą przeglądową opublikowaną w czasopiśmie nieznajdującym się w bazie Journal Citation Reports. Jestem ponadto autorem dwu wystąpień ustnych na konferencjach krajowych oraz współautorem 37 doniesień na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Pozostając w kręgu zagadnień związanych z funkcjonowaniem chloroplastów, w szczególności zaś z problematyką fotosyntetyczną oraz proteazową, podejmowałem prace mające na celu analizę możliwych interakcji polipeptydu Lhca5 z rdzeniem fotosystemu I (PSI). Doświadczenia te prowadziłem w Umea Plant Science Center, w ramach mojego stażu podoktorskiego. Białka Lhca1-4 stanowią elementy budujące zewnętrzne anteny energetyczne

PSI. Zorganizowane są one w dwa heterodimeryczne kompleksy, z których jeden budują polipeptydy Lhca1 i Lhca4, drugi zaś tworzą polipeptydy Lhca2 i Lhca3. Będący przedmiotem zainteresowania polipeptyd Lhca5 ulega ekspresji na zdecydowanie niższym poziomie niż polipeptydy Lhca1-4. Jego dokładna lokalizacja w obrębie kompleksu PSI-LHCI była do tej pory niewyjaśniona. Na podstawie wyników doświadczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem mutantów pozbawionych białek Lhca1, Lhca2, Lhca3 i Lhca4, udało się skonstruować model zgodnie z którym polipeptyd Lhca5 oddziałuje z antenami LHCI w miejscu, w którym zlokalizowany jest heterokompleks Lhca2/Lhca4. Lhca5 może w tym miejscu być przyłączony zarówno jako monomer jak i jako homodimer. Co więcej, w przypadku braku polipeptydów Lhca1 lub Lhca4, dochodzi – jak wykazały moje doświadczenia – do zmiany aranżacji cząstek PSI-LHCI. Skutkiem takiej rearanżacji jest wiązanie się homodimeru Lhca5 do rdzenia PSI w miejscu, w którym normalnie występuje heterodimer Lhca1/Lhca4. Uzyskane wyniki pokazują dużą plastyczność wiązania polipeptydu Lhca5 do rdzenia PSI według modelu kompetytywnego, zależnego wprost od oddziaływań pomiędzy polipeptydami Lhca a rdzeniem PSI (Luciński i wsp. 2006).

W trakcie swojej pracy badawczej byłem zaangażowany również w pracę stawiającą sobie za cel sprawdzenie, czy ekspresja genów kodujących białkowe elementy proteolitycznych systemów funkcjonujących w obrębie chloroplastów i mitochondriów (m.in. geny kodujące białka AtClp, AtFtsH i AtDeg) ulega istotnym zmianom w trakcie aklimatyzacji roślin *A. thaliana* do zmieniających się warunków oświetleniowych. Spośród ponad 50 przeanalizowanych genów podczas aklimatyzacji roślin do nadmiernie wysokiego natężenia światła wzrostowi ulegała ekspresja jedynie genu kodującego regulatorową podjednostkę AtClpB3, natomiast gen kodujący proteazę AtDeg2 okazał się być jedynym, którego poziom ekspresji ulegał w tych warunkach obniżeniu. Hierarchiczna analiza skupień wykazała, że w badanych warunkach oświetleniowych gen *CLPB3* ulegał koekspresji z genami kodującymi czynniki transkrypcyjne PAP1, GBF6 oraz bHLH. Stwierdzono, że promotor genu *CLPB3* zawiera w swej strukturze fragmenty cis-regulatorowe, które mogą wiązać wszystkie trzy wymienione powyżej czynniki transkrypcyjne. Na podstawie analizy danych dotyczących szeregu długoterminowych stresów abiotycznych, dostępnych w publicznych, transkryptomicznych bazach danych postawiono hipotezę, że czynnik PAP1 może pełnić rolę pośredniczącą w zmianie ekspresji genu *CLPB3* wywoływaną przez zmianę warunków środowiskowych (Adamiec i wsp. 2011).

W obrębie zagadnień związanych z funkcjonowaniem chloroplastów mieszczą się również prace skupiające się na analizie dynamiki przenoszenia wzbudzenia elektronowego w

obrębie superkompleksów PSII-LHCII. W badaniach tych wykorzystywano homozygotyczne mutanty *A. thaliana* pozbawione proteazy AtDeg5 oraz białka Lhcb3. W obu przypadkach dokładna analiza zawartości wszystkich apobiałek Lhcb1-6 wykazała, że mutant *deg5* wykazywał obniżony o ok. 25% poziom apobiałka Lhcb6 przy jednoczesnym zachowaniu pozostałych Lhcb na poziomie niezmiennym w porównaniu do szczepu dzikiego. Mutant *lhcb3* wykazywał natomiast – poza brakiem apobiałka Lhcb3 – kompensacyjny wzrost poziomu apobiałek Lhcb1 i Lhcb2. Informacje te, wraz z wynikami czasowo-rozdzielczych pomiarów zaniku fluorescencji, zostały wykorzystane przy tworzeniu symulacji Monte Carlo, która pozwoliła wyznaczyć wartości parametrów molekularnych opisujących dynamikę przesyłania energii wzbudzenia elektronowego w obrębie PSII. Okazało się, że obniżenie o 25% poziomu apobiałka Lhcb6 (w mutancie *deg5*) skutkuje istotnym przyspieszeniem pułapkowania wzbudzenia elektronowego w obrębie PSII, co daje się tłumaczyć reorganizacją superkompleksów PSII-LHCII, wymuszoną zmniejszoną pulą Lhcb6. Ta reorganizacja miałaby polegać na przeniesieniu części trimerów LHCII związanych z rdzeniem PSII w miejscu M do tzw. puli trimerów wolnych (Gibasiewicz i wsp. 2015). Z kolei doświadczenia z wykorzystaniem mutanta *lhcb3* pokazały, że brak tego białka jest przez rośliny kompensowany przez dodatkowe kopie Lhcb1 i Lhcb2, które zastępują Lhcb3 w strukturze trimerów LHCII, złączonych z rdzeniem PSII w miejscu M. Prowadzi to do zmian w organizacji strukturalnej cząstek PSI-LHCII typu C₂S₂M₂, co skutkuje spowolnieniem średniego czasu zaniku fluorescencji. Wyniki uzyskane z symulacji Monte Carlo pozwalają przypuszczać, że apobiałko Lhcb3 pełni unikalną funkcję w przenoszeniu wzbudzenia elektronowego i apobiałka Lhcb1 i Lhcb2 nie mogą go w tej roli zastępować (Adamiec i wsp. 2015).

W ramach szeroko pojętego funkcjonowania chloroplastów mieści się również kolejna praca, której jestem współautorem, a która dotyczy różnego rodzaju zmian jakim podlega enzym karboksylaza/oksygenaza Rybulozo 1,5-bisfosforanu (Rubisco) na skutek zmiany natężenia światła, w którym rosną rośliny, z umiarkowanego na niskie (Grabsztunowicz i wsp. 2015). Sądzę, że głównym osiągnięciem tej pracy jest wykazanie, że zmiana natężenia światła z umiarkowanego na niskie prowadzi do powstawania agregatów dużej podjednostki Rubisco. Dzieje się tak na skutek wystąpienia łagodnego stresu oksydacyjnego, wywołanego obniżeniem natężenia światła. Efektem wspomnianej agregacji jest spadek aktywności karboksylacyjnej Rubisco. Jednocześnie przywrócenie roślinom wyjściowego (umiarkowanego) natężenia światła skutkuje zanikiem agregatów dużej podjednostki Rubisco i wzrostem aktywności karboksylacyjnej enzymu.

Odrębnym wątkiem mojej pracy badawczej były zagadnienia stanowiące niejako kontynuację tematyki podejmowanej w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej. Dotyczyły one głównie wybranych aspektów metabolizmu azotowego brodawek korzeniowych łubinu żółtego oraz wolnożyjących bakterii *Rhizobium* sp. (*Lupinus*). Stan wiedzy w tych obszarach opisany został w dwu pracach przeglądowych, z których jedna zajmuje się wpływem azotanów na symbiotyczne oddziaływania pomiędzy roślinami motylkowymi a bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Druga z prac przeglądowych poświęcona jest z kolei procesom dysymilacji azotanów i azotynów przeprowadzanych przez różne gatunki bakterii.

Wiadomym jest, że aktywność enzymu nitrogenazy, odpowiadającego u roślin motylkowych za wiązanie azotu cząsteczkowego, zależna jest – w dużym stopniu – od stężenia tlenu w obrębie brodawki korzeniowej. Z kolei dostępność tlenu do wnętrza brodawki jest limitowana przez korę brodawki, stanowiącą barierę dla dyfuzji gazów. Obecność azotanów może zmieniać oporność kory brodawki na dyfuzję gazów. Co więcej rizobia, które charakteryzują się wysoką aktywnością dysymilacyjnej reduktazy azotanowej są mniej wrażliwe, w warunkach symbiotycznych, na inhibicję nitrogenazy będącą skutkiem obecności azotanów w środowisku. Stąd też w pracy postawiłem tezę, że bakteroidowa reduktaza azotanowa katalizująca dysymilacyjną redukcję azotanów w istotny sposób poprawia funkcjonowanie bakteroidów (Luciński i wsp. 2002).

W ramach zagadnień związanych z metabolizmem azotowym roślin motylkowych zajmowałem się między innymi lokalizacją centrów redukcji azotanów i azotynów w roślinach łubinu żółtego, posiadających brodawki korzeniowe oraz w roślinach tych brodawek pozbawionych. Udało się wykazać, że w młodych siewkach azotany były akumulowane wyłącznie w korzeniach, które stanowiły jednocześnie jedyne miejsce ich redukcji. Powstające w wyniku redukcji azotanów jony azotynowe były natomiast transportowane do liści, gdzie zachodziła ich redukcja do jonów amonowych. Taki sam rozdział aktywności reduktazy azotanowej i azotynowej stwierdzono w roślinach posiadających brodawki korzeniowe. Jednakże dla roślin pochodzących z upraw polowych, w których poziom azotanów był na niskim poziomie, charakterystyczna była bardzo wysoka aktywność reduktazy azotanowej we frakcji brodawek korzeniowych. Poziom tej aktywności wielokrotnie przewyższał poziom aktywności korzeniowej reduktazy azotanowej. Wyniki takie sugerowały, że aktywność brodawkowej reduktazy azotanowej nie była indukowana bezpośrednio obecnością jonów azotanowych lecz, że proces indukcji jej aktywności odbywał się w sposób pośredni. Uwzględniając fakt, że zdecydowana większość aktywności reduktazy azotanowej lokalizowanej we frakcji brodawek korzeniowych jest pochodzenia bakteryjnego oraz fakt, że azotany występujące w glebie mogą

powodować stan hypoksji w korzeniu zaproponowano model, zgodnie z którym za indukcję niewspółmiernie wysokiej aktywności reduktazy azotanowej w brodawkach korzeniowych łubinu żółtego rosnącego w warunkach polowych odpowiada stan hypoksji pojawiający się na skutek obecności azotanów w glebie, w strefie brodawek korzeniowych (Polcyn i Luciński 2009).

Wspomniane powyżej dane dotyczące lokalizacji aktywności reduktazy azotanowej we frakcji brodawek korzeniowych pochodziły z wcześniejszej pracy, której jestem współautorem (Polcyn i Luciński 2001). W publikacji tej wykazano, że aktywność reduktazy azotanowej brodawki korzeniowej jest wielokrotnie wyższa niż analogiczna aktywność wykrywana w korzeniu i liściach. Przedstawiono dowody świadczące o tym, że ponad 97% aktywności reduktazy azotanowej zlokalizowanej w obrębie brodawki korzeniowej jest pochodzenia bakteroidowego. Ponadto w omawianej pracy przedstawiono wyniki badań świadczące o tym, że reduktaza azotanowa pochodząca z symbiotycznych komórek *Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*) posiada wiele cech charakterystycznych dla enzymów szlaku dysymilacji azotanów, a mianowicie: jest enzymem błonowym, wykorzystującym do redukcji azotanów elektrony pochodzące z NADH, jej aktywność jest inhibowana w warunkach tlenowych i wreszcie aktywność bakteroidowej reduktazy azotanowej nie jest zależna od podaży azotanów. W pracy wykazano także, stosując rotenon, który jest inhibitorem oksydoreduktazy NADH, że to właśnie ten kompleks enzymatyczny, a nie dehydrogenaza bursztynianowa jest głównym pośrednikiem w niezwykle wysokiej aktywności reduktazy azotanowej związanej z podażą bursztynianu. Ponadto przedstawione w pracy doświadczenia z wykorzystaniem pirogrognianu, jabłczanu oraz ketoglutaranu jako potencjalnych donorów elektronów do redukcji azotanów pozwoliły postawić tezę, zgodnie z którą możliwa jest sytuacja, w której duża część cyklu kwasów trójkarboksylowych (TCA) nie jest potrzebna do przeprowadzania redukcji azotanów w bakteroidach, a niezbędne źródło elektronów dla tego procesu stanowią alternatywne szlaki metaboliczne.

Drugi watek prac związanych z różnymi aspektami metabolizmu azotowego układu symbiotycznego rizobiów z roślinami motylkowymi, obejmował badania nad wolnożyjącymi komórkami rizobiów. Głównym przedmiotem zainteresowania były oczywiście enzymy szlaku dysymilacji azotanów i azotynów oraz ich relacje z wiązaniem azotu cząsteczkowego. W pracy przeglądowej, opisującej różne szlaki dysymilacyjne obecne w komórkach *Paracoccus denitrificans*, *Escherichia coli* oraz *Bacillus subtilis* zwrócono uwagę na denitryfikację jako potencjalne źródło ATP dla wiązania azotu cząsteczkowego (Polcyn i Luciński 2004).

W trakcie badań nad redukcją azotanów i azotynów przeprowadzaną przez wolnożyjące komórki *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) wykazano, że bakterie te zdolne są do redukcji azotanów zarówno przy dostępności tlenu, jak i w warunkach anaerobowych, jednakże tlenowa redukcja azotynów jest niewrażliwa na inhibicję jonami amonowymi. Z kolei beztlenowa redukcja azotanów i azotynów związana jest z produkcją energii metabolicznej. Wykazano także, że toksyczność azotynów jest przyczyną dla której jedynie stężenia poniżej 2mM zarówno azotanów jak i azotynów zapewniają linearną zależność pomiędzy konsumpcją tych jonów przez rizobia a przyrostem biomasy hodowli. Co więcej obecność w pożywce azotanów w stężeniu początkowym powyżej 5mM prowadziła do akumulacji stechiometrycznych ilości azotynów, które pozostawały w pożywce nie będąc dalej redukowane. Wynik taki skłonił do postawienia hipotezy o inhibicyjnym wpływie azotanów na aktywność reduktazy azotynowej na skutek konkurencji tego enzymu z reduktazą azotanową o pulę elektronów. Hipotezę tą potwierdziły wyniki doświadczeń analizujące konsumpcję azotanów w obniżonej temperaturze. W takich warunkach powstające stechiometrycznie azotyny były metabolizowane nawet przy początkowym stężeniu azotanów wynoszącym 10mM.

Jednakże największą wartością pracy jest wykazanie, po raz pierwszy w literaturze, że rizobia zdolne są do przeprowadzania procesu dysymilacyjnej amonifikacji. Proces ten prowadzi do powstania jonów amonowych z jonów azotanowych i/lub azotynowych w warunkach beztlenowych i wiąże się z koniecznością istnienia w badanych komórkach bakteryjnych dodatkowej reduktazy azotynowej typu dysymilacyjnego. Dokładniejsze wyliczenia przeprowadzone na podstawie wykonanych doświadczeń pozwoliły oszacować, że wspomniana dysymilacyjna amonifikacja wykorzystuje około 40% dostępnych w hodowli jonów azotanowych (Polcyn i Luciński 2003).

Ostatnim aspektem pracy nad redukcją azotanów przeprowadzaną przez komórki *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) była szczegółowa charakterystyka kompleksów reduktazy azotanowej występujących u tej bakterii w stanie wolnożyjącym i symbiotycznym. Udało się uzyskać eksperymentalne dowody świadczące o obecności u badanej bakterii dwu kompleksów enzymatycznych wykazujących aktywność reduktazy azotanowej. Oba te kompleksy (różniące się między sobą masą cząsteczkową: 140kDa i 190kDa) zlokalizowane są w błonie komórkowej, co w połączeniu z ich specyficzną zdolnością do redukcji zarówno azotanów jak i chloranów oraz wrażliwość na mikromolarne stężenia azydku przemawia za tym, że są to enzymy typu dysymilacyjnego. Co więcej oba te kompleksy białkowe zostały wyizolowane i oczyszczone, co pozwoliło na uzyskanie specyficznych przeciwciał. Wykorzystując otrzymane przeciwciała pokazano, że oba kompleksy enzymatyczne charakteryzują się wysokim

podobieństwem immunologicznym i składają się z trzech podjednostek o masach około 126-, 65- i 25-kDa. Na podstawie przedstawionych w pracy wyników prac eksperymentalnych postawiono więc hipotezę, że obserwowane dwa kompleksy enzymatyczne mogą, w rzeczywistości, stanowić dwie różne formy tego samego enzymu. (Polcyn i Luciński 2006).

Podsumowując tą część mojego dorobku naukowego (niewchodzącą w skład osiągnięcia naukowego) za najistotniejsze jego elementy uważam: pokazanie miejsca łączenia polipeptydu Lhca5 do cząstek PSI-LHCI oraz dużej plastyczności tego procesu; wykazanie zdolności rizobiów do przeprowadzania procesu dysymilacyjnej amonifikacji oraz zwrócenie uwagi na proces dysymilacji azotanów jako źródła energii dla wiązania azotu cząsteczkowego i szczegółową charakterystykę enzymów tego szlaku w komórkach *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).

Zacytowana literatura:

Adamiec M, Gibasiewicz K, Luciński R, Giera W, Chełminiak P, Szewczyk S, Sipińska W, van Grondelle R, Jackowski G. 2015, Excitation energy transfer and charge separation are affected in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking light-harvesting chlorophyll a/b binding protein Lhcb3. *J Photochem Photobiol B.*: 153: 423-428.

Adamiec M, Luciński R, Jackowski G. 2011, The irradiance dependent transcriptional regulation of AtCLPB3 expression. *Plant Science* 181: 449-456.

Baranek M, Grabsztunowicz M, Sikora B, Jackowski G. 2011. Zależne od ATP proteazy chloroplastowe FtsH I Lon. *Post. Bioch.* 57: 101-108.

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: 857 - 64.

Chen L, Li Q, Li L. 2014. The modelled structures of Deg5 and Deg8 proteases in *Arabidopsis thaliana*. *Turkish Journal of Biology* 38: 168-176.

Clarke A. 2005. Plant proteases – an appetite for destructin. *Plant Physiol.* 123: 359-361.

Clausen T, Southan C, Erhmann M. 2002. The HtrA family proteases: implications for protein composition and cell fate. *Moll. Cell* 10: 443 - 455.

Gibasiewicz K, Adamiec M, Luciński R, Giera W, Chełminiak P, Szewczyk S, Sipińska W, Głów E, Karolczak J, van Grondelle R, Jackowski G. 2015, Monte Carlo simulations of excitation and electron transfer in grana membranes. *Biochim Biophys Acta.*: 1847, 314-327. (IF₂₀₁₅=5,353, MNiSW=35)

Grabsztunowicz M, Górski Z, Luciński R, Jackowski G. 2015, A reversible decrease in ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase carboxylation activity caused by the aggregation of the enzyme's large subunit is triggered in response to the exposure of moderate irradiance-grown plants to low irradiance. *Physiol. Plant.*: 154: 591-608.

Grabsztunowicz M, Luciński R, Baranek M, Sikora B, Jackowski G. 2011, Proteazy chloroplastowe Deg. *Postępy. Biochemii* 57: 109-114.

Hausuhl K, Andersson B, Adamska I. 2001. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J.* 20: 713 - 722.

Huesgen P.F, Schuhmann H, Adamska I. 2006. Photodamaged D1 protein is degraded in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking the Deg2 protease. *FEBS Lett.* 580: 6929 - 6932.

- Jagodzik P, Adamiec M, Jackowski G. 2014. AtDeg2- a chloroplast protein with dual protease/chaperone activity. *Acta Soc. Bot. Pol.* 83: 169-174.
- Kapri-Pardes E, Naveh L, Adam Z. 2007. The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:1039-47.
- 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. *Nature Struct. Mol. Biol.* 18: 728-731.
- Luciński R, Jackowski G. 2013, AtFtsH heterocomplex-mediated degradation of apoproteins of the major light harvesting complex of photosystem II (LHCII) in response to stresses. *J. Plant. Physiol.* 170: 1082-1089.
- Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G. 2011, Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. *Plant Physiol. Biochem.:* 49: 311-320.
- 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.
- Luciński R, Polcyn W, Ratajczak L. 2002, Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium – Legumes. *Acta Bioch. Pol.* 49: 537-546.
- Luciński R, Schmidt VHR, Jansson S, Klimmek F. 2006, Lhca5 interaction with plant photosystem I. *FEBS Letters* 580, 6485-6488.
- Moldavski O, Levin-Kravets O, Ziv T, Adam Z, Prag G. 2012. The hetero-hexameric nature 607 of a chloroplast AAA⁺ FtsH protease contributes to its thermodynamic stability. 608. *PLoS One*.7:e36008. 609.
- Peltier J.B, Emanuelsson O, Kalume D.E, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles D.A, Soderberg L. 2002. Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14: 211 - 236.
- Polcyn W, Lucinski R. 2001, Functional similarities of nitrate reductase from yellow lupine bacteroids to bacterial denitrification systems. *J. Plant Physiol.* 158: 829-834.
- Polcyn W, Luciński R. 2003, Aerobic and anaerobic nitrate and nitrite reduction in free-living cells of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). *FEMS Microbiol. Lett.* 226: 331-337.
- Polcyn W, Luciński R. 2004, Zróżnicowanie strukturalne i regulacyjne bakteryjnej dysymilacji azotanów i azotynów. *Postępy. Mikrobiologii* 52, 205-224.
- Polcyn W, Luciński R. 2006, Dissimilatory nitrate reduction in free-living and symbiotic cells of *Bradyrhizobium* sp.(*Lupinus*). Subcellular location, catalytic properties and characterization of the active enzyme forms. *Curret Microbiology*, 52, 231-237.
- Polcyn W, Luciński R. 2009, Effect of N oxyanions on anaerobic induction of nitrate reductase in subcellular fractions of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). *Antonie van Leewenhoek* 95: 159-164.
- Polcyn W, Luciński R. 2009, Main centers of nitrate and nitrite reduction in young and nadulated yellow lupine (*Lupinus luteus*). *Acta Physiol. Plant.:* 31, 605-610.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38: 227–233.
- Sakamoto W, Tamura T, Hanba-Tomita Y, Murata M, Sodmergen. 2002. The *VAR1* locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. *Genes Cells* 7: 769-780.
- Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y. 2003. Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell* 15: 2843-2855.

- Schubert M, Petersson U.A, Haas B.J, Funk C, Schröder W.P, Kieselbach T. 2002. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 8354 - 8365.
- Schuhmann H, Adamska I. 2011. Deg proteases and their role in protein quality control and processing in different subcellular compartments of plant cell. *Physiol. Plant.* 145: 224-234.
- Schuhmann H, Huesgen P, Adamska I. 2012. The family of Deg/HtrA proteases in plants. *BMC Plant Biology* 12: 52-66.
- Sun R, Fan H, Gao F, Lin Y, Zhang L, Gong W, Liu L. 2012. Crystal structure of Arabidopsis Deg2 protein reveals an internal PDZ ligand locking the hexameric resting state. *J. Biol. Chem.* 287: 37564-37569.
- Sun X, Fu T, Chen N, Guo J, Ma J, Zou M, Lu C, Zhang L. 2010. The stromal Chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 152: 1263-1273.
- Sun X, Peng L, Guo J, Chi W, Ma J, Lu C, Zhang L. 2007a. Formation of DEG5 and DEG8 and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19: 1347-1361.
- Sun XW, Wang LY, Zhang LX. 2007b. Involvement of Deg5 and Deg8 proteases in the turnover of the photosystem II reaction center under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Chin. Sci. Bull.* 52: 1742 - 5.
- Tanz S.K, Castleden I, Hooper C.M, Small I, Millar H.A. 2014. Using the SUB cellular database for *Arabidopsis* proteins to localize the Deg protease family. *Frontiers in Plant Science* doi: 10.3389/fpls.2014.00396.
- Tomizioli M, Lazar C, Brugière S, Burger T, Salvi D, Gatto L, Moyet L, Breckels L.M, Hesse A.M, Lilley K.S, Seigneurin-Berny D, Finazzi G, Rolland N, Ferro M. 2014. Deciphering thylakoid sub-compartments using a mass spectrometry-based approach. *Mol. Cell Proteomics* 13: 2147-2167.
- Želisko 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. U. S. A.* 102: 13699-13704
- Zienkiewicz M, Ferenc A, Wasilewska W, Romanowska E. 2011. High light stimulates Deg1-dependent cleavage of the minor LHCII antenna proteins CP26 and CP29 and the PsbS protein in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 235: 279 - 288.

Želisko