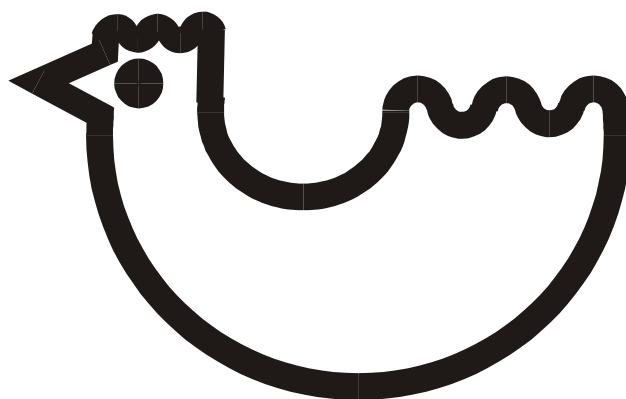




**POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOFIZYCZNE**

ODDZIAŁ LUBELSKI



KAZIMIERZ 2024

PTBF Lublin

XXIX Lubelskie Warsztaty Biofizyczne
Kazimierz nad Wisłą
23-24 maja 2024 r.

Materiały konferencyjne

Organizatorzy konferencji:

Polskie Towarzystwo Biofizyczne Oddział w Lublinie

Komitet Organizacyjny

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS

Dr Monika Zubik-Duda

Dr hab. Wojciech Grudziński, prof. UMCS

Nakład: 35 egz.

SPIS TREŚCI

BIOFIZYKA NOWOTWORÓW MÓZGU – OD REOLOGII PO NANOSPEKTROSKOPIĘ	5
<i><u>Katarzyna Pogoda</u></i>	
ABCA1 MODIFIES THE PLASMA MEMBRANE ORGANIZATION OF LIVING CELLS	6
<i>Mateusz Kondratowicz, Ambroise Wu, Ewa Grela, Olga Raducka-Jaszul, Rafał Luchowski, Ewa Błaszczak, Karolina Wójtowicz, Yannick Hamon, Wiesław I. Gruszecki, Katarzyna Cieślik-Boczula and <u>Tomasz Trombik</u></i>	
WPŁYW NAWODNIENIA NA LATERALNĄ ORGANIZACJĘ BIOMIMETYCZNYCH BŁON KOMÓRKOWYCH.....	7
<i><u>Emilia Krok</u>, Henri G. Franquelim, Petra Schwille i Łukasz Piatkowski</i>	
DŁUGODYSTANSOWE SYGNAŁY ELEKTRYCZNE I FALE WAPNIOWE U MODELOWEGO WĄTROBOWCA <i>MARCHANTIA POLYMORPHA</i>	8
<i>Kenshiro Watanabe, Mateusz Koselski, Piotr Waśko, Kazuyuki Kuchitsu i <u>Kazimierz Trębacz</u></i>	
BŁONY SZEŚCIENNE PLASTYDÓW - IDENTYFIKACJA I ŚCIEŻKI ICH STRUKTURALNYCH TRANSFORMACJI NA PRZYKŁADZIE GYROIDU	9
<i><u>Łucja Kowalewska</u>, Anna Węgrzyn, Joanna Wójtowicz, Michał Bykowski, Alicja Bukat, Karina Kwapiszewska i Radosław Mazur</i>	
W POSZUKIWANIU BIOCHEMICZNYCH CZYNNIKÓW POWIĄZANYCH Z PROCESEM TRANSFORMACJI LAMELLARNO-SZEŚCIENNEJ BŁON TYLAKOIDÓW	10
<i><u>Radosław Mazur</u>, Anna Węgrzyn, Joanna Wójtowicz, Michał Bykowski, Alicja Bukat, Katarzyna Tratkiewicz, Karina Kwapiszewska i Łucja Kowalewska</i>	
JAK TRAKTOWAĆ NIEKTÓRE “ZWIERZĘTA”?	11
<i><u>Andrzej Pelc</u></i>	
ROLA CHOLESTEROLU I TRATW LIPIDOWYCH W PROCESIE FUZJI BŁONOWEJ	12
<i><u>Hanna Orlikowska-Rzeźnik</u>, Emilia Krok, Maria Domańska, Piotr Setny, Anna Łągowska, Madhurima Chattopadhyay i Łukasz Piątkowski</i>	
WPŁYW ŻEŃSKICH HORMONÓW STEROIDOWYCH NA WŁAŚCIWOŚCI BIOFIZYCZNE BIOMIMETYCZNYCH BŁON KOMÓRKOWYCH.....	13
<i><u>Anna Łągowska</u>, Hanna Orlikowska-Rzeźnik, Emilia Krok i Łukasz Piątkowski</i>	
INTERACTION OF NATAMYCIN WITH YEAST MEMBRANES STUDIED BY SPECTROSCOPY AND LABEL-FREE FLUORESCENCE IMAGING	14
<i><u>Maria Szomek</u>, Vibeke Akkerman, Douglas F. Covey, Peter Müller and Daniel Wüstner</i>	

JAK AMFOTERYCYNA B DOSTAJE SIĘ DO BŁON KOMÓRKOWYCH I CO TAM ROBI?	15
<i><u>Sebastian Janik</u>, Rafał Luchowski, Ewa Grela, Wojciech Grudzinski i Wiesław I. Gruszecki</i>	
BADANIA NAD PROCESEM WYTWARZANIA CEMENTÓW ZAWIERAJĄCYCH ODPADY Z ENERGETYKI WIATROWEJ	16
<i><u>Sandra Bulińska</u>, Michał Pyzalski i Agnieszka Sujak</i>	
POTENCJAŁ OKSYDOREDUKCYJNY I WPŁYW NAJBLIŻSZEGO OTOCZENIA BIAŁKOWEGO JAKO CZYNNIKI KONTROLUJĄCE FUNKCJONALNOŚĆ CHINONÓW	17
<i><u>Magdalena Łazicka</u>, Michał Kamiński i Maciej Garstka</i>	
BADANIA STRUKTURALNE KOMPLEKSU LHCII ZE SZPINAKU METODAMI TRÓJWYMIAROWEJ DYFRAKCJI ELEKTRONOWEJ (3D-ED)	18
<i><u>Michał Kamiński</u>, Magdalena Łazicka, Marlena Kisiąta, Tomasz Góral, Maciej Garstka i Paulina Maria Dominiak</i>	
FLUORESCENCJA CHLOROFILU JAKO WYZNACZNIK WYDAJNOŚCI FOTOSYNTETYCZNEJ JĘCZMIENIA W ZMIENNYCH WARUNKACH WZROSTU	19
<i><u>Karolina Okoń</u> i Artur Nosalewicz</i>	

Biofizyka nowotworów mózgu – od reologii po nanospektroskopię

Katarzyna Pogoda

Zakład Fizyki Biologicznej i Nanospektroskopii, Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego
Polskiej Akademii Nauk, ul. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków, Polska

Mózg jest jedną z najbardziej miękkich tkanek ludzkiego organizmu. Pod wpływem ściskania, rozciągania lub ścinania zachowuje się jak materiał lepkosprężysty, przy czym jego odpowiedź na ścinanie proste często różni się od odpowiedzi na kompresję jednoosiową. Pomimo swej naturalnej miękkości tkanka mózgowa sztywnieje podczas kompresji, a pojedyncze komórki są narażone na działanie dużych naprężeń mechanicznych. Pojawia się zatem pytanie, w jaki sposób komórki mózgu adaptują się do zwiększonej sztywności i jak przekłada się to na ich funkcjonowanie. Jednocześnie, tkanka mózgu charakteryzuje się dużą lepkością, a reakcja komórek na wzrost sztywności ich otoczenia jest odmienna od reakcji na zmieniającą się lepkość. Dzięki intensywnym pracom nad syntezą nowych biomateriałów do hodowli komórkowych można przebadać odpowiedź komórek mózgu na zmieniający się moduł sprężystości lub lepkości ich otoczenia w sposób niezależny. W swoim referacie omówię własności biomechaniczne tkanki mózgu, a następnie pokażę jak uwzględnienie zmieniających się parametrów mechanicznych tkanek i komórek może zmienić badania nad rozwojem i leczeniem nowotworów. W ostatniej części przedstawię możliwości badania błon plazmatycznych prawidłowych oraz rakowych komórek mózgu w odniesieniu do ich składu biochemicznego oraz własności mechanicznych.

ABCA1 modifies the plasma membrane organization of living cells

**Mateusz Kondratowicz^a, Ambroise Wu^b, Ewa Greła^{c,d},
Olga Raducka-Jaszul^e, Rafał Luchowski^c, Ewa Błaszczak^f, Karolina Wójtowicz^b, Yannick
Hamon^g, Wiesław I. Gruszecki^c, Katarzyna Cieślik-Boczula^a and Tomasz Trombik^{b,f}**

^aFaculty of Chemistry, University of Wrocław, Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław, Poland

^bDepartment of Biophysics, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław, Poland

^cDepartment of Biophysics, Faculty of Mathematics, Physics and Computer Science, Maria Curie-Skłodowska University, M. Curie-Skłodowska Square 1, 20-031 Lublin, Poland

^dDivision of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Faculty of Physics, University of Warsaw, Pasteura 5, 02-093 Warsaw, Poland (Present address for Ewa Greła)

^eDepartment of Cytobiochemistry, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław, Poland

^fDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medical Sciences, Medical University of Lublin, W. Chodźki 1, 20-093 Lublin, Poland (Present address for Tomasz Trombik)

The plasma membrane, composed mostly of lipids and proteins, is not only a selective barrier protecting the cells from their extracellular environment but also a critical element for many cellular events. The composition, organization and molecular dynamics of the plasma membrane are required for cellular homeostasis maintenance and have important functional consequences for the cell. Here, we show the importance of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), a key player in cellular lipid and cholesterol metabolism, in the plasma membrane organization and dynamics. Using a combination of molecular spectroscopy techniques, such as fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM), fluorescence anisotropy and spot variation fluorescence correlation spectroscopy (svFCS), together with nuclear magnetic resonance (NMR), we show that ABCA1 is at the origin of the alterations in the lipid distribution within the plasma membrane of living cells, therefore, affecting its pre-existing lipid-raft nanodomain organization.

Keywords: plasma membrane organization, ABCA1, FLIM, NMR, svFCS

Wpływ nawodnienia na lateralną organizację biomimetycznych błon komórkowych

Emilia Krok¹, Henri G. Franquelim^{2,3}, Petra Schuille² i Łukasz Piatkowski¹

¹Poznan University of Technology, Faculty of Materials Engineering and Technical Physics, Institute of Physics, Piotrowo 3, 60-965 Poznan, Poland

²Department of Cellular and Molecular Biophysics, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany

³Leipzig University, Research and Transfer Center for Bioactive Matter, Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig, Germany

Powstawanie separacji fazowej w obrębie błon biologicznych i wymiary domen fazy L_o zależą od wzajemnych oddziaływań molekularnych między składnikami błony, wśród których możemy wyróżnić interakcje lipid-lipid i lipid-białko. Co więcej, na lateralną segregację błon wpływają czynniki środowiska zewnętrznego, takie jak temperatura, pH [1] czy nawodnienie [3]. W naszych badaniach skupiliśmy się na tym ostatnim czynniku, jakim jest obecność wody - cząsteczki niezbędnej do podtrzymania życia we wszystkich organizmach.

W przedstawionych badaniach [3], biomimetyczne błony komórkowe eksponowane były na zmienne warunki nawodnienia, w wyniku czego zaobserwowano znaczącą zmianę kształtu domen L_o , których stawały się mniej okrągłe wraz z obniżaniem nawodnienia. Analiza intensywności znakowania fazy L_d sondą fluorescencyjną DOPE-Atto 633 w obszarach fazy L_o , wskazała na zwiększoną migrację lipidów tworzących fazę L_d do wnętrza domen błonowych. Aby przewyższyć limit dyfrakcyjny, nieodłącznie związany z obrazowaniem mikroskopią fluorescencyjną i zbadać reorganizację strukturalną błony w nanoskali, przeprowadziliśmy pomiary AFM. Analiza profili wysokości pozwoliła na obliczenie niedopasowania hydrofobowego między fazami, które było 2-krotnie niższe dla całkowicie wysuszonej membrany niż dla w pełni nawodnionej. Było to związane z 3-krotnym spadkiem napięcia liniowego na granicy faz L_o i L_d (z ang. *line tension*). Co ważne, proces ten był całkowicie odwracalny, a po ponownym nawodnieniu niedopasowanie pomiędzy fazami powróciło do wartości początkowej.

Przedstawione badania przyczyniają się do lepszego zrozumienia procesów, które wymagają przejściowego, lokalnego odwodnienia błon komórkowych, takich jak endo- i egzocytoza, wnikanie wirusów, czy zapłodnienie komórki. Ponadto pionierskie pomiary AFM w zmiennych warunkach nawodnienia, z powodzeniem mogą być stosowane do badania innych modelowych systemów komórkowych.

[1] Emilia Krok et al. J. Mol. Liq., **2022**, 345, 117907

[2] Chattopadhyay et al. J. Am. Chem. Soc. **2021**, 143, 36, 14551–14562

[3] Emilia Krok et al. Nanoscale, **2024**, 16, 72-84

Długodystansowe sygnały elektryczne i fale wapniowe u modelowego wątrobowca *Marchantia polymorpha*

Kenshiro Watanabe¹, Mateusz Koselski², Piotr Waśko², Kazuyuki Kuchitsu¹
i Kazimierz Trębacz²

¹Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, Japan

²Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki, Instytut Nauk Biologicznych, UMCS, Lublin

Wątrobowiec *Marchantia polymorpha* należy do najstarszych ewolucyjnie roślin lądowych. Od 2017 roku znany jest pełny genom tej rośliny. Istnieją też efektywne metody transformacji genetycznej *M. polymorpha*. Wspólnie z grupą prof. Kazuyuki Kuchitsu z Tokyo University of Science przeprowadziliśmy badania mające na celu określenie dynamiki i mechanizmu molekularnego długodystansowych odpowiedzi tej rośliny na bodźce zewnętrzne. Skonstruowano mutantą *M. polymorpha* typu GCaMP wykazującego fluorescencję w zakresie zieleni pod wpływem wzrostu poziomu Ca^{2+} w cytoplazmie, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Stwierdzono, że stymulacja mechaniczna – punktowe nakłucie i bodźce elektryczne wywołują rozprzestrzeniające się zmiany potencjału powierzchniowego typu potencjału czynnościowego, AP oraz fale zmian $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ [1]. Zakres i dynamika tych zmian są niemal identyczne, co świadczy o wzajemnym powiązaniu obu zjawisk.

Wykazano, że inhibitory kanałów wapniowych, LaCl_3 i potasowych, TEACl powodują blokadę rozprzestrzeniania się zarówno AP jak i fal $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Ponadto, wykazano, że podobna blokada ma miejsce u mutantą *Mp glr* z wyłączonym genem kodującym kanał-receptor glutaminianu przepuszczający jony Ca^{2+} [1]. Świadczy to o udziale strumieni Ca^{2+} i K^+ we wczesnych etapach odpowiedzi na bodźce u *M. polymorpha*.

Zbadano też udział kanałów typu TPC w powstawaniu i rozprzestrzenianiu się AP i fal wapniowych. Wcześniej określono, że genom *M. polymorpha* posiada trzy geny kodujące kanały TPC i że tylko produkt jednego z nich, *MpTPC1* jest aktywny – odpowiada za przepływ kationów, w tym Ca^{2+} , przez błonę wakuolarną [2]. Nie zaobserwowano zmian tempa i zakresu rozprzestrzeniania się AP i fal zmian $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ u mutantów z wyłączonymi genami kodującymi białka TPC1, TPC2 i TPC3, co jednoznacznie wykluczyło udział tych kanałów w badanych zjawiskach [1].

[1] Watanabe K., Hashimoto K., Hasegawa K., Shindo H., Tsuruda Y., Kupisz K., Koselski M., Wasko P., Trębacz K., Kuchitsu K. (2024) Rapid propagation of Ca^{2+} waves and electrical signals in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* DOI10.1093/pcp/pcad159.

[2] Hashimoto, K., Koselski, M., Tsuboyama, S., Dziubinska, H., Trębacz, K., Kuchitsu, K. (2022) Functional analyses of the two distinctive types of two-pore channels and the slow vacuolar channel in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* 63: 163-175.

Błony sześciennie plastydów - identyfikacja i ścieżki ich strukturalnych transformacji na przykładzie gyroidu

**Łucja Kowalewska¹, Anna Węgrzyn¹, Joanna Wójtowicz¹, Michał Bykowski¹,
Alicja Bukat¹, Karina Kwapiszewska² i Radosław Mazur³**

¹Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, Polska

²Instytut Chemii Fizycznej, Polska Akademia Nauk, ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa, Polska

³Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, Polska

Błony komórkowe mają zdolność do samoorganizacji w różne morfologie, z których najbardziej złożone to okresowe układy zwane błonami sześciennymi. Strukturalnie błony sześciennie zbliżone są do potrójnie okresowych powierzchni minimalnych, dobrze znanych w geometrii różniczkowej. Choć takie złożone układy błonowe występują u różnych organizmów od pierwotniaków do ssaków, wiedza na temat strukturalnych mechanizmów prowadzących do ich tworzenia i dalszej transformacji w inne morfologie błon jest ograniczona. Ze względu na skalę wielkości pojedynczych jednostek strukturalnych błon sześciennych (około 50–500 nm) i ich płynną naturę, analiza metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) 2D i 3D pozostaje złotym standardem badania ich nanostrukturalnych cech.

Podczas prezentacji przedstawię metody identyfikacji sześciennych układów błonowych wizualizowanych metodą TEM i ich przyporządkowania do odpowiednich typów powierzchni minimalnych - P (prymityw), D (diament) i G (gyroid) - z wykorzystaniem oprogramowania SPIRE. Na przykładzie układu gyroidu występującego na terenie dojrzałych chloroplastów mutanta *stn7 Arabidopsis thaliana* przedstawię ponadto strukturalną ścieżkę transformacji lamellarno-sześciennie-lamellarnej w odpowiedzi na cykl dzień/noc.

W poszukiwaniu biochemicznych czynników powiązanych z procesem transformacji lamellarno-sześcienniej błon tylakoidów

Radosław Mazur¹, Anna Węgrzyn², Joanna Wójtowicz², Michał Bykowski², Alicja Bukat², Katarzyna Tratkiewicz², Karina Kwapiszewska³ i Łucja Kowalewska²

¹Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, Polska

²Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, Polska

³Instytut Chemii Fizycznej, Polska Akademia Nauk, ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa, Polska

Wewnętrzne błony plastydów dojrzałych chloroplastów tworzą spłaszczoną strukturę lamellarną uformowaną z tylakoidów gran i tylakoidów stromy. Ten charakterystyczny układ pozostaje jedynym opisanym dotąd typem struktury błon roślinnych chloroplastów. Ostatnio odkryliśmy, że w pełni rozwinięta sieć błon chloroplastów *Arabidopsis thaliana* u dwóch mutantów w ścieżkach regulacji procesu fotosyntezy (*stn7* i *aba1-6*) może również przyjąć konfigurację wysoce periodycznej błony sześcienniej o typie gyroidu. Aby odszyfrować molekularne podstawy przejścia lamellarno-sześciennego, określiliśmy skład, modyfikacje i organizację kompleksów białkowych oraz skład lipidów polarnych i barwników błon tylakoidów. W trakcie mojej prezentacji przedstawię wyniki kompleksowej analizy składu błon tylakoidów przyjmujących strukturę sześcienną i lamellarną, które wskazują na kluczową rolę zmian w ładunku powierzchniowym błon tylakoidów w procesie inicjacji transformacji lamellarno-sześcienniej oraz rolę składnika lipidowego w dalszych etapach tego procesu. Na koniec zaproponuję rolę biologiczną badanej struktury gyroidu.

Jak traktować niektóre “zwierzęta”?

Andrzej Pelc

Maria Curie-Skłodowska University, Department of Biophysics, Mass Spectrometry Laboratory,
Pl. M. C.-Skłodowskiej 1, 20-031 Lublin, e-mail: Andrzej.Pelc@mail.umcs.pl

W wyniku oddziaływania wysokoenergetycznego promieniowania z ośrodkiem biologicznym powstaje duża liczba elektronów wtórnych o energii kinetycznej od 0 do kilkuset elektronowoltów (eV). Spośród tych wtórnych elektronów największy udział mają elektrony o niskiej energii - poniżej 20 eV, które mogą powodować rozerwanie nici DNA. Wiadomo również, że wydajność rozerwania wiązań w DNA zależy od początkowej energii kinetycznej elektronów. Co ciekawe, te niskoenergetyczne elektrony mają średnią energię bliską 9–10 eV. W badaniach DNA w fazie skondensowanej wykazano, że również elektrony o energii zaledwie 0–4 eV mają skłonność do indukowania pęknięć pojedynczych nici w DNA. Przy tak niskich energiach elektronów mamy do czynienia z procesem dysocyjnego przyłączenia elektronów do molekuł, który stanowi podstawowy mechanizm powodujący uszkodzenie DNA poprzez tworzenie reaktywnych form anionów.

Podczas prezentacji zostaną przedstawione wyniki masowo-spektrometrycznych badań wychwytu elektronów przez molekuły nikotynamidu i PtBr₂ i ich potencjalne aplikacje.

Rola cholesterolu i tratw lipidowych w procesie fuzji błonowej

**Hanna Orlikowska-Rzeźnik¹, Emilia Krok¹, Maria Domańska², Piotr Setny²,
Anna Łągowska¹, Madhurima Chattopadhyay¹ i Łukasz Piątkowski¹**

¹Instytut Fizyki, Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej, Politechnika Poznańska,
Poznań, Polska

²Grupa Modelowania Biomolekularnego, Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski,
Warszawa, Polska

Fuzja błon biologicznych jest kluczowym mechanizmem w wielu procesach, takich jak zapłodnienie i neurotransmisja, ale także wnikanie niektórych wirusów do komórek gospodarza, w tym wirusa HIV. Badania na modelach błony limfocytów T i otoczki wirusa HIV wykazały, że separacja fazowa na tratwy lipidowe, bogate w cholesterol i sfingomielinę, oraz fazę płynną, która składa się głównie z fosfolipidów nienasyconych, sprzyja fuzji błonowej[1]. Jednym z kluczowych etapów fuzji jest lokalne odwodnienie błon wskutek ich ścisłego zbliżenia.

W prezentacji przedstawione zostaną wyniki eksperymentów z wykorzystaniem konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej oraz symulacji dynamiki molekularnej (MD) dotyczące wpływu odwodnienia na organizację cholesterolu w błonie lipidowej z tratwami lipidowymi[2]. Odkryliśmy, że zmniejszenie poziomu hydratacji błony powoduje migrację cholesterolu z tratw do otaczającej je fazy płynnej. Symulacje MD wskazują, że fosfolipidy nienasycone w fazie płynnej są bardziej podatne na zmiany strukturalne wywołane dehydratacją i tracą więcej wiązań wodorowych z wodą niż sfingomielina. Wnioskujemy, że uwolnienie cholesterolu z tratw jest napędzane wyrównaniem właściwości biofizycznych między fazami i zaspokojeniem wiązań wodorowych lipidów. Eksperymenty z użyciem fluorescencyjnej sondy środowiskowej wykazały, że napływ cholesterolu do fazy fosfolipidów nienasyconych łagodzi drastyczne zmiany w jej płynności w wyniku odwodnienia[3]. Nasze wyniki sugerują, że poziom cholesterolu w błonie komórkowej może być aktywnie regulowany w miejscu fuzji.

Praca naukowa finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2019-2023, jako projekt badawczy w ramach programu „Diamentowy Grant”. Autorzy dziękują również za wsparcie finansowe z grantów Narodowego Centrum Nauki 2020/37/B/ST4/01785 (Ł.P.) oraz 2020/38/E/ST4/00319 (M.D., P.S.).

[1] Yang, S. T., Kiessling, V., Simmons, J. A., White, J. M., Tamm, L. K. (2015). *Nat. Chem. Biol.* **11**, 424–431.

[2] Orlikowska-Rzeźnik, H., Krok, E., Domanska, M., Setny, P., Łągowska, A., Chattopadhyay, M., Piątkowski, L. (2024). *J. Phys. Chem. Lett.* **15**, 4515–4522.

[3] Orlikowska-Rzeźnik, H., Krok, E., Chattopadhyay, M., Lester, A., Piątkowski, L. (2023). *J. Phys. Chem. B* **127**(15), 3382–3391.

Wpływ żeńskich hormonów steroidowych na właściwości biofizyczne biomimetycznych błon komórkowych

Anna Łągowska¹, Hanna Orlikowska-Rzeźnik¹, Emilia Krok¹ i Łukasz Piątkowski¹

¹Zakład Fizyki Molekularnej, Instytut Fizyki, Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej,
Politechnika Poznańska, Poznań, Polska

W ludzkim ciele znajduje się kilkadziesiąt hormonów steroidowych, które pełnią rozmaite funkcje – od regulowania procesów metabolicznych aż po kontrolę funkcji i zachowań seksualnych. Aby skutecznie odgrywać swoją rolę, steroidy muszą oddziaływać z błoną komórkową, gdyż receptory sygnału znajdują się zazwyczaj w obrębie membrany albo we wnętrzu komórki. Może zdarzyć się jednak, że hormony steroidowe działają w sposób niespecyficzny – poprzez bezpośrednią aktywną interakcję z błoną lipidową i zmianę jej właściwości biofizycznych, takich jak na przykład płynność. Poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tego oddziaływania może pomóc zrozumieć genezę stanów patologicznych związanych z zaburzoną równowagą hormonalną. W badaniach skoncentrowano uwagę na żeńskich hormonach płciowych, do których należą m.in. rodzina estrogenów, czy też progesteron.

Celem badań było poznanie wpływu wybranych steroidów na właściwości biofizyczne modelowych błon komórkowych, a także podjęcie próby zrozumienia mechanizmu oddziaływań błona biologiczna – hormon. Przeanalizowano parametry strukturalne, takie jak organizacja lateralna błony oraz parametry dynamiczne, jak na przykład szybkość procesu dyfuzji bocznej błon lipidowych, które zbudowane były z nienasyconej fosfatydylocholiny (14:1 PC), sfingomieliny (SM) i wybranego hormonu steroidowego. Zauważono, że dodatek progesteronu niezaprzeczalnie zakłóca proces separacji fazowej w obrębie biomimetycznej błony lipidowej – zjawisko to nie występuje samoistnie w skali mikrometrycznej bez zmiany parametrów środowiska zewnętrznego. Wykazano, że wybrany hormon steroidowy wpływa na usztywnienie błony o podanym składzie – zmiany uzyskane dla jednofazowej błony utworzonej z PC są jednak niewielkie w porównaniu do tych, które indukuje dodatek cholesterolu. Co więcej, zaobserwowano także obniżoną szybkość przebiegu dyfuzji lateralnej lipidów w porównaniu do membran, które zawierają cholesterol.

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Polsce w roku 2024 (projekt nr 0512/SBAD/6216) oraz Narodowe Centrum Nauki (projekt nr 2022/45/N/ST4/01442).

Interaction of natamycin with yeast membranes studied by spectroscopy and label-free fluorescence imaging

**Maria Szomek¹, Vibeke Akkerman¹, Douglas F. Covey², Peter Müller³
and Daniel Wüstner*¹**

¹ University of Southern Denmark, DK-5230 Odense M, Denmark,

² Department of Developmental Biology, Washington University in St. Louis, St. Louis, MO 63110, USA

³ Humboldt University Berlin, Invalidenstr. 43, 10115 Berlin, Germany

Natamycin is a polyene macrolide that is commonly used to treat fungal keratitis and other yeast infections, as well as to protect foods from fungal molds. Unlike other polyene macrolides like nystatin or amphotericin B, natamycin does not generate pores in yeast membranes [1], and its mechanism of action is still unknown. Due to the intrinsic fluorescence properties of natamycin, we were able to study the molecular interactions of natamycin that underpin its antifungal activity by using UV-optimized wide-field microscopy and spectroscopy.

We discovered that natamycin forms aggregates in solution and when it binds to a model system (LUVs). In the model system, natamycin binds preferentially to membranes containing ergosterol, the main sterol component of fungal membranes, compared to membranes containing cholesterol [2]. To follow up, we used *Saccharomyces cerevisiae* and discovered that natamycin forms sterol-dependent aggregates in the yeast plasma membrane (PM). Additionally, we demonstrated permeation of propidium iodide (PI) into cells approximately 2.5 hours after adding natamycin to the yeast indicating that the PM of yeast gets compromised. To check if aggregation of the natamycin is not the result of a clustered sterol distribution, we used intrinsically fluorescent analogs of ergosterol and cholesterol. By live-cell imaging of those analogs, we found out that they have a homogenous distribution in the PM and therefore natamycin clustering should not be a consequence of a pre-clustered sterol distribution. The synthesis inhibitor myriocin was used to deplete sphingolipids, which enhanced natamycin binding. This was probably caused by ergosterol being redistributed from the inner to the outer PM leaflet [3].

Our results provide a mechanistic explanation for natamycin action on fungal cells, which can set the stage for the rational design of novel polyenes in the future.

[1] X. Guo *et al.*, "Sterol Sponge Mechanism Is Conserved for Glycosylated Polyene Macrolides," *ACS Cent. Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 781–791, May 2021.

[2] M. Szomek *et al.*, "Natamycin sequesters ergosterol and interferes with substrate transport by the lysine transporter Lyp1 from yeast," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1864, no. 11, p. 184012, Nov. 2022.

[3] M. Szomek *et al.*, "Ergosterol mediates aggregation of natamycin in the yeast plasma membrane."

Jak Amfoterycyna B dostaje się do błon komórkowych i co tam robi?

Sebastian Janik¹, Rafał Luchowski¹, Ewa Grela², Wojciech Grudziński¹

i Wiesław I. Gruszecki¹

1. Katedra Biofizyki, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 20-031 Lublin, Polska

2. Zakład Biofizyki, Uniwersytet Warszawski, 02-093 Warszawa, Polska

Amfoterycyna B (AmB) jest popularnym antybiotykiem przeciwgrzybiczym stosowanym w zakażeniach grzybiczych miejscowych jak i ogólnoustrojowych, ale dokładny sposób jej działania jest nadal przedmiotem dyskusji. Wykorzystaliśmy układ modelowy utworzony z pojedynczej warstwy dioleoilofosfatydylocholiny (DOPC) i ergosterolu (Ergo), głównego sterolu komórek grzybowych, do badania wbudowywania cząsteczek AmB do błony z fazy wodnej i analizy molekularnej reorganizacji błon leżącej u podstaw biologicznej aktywności antybiotyku. Wyniki pokazują, że internalizacja cząsteczek antybiotyku do błon zachodzi tylko w obecności ergosterolu w fazie lipidowej. Porównanie obrazów monowarstw na podłożu stałym uzyskanych za pomocą mikroskopii sił atomowych i mikroskopii fluorescencyjnej z obrazowaniem czasu życia wskazuje na tworzenie się wewnątrz-błonowych klastrów o różnych rozmiarach w fazie lipidowej, składających się głównie z dimerów antybiotyków i stosunkowo dużych porów błonowych (~15 nm średnicy). Wyniki te ujawniają wiele sposobów działania Amfoterycyny B, działających jednocześnie, z których każdy niekorzystnie wpływa na właściwości strukturalne błon lipidowych i ich fizjologiczną funkcjonalność.

Badania nad procesem wytwarzania cementów zawierających odpady z energetyki wiatrowej

Sandra Bulińska¹, Michał Pyzalski² i Agnieszka Sujak¹

¹Katedra Inżynierii Biosystemów, Wydział Inżynierii Środowiska i Inżynierii Mechanicznej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań, Polska

²Katedra Technologii Materiałów Budowlanych, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie, Kraków, Polska

Główne wyzwania zarządzania odpadami z łopat turbin wiatrowych to minimalizacja ilości odpadów i spełnienie restrykcji UE. Metody ich przetwarzania obejmują unieszkodliwianie poprzez składowanie lub spalanie, odzysk surowców, recykling, ponowne wykorzystanie, regenerację elementów i zapobieganie powstawaniu odpadów.

Dodanie surowców, takich jak szkło i włókna szklane z odpadów z elektrowni wiatrowych do cementów, poprawia właściwości mechaniczne betonu, zwiększając jego trwałość i odporność na obciążenia. Recykling odpadów w cementach wspiera zrównoważony rozwój, ograniczając ilość odpadów i negatywny wpływ na środowisko, co redukuje emisję CO₂ i zużycie surowców.

Łopaty turbin wiatrowych poddane zostały termicznej separacji komponentów. Uzyskany proszek oraz wyizolowane włókna, które wchodziły w skład laminatu, zostały poddane analizie mikrostruktury oraz obserwacji przy użyciu mikroskopii elektronowej. Obserwacja SEM wraz z analizą mikroobszarów oznaczonych przy użyciu energii dyspersji promieniowania rentgenowskiego (EDS) wykazała, że badane włókna charakteryzują się budową amorficzną o zróżnicowanej średnicy od 14.94 do 16.2 μm i długości o minimum 600 μm. Analiza składu chemicznego ujawniła występowanie trzech dominujących tlenków, tj. Al₂O₃ - 12.7%, SiO₂ – 57.6%, oraz CaO - 25.2%. Wykonana została również analiza XRD proszków uzyskanych poprzez mechaniczne rozdrobnienie kompozytu. Badania wykazały, iż w składzie nie występują fazy krystaliczne. Wykonano także kompleksową analizę termiczną DTA, DTG, TG, EGA, z której wynika, że rozkład termiczny kompozytu związany jest z egzotermiczną reakcją spalania się substancji spajających włókna szklane przy jednoczesnym wydzielaniu się gazów, takich jak H₂O oraz CO₂, oznaczonych przy pomocy spektrometrii masowej.

Przedstawione zostaną wstępne badania dotyczące możliwości zastosowania substratów występujących w składzie elementów śmigieł używanych w energetyce wiatrowej do produkcji cementu specjanego.

Potencjał oksydoredukcyjny i wpływ najbliższego otoczenia białkowego jako czynniki kontrolujące funkcjonalność chinonów

Magdalena Łazicka¹, Michał Kamiński^{1,2,3} i Maciej Garstka¹

¹Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
Warszawa, Polska

²Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu
Warszawskiego, Warszawa, Polska

³Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, Polska

Chinony występujące w centrach reakcji roślin wyższych (plastochinon-9) jak również bakterii purpurowych (ubichinon-10) są chemicznie identyczne. Jednakże ich najbliższe otoczenie warunkuje ich funkcjonalność. Utleniony chinon Q_A , jak i jego forma pośrednia, anionowy semichinon Q_A^- jest ściśle związany ze stosunkowo hydrofobową białkową wnęką. Chinon Q_A pośredniczy w transferze pojedynczego elektronu. Jego przeciwieństwem jest drugi, mobilny przekaźnik elektronów, chinon Q_B , który związany jest z bardziej polarnym obszarem podjednostki białkowej. W zależności od stopnia zredukowania i uprotonowania przyjmuje on trzy funkcjonalne formy, utlenioną Q_B , semichinonową Q_B^- jak i zredukowaną Q_BH_2 .

W przypadku sztucznych układów, w których chinony używane są jako egzogenne przenośniki elektronów interakcje ze środowiskiem białkowym jak i określenie formy samego chinonu są bardziej skomplikowane. Główny pierścień benzoquinonowy może przyjąć aż 9 form rodnikowych. Dodatkowy wpływ mają grupy funkcyjne. Chinony mogą również łączyć się, tworząc układy sprzężone nazywane quinhydronami.

Oddziaływania chinon-chlorofil próbujemy określić analizując funkcjonowanie utworzonego przez nas układu biohybrydowego jak i w roztworze. Układ biohybrydowy składa się z (i) fotoaktywnej warstwy utworzonej z trimerów LHCII usieciowanych glutaraldehydem, (ii) mediatora (PPBQ, BQ, DCBQ, DQ) oraz (iii) sitodrukowanej elektrody grafitowej [1].

Modelowanie wykazało, iż w lhc, zastosowane chinony mogą dokować się w pobliżu terminalnych emiterów energii, chlorofili *Chl a* 610-611-612. Oddziaływania Chl-Q, umożliwiające generowanie fotoprądów, jak również wpływające na wygaszanie kompleksu LHCII, są ograniczone przez dostępność miejsc wiązania. Kluczowa pozostaje jednak forma chinonu, pomiary czasów życia fluorescencji wykazały, iż uprotonowana forma chinonu skraca najdłuższą składową czasów życia kompleksu LHCII. Pomiary chronoamperometryczne pokazały, że układy biohybrydowe, w zależności od użytego chinonu jest w stanie generować anodowe lub katodowe fotoprądy.

[1] Łazicka M, Palińska-Saadi A, Piotrowska P, Paterczyk B, Mazur R, Maj-Żurawska M, Garstka M. The coupled photocycle of phenyl-p-benzoquinone and Light-Harvesting Complex II (LHCII) within the biohybrid system. *Sci Rep.* 2022 Jul 27;12(1):12771; doi: 10.1038/s41598-022-16892-y.

Badania strukturalne kompleksu LHCII ze szpinaku metodami trójwymiarowej dyfrakcji elektronowej (3D-ED)

**Michał Kamiński^{1,2,3}, Magdalena Łazicka⁴, Marlena Kisiąła³, Tomasz Góral⁵,
Maciej Garstka⁴ i Paulina Maria Dominiak^{2,3}**

¹Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu
Warszawskiego, Warszawa

²Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

³Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

⁴Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

⁵Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa

Procesy fazy jasnej fotosyntezy stały się w ostatnich latach inspiracją do tworzenia fotoaktywnych układów biohybrydowych. Jeden z możliwych układów wykorzystuje kompleksy antenowe LHCII i zawarte w nim barwniki fotosyntetyczne do absorpcji kwantów światła oraz chinony jako mediatory do przenoszenia elektronów na elektrodę [1]. Aby zrozumieć molekularny proces przenoszenia elektronów na mediatory należy poznać mechanizm i miejsce dokowania chinonów w kompleksach białkowych, w czym mogą pomóc analizy strukturalne białka.

Rozwijana ostatnio krystalografia elektronowa (3D-ED) umożliwia pomiary nanokryształów w rozdzielczości atomowej, co pozwala m. in. na uzyskanie modeli strukturalnych białek słabo krystalizujących, w lepszej rozdzielczości niż w popularnie stosowanej mikroskopii elektronowej (EM) wykorzystującej metodę „single particles” do rekonstrukcji [2]. Aby uzyskać informacje strukturalne o miejscu i mechanizmie dokowania chinonów do LHCII należy najpierw wykrystalizować białko natywne oraz rozwiązać jego strukturę po pomiarach dyfrakcyjnych.

Niniejsza praca skupia się na ustaleniu struktury krystalicznej i atomowej kompleksu białkowo-barwnikowego LHCII z wykorzystaniem narzędzi 3D-ED. W tym celu wyizolowano kompleksy fotosyntetyczne z liści szpinaku (*Spinacia oleracea* L.), które następnie oczyszczono na gradientach sacharozowych, zagęszczono i wykrystalizowano. Czystość preparatu potwierdzono poprzez analizę SDS-Page, a także wykonano analizę Western Blot w celu ustalenia składu podjednostkowego kompleksu. Wpływ stosowanych detergentów na strukturę LHCII zbadano metodami fluorescencyjnymi.

[1] Łazicka M, Palińska-Saadi A, Piotrowska P, Paterczyk B, Mazur R, Maj-Żurawska M, Garstka M., 2022 The coupled photocycle of phenyl-p-benzoquinone and Light-Harvesting Complex II (LHCII) within the biohybrid system, *Sci Rep.*, 12(1):12771.

[2] Gemmi, M., Mugnaioli, E., Gorelik, T. E., Kolb, U., Palatinus, L., Boullay, P., Hovmöller, S., Abrahams, J. P., 2019, 3D electron diffraction: the nanocrystallography revolution, *ASC Cent. Sci.*, 5, 8, pp. 1315-1329.

Fluorescencja chlorofilu jako wyznacznik wydajności fotosyntetycznej jęczmienia w zmiennych warunkach wzrostu

Karolina Okoń i Artur Nosalewicz

Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii
Nauk w Lublinie, Polska

Jęczmień (*Hordeum vulgare* L.) jest drugim po pszenicy, najczęściej uprawianym zbożem w Europie. Wykorzystywany jest w celach spożywczych, przemysłowych oraz jako pasza dla zwierząt [1]. Większość dotychczasowych badań nad fotosyntezą roślin uprawnych prowadzona była w stałych warunkach świetlnych. Fluktuacje światła (FL), których udział jest szczególnie duży w niższej położonych, starszych liściach w łanie, wpływają na produktywność roślin, poprzez szereg powiązanych mechanizmów molekularnych. Badania nad mechanizmami fotoochronnymi w liściach i ich modyfikacje mogą przyczynić się do zwiększenia produktywności roślin uprawnych [2].

Celem prezentowanego doświadczenia była ocena wydajności fotosyntetycznej dwóch powszechnie stosowanych odmian jęczmienia, LG Diabło (LD) i Ellinor (E), w warunkach suszy i FL.

Doświadczenie przeprowadzono na odciętych liściach roślin, w dwóch fazach wzrostu, uprawianych w fitotronie. W połowie liści indukowano stan odpowiadający umiarkowanej suszy, pozostawiając je w komorze wegetacyjnej do spadku relatywnej zawartości wody (RWC) do oczekiwanego poziomu. Pomiar (n=4) fluorescencji chlorofilu, na zaadaptowanych do ciemności liściach wykonano za pomocą ImagingPAM (Walz GmbH). Podczas pomiarów indukowano FL o natężeniu zmieniającym się w zakresie 55 - 530 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ co 20s. Oceniono parametry fotosyntetyczne, takie jak efektywna wydajność kwantowa fotosystemu II Y(II) i wydajność kwantowa regulowanego rozpraszania energii Y(NPQ).

Wyniki pomiarów Y(II) wykazały, że zarówno RWC, jak i wiek liści skutkuje odmienną reakcją na FL. Młodsze liście charakteryzowały się szybszą indukcją NPQ w świetle o wysokim natężeniu (HL). Warunki symulowanego deficytu wody znacznie obniżyły zdolność badanych odmian do wykorzystania składowej HL z FL do procesów fotochemicznych. Znaczny udział NPQ w fazie HL skutkował redukcją szybkości transportu elektronów, z tego względu ogólna produktywność fotosyntetyczna w FL była kształtowana w okresach niskiego natężenia światła. Obserwowane różnicownie efektywności mechanizmów fotoochronnych i efektywności wykorzystania energii świetlnej na procesy fotochemiczne, między badanymi odmianami wskazuje, że istnieje potencjał do poprawy produktywności fotosyntetycznej roślin uprawianych w łanie, w zakresie reakcji na zmienne oświetlenie.

[1] Czembor, E.; Kaczmarek, Z.; Pilarczyk, W.; Mańkowski, D.; Czembor, Agriculture 2022, 12, 1091.

[2] Kaiser, E.; Morales, A.; Harbinson J., Fluctuating Light Takes Crop Photosynthesis on a Rollercoaster Ride , Plant Physiology, Volume 176, Issue 2, 2018, Pages 977–989

XXIX Lubelskie Warsztaty Biofizyczne,
Kazimierz nad Wisłą, 23–24 maja 2024 r.