

## **Załącznik 2**

# **AUTOREFERAT**

przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

**dr Edyta Zdunek-Zastocka**

Katedra Biochemii

Wydział Rolnictwa i Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2019

**SPIS TREŚCI**

<b>1. DANE OSOBOWE.....</b>	<b>3</b>
1.1. Imię i nazwisko.....	3
1.2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	3
1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
<b>2. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....</b>	<b>4</b>
2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
2.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	4
2.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
2.3.1. Wprowadzenie.....	6
2.3.2. Cel naukowy.....	10
2.3.3. Omówienie wyników badań oraz dyskusja.....	11
2.3.4. Podsumowanie.....	19
2.3.5. Piśmiennictwo.....	21
<b>3. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH .25</b>	
3.1. Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora.....	25
3.2. Praca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora oraz aktualnie realizowane zadania badawcze.....	27
<b>4. PODSUMOWANIE PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ.....</b>	<b>36</b>

## 1. DANE OSOBOWE

### 1.1. Imię i nazwisko:

Edyta Zdunek-Zastocka

### 1.2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

#### 1996 tytuł magistra biologii, specjalność biochemia

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej w Lublinie

Tytuł pracy magisterskiej: „Badanie wpływu chlorochiny na profile wewnątrzkomórkowych aktywności proteolitycznych u *Trametes versicolor* w warunkach idiofazy wymuszonej ograniczeniem źródła azotu lub węgla” (ocena bardzo dobra)

Promotor: prof. dr hab. Andrzej Leonowicz

#### 2002 stopień doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii

Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Mo-enzymes from leaves and roots of pea plants (*Pisum sativum* L.) as affected by salinity and different N-source” (z wyróżnieniem), praca doktorska napisana w języku angielskim

Promotor: prof. dr hab. Wiesław Bielawski

### 1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

**01.10.1996 - 30.09.2002**      **asystent**, Katedra Biochemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**01.10.2002 – obecnie**      **adiunkt**, Katedra Biochemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

## 2. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

### 2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Udział wybranych genów metabolizmu kwasu abscysynowego w utrzymaniu homeostazy tego fitohormonu w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe oraz podczas wykształcania i kiełkowania nasion

### 2.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowi cykl 5 publikacji, w tym 4 oryginalnych publikacji naukowych oraz jednej pracy przeglądowej. Prace badawcze wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były częściowo finansowane ze środków uzyskanych w ramach grantu KBN P06A 022 30 (rola habilitanta – kierownik) oraz grantu wewnętrznego SGGW (rola habilitanta - główny wykonawca). W obu projektach opracowałam koncepcję badań oraz wykonałam ponad 95% doświadczeń i analiz.

1. **Zdunek-Zastocka E<sup>✉</sup>**, Grabowska A (2019) The interplay of *PsABAUGT1* with other abscisic acid metabolic genes in the regulation of ABA homeostasis during the development of pea seeds and germination in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plant Science (praca po pozytywnych recenzjach) (IF = **3,712**, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = **35**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń i analiz, interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu manuskryptu oraz przygotowaniu go do druku. Jestem autorem korespondencyjnym tej publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 95%.*

2. Fidler J, **Zdunek-Zastocka E<sup>✉</sup>**, Bielawski W (2015) Regulation of abscisic acid metabolism in relation to the dormancy and germination of cereal grains. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 84: 3-11 (IF= **1,213**, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = **20**, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = **20**)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zgromadzeniu i dokonaniu przeglądu części literatury, napisaniu większości manuskryptu, odpowiedzi na recenzje. Jestem autorem korespondencyjnym. Mój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 60%.*

3. **Zdunek-Zastocka E**✉, Sobczak M (2013) Expression of *Pisum sativum* PsAO3 gene, which encodes an aldehyde oxidase utilizing abscisic aldehyde, is induced under progressively but not rapidly imposed drought stress. Plant Physiology and Biochemistry 71:57-66 (IF=2,352, p<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = 35, p<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = 35)

*Mój udział w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń i analiz, interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu manuskryptu oraz przygotowaniu go do druku. Jestem autorem korespondencyjnym. Mój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 95%.*

4. **Zdunek-Zastocka E**✉ (2010) The activity pattern and gene expression profile of aldehyde oxidase during the development of *Pisum sativum* seeds. Plant Science 179:543-54 (IF= 2,481, p<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = 27, p<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = 35)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji to 100%.*

5. **Zdunek-Zastocka E**✉ (2008) Molecular cloning, characterization and expression analysis of three aldehyde oxidase genes from *Pisum sativum* L. Plant Physiology and Biochemistry 46:19-28 (IF= 1,905, p<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = 20, p<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = 35)

*Mój wkład w powstanie tej publikacji to 100%.*

✉ autor korespondencyjny

<sup>a</sup> p<sub>MNiSW</sub> - punkty MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania

<sup>b</sup> p<sub>MNiSW</sub> - punkty MNiSW według ujednoliconego wykazu czasopism załączonego do komunikatu z dnia 26.01.2017

Oświadczenia określające indywidualny wkład współautorów w powstanie poszczególnych publikacji stanowią załącznik 6.

Sumaryczne wskaźniki bibliometryczne dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

- **Impact Factor (IF) = 11,663** (zgodnie z rokiem opublikowania)
- **punkty<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = 137**
- **punkty<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = 160**
- **liczba cytowań wg Web of Science = 46.**

### **2.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **2.3.1. Wprowadzenie**

**Kwas abscysynowy (ABA)** to hormon roślinny zaangażowany w regulację wielu procesów związanych z wzrostem i rozwojem roślin, jak również adaptacją do zmieniających się warunków środowiska. Wzrost jego stężenia obserwuje się w tkankach oraz w soku ksylemowym w odpowiedzi na deficyt wody, zasolenie, anoksję czy chłód (Nambara i Marion-Poll, 2005; Ma i wsp., 2018). W warunkach stresu, ABA uczestniczy w regulacji ekspresji genów i utrzymaniu homeostazy osmotycznej, która w wyniku działania wymienionych czynników ulega zaburzeniu (Tuteja, 2007). Podczas rozwoju nasion, ABA pochodzenia matcznego jest niezbędny do prawidłowego wzrostu i rozwoju zarodka we wczesnych etapach wykształcania nasion (Finkelstein i wsp., 2002; Frey i wsp., 2004; Kermode, 2005), podczas gdy ABA pochodzenia zarodkowego odpowiedzialny jest za indukcję i utrzymanie spoczynku podczas dojrzewania nasion (Karssen i wsp., 1983). Spadek zawartości ABA obserwowany w nasionach poddanych imbibicji, skorelowany jest natomiast z ustępowaniem spoczynku i w konsekwencji prowadzi do kiełkowania (Millar i wsp., 2006). Procesy, w których pośredniczy ABA korelują ze zmianami zawartości tego fitohormonu, które z kolei są wynikiem równowagi pomiędzy dwoma działającymi równolegle procesami, biosyntezą i rozkładem (Nambara i Marion-Poll, 2005; Rodriguez-Gacio i wsp., 2009; Finkelstein, 2013; Frankowski i wsp., 2013).

**Biosynteza ABA *de novo*** w komórkach roślinnych odbywa się poprzez rozkład 40-węglowych karotenoidów. Pierwszą specyficzną dla szlaku syntezy ABA reakcją katalizuje **dioksygenaza 9-cis-epoksykarotenoidowa (NCED, ang. nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; EC 1.13.11.51)**. Przyjmuje się że, reakcja katalizowana przez NCED decyduje o tempie biosyntezy ABA w odpowiedzi na czynniki stresowe (Nambara i Marion-Poll, 2005). Enzymem katalizującym ostatni etap szlaku syntezy ABA *de novo*, czyli **utlenienie aldehydu abscysynowego (ABAld) do ABA**, jest prawdopodobnie **oksydaza aldehydowa (AO, ang. aldehyde oxidase; EC 1.2.3.1)** (Seo i wsp., 2000a).

Oksydaza aldehydowa należy do hydroksylaz molibdenowych, a podstawową reakcją katalizowaną przez ten enzym jest oksydacyjna hydroksylacja aldehydów do odpowiednich kwasów karboksylowych. Informacje dotyczące funkcji AO u roślin są nieliczne i ograniczają się jedynie do możliwego zaangażowania tego enzymu w syntezę ABA (Seo i wsp., 2000a, 2000b). Poznane dotychczas białka AO charakteryzują się szeroką specyficznością substratową, zarówno w stosunku do alifatycznych jak i aromatycznych aldehydów, jednak **izoformy AO utleniające ABAld do ABA wykryto tylko u *Arabidopsis* (AAO $\delta$ ; Seo i wsp., 2000a) i grochu (PsAO $\gamma$ ; Zdunek-Zastocka i wsp., 2004)**. W tkankach grochu stwierdzono obecność trzech izoform AO (PsAO $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), przy czym wszystkie trzy występują w liściach, a jedna w korzeniach (PsAO $\gamma$ ). Zdolność do utleniania ABAld wykazuje tylko izoforma o największej mobilności elektroforetycznej (PsAO $\gamma$ ). Izoforma PsAO $\gamma$  jest homodimerem składającym się z podjednostek o masie około 150 kDa (Zdunek-Zastocka i wsp., 2004). Aktywność oraz poziom białka PsAO $\gamma$  rosły znacząco zarówno w liściach, jak również w korzeniach grochu, podczas wzrostu na pożywkach zawierających czynnik stresowy (Zdunek-Zastocka i wsp., 2004). **Obserwowany u grochu wzrost aktywności PsAO $\gamma$  wobec ABAld w odpowiedzi na czynniki stresowe, jest jak dotąd jedynym cytowanym w literaturze.** Oksydaza aldehydowa jest jednym z najsłabiej poznanych i scharakteryzowanych enzymów szlaku biosyntezy ABA (Zdunek-Zastocka i wsp., 2004). Oczyszczono i scharakteryzowano pod względem właściwości biochemicznych tylko jedno białko AO zdolne do utleniania ABAld, tj. rekombinowane białko AAO $\delta$  *Arabidopsis* (Seo i wsp., 2000a). Niewiele również wiadomo na temat ekspresji genów kodujących izoformy AO utleniające ABAld, szczególnie w odpowiedzi na niekorzystne zmiany warunków środowiska. Wprawdzie w warunkach stresu wodnego stwierdzono wzrost poziomu transkryptu AAO3, genu kodującego podjednostki AAO $\delta$  w liściach

*Arabidopsis* (Seo i wsp., 2000a; Ikegami i wsp., 2009), to jednak wzrostowi poziomu mRNA nie towarzyszył wzrost aktywności AAO $\delta$  (Seo i wsp., 2000a). Brak jest także informacji dotyczących zmian aktywności oraz ekspresji genów kodujących AO w poszczególnych stadiach wykształcania i dojrzewania nasion. Jedyną informacją na ten temat, jest potwierdzenie obecności transkryptu *AAO3* w nasionach *Arabidopsis* zebranych dziesięć dni po zapyleniu (Lefebvre i wsp., 2006). Również informacje dotyczące lokalizacji tkankowej AO zdolnej do utleniania ABAld ograniczają się jedynie do AO $\delta$  u *Arabidopsis* (Koiwai i wsp., 2004; Endo i wsp., 2008). Ta niewielka wiedza na temat AO, jak również szeroki wachlarz procesów, w których uczestniczy ABA, czynią oksydazę aldehydową interesującym obiektem dalszych badań.

**Przyjmuje się, że obniżenie zawartości ABA w końcowych etapach dojrzewania nasion oraz w nasionach poddanych imbibicji jest wynikiem wzmożonego katabolizmu tego fitohormonu** (Nambara i Marion-Poll, 2005; Rodriguez-Gacio i wsp., 2009). Przekształcenie ABA w formę nieaktywną może zachodzić poprzez hydroksylację grupy metylowej w pozycji C-8', w reakcji katalizowanej przez **8'-hydroksylazę ABA (ABA8'OH, ang. ABA 8'-hydroxylase; EC 1.14.14.137)**, lub koniugację z glukozą, w reakcji katalizowanej przez **UDP-glukozylotransferazę ABA (ABAUGT, ang. ABA UDP-glucosyltransferase; EC 2.4.1.263)** (Xu i wsp., 2002; Kushiro i wsp., 2004). Analiza roślin transgenicznych w połączeniu z charakterystyką biochemiczną rekombinowanych białek **potwierdziły udział ABA8'OH w regulacji zawartości ABA w dojrzewających i kiełkujących nasionach** (Okamoto i wsp., 2006), **jednak rola ABAUGT w tym procesie nie jest do końca wyjaśniona, a wiedza na ten temat bardzo ograniczona**. Wprawdzie badania biochemiczne potwierdziły zdolność tego enzymu do glikozylacji ABA *in vitro*, to jednak nadekspresja czy wyciszenie pojedynczych genów kodujących ABAUGT nie wpływały zasadniczo na tempo kiełkowania nasion roślin transgenicznych (Lim i wsp., 2005; Dong i wsp., 2014). Ponadto, wciąż nie znajdziemy w publikacjach kompleksowej analizy ekspresji genów *ABAUGT* w połączeniu ze zmianami zawartości ABA zachodzącymi podczas rozwoju nasion, jak również w trakcie ich imbibicji. Jak wykazały najnowsze badania, w odróżnieniu od oksydacyjnej inaktywacji ABA, tworzenie nieaktywnych koniugatów ABA z glukozą jest procesem odwracalnym. Możliwa jest bowiem hydroliza estrów glukozowych ABA (ABA-GE) przez  $\beta$ -glukozydazę (BG, ang. beta-glucosidase; EC 3.2.1.175) specyficzną względem ABA-GE. Hydroliza ABA-GE następuje jednoetapowo i w porównaniu z biosyntezą ABA *de novo* może znacznie szybciej prowadzić do lokalnego zwiększenia stężenia tego fitohormonu (Han i wsp.,



2012; Xu i wsp., 2013). Stąd też, stosunkowo niedawno odkryta możliwość przemian ABA z udziałem enzymów ABAUGT oraz BG, może odgrywać znacznie ważniejszą rolę w regulacji zawartości ABA na poszczególnych etapach rozwoju osobniczego roślin, jak i w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego, niż obecnie przypuszcza się.

Badania ostatnich lat pokazują, że tempo syntezy jak i rozkładu ABA regulowane jest głównie na poziomie transkrypcji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm tego fitohormonu. Jednak większość informacji dotyczących regulacji metabolizmu ABA, zarówno ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę i rozkład ABA, jak również czynników wpływających na tę ekspresję, uzyskano z badań na *Arabidopsis*. **Wciąż niewiele wiadomo na temat metabolizmu ABA i czynników regulujących ten metabolizm u roślin uprawnych, szczególnie w kontekście regulacji spoczynku nasion.** Spoczynek nasion wielu gatunków roślin uprawnych ma bowiem bezpośredni wpływ na jakość plonów. Zbyt głęboki spoczynek nie jest zjawiskiem pożądanym, gdyż może powodować nierównomierne wschody oraz opóźniać kiełkowanie, natomiast zbyt płytki spoczynek, jakim charakteryzują się liczne odmiany gospodarczo istotnych gatunków zbóż, prowadzi do niekorzystnego zjawiska, jakim jest przedźniwne porastanie (Gerjets i wsp., 2009; Gao i wsp., 2013). Stąd też w pracy przeglądowej (Fidler i wsp., 2015), wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego, usystematyzowano i skonfrontowano ze sobą najnowsze informacje dotyczące identyfikacji genów biorących udział w biosyntezie i katabolizmie ABA w ziarniaków zbóż. W pracy tej opisano również wpływ czynników, takich jak późniwne przechowywanie, światło, temperatura, tlenek azotu oraz reaktywne formy tlenu (ROS), na zawartość ABA i jego metabolizm w suchych ziarniakach oraz ziarniakach poddanych imbibicji. W świetle dostępnej literatury, wymienione czynniki wydają się wpływać na spoczynek i kiełkowanie ziarniaków poprzez regulację ekspresji genów biorących udział w biosyntezie i katabolizmie ABA, głównie genów kodujących NCED oraz ABA8'OH. **Reakcje katalizowane przez AO i ABAUGT mogą stanowić kolejne ważne ogniwa w regulacji spoczynku zarówno ziarniaków zbóż, jak również nasion innych gatunków roślin uprawnych, jednak rola obu enzymów w tym procesie pozostaje nadal do wyjaśnienia.**

### 2.3.2. Cel naukowy

Niewielka wiedza na temat oksydazy aldehydowej (AO) zdolnej do utleniania aldehydu abscysynowego do ABA, oraz UDP-glukozylotransferazy ABA (ABAUGT) katalizującej jednoetapową inaktywację ABA, w połączeniu z obiecującymi wynikami wstępnymi (Zdunek i Lips, 2001; Zdunek-Zastocka i wsp., 2004; Fidler i wsp., 2016), czynią je interesującym obiektem dalszych badań.

**Stąd też, celem prezentowanego osiągnięcia** było wyjaśnienie roli genów kodujących oksydazę aldehydową oraz UDP-glukozylotransferazę ABA w regulacji zawartości ABA u grochu podczas wykształcania i kiełkowania nasion oraz w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. Badania te przyczynią się nie tylko do poznania miejsc syntezy ABA jako, że AO jest uważana za enzym katalizujący ostatni etap w biosyntezie ABA, ale również umożliwią zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację metabolizmu tego fitohormonu, jak i procesów w których bierze on udział.

**Cel ten został osiągnięty w wyniku realizacji następujących zadań badawczych:**

1. Poznanie sekwencji nukleotydowych genów kodujących enzymy potencjalnie zaangażowane w biosyntezę i rozkład ABA u grochu, czyli odpowiednio genów z rodziny oksydazy aldehydowej oraz UDP-glukozylotransferazy ABA (**Zdunek-Zastocka, 2008; Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019**)
2. Zbadanie profili ekspresji sklonowanych genów *PsAO* podczas rozwoju nasion grochu oraz w odpowiedzi roślin grochu na czynniki stresowe, takie jak zasolenie, deficyt wody czy obecność jonów amonowych jako jedyne źródła azotu w pożywce (**Zdunek-Zastocka, 2008; Zdunek-Zastocka, 2010; Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013**)
3. Otrzymanie, oczyszczenie oraz biochemiczna charakterystyki rekombinowanego białka PsAO3 grochu zdolnego do utleniania aldehydu abscysynowego do ABA (**Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013**)

4. Zbadanie profili ekspresji genów *PsABAUGT* podczas dojrzewania nasion grochu oraz w trakcie imbibicji nasion w wodzie oraz roztworach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, w warunkach tlenowych i anoksji (Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019)
5. Analiza porównawcza profili ekspresji genów *PsAO* oraz *PsABAUGT* z ekspresją genów o ugruntowanej roli w syntezie i rozkładzie ABA, czyli odpowiednio dioksygenazy 9-*cis*-epoksykarotenoidowej (*PsNCED*) oraz 8'-hydroksylazy ABA (*PsABA8'OH*), podczas wykształcania i kiełkowania nasion oraz w odpowiedzi roślin grochu na czynniki stresowe (Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013; Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019)
6. Analiza funkcjonalna genu *PsABAUGT1* grochu poprzez nadekspresję w roślinach rzodkiewnika (Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019).

### 2.3.3. Omówienie wyników badań oraz dyskusja

#### Molekularna charakterystyka oksydazy aldehydowej grochu

W tkankach grochu zidentyfikowano trzy pełnej długości sekwencje cDNA oksydazy aldehydowej, które nazwano: *PsAO1*, *PsAO2* oraz *PsAO3*, a następnie zarejestrowano je w bazie GeneBank NCBI pod następującymi numerami akcesyjnymi: EF491598, EF491599 oraz EF491600. Sekwencja *PsAO1* składa się z 4630 pz, z czego sekwencję kodującą (ORF, ang. open reading frame) stanowi 4122 pz, sekwencja *PsAO2* składa się z 4348 pz z czego ORF stanowi 4104 pz, natomiast sekwencja *PsAO3* składa się z 4333 pz z czego ORF stanowi 4104 pz (Zdunek-Zastocka, 2008). Stosując narzędzia bioinformatyczne stwierdzono, że sekwencja *PsAO1* jest w 90% identyczna z *PsAO2* oraz w 78% z *PsAO3*, natomiast *PsAO2* jest w 80% identyczna z *PsAO3*, zarówno na poziomie sekwencji nukleotydowych, jak również aminokwasowych. Sekwencje aminokwasowe kodowane przez geny *PsAO* wykazują 55% identyczności z sekwencjami AO roślin jednoliściennych oraz 60% identyczności z sekwencjami AO dwuliściennych. Porównawcza analiza sekwencji aminokwasowych pozwoliła także na identyfikację w obrębie sekwencji grochu, trzech charakterystycznych dla AO domen wiążących

kofaktory: N-końcową domenę wiążącą dwa centra żelazo-siarkowe, centralnie położoną domenę wiążącą FAD oraz C-końcową domenę wiążącą kofaktor molibdenowy.

### **Organospecyficzna ekspresja genów kodujących AO grochu**

Poziom mRNA wszystkich trzech genów *PsAO* badano w liściach i korzeniach siewek oraz roślin dorosłych grochu stosując metodę półilościowego RT-PCR (**Zdunek-Zastocka, 2008**). Liście roślin dorosłych podzielono na: A- najmłodsze, nierozwinięte; B- dojrzałe, rozwinięte; C- najstarsze, starzejące się. W organach wegetatywnych profile ekspresji *PsAO1* oraz *PsAO2* były zbliżone. Poziomy transkryptów obu genów były najwyższe w liściach siewek oraz młodych liściach roślin dorosłych, a najniższe w korzeniach oraz w starzejących się liściach. *PsAO3* ulegał ekspresji we wszystkich badanych organach, przy czym **najwyższy poziom transkryptu *PsAO3* zaobserwowano w korzeniach i starzejących się liściach roślin dorosłych**, a najniższy w siewkach i młodych liściach roślin dorosłych. Profil ekspresji genu *PsAO3* korelował z opisanym wcześniej profilem aktywności i poziomu białka izoformy *PsAO $\gamma$*  (Zdunek-Zastocka i wsp., 2004).

### **Analiza ekspresji genów oksydazy aldehydowej w odpowiedzi na czynniki stresowe**

Czynniki stresowymi, które zastosowano w doświadczeniach było zasolenie (100 mM NaCl), stopniowo (3- 14 dni) lub gwałtownie (1- 24 h) wprowadzany deficyt wody, oraz obecność jonów amonowych (4 mM  $\text{NH}_4^+$ ) w pożywce jako jedyne źródła azotu.

W warunkach zasolenia, stopniowo wprowadzanego stresu wodnego oraz obecności jonów  $\text{NH}_4^+$  w pożywce, poziom transkryptu *PsAO1* oraz *PsAO2* nie ulegał zmianie w żadnej z badanych tkanek. Natomiast poziom mRNA *PsAO3* wzrósł znacznie, zarówno w liściach jak również w korzeniach grochu, przy czym zmiany te były większe w liściach (**Zdunek-Zastocka, 2008; Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013**). Spośród liści różniących się wiekiem, najwyższy wzrost ekspresji *PsAO3* widoczny był w starych liściach, niewiele mniejszy w dojrzałych, w pełni rozwiniętych liściach, podczas gdy w młodych, nierozwiniętych liściach poziom transkryptu *PsAO3* nie ulegał zmianie (**Zdunek-Zastocka, 2008**). **W odpowiedzi na czynniki stresowe, profile ekspresji genu *PsAO3* korelują z obserwowanymi we wcześniejszych badaniach oraz w prezentowanym**

**osiągnięciu naukowym zmianami aktywności oraz poziomu białka izoformy PsAO $\gamma$**  (Zdunek-Zastocka i wsp., 2004; **Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013**).

W warunkach stopniowo wprowadzanego deficytu wody, indukcji ekspresji *PsAO3* towarzyszył wzrost poziomu transkryptu *PsNCED3* w liściach grochu, natomiast w korzeniach wzrost ekspresji *PsNCED2*, sugerując możliwość syntezy ABA w obu badanych organach. Jednak analiza zawartości ABA wykazała, że w odpowiedzi na stopniowo wprowadzany stres wodny, hormon ten akumulowany jest tylko w liściach (**Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013**). Brak wzrostu zawartości ABA w korzeniach w odpowiedzi na zasolenie, deficyt azotu czy obecność  $\text{NH}_4^+$  w pożywce, obserwowano także w poprzednich doświadczeniach prowadzonych na grochu (Zdunek i Lips, 2001). Zaobserwowano wówczas wzmożony transport ABA ( $\text{pmol} \times \text{g}^{-1} \text{FW root} \times \text{h}^{-1}$ ) w sokach ksylemu, co w połączeniu z prezentowanymi powyżej wynikami wskazuje, że u grochu w odpowiedzi na czynniki stresowe ma miejsce synteza *de novo* ABA zarówno w liściach jak i korzeniach, jednak ABA syntetyzowany w korzeniach nie jest w tych organach akumulowany, a transportowany do liści. Stąd też, część ABA akumulowanego w liściach w odpowiedzi na stres wodny, może pochodzić z korzeni.

#### **Analiza ekspresji genów oraz aktywności oksydazy aldehydowej podczas wykształcania i dojrzewania nasion grochu**

Przedstawione poniżej badania opisują zmiany aktywności poszczególnych izoform AO oraz zmiany w ekspresji genów kodujących podjednostki AO podczas wykształcania i dojrzewania nasion grochu, osobno w części pochodzenia matcznego (**okrywa nasienna**) oraz w zarodku (**oś zarodkowa, liścienie**) (**Zdunek-Zastocka, 2010**). Badaniom poddano także **owocnię (perykarp)**. Nasiona grochu są doskonałym modelem do badania lokalizacji procesów zachodzących podczas rozwoju nasion, ze względu na ich morfologię i duże rozmiary. Okres wykształcania i dojrzewania nasion grochu odmiany Little Marvel wynosił około 40-43 dni, licząc od pierwszego dnia po zapyleniu (DAP).

W rozwijających się nasionach grochu wykryto pięć izoform AO, z których wszystkie pięć były zdolne do utleniania aldehydu indolowego (PsAO $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\kappa$ ), a tylko **trzy izoformy utleniały aldehyd abscysynowy (PsAO $\gamma$ , - $\delta$ , - $\kappa$ )**. W początkowych etapach wykształcania nasion (do około 13 DAP), stwierdzono obecność tylko izoform PsAO $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , których mobilność elektroforetyczna pokrywała się z mobilnością białek AO obecnych w organach wegetatywnych grochu (Zdunek-Zastocka i wsp., 2004). Na tym

etapie wykształcania nasion, występowanie izoform PsAO, jak również ekspresja genów je kodujących (*PsAO1*, *PsAO2*, *PsAO3*), ograniczała się jedynie do części pochodzenia matecznego, tj. okrywy nasiennej oraz owocni (Zdunek-Zastocka, 2010). Przeprowadzone wcześniej badania na mutantach sugerowały, że ABA, który niezbędny jest do prawidłowego wzrostu i rozwoju zarodka, jak również stymuluje zmiany zachodzące w owocni w początkowych etapach embriogenezy, transportowany jest z organów wegetatywnych rośliny matecznej (Frey i wsp., 2004). **Jednak przeprowadzone na nasionach grochu badania po raz pierwszy wskazują, że w początkowych etapach wykształcania nasion ABA może być syntetyzowany w okrywie nasiennej oraz owocni (Zdunek-Zastocka, 2010).**

Po zakończeniu podziałów komórkowych oraz wzrostu wydłużeniowego komórek, aktywność izoformy PsAO- $\alpha$  oraz - $\beta$  zanika (izoformy nie utleniające ABAld), sugerując udział w syntezie innego hormonu roślinnego – kwasu indolio-3-ocowego (dyskusja w Zdunek-Zastocka, 2010), natomiast aktywność PsAO $\gamma$  (utleniająca ABAld) utrzymuje się do osiągnięcia przez nasiona dojrzałości pełnej. Podczas dojrzewania nasion, aktywność **izoformy PsAO $\gamma$**  występuje nadal na wysokim poziomie w okrywie nasiennej oraz od 25 DAP pojawia się także w osi zarodkowej, sugerując **jej udział w syntezie ABA nie tylko pochodzenia matecznego, ale również zarodkowego**. Zmiany aktywności jak również lokalizacja izoformy PsAO $\gamma$  korelowała z ekspresją genu *PsAO3*, po raz kolejny sugerując że podjednostki tej izoformy są kodowane właśnie przez *PsAO3*. Pod koniec okresu syntezy substancji zapasowych, tuż przed intensywnym odwodnieniem nasion, zaobserwowano pojawienie się wyłącznie w liścieniach dwóch nowych izoform AO, **PsAO $\delta$  oraz PsAO $\kappa$** . Wysoka aktywność tych izoform, zdolnych do utleniania ABAld, koreluje ze szczytem akumulacji ABA w zarodkach (pomiędzy 26 a 30 DAP), sugerując **udział obu izoform w syntezie ABA pochodzenia zarodkowego**. Badania molekularne w połączeniu z analizą mutantów, wykazały, że ABA pochodzenia zarodkowego jest kluczowy dla indukcji i utrzymania spoczynku pierwotnego nasion (Karssen i wsp., 1983). Ponieważ pojawieniu się izoform PsAO $\delta$  oraz - $\kappa$  towarzyszył wzrost ekspresji genu *PsAO2*, sugeruje się, że przynajmniej jedna z tych izoform jest kodowana przez *PsAO2*. W dojrzałych nasionach, obecne były tylko izoformy PsAO $\kappa$  oraz - $\gamma$ , których lokalizacja jak również ekspresja genów je kodujących ograniczała się wyłącznie do zarodka (Zdunek-Zastocka, 2010).

Biorąc pod uwagę lokalizację izoform zdolnych do utleniania ABAld sugeruje się, że w początkowych etapach wykształcania nasion synteza ABA możliwa jest głównie w częściach pochodzenia matecznego, podczas dehydratacji nasion w częściach pochodzenia matecznego oraz zarodku, natomiast w dojrzałych nasionach tylko w zarodku. W świetle wciąż niepotwierdzonej syntezy ABA w częściach owocu pochodzenia matecznego, powyższe badania uzupełniają badania genetyczne w wyjaśnianiu pochodzenia ABA akumulowanego w wykształcających i dojrzewających nasionach.

### **Biochemiczna charakterystyka rekombinowanego białka PsAO3**

Na podstawie analizy ekspresji genów kodujących PsAO u grochu sformułowano hipotezę, według której podjednostki izoformy PsAO $\gamma$  (homodimer), utleniającej aldehyd abscysynowy do ABA, są kodowane przez gen *PsAO3*. W celu potwierdzenia postawionej hipotezy, gen *PsAO3* grochu poddano heterologicznej ekspresji w komórkach drożdży, a otrzymane rekombinowane białko scharakteryzowano, szczególnie pod kątem zdolności do utleniania aldehydu abscysynowego oraz wrażliwości na inhibitory (**Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013**). Aldehyd abscysynowy nie jest komercyjnie dostępny, zaś ten wykorzystany w prezentowanych badaniach został zsyntetyzowany i udostępniony dzięki uprzejmości profesora Jana Zeevaart'a (Department of Plant Biology, Michigan State University, USA).

W pierwszym etapie doświadczenia, sekwencję kodującą *PsAO3* subklonowano do wektora ekspresyjnego pPICZB pod kontrolą promotora genu oksydazy alkoholowej, a otrzymany konstrukt genetyczny wprowadzono na drodze elektroporacji do komórek metylotroficznych drożdży *Pichia pastoris* szczepu KM71H. Otrzymane w komórkach drożdży białko PsAO3 grochu oczyszczono wykorzystując chromatografię jonowymienną na złożu DEAE-cellulose, chromatografię sita molekularnego na złożu Superdex 200 oraz chromatografię powinowactwa na złożu Ni-IDA (a nickel-*iminodiacetic acid* resin) (**Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013**). Stosując chromatografię sita molekularnego jak również elektroforezę w żelu poliakryloamidowym z SDS stwierdzono, że rekombinowane białko PsAO3 jest homodimerem o masie około 300 kDa. Analiza białka PsAO3 z zastosowaniem spektrometrii mas pozwoliła na zidentyfikowanie sekwencji czternastu peptydów i potwierdziła, że oczyszczone białko było rzeczywiście kodowane przez gen *PsAO3*.

Analizy biochemiczne wykazały, że **rekombinowane białko PsAO3 charakteryzuje się podobną specyficnością substratową w stosunku do izoformy PsAOγ obecnej w ekstraktach z grochu**. Obydwa białka preferują aldehyd 3-indolowy oraz aldehyd naftoesowy jako substraty, chociaż wysoką aktywność wykazują także wobec aldehydu abscysynowego oraz cytralu. PsAOγ i PsAO3 są również zdolne do utleniania aldehydu cynamonowego i benzoesowego, lecz ze znacznie niższą wydajnością. Obydwa białka nie utleniają natomiast aldehydu octowego. **Białko PsAO3 wykazało najniższe wartości Km wobec aldehydu naftoesowego (4,6 μM) i aldehydu abscysynowego (5,1 μM)**. Podobnymi właściwościami kinetycznymi charakteryzowało się rekombinowane białko AAO3 Arabidopsis (Seo i wsp., 2000a), otrzymane poprzez heterologiczną ekspresję genu *AAO3* w drożdżach. Gen *AAO3* Arabidopsis koduje podjednostki homodimerycznej izoformy AAOδ, utleniającej ABAld do ABA u Arabidopsis. Obydwa rekombinowane białka, PsAO3 oraz AAO3, charakteryzowały się ponadto podobną wrażliwością na zastosowane inhibitory. Inhibitorami niemal całkowicie hamującymi aktywność obu białek okazały się cyjanek potasu, N,N'-difenylo-p-fenylenodiamina oraz kwas *p*-hydroksyrzędziobenzoesowy (Seo i wsp., 2000a; **Zdunek-Zastocka i Sobczak, 2013**).

### **Molekularna charakterystyka UDP-glukozylotransferazy ABA oraz 8'-hydroksylazy ABA grochu**

Geny kodujące enzymy biorące udział w inaktywacji ABA, podobnie jak i biosyntezy ABA, należą do dużych rodzin genów, które ulegają ekspresji w różnych tkankach, pod wpływem różnych czynników, pełniąc różnorodne funkcje (Nambara i Marion-Poll, 2005). Dalego też, pierwszym etapem badań było poznanie sekwencji genów potencjalnie należących do rodziny UDP-glukozylotransferazy ABA oraz rodziny 8'-hydroksylazy ABA, a następnie na podstawie analizy profili ekspresji, wytypowanie tych genów, które biorą udział w regulacji zawartości ABA w nasionach (**Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019**).

**W tkankach grochu zidentyfikowano i scharakteryzowano dwie pełnej długości sekwencje cDNA UDP-glukozylotransferazy ABA (*PsABAUGT1*, *PsABAUGT2*) oraz dwie sekwencje cDNA 8'-hydroksylazy ABA (*PsABA8'OH1*, *PsABA8'OH2*).** Sekwencje te zarejestrowano w bazie GeneBank NCBI pod następującymi numerami akcesyjnymi: MF034884, MF034881, MF034882 oraz MF034883. Sekwencje kodujące



(ORF) wymienionych genów składały się odpowiednio z 1443 pz, 1431 pz, 1395 pz, oraz 1398 pz. Bioinformatyczna analiza sekwencji aminokwasowych wykazała, że PsABAUGT1 oraz PsABAUGT2 należą do 73-ciej rodziny glukozylotransferaz oraz są w 64% identyczne z sekwencją białka PvABAGT. UDP-glukozylotransferaza ABA z fasoli (PvABAGT) charakteryzuje się wysoką specyficnością wobec ABA jako substratu (Palaniyandi i wsp., 2015), co sugeruje udział obu enzymów PsABAUGT grochu w metabolizmie tego hormonu. Natomiast bioinformatyczna analiza sekwencji aminokwasowych PsABA8'OH1 i PsABA8'OH2 wykazała, że należą one do rodziny cytochromów P450 (CYP), dokładnie do podrodziny CYP707A.

### **Ekspresja *PsABAUGT*, *PsABA8'OH* oraz *PsNCED* podczas rozwoju i imbibicji nasion grochu**

Ekspresję sklonowanych genów badano w nasionach grochu w trakcie ich wykształcania i dojrzewania, a następnie w dojrzałych, niespoczynkowych nasionach (ang. nondormant seeds) poddanych imbibicji w wodzie lub roztworach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, w warunkach tlenowych i anoksji. Profile ekspresji genów *PsABAUGT* i *PsABA8'OH* skorelowano następnie ze zmianami zawartości ABA oraz z ekspresją genów zaangażowanych w biosyntezę tego fitohormonu, czyli genów *PsNCED*.

W czasie rozwoju nasion grochu, trwającego około 40-43 dni, szczyt akumulacji ABA w zarodkach miał miejsce około 26 dnia po zapyleniu i był poprzedzony wzrostem ekspresji *PsNCED2* i *PsNCED3*. Również w nasionach poddanych imbibicji, poziom transkryptu obu *PsNCED* wzrósł znacząco sugerując, że pomimo obserwowanego spadku zawartości ABA podczas imbibicji, ma miejsce synteza *de novo* tego fitohormonu (Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019). Wcześniejsze badania sugerowały, że synteza ABA *de novo* jest niezbędna do podtrzymania spoczynku w trakcie imbibicji dojrzałych nasion spoczynkowych (ang. dormant seeds) (Ali-Rachedi i wsp., 2004). Natomiast, **badania przeprowadzone u grochu po raz pierwszy wskazują, że synteza ABA *de novo* w pierwszych godzinach imbibicji ma miejsce także w nasionach, w których spoczynek pierwotny już ustąpił** (w nasionach niespoczynkowych).

Uważa się, że spadek zawartości ABA, obserwowany w fazie późnego dojrzewania nasion i w nasionach poddanych imbibicji, wynika z wzmożonego katabolizmu tego fitohormonu na skutek hydroksylacji ABA katalizowanej przez 8'-hydroksylazę ABA

(Nambara i wp., 2010). Rzeczywiście, wzrost poziomu transkrypty *PsABA8'OHI* towarzyszył obniżeniu zawartości ABA w zarodkach nasion grochu w okresie intensywnego odwodnienia nasion (22-34 DPA) oraz w nasionach poddanych imbibicji (pomiędzy 12 a 24h). Jednak ekspresja tego genu malała tuż przed osiągnięciem dojrzałości pełnej nasion oraz była nadal niska w pierwszych godzinach po rozpoczęciu imbibicji sugerując, że w utrzymaniu niskiego stężenia ABA bierze wówczas udział inny enzym. **Z badań przeprowadzonych na nasionach grochu wynika, że enzymem koniecznym dla utrzymania niskiego stężenia ABA w końcowych etapach dojrzewania nasion oraz w pierwszych godzinach imbibicji jest PsABAUGT1.** Obserwowany bowiem wzrost poziomu transkrypty *PsABAUGT1* korelował ze spadkiem zawartości ABA zarówno w dojrzewających nasionach grochu, w fazie intensywnego odwodnienia nasion pomiędzy 30 a 43 DAP, jak również w nasionach poddanych imbibicji, w pierwszych 12-tu godzinach od rozpoczęcia imbibicji w wodzie (**Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019**).

Dane literaturowe wskazują, że imbibicja nasion w roztworach  $H_2O_2$  przed wysiewem przyspiesza kiełkowanie oraz prowadzi do większej tolerancji na zasolenie (Kong i wsp., 2017). W ostatnich latach zaproponowano także, że  $H_2O_2$  może wpływać na równowagę hormonalną powodując wzrost stężenia giberelin (GA) oraz spadek zawartości ABA. Rzeczywiście w wyniku potraktowania nasion tytoniu roztworami  $H_2O_2$  obserwowano wzrost zawartości giberelin oraz indukcję ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę giberelin, czyli 3-oksydazę GA oraz 20-oksydazę GA (Li i wsp., 2018). Natomiast informacje na temat wpływu  $H_2O_2$  na zawartość ABA i ekspresję genów zaangażowanych w jego metabolizm w nasionach poddanych imbibicji są ograniczone i często sprzeczne (Bahin i wsp., 2011; El-Maarouf-Bouteau i wsp., 2015). Zawartość ABA badano jedynie w nasionach dopiero po 24 godzinach od rozpoczęcia imbibicji w  $H_2O_2$  lub w siewkach już po zakończeniu kiełkowania. Brak jest natomiast informacji na temat wpływu  $H_2O_2$  na zawartość ABA i ekspresję genów zaangażowanych w jego metabolizm w pierwszych 24 godzinach imbibicji. **Dlatego też badania przeprowadzone na nasionach grochu są pierwszymi, w których przeanalizowano zmiany w zawartości ABA oraz w ekspresji genów zaangażowanych w jego metabolizm podczas pierwszych 24 godzin imbibicji nasion w roztworach  $H_2O_2$ , w warunkach tlenowych i anoksji (Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019).** Zarówno w warunkach tlenowych, jak również anoksji, zaobserwowano wyższą zawartość ABA w zarodkach nasion imbibowanych w roztworach  $H_2O_2$  (40 mM) w porównaniu z nasionami

imbibowanymi w wodzie już w 6-tej godzinie imbibicji. Wzrostowi zawartości ABA towarzyszył wzrost poziomu transkryptu *PsNCED2* oraz spadek poziomu transkryptu *PsABAUGTI*, zarówno w warunkach tlenowych jak i anoksji. Natomiast ekspresja genu *PsABA8'OH1* korelowała ze zmianami zawartości ABA tylko w warunkach tlenowych sugerując, że to jednak *PsABAUGTI* odgrywa kluczową rolę w regulacji zawartości ABA podczas imbibicji nasion grochu.

### **Analiza funkcjonalna *PsABAUGTI* grochu poprzez nadekspresję w roślinach rzodkiewnika**

W celu potwierdzenia zaangażowania *PsABAUGTI* w regulację zawartości ABA, **przeprowadzono analizę funkcjonalną *PsABAUGTI* poprzez nadekspresję w *Arabidopsis thaliana*.** W wyniku transformacji roślin rzodkiewnika konstruktem genetycznym *PsABAUGTI*\_pCAMBIA (sekwencję *PsABAUGTI* wprowadzono do wektora pCAMBIA pod promotorem CaMV35S) otrzymano kilkanaście linii homozygotycznych. **Nasiona transgenicznych roślin *Arabidopsis* (pokolenie T4) kielkowały szybciej niż nasiona roślin dzikich oraz charakteryzowały się obniżoną zawartością endogennego ABA oraz mniejszą wrażliwością na ABA podany egzogennie (Zdunek-Zastocka i Grabowska, 2019).** Otrzymane wyniki po raz pierwszy dowodzą, że *PsABAUGTI* odgrywa kluczową rolę w katabolizmie ABA, obniżając zawartości ABA w dojrzewających nasionach, jak również w nasionach poddanych imbibicji, zarówno w wodzie jak i w roztworach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **2.3.4. Podsumowanie wyników badań**

1. Otrzymano i scharakteryzowano trzy pełnej długości sekwencje cDNA oksydazy aldehydowej grochu (*PsAO1*, *PsAO2*, *PsAO3*), enzymu katalizującego ostatni etap szlaku biosyntezy kwasu abscysynowego (ABA).
2. W organach wegetatywnych, profil ekspresji genu *PsAO3* korelował z profilem aktywności i poziomem białka PsAOγ, izoformy AO grochu zdolnej do utleniania

aldehydu abscysynowego (ABAld) do ABA, zarówno w warunkach kontrolnych, jak również w warunkach stresu abiotycznego. Poziom mRNA *PsAO3* oraz aktywność  $PsAO\gamma$  znacząco wzrosły w warunkach zasolenia, obecności jonów amonowych oraz stopniowo wprowadzanego deficytu wody, zarówno w korzeniach jak i liściach grochu. Spośród liści różnych wiekiem, wzrost ten był najwyższy w starzejących się liściach, podczas gdy w młodych liściach poziom mRNA *PsAO3* nie ulegał zmianie. Uzyskane wyniki, po raz pierwszy przedstawiają pozytywną zależność pomiędzy poziomem transkryptu oraz poziomem aktywności izoformy AO, zdolnej do utleniania ABAld, w odpowiedzi na wybrane czynniki stresowe. Ponadto, profil ekspresji genu *PsAO3* korelował z ekspresją genu *PsNCED* oraz zawartością ABA w tkankach, zarówno w warunkach kontrolnych, jak również w odpowiedzi na czynniki stresowe. Otrzymane wyniki sugerują, że *PsAO3* bierze udział w wzmożonej w warunkach stresu syntezie ABA, jak również jest pośrednio zaangażowany w procesy starzenia mające miejsce w liściach.

3. Z badań przeprowadzonych u grochu po raz pierwszy wynika, że w początkowych etapach wykształcania nasion możliwa jest synteza ABA w częściach owocu pochodzenia matecznego, tj. okrywie nasiennej oraz owocni. Wskazują na to nie tylko wysoka aktywność izoformy  $PsAO\gamma$ , ale również wysoki poziom mRNA *PsAO3* oraz *PsNCED3*. Uzyskane wyniki sugerują także, że w syntezie ABA pochodzenia zarodkowego, odpowiedzialnego za indukcję spoczynku nasion podczas dojrzewania, bierze udział nie tylko izoforma  $PsAO\gamma$  (zlokalizowana w osi zarodka), ale także występujące w liścieniach izoforma  $PsAO\delta$  oraz  $PsAO\kappa$ .
4. W wyniku heterologicznej ekspresji genu *PsAO3* w komórkach *Pichia pastoris*, otrzymano rekombinowane białko, które było zdolne do utleniania aldehydu abscysynowego i charakteryzowało się bardzo zbliżoną specyficznością substratową oraz wrażliwością na inhibitory w porównaniu do izoformy  $PsAO\gamma$ . Analizy molekularne i biochemiczne potwierdziły, że *PsAO3* koduje podjednostki homodimeru  $PsAO\gamma$ .
5. W tkankach grochu zidentyfikowano i scharakteryzowano dwie pełnej długości sekwencje cDNA UDP-glukozylotransferazy ABA (*PsABAUGT1*, *PsABAUGT2*) oraz

dwie sekwencje cDNA 8'-hydroksylazy ABA (*PsABA8'OH1*, *PsABA8'OH1*), enzymów zaangażowanych w katabolizm ABA.

6. Z badań przeprowadzonych na nasionach grochu wynika, że enzymem koniecznym dla utrzymania niskiego stężenia ABA w końcowych etapach dojrzewania nasion oraz w pierwszych godzinach imbibicji, jest *PsABAUGT1*. Badania te są pierwszymi, w których przeanalizowano zmiany zawartości ABA oraz ekspresji genów zaangażowanych w jego metabolizm podczas pierwszych 24 godzin imbibicji nasion w roztworach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, w warunkach tlenowych jak i anoksji. Wyższa zawartość ABA w zarodkach nasion grochu, obserwowana była podczas imbibicji w roztworach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> niż w wodzie, a towarzyszył jej wzrost poziomu transkryptu *PsNCED2* oraz spadek poziomu transkryptu *PsABAUGT1*, zarówno w warunkach tlenowych jak i anoksji.
7. W wyniku nadekspresji *PsABAUGT1* w roślinach *Arabidopsis*, potwierdzono udział tego genu w katabolizmie ABA, a tym samym w regulacji jego zawartości, w dojrzewających i kiełkujących nasionach. Nasiona transgenicznych roślin (pokolenie T4) kiełkowały szybciej niż nasiona roślin dzikich, charakteryzowały się niższą zawartością endogennego ABA oraz obniżoną wrażliwością na egzogennie podany ABA.

### 2.3.5. Piśmiennictwo

1. Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M (2004) Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219:479-488
2. Bahin E, Bailly C, Sotta B, Kranner I, Corbineau F, Leymarie J (2011) Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant Cell Environ* 34:980-993
3. Dong T, Hwang I (2014) Contribution of ABA UDP-glucosyltransferases in coordination of ABA biosynthesis and catabolism for ABA homeostasis. *Plant Signal Behav* e28888:1-3
4. El-Maarouf-Bouteau H, Sajjad Y, Bazin J, Langlade N, Cristescu SM, Balzergue S, Baudouin E, Bailly C (2015) Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant Cell Environ* 38:364-374

5. Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Shinozaki K, Nakazono M, Kamiya Y, Koshihara T, Nambara E (2008) Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol* 147:1984-1993
6. Fidler J, Zdunek-Zastocka E, Prabucka B, Bielawski W (2016) Abscisic acid content and the expression of genes related to its metabolism during maturation of triticale grains of cultivars differing in pre-harvest sprouting susceptibility. *J Plant Physiol* 207: 1-9
7. Finkelstein R (2013) Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arabidopsis book* 11:1-36
8. Finkelstein R, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14:S15-S45
9. Frankowski K, Wilmowicz E, Kućko A, Sidłowska M, Kęsy J, Kopcewicz J (2013) Metabolizm kwasu abscysynowego. *Post Bioch* 59:83-88
10. Frey A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, Marion-Poll A (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 218:958-964
11. Gao X, Hu C, Li H, Yao Y, Meng M, Dong J, Zhao W, Chen Q, Li X (2013) Factors affecting pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review. *J Anim Plant Sci* 23:556-565
12. Gerjets T, Scholefield D, Foulkes MJ, Lenton JR, Holdsworth MJ (2009) An analysis of dormancy, ABA responsiveness, after-ripening and pre-harvest sprouting in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) caryopses. *J Exp Bot* 61:597-607
13. Han YJ, Cho KC, Hwang OJ, Choi YS, Shin AY, Hwang I, Kim JI (2012) Overexpression of an *Arabidopsis*  $\beta$ -glucosidase gene enhances drought resistance with dwarf phenotype in creeping bentgrass. *Plant Cell Rep* 31:1677-1686
14. Ikegami K, Okamoto M, Seo M, Koshihara T (2009) Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *J Plant Res* 122:235-243
15. Karssen CM, Brinkhorst-van der Swan DLC, Breeklant AE, Koornneef M (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 157:158-165
16. Kermodé AR (2005) Role of abscisic acid in seed dormancy. *J Plant Growth Regul* 24:319-344
17. Kong X, Luo Z, Zhang Y, Li W, Dong H (2017) Soaking in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates ABA biosynthesis and GA catabolism in germinating cotton seeds under salt stress. *Acta Physiol Plant* 39:2
18. Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshihara T, Kamiya Y, Nambara E (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* 23:1647-1656

19. Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E, Marion-Poll A (2006) Functional analysis of *Arabidopsis* *NCED6* and *NCED9* genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *Plant J* 45:309-319
20. Li Z, Gao Y, Zhang Y, Lin C, Gong D, Guan Y, Hu J (2018) Reactive oxygen species and gibberellin acid mutual induction to regulate tobacco seed germination. *Front Plant Sci* 9:1279
21. Lim EK, Doucet CJ, Hou B, Jackson RG, Abrams SR, Bowles DJ (2005) Resolution of (+)-abscisic acid using an *Arabidopsis* glycosyltransferase. *Tetrahedron-Asymmetr* 16:143-147
22. Ma Y, Cao J, He J, Chen Q, Li X, Yang Y (2018) Molecular mechanism for the regulation of ABA homeostasis during plant development and stress responses. *Int J Mol Sci* 19:3643
23. Millar A, Jacobsen J, Ross J, Helliwell C, Poole A, Scofield G, Reid J, Gubler F (2006) Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J* 45:942-954
24. Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56:165-185
25. Nambara E, Okamoto M, Tatematsu K, Yano R, Seo M, Kamiya Y (2010) Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci Res* 20:55-67
26. Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshiha T, Nambara E (2006) *CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141:97-107
27. Rodriguez-Gacio MC, Matilla-Vazquez MA, Matilla AJ (2009) Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal Behav* 4:1035-1048
28. Seo M, Koiwai H, Akaba S, Komano T, Oritani T, Kamiya Y, Koshiha T (2000a) Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 23:481-488
29. Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JAD, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiha T (2000b) The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12908-12913
30. Tuteja N (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav* 2:135-138
31. Xu ZJ, Nakajima M, Suzuki Y, Yamaguchi I (2002) Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiol* 129:1285-1295
32. Xu ZY, Kim DH, Hwang I (2013) ABA homeostasis and signaling involving multiple subcellular compartments and multiple receptors. *Plant Cell Rep* 32:807-813
33. Zdunek-Zastocka E, Fidler J, Prabucka B, Pojmaj M (2016) Wrażliwość na kwas abscysynowy zarodków pszenżyta odmian różniących się podatnością na porastanie. W:

„Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania 2016” pod redakcją Dety Łuczyckiej.  
Wydawnictwo Idea Knowledge Future, Wrocław, 367-377, ISBN 978-83-945311-0-2

34. Zdunek E, Lips SH (2001) Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *J Exp Bot* 52:1269-1276
35. Zdunek-Zastocka E, Omarov RT, Koshiha T, Lips SH (2004) Activity and protein level of AO isoforms in pea plants (*Pisum sativum* L.) during vegetative development and in response to stress conditions. *J Exp Bot* 55:1361-1369.



### 3. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

#### 3.1. Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

W latach 1991-1996 byłam studentką kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Pracę magisterską pt.: „Badanie wpływu chlorochiny na profile wewnątrzkomórkowych aktywności proteolitycznych u *Trametes versicolor* w warunkach idiofazy wymuszonej ograniczeniem źródła azotu lub węgla”, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Leonowicza oraz dr hab. Magdaleny Staszczak obroniłam w czerwcu 1996 roku. Wyniki doświadczeń prowadzonych przeze mnie w trakcie przygotowywania pracy magisterskiej stały się częścią następujących opracowań naukowych:

Staszczak M, **Zdunek E**, Leonowicz A (2000) Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*: Effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzymes activity. *Journal of Basic Microbiology* 40:51-63 (IF = **1,051**, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = **9**, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = **20**)

Staszczak M, **Zdunek E**, Leonowicz A (1999) Intracellular proteolysis. *Postępy Biochemii* 45, 32-41 (IF = 0, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = **6**, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = **5**)

W październiku 1996 roku podjęłam pracę w zespole badawczym kierowanym przez prof. dr hab. Wiesława Bielawskiego w Katedrze Biochemii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Prowadzone wówczas w Katedrze Biochemii badania koncentrowały się między innymi wokół hydrolizy substancji zapasowych w ziarniakach pszenżyta odmian różniących się wrażliwością na przedźniwne porastanie. W swojej pracy skupiłam się głównie na identyfikacji, oczyszczaniu i charakterystyce biochemicznej aminopeptydaz zaangażowanych w hydrolizę białek podczas kiełkowania ziarniaków pszenżyta. Rozpoczęte przeze mnie badania były następnie kontynuowane przez kolejnych doktorantów prof. dr hab. Wiesława Bielawskiego oraz przeze mnie po powrocie z Izraela. W marcu 1998 wyjechałam na 3-letni staż naukowy do Biostress Research Laboratory, the Blaustein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University of Negev, Sede Boqer, Izrael. W Izraelu włączyłam się w badania ukierunkowane na

poznanie mechanizmów warunkujących tolerancję oraz adaptację roślin do niekorzystnych warunków środowiska tj. susza, zasolenie, czy wysoka temperatura. Pracę w laboratorium kierowanym przez prof. Herman Lipsa rozpoczęłam od badania wymiany sygnałów pomiędzy organami grochu w odpowiedzi na czynniki stresowe. Otrzymane wyniki sugerowały, że rolę cząsteczki sygnałowej przesyłanej sokami ksylemu z korzeni do pędu w warunkach zasolenia pełni kwas abscysynowy. Natomiast w warunkach deficytu azotu lub obecności jonów amonowych jako jedyne źródła azotu, informacja o stresie może być przekazywana w postaci obniżonego stężenia cytokinin bądź obniżonej wartości ilorazu stężeń  $\text{NO}_3^-/\text{N}_{\text{zred}}$  ( $\text{N}_{\text{zred}}$ =aminokwasy plus ureidy) w soku ksylemowym. W swojej pracy badałam także udział oksydazy aldehydowej oraz innych molibdenoenzymów, takich jak reduktaza azotanowa oraz dehydrogenazay ksantynowa, w odpowiedzi grochu na czynniki stresowe. Zaangażowanie oraz obiecujące wyniki moich badań, skutkowało możliwością wyjazdu do laboratorium kierowanym przez prof. Tomokazu Koshiba w Tokio (Laboratory of Hormonal Cellular Mechanism, Tokyo Metropolitan University, Japonia), gdzie zapoznałam się z metodami biologii molekularnej oraz wykonałam część badań dotyczących oczyszczania białka oksydazy aldehydowej grochu.

Wyniki badań prowadzonych w Izraelu oraz Japonii stały się treścią zarówno mojej pracy doktorskiej, którą obroniłam w 2002 roku, jak również kilku, wymienionych poniżej publikacji:

**Zdunek E**✉, Falik O, Fölöp K, Gersani M, Lips SH (2000) Interchange of shoot and root signals during competition and limiting nitrogen. W: Nitrogen in a sustainable ecosystem: from the cell to the plant. M. A. Martins- Louçao and S. H. Lips (eds.). Backhuys Publishers, Leiden, Holandia, 205-210, ISBN 90-5782-063-3 (IF=0,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^{\text{a}}=5$ )

**Zdunek E**✉, Lips SH (2001) Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. Journal of Experimental Botany 52:1269-1276 (IF= 2,433,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^{\text{a}} = 13$ ,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^{\text{b}} = 45$ )

Lips SH, Omarov RT, Sagi M, **Zdunek E** (2002) The role of inorganic N ions on plant growth adaptation to changing environmental conditions. W: Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la biología molecular a la agronomía. P. A. Tejo (ed.). Universidad Pública de Navarra, Hiszpania, 401-409. ISBN 84-95075-88-1 (IF=0,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^{\text{a}} = 5$ )

**Zdunek-Zastocka E**, Lips SH (2003) Is xanthine dehydrogenase involved in response of pea plants (*Pisum sativum* L.) to salinity or ammonium treatment? *Acta Physiologiae Plantarum* 25:395-401 (IF= 0,438, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = 7, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = 25)

**Zdunek-Zastocka E**, Lips SH (2003) Plant molybdoenzymes and their response to stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 25:437-452 (IF=0,438, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup>=7, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup>=25)

**Zdunek-Zastocka E**, Omarov RT, Koshiha T, Lips SH (2004) Activity and protein level of AO isoforms in pea plants (*Pisum sativum* L.) during vegetative development and in response to stress growth conditions. *Journal of Experimental Botany* 55:1361-1369 (IF = 3,366, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = 13, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>b</sup> = 45)

☒ autor korespondencyjny

<sup>a</sup> pkt<sub>MNiSW</sub> - punkty MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania

<sup>b</sup> pkt<sub>MNiSW</sub> - punkty MNiSW według ujednoliconego wykazu czasopism załączonego do komunikatu z dnia 26.01.2017

### **3.2. Praca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora oraz aktualnie realizowane zadania badawcze**

Po uzyskaniu stopnia doktora, równolegle do badań stanowiących opisane powyżej osiągnięcie naukowe, uczestniczyłam w kilku innych zadaniach badawczych, które zostały przedstawione poniżej.

#### **Molekularna, biochemiczna i funkcjonalna charakterystyka aminopeptydazy prolinowej pszenżyta**

**Aminopeptydaza prolinowa** (PAP; EC 3.4.11.5) jest enzymem katalizującym reakcję odłączenia aminokwasu proliny lub hydroksyproliny z N-końca krótkich peptydów. Wiedza na temat właściwości biochemicznych, a przede wszystkim funkcji PAP u roślin jest bardzo ograniczona. Ze względu na właściwości osmoprotekcyjne proliny, sugeruje się udział PAP w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. W siewkach

pszenżyta zaobserwowano bowiem wzrost aktywności iminopeptydazowej w odpowiedzi na suszę, zasolenie, oraz obecność jonów metali w pożywce. Białko PAP z siewek pszenżyta poddanych stresowi suszy wyizolowano, oczyszczono z zastosowaniem metod chromatograficznych oraz zbadano jego właściwości biochemiczne. Wysokie powinowactwo enzymu do substratów z proliną na N-końcu oraz optimum pH około 7,5 pozwoliło zaklasyfikować ten enzym do grupy aminopeptydaz neutralnych, podgrupy aminopeptydaz prolinowych. Aminopeptydaza prolinowa z siewek pszenżyta okazała się tetrametrem o masie cząsteczkowej 216 kDa, zbudowanym z czterech podjednostek o masie 54 kDa.

Wyniki powyższych badań opisano i przedyskutowano w następującej publikacji:

Szawłowska U, **Zdunek-Zastocka E**✉, Bielawski W (2011) Biochemical characterization of prolyl aminopeptidase from shoots of triticale seedlings and its activity changes in response to suboptimal growth conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49:1342-1349 (IF = **2,838**,  $\text{pkt}_{\text{MNI}^{\text{SW}}}$ <sup>a</sup> = **35**,  $\text{pkt}_{\text{MNI}^{\text{SW}}}$ <sup>b</sup> = **35**)

Białka PAP wyizolowano wprawdzie z kilku gatunków roślin, to jednak nadal nie poznano sekwencji aminokwasowych scharakteryzowanych biochemicznie białek. Stąd też, celem kolejnego etapu badań było poznanie sekwencji cDNA aminopeptydazy prolinowej z pszenżyta. Otrzymaną sekwencję nukleotydową z pszenżyta nazwano *TsPAPI* i zarejestrowano w bazie GeneBank NCBI pod następującym numerem akcesyjnym: JN808306. Pełnej długości cDNA *TsPAPI* składa się z 1387 pz, gdzie ORF stanowi 1173 pz i koduje białko o długości 390 aminokwasów i masie 43,9 kDa. **Seqwencja *TsPAPI* z pszenżyta okazała się być wyjątkową, gdyż w przetłumaczonej sekwencji aminokwasowej posiada regiony charakterystyczne dla bakteryjnych, monomerycznych form tego enzymu.** Interesującym więc było poznanie funkcji tego enzymu w organizmach roślinnych, jak również jego właściwości biochemicznych.

W wyniku **nadekspresji genu *TsPAPI* w *Arabidopsis thaliana*** otrzymano transgeniczne linie charakteryzujące się kilkanaście razy wyższą, w stosunku do roślin dzikich, aktywnością iminopeptydazową oraz trzykrotnie wyższą zawartością proliny. Transgeniczne linie kwitły o 4 dni wcześniej niż rośliny dzikie, wykształciły o 20-30% więcej łuszczyń, a pędy główne były średnio o około 3,5 cm krótsze. Wyniki wskazują, że *TsPAPI* może brać udział w regulacji zawartości proliny w roślinach, a tym samym może wpływać na procesy uzależnione od stężenia proliny w tkankach. Może tym samym brać

udział w regulacji zawartości proliny w odpowiedzi na czynniki stresowe. Hipotezę tę potwierdzał obserwowany wzrost proliny w siewkach pszenżyta w odpowiedzi na zasolenie, suszę czy obecność kadmu, któremu towarzyszył wzrost poziomu transkryptu *TsPAP1*.

W celu potwierdzenia, że *TsPAP1* koduje białko o aktywności iminopeptydazowej, gen ten poddano **heterologicznej ekspresji w *Escherichia coli***, a otrzymane białko rekombinowane oczyszczono z zastosowaniem chromatografii powinowactwa i scharakteryzowano. Chromatografia sita molekularnego w połączeniu z elektroforezą SDS wykazały, że *TsPAP1* jest monomerem o masie cząsteczkowej 37,5 kDa. Tak więc, scharakteryzowane we wcześniejszych badaniach białko PAP pszenżyta (tetramer) (Szawłowska i wsp., 2011), nie jest kodowane przez *TsPAP1*. Dalsze badania wykazały, że rekombinowane białko *TsPAP1* preferuje substraty z proliną na N-końcu ( $K_m=7,75 \times 10^{-5} M$ ), ale jest także zdolne do hydrolizowania  $\beta$ -naftyloamidów hydroksyproliny i alaniny ( $K_m=2,8 \times 10^{-4} M$ ). Wśród testowanych peptydów najefektywniej hydrolizowane były di- i tripeptydy, zwłaszcza te z glicyną w pozycji Y. Zastosowanie inhibitorów diagnostycznych wykazało, że *TsPAP1* jest peptydazą serynową, a dalsza charakterystyka ujawniła, że kluczowe dla utrzymania aktywnej katalitycznej konformacji białka *TsPAP1* są reszty SH. W badaniach tych po raz pierwszy otrzymano i scharakteryzowano pod względem biochemicznym oraz funkcjonalnym monomeryczne, roślinne białko aminopeptydazy prolinowej.

Wyniki powyższych badań opisano i przedyskutowano w następujących publikacjach:

Szawłowska U, Grabowska A, **Zdunek-Zastocka E**, Bielawski W (2012) *TsPAP1* encodes a novel plant prolyl aminopeptidase whose expression is induced in response to suboptimal growth conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419:104-109 (IF = **2,406**,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^a = 25$ ,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^b = 20$ )

**Zdunek-Zastocka E**, Grabowska A, Branicki T, Michniewska B (2017) Biochemical characterization of the triticale *TsPAP1*, a new type of plant prolyl aminopeptidase, and its impact on proline content and flowering time in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 116:18-26 (IF = **2,718**,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^b = 35$ )

### **Biochemiczna charakterystyka aminopeptydazy fenyloalanylowej grochu**

Pomimo szeregu publikacji potwierdzających istnienie aminopeptydaz specyficznie odłączających aminokwasy aromatyczne z N-końca łańcuchów polipeptydowych, do tej pory nikt nie podjął się wyodrębnienia aminopeptydaz aromatycznych jako oddzielnej grupy, czego skutkiem było wcielenie opisanych enzymów do grupy aminopeptydaz leucynowych (LAP). Dlatego też, celem kolejnej pracy było oczyszczenie oraz molekularna i biochemiczna charakterystyka **aminopeptydazy fenyloalanylowej** z liści grochu. W przeprowadzonych badaniach nie tylko opisano budowę oraz właściwości biochemiczne aminopeptydazy fenyloalanylowej grochu, ale przede wszystkim starano się podkreślić jej odrębność w stosunku do aminopeptydaz leucynowych, a w szczególności wobec aminopeptydaz typu LAP-N.

Wyniki powyższych badań opisano i przedyskutowano w następującej publikacji:

Pyrzyna M, Szawłowska U, Bielawski W, **Zdunek-Zastocka E**✉ (2011) Purification, biochemical characterisation, and mass spectrometry analysis of phenylalanine aminopeptidase from the shoots of pea plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:609-617 (IF = **1,639**,  $\text{pkt}_{\text{MNiSW}}^{\text{a}} = \mathbf{25}$ ,  $\text{pkt}_{\text{MNiSW}}^{\text{b}} = \mathbf{25}$ )

### **Rola dioksygenazy 9-cis-epoksykarotenoidowej oraz 8'-hydroksylazy ABA w regulacji spoczynku nasion pszenżyta**

Badania zostały zrealizowane w ramach **grantu NCN 2012/07/B/NZ9/01765**, którego byłam **kierownikiem** (2013-2017). Opracowałam koncepcję badań, przygotowałam wnioski, byłam wykonawcą dużej części doświadczeń i analiz (analiza ziarniaków pszenżyta pochodzącego z doświadczenia polowego, analiza transgenicznych roślin *Arabidopsis*).

Jak wcześniej wspomniałam, w Katedrze Biochemii prowadzone są od wielu lat badania nad przedźniwnym porastaniem (PHS) ziarniaków pszenżyta, zjawiskiem przynoszącym corocznie wymierne straty gospodarcze. Przedźniwne porastanie polega na kiełkowaniu ziarniaków jeszcze przed oddzieleniem od rośliny matecznej i jest wynikiem przełamania spoczynku przed osiągnięciem przez ziarniaki dojrzałości pełnej. Mimo intensywnych badań prowadzonych w obrębie różnych dziedzin nauki (m. in. fizjologia,

genetyka molekularna, biochemia) mechanizm ustępowania spoczynku pozostaje nadal niewyjaśniony. Wydaje się, że jedynie badania interdyscyplinarne, obejmujące wszystkie wspomniane dziedziny, są w stanie przybliżyć nas do jego poznania. Stąd też powstał pomysł, aby połączyć i wykorzystać wiedzę oraz doświadczenie pracowników Katedry Biochemii i stworzyć projekt, który mógłby przybliżyć nas do wyjaśnienia powyższego problemu. Do udziału w projekcie zaprosiłam również naukowców Zakładu Biochemii Roślin, Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, dr hab. Annę Góra-Sochacką oraz dr Anetę Więsyk.

Wiadomo, że spoczynek pierwotny indukowany jest w trakcie dojrzewania nasion, a istotną rolę w tym procesie odgrywa kwas abscysynowy (ABA). Spadek zawartości ABA w nasionach poddanych imbibicji skorelowany jest z ustąpieniem spoczynku i w konsekwencji prowadzi do kiełkowania. Przyjmuje się, że spadek zawartości ABA podczas kiełkowania może być wynikiem wzmożonego katabolizmu tego fitohormonu. Z drugiej strony wiadomo, że w nasionach poddanych imbibicji zachodzi również synteza ABA *de novo*. Zatem różnice w głębokości spoczynku występujące pomiędzy gatunkami i odmianami roślin uprawnych mogą być wynikiem m.in. różnic w równowadze pomiędzy tymi procesami. Stąd też jednym z czynników decydujących o głębokości spoczynku, a tym samym wrażliwości ziarniaków zbóż na przedźniwne porastanie, może być zróżnicowana zdolność ziarniaków do biosyntezy i katabolizmu ABA.

Dlatego też **celem projektu** było określenie udziału genów kodujących enzymy regulatorowe szlaku biosyntezy i katabolizmu ABA, czyli dioksygenazę 9-*cis*-epoksykarotenoidową (NCED) oraz 8'-hydroksylazę ABA (ABA8'OH), w regulacji spoczynku ziarniaków pszenżyta. **Materiał badawczy** stanowiły ziarniaki pszenżyta ozimego ( $\times$  *Triticosecale* Wittm.) dwóch odmian różniących się odpornością na przedźniwne porastanie Odmiana Leontino charakteryzuje się średnią odpornością na porastanie ziaren w kłosie, natomiast Fredro jest odmianą o wysokiej odporności na to niekorzystne zjawisko. Ziarniaki obu odmian zostały zebrane z roślin uprawianych w wazonach (szklarnie SGGW), jak również w **warunkach polowych** (Laski k/Warki).

W ramach projektu otrzymano dwie pełnej długości sekwencje cDNA dioksygenazy 9-*cis*-epoksykarotenoidowej pszenżyta (*TsNCED1*, *TsNCED2*), enzymu z szlaku biosyntezy ABA, oraz dwie pełnej długości sekwencje cDNA 8'-hydroksylazy ABA pszenżyta (*TsABA8'OH1*, *TsABA8'OH2*), enzymu z szlaku katabolizmu ABA. Sekwencje aminokwasowe TsNCED1 oraz TsNCED2 zawierały motywy silnie konserwowane w białkach należących do rodziny dioksygenaz karotenoidów oraz aminokwasy istotne dla

specyficzności substratowej względem 9-*cis*-karotenoidów. Natomiast, w sekwencjach aminokwasowych obu *TsABA8'OH* stwierdzono obecność motywów charakterystycznych dla białek z rodziny cytochromów P450.

W trakcie dojrzewania ziarniaków pszenżyta, zarówno w warunkach kontrolnych jak również w warunkach sprzyjających porastaniu, wyższą zawartość ABA obserwowano w ziarniakach odmiany Fredro niż Leontino. Dwukrotnie wyższa zawartość ABA w ziarniakach odmiany Fredro była skorelowana z bardziej intensywną syntezą tego fitohormonu. Ekspresja *TsNCEDI* i *TsNCED2* była bowiem znacznie wyższa w odmianie Fredro niż Leontino przez cały okres dojrzewania ziarniaków, osiągając najwyższy poziom w okresie poprzedzającym szczyt akumulacji ABA oraz w trakcie tego szczytu. Otrzymane wyniki wskazują na udział obu *TsNCED* w regulacji zawartości ABA w tym okresie rozwoju ziarniaków.

W końcowych etapach dojrzewania ziarniaków, większy spadek zawartości ABA obserwowano w odmianie Leontino niż Fredro, co korelowało z wyższym poziomem transkryptu *TsUGT1*. Wyniki te wskazują na ważną rolę glikozylacji w regulacji zawartości ABA na tym etapie rozwoju ziarniaków. Dalsze obniżenie zawartości ABA, obserwowane po imbibicji ziarniaków odmiany Leontino, skutkowało ustąpieniem spoczynku i wynikało z wzmożonego katabolizmu ABA, będącego udziałem enzymów kodowanych przez *TsABA8'OH1* oraz *TsABA8'OH2*. Po imbibicji ziarniaków odmiany Fredro, zawartość ABA utrzymywała się nadal na wysokim poziomie, który wydaje się być wynikiem intensywnej biosyntezy będącej udziałem enzymu kodowanego przez *TsNCEDI*.

Późnive przechowanie nie powodowało zmian w zawartości ABA w suchych ziarniakach, jednak miało wpływ na tempo metabolizmu tego hormonu po imbibicji, szczególnie w ziarniakach odmiany Fredro. Obserwowano bowiem w ziarniakach tej odmiany, zarówno intensywniejszy katabolizm ABA, wynikający z wzrostu ekspresji obu *TsABA8'OH*, jak również osłabioną syntezę ABA, wynikającą z spadku poziomu transkryptu *TsNCEDI*. Zmiany te skutkowały ustąpieniem spoczynku ziarniaków tej odmiany.

W wyniku analizy funkcjonalnej, potwierdzono udział *TsNCEDI* w regulacji syntezy kwasu abscysynowego. Nasiona transgenicznych roślin *Arabidopsis* oraz tytoniu z nadekspresją tego genu cechowały się wyższą zawartością ABA niż nasiona roślin typu dzikiego. Ponadto potwierdzono udział *TsNCEDI* w regulacji spoczynku nasion, bowiem nasiona roślin transgenicznych kiełkowały później w porównaniu do nasion roślin typu dzikiego.



Analiza funkcjonalna w połączeniu z analizą profili ekspresji, potwierdziła udział obu *TsABA8'OH* w obniżaniu zawartości ABA podczas imbibicji nasion. Ponadto, analiza transgenicznych siewek tytoniu z nadekspresją genu *TsABA8'OH2*, sugeruje na udział tego genu w regulacji zawartości ABA także po zakończeniu procesu kiełkowania.

Otrzymane w ramach niniejszego projektu wyniki wskazują, że jednym z czynników warunkujących głębokość spoczynku ziarniaków pszenżyta jest zróżnicowana zdolność ziarniaków do biosyntezy i katabolizmu ABA, zarówno podczas dojrzewania ziarniaków, jak również po imbibicji. Zróżnicowana zdolności ziarniaków do metabolizmu ABA może być więc jednym z czynników determinujących podatność na przedźniwne porastanie, a ekspresja genów *TsNCED1*, *TsABA8'OH1* oraz *TsABA8'OH2* może stanowić marker molekularny, znajdujący zastosowanie w selekcji odmian zbóż o zwiększonej odporności na to niekorzystne zjawisko.

Wyniki powyższych badań opisano i przedyskutowano w następujących publikacjach:

Fidler J, **Zdunek-Zastocka E**✉, Prabucka B, Bielawski W (2016) Abscisic acid content and the expression of genes related to its metabolism during maturation of triticale grains of cultivars differing in pre-harvest sprouting susceptibility. *Journal of Plant Physiology* 207:1-9 (IF = **3,121**,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^{\text{a}} = 35$ ,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^{\text{b}} = 35$ ).

Fidler J, Grabowska A, Prabucka B, Więsyk A, Góra-Sochacka A, Bielawski W, Pojmaj M, **Zdunek-Zastocka E**✉ (2018) The varied ability of grains to synthesize and catabolize ABA is one of the factors affecting dormancy and its release by after-ripening in imbibed triticale grains of cultivars with different pre-harvest sprouting susceptibilities. *Journal of Plant Physiology* 226:48-55 (IF = **2,833**,  $\text{pkt}_{\text{MNI SW}}^{\text{b}} = 35$ ).

### **Wrażliwość na kwas abscysynowy zarodków pszenżyta odmian różniących się podatnością na przedźniwne porastanie**

Badania przeprowadzone na pszenżycie wykazały, że zarodki ziarniaków odmian różniących się podatnością na przedźniwne porastanie charakteryzowały się nie tylko zróżnicowaną zawartością ABA, ale także wrażliwością na ten fitohormon. Zarodki obu badanych odmian pszenżyta ozimego, Leontino i Fredro, były najbardziej wrażliwe na ABA we wczesnym etapie dojrzewania ziarniaków. Wrażliwość na ABA spadała stopniowo podczas dojrzewania ziarniaków odmiany Leontino (jednej z najbardziej

wrażliwych odmian na PHS), co korelowało z ustępowaniem spoczynku ziarniaków tej odmiany, podczas gdy w zarodkach odmiany Fredro (jednej z najbardziej odpornych odmian na PHS) pozostawała nadal wysoka, aż do pełnej dojrzałości. Ustąpienie spoczynku ziarniaków odmiany Fredro miało miejsce dopiero po okresie późniejszego przechowywania, czemu towarzyszyła utrata wrażliwości na ABA.

Uzyskane wyniki wskazują, że nie tylko zawartość ABA, ale również wrażliwość na ten fitohormon odgrywa istotną rolę w regulacji spoczynku nasion i wpływa na ich podatność na PHS. Aby odpowiedzieć na pytanie, czym uwarunkowana jest zróżnicowana wrażliwość zarodków ziarniaków zbóż na ABA, celem badań obecnie prowadzonych jest poznanie sekwencji nukleotydowej oraz ekspresji receptorów PYR/PYL, będących głównym komponentem ścieżki sygnałowej ABA.

Wyniki powyższych badań opisano i przedyskutowano w następującej publikacji:

**Zdunek-Zastocka E**<sup>✉</sup>, Fidler J, Prabucka B, Pojmaj M (2016) Wrażliwość na kwas abscysynowy zarodków pszenżyta odmian różniących się podatnością na porastanie. W: „Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania 2016” pod redakcją Dety Łuczyckiej. Wydawnictwo Idea Knowledge Future, Wrocław, 367-377, ISBN 978-83-945311-0-2 (IF=0, pkt<sub>MNiSW</sub><sup>a</sup> = 5)

### **Molekularna charakterystyka fitocystatyn występujących w wykształcających i kielkujących ziarniakach pszenżyta**

Uczestniczyłam także w badaniach nad regulacją proteolizy w ziarniakach pszenżyta odmian różniących się podatnością na przedźniwne porastanie. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że w kontrolę aktywności endopeptydaz cysteinowych, w tym tych współodpowiedzialnych za przedwczesną hydrolizę białek zapasowych w ziarniakach pszenżyta, zaangażowane są fitocystatyny. Analiza ekspresji genów kodujących te białkowe inhibitory (*Trc-1*, *Trc-4*, *TrcC-5*), podczas wykształcania i kielkowania ziarniaków pszenżyta, wykazała ich możliwe zaangażowanie w kontrolę przedwczesnego kielkowania w kłosie, zwanego przedźniwnym porastaniem.

Wyniki powyższych badań opisano i przedyskutowano w następującej publikacji:

Szewińska J, **Zdunek-Zastocka E**, Pojmaj M, Bielawski W (2012) Molecular cloning and expression analysis of triticale phytocystatins during development and

germination of seeds. *Plant Molecular Biology Reporter* 30, 867–877 (IF = **5,319**,  $\text{pkt}_{\text{MNiSW}}^{\text{a}} = 20$ ,  $\text{pkt}_{\text{MNiSW}}^{\text{b}} = 25$ )

### Funkcjonalna analiza dehydrogenazy glutaminianowej pszenżyta

Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH, EC 1.4.1.2-3) jest enzymem katalizującym redukcyjną aminację 2 -oksoglutaranu prowadzącą do powstania kwasu glutaminowego. U wielu gatunków roślin GDH jest heksametrem, który zbudowany jest z dwóch typów podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$ , które kodowane są przez oddzielne geny. U pszenżyta zostały sklonowane dwa geny kodujące podjednostki GDH: *TsGDH1* (kodujący podjednostkę  $\beta$ ) oraz *TsGDH2* (kodujący podjednostkę  $\alpha$ ). W celu zbadania funkcji obu sklonowanych genów, poddano analizie transgeniczne linie *Arabidopsis*, które otrzymano w wyniku transformacji konstruktami genetycznymi *35S::TsGDH1s* oraz *35S::TsGDH2s*. Linie transgeniczne fenotypowo nie różniły się od roślin typu dzikiego, kiedy uprawiane były w standardowych warunkach, chociaż charakteryzowały się zwiększoną aktywnością aminacyjną i deaminacyjną dehydrogenazy glutaminianowej w porównaniu z roślinami dzikimi. Natomiast kiedy rośliny uprawiane były w warunkach umiarkowanego zasolenia: 50 mM NaCl, w roślinach transgenicznych obserwowano większą biomasę, wyższą zawartość chlorofilu oraz aktywność GDH w porównaniu z roślinami dzikimi. Uzyskane wyniki wskazują na udział dehydrogenazy glutaminianowej pszenżyta w odpowiedzi na stres solny.

Wyniki powyższych badań opisano i przedyskutowano w następującej publikacji:

Grabowska A, **Zdunek-Zastocka E**, Kutryn E, Kwinta J (2017) Molecular cloning and functional analysis of the second gene encoding glutamate dehydrogenase in triticale. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:24 (IF = **1,438**,  $\text{pkt}_{\text{MNiSW}}^{\text{b}} = 25$ ).

✉ autor korespondencyjny

<sup>a</sup>  $\text{pkt}_{\text{MNiSW}}$  - punkty MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania

<sup>b</sup>  $\text{pkt}_{\text{MNiSW}}$  - punkty MNiSW według ujednoliconego wykazu czasopism załączonego do komunikatu z dnia 26.01.2017

**4. PODSUMOWANIE PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ**

<b>Publikacje</b>	<b>Liczba</b>	<b>IF<sup>a</sup></b>	<b>Punkty MNiSW<sup>a</sup></b>	<b>Punkty MNiSW<sup>b</sup></b>
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:				
A) w czasopiśmie z bazy JCR <sup>c</sup>	5	11,663	137	160
B) w czasopiśmie spoza bazy JCR <sup>c</sup>	-	-	-	-
Publikacje niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego, w tym:	18	30,038	310	420
A) publikacje w czasopiśmie z bazy JCR <sup>c</sup>				
- przed uzyskaniem stopnia doktora	2	3,484	22	65
- po uzyskaniu stopnia doktora	11	26,554	262	335
B) rozdziały w monografiach i publikacje spoza bazy JCR <sup>c</sup>				
- przed uzyskaniem stopnia doktora	2	-	11	10
- po uzyskaniu stopnia doktora	3	-	15	15
<b>Łącznie publikacje naukowe</b>	<b>23<sup>d</sup></b>	<b>41,701</b>	<b>447</b>	<b>580</b>
Komunikaty zjazdowe prezentowane na				
- konferencjach krajowych	14			
- konferencjach międzynarodowych	4			
<b>RAZEM (publikacje naukowe oraz komunikaty zjazdowe)</b>	<b>41</b>	<b>41,701</b>	<b>447</b>	<b>580</b>

<sup>a</sup> zgodnie z rokiem opublikowania

<sup>b</sup> według ujednoliconego wykazu czasopism załączonego do komunikatu z dnia 26.01.2017

<sup>c</sup> Journal Citation Reports (JCR)

<sup>d</sup> jestem autorem korespondencyjnym w 17 z 23 publikacji naukowych

Liczba projektów w których byłam kierownikiem (grant KBN, grant NCN): **2**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **8**

Całkowita liczba cytowań publikacji według bazy WoS: **191**

Liczba cytowań publikacji według bazy WoS bez autocytowań: **166**

*Zdunek - Zastocka*