AUTOREFERAT

Dr inż. Weronika Krystyna Czarnocka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii

Katedra Botaniki

Warszawa, 2021

Spis treści

1. Dane osobowe ……...….3

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe ……...……..…3

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych ……..…….3

4. Sumaryczne wskaźniki dorobku naukowo-badawczego ……..……..3

5. Omówienie osiągnięć ……..…..…….4

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego i wykaz cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie wraz z danymi bibliometrycznymi …….…….....4

5.2. Syntetyczne omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników ……...…...……...6

5.2.1. Wstęp ……...…….6

5.2.2. Cel pracy i hipotezy badawcze ……...……10

5.2.3. Omówienie wyników badań oraz metod ich wykorzystania ……11

5.2.4. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań ……..……25

5.2.5. Wykaz cytowanej literatury ……..…….25

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych …….…….…….30

6.1. Wykaz pozostałych publikacji wraz z danymi bibliometrycznymi ……30

6.2. Obszary zainteresowań naukowych wraz z omówieniem pozostałych, najważniejszych osiągnięć naukowo-badawczych ……..…….……32

7. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej ……..…….…….37

8. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę …….…….…..37

8.1. Funkcja promotora pomocniczego w przewodach doktorskich …….…….…..37

8.2. Funkcja promotora prac magisterskich ……...…...37

8.3. Zajęcia dydaktyczne ……..……...38

8.4. Doświadczenie w tworzeniu oferty programowej uczelni ……..….…….39

8.5. Popularyzacja nauki ……...……...39

9. Studia podyplomowe, kursy i szkolenia ……..…….39

1. DANE OSOBOWE

Imię i nazwisko: **Dr inż. Weronika Krystyna Czarnocka** (poprzednio: Wituszyńska)

Miejsce zatrudnienia: Katedra Botaniki
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159, 02-787 Warszawa

e-mail: weronika_czarnocka@sggw.edu.pl
nr ORCID: 0000-0003-4062-0370
Web of Science ResearcherID C-1461-2014

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

2013 r. **doktor nauk biologicznych** w dyscyplinie biochemia (dyplom z wyróżnieniem)
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akadami Nauk w Warszawie
Temat pracy doktorskiej: „Genetyczne oraz molekularne mechanizmy kontrolujące programowaną śmierć komórki oraz przystosowanie roślin w odpowiedzi na stresy abiotyczne"
Promotor: Prof. dr Stanisław Karpiński

2009 r. **magister inżynier biotechnologii**, specjalność: diagnostyka molekularna
Uniwersytet Przyrodniczy im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu
Temat pracy magisterskiej: „Zastosowanie interferencyjnego RNA do inaktywacji genu kodującego α1,3-galaktozylotransferazę świni domowej (*Sus scrofa domestica*)"
Promotor: Prof. dr hab. Ryszard Słomski

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

10.2015 – obecnie **adiunkt** - Katedra Botaniki, Instytut Biologii (do 2019 roku Wydział Rolnictwa i Biologii), Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

10.2013 – 09.2015 **asystent** - Katedra Botaniki, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

4. SUMARYCZNE WSKAŹNIKI DOROBKU NAUKOWO-BADAWCZEGO

Wskaźniki wg bazy danych Scopus (12.03.2021) lub wg punktacji czasopism, zgodnie z komunikatem Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) na dany rok.

Liczba publikacji w czasopismach posiadających Impact Factor – 23 w tym 20 prac oryginalnych i 3 prace przeglądowe.

Liczba rozdziałów w monografiach – 3

Indeks Hirscha – 10

Sumaryczny Impact Factor – 96,670 (w tym 35,469 przypadających na niniejsze osiągnięcie naukowe)

Suma punktów MNiSW – 1400 (w tym 615 przypadających na niniejsze osiągnięcie naukowe)

Sumaryczna liczba cytowań – 481 (w tym 174 przypadające na niniejsze osiągnięcie naukowe)

5. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY

5.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO I WYKAZ CYKLU PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE WRAZ Z DANYMI BIBLIOMETRYCZNYMI

Tytuł osiągnięcia naukowego: **„Wpływ percepcji światła i szlaku przekazywania sygnału zależnego od LSD1 na rozwój roślin i ich odporność na czynniki środowiskowe"**

Cykl publikacji stanowiących osiągnięcie wraz z danymi bibliometrycznymi (kolejność publikacji wynika z tematycznego opisu osiągnięcia)

P1	**Czarnocka W**., Karpiński S. (2018) *Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses*. Free Radical Biology and Medicine 122: 4-20		
	Punkty $MNiSW_{2018*}$	IF_{2018*}	Liczba cytowań**
	40	5,656	129
P2	**Czarnocka W**., Rusaczonek A., Willems P., Sujkowska-Rybkowska M., Van Breusegem F., Karpiński S. (2020) *Novel role of JAC1 in influencing photosynthesis, stomatal conductance and photooxidative stress signalling pathway in* Arabidopsis thaliana. Frontiers in Plant Science 11: 1124		
	Punkty $MNiSW_{2020*}$	IF_{2020*}	Liczba cytowań**
	100	4,402	0
P3	Rusaczonek A., **Czarnocka W**., Willems P., Sujkowska-Rybkowska M., Van Breusegem F., Karpiński S. (2021) *Phototropin 1 and 2 influence photosynthesis, UV-C induced photooxidative stress responses, and cell death.* Cells 10: E200		
	Punkty $MNiSW_{2021*}$	IF_{2021*}	Liczba cytowań**
	140	4,366	0
P4	Rusaczonek A., **Czarnocka W**., Kacprzak S., Witoń D., Ślesak I., Szechyńska-Hebda M., Gawroński P., Karpiński S. (2015) *Role of phytochromes A and B in the regulation of cell death and acclimatory responses to UV stress in* Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany 66: 6679–6695		
	Punkty $MNiSW_{2015*}$	IF_{2015*}	Liczba cytowań**
	45	5,677	24

P5	Bernacki M.J., **Czarnocka W**., Szechyńska-Hebda M., Mittler R., Karpiński S. (2019) *Biotechnological potential of LSD1, EDS1, and PAD4 in the improvement of crops and industrial plants*. Plants (Basel) 8: 290		
	Punkty MNiSW$_{2019*}$	IF$_{2019*}$	Liczba cytowań**
	70	2,762	3
P6	Bernacki M.J.#, **Czarnocka W**.#, Witoń D., Rusaczonek A., Szechyńska-Hebda M., Ślesak I., Dąbrowska-Bronk J., Karpiński S. (2018) *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) affects development, photosynthesis and hormonal homeostasis in hybrid aspen (*Populus tremula *L.* × P. tremuloides*).* Journal of Plant Physiology 226: 91-102		
	Punkty MNiSW$_{2018*}$	IF$_{2018*}$	Liczba cytowań**
	35	2,825	6
P7	**Czarnocka W**., Van Der Kelen K., Willems P., Szechyńska-Hebda M., Shahnejat-Bushehri S., Balazadeh S., Rusaczonek A., Mueller-Roeber B., Van Breusegem F., Karpiński S. (2017) *The dual role of LESION SIMULATING DISEASE 1 as a condition-dependent scaffold protein and transcription regulator.* Plant, Cell and Environment 40: 2644-2662		
	Punkty MNiSW$_{2017*}$	IF$_{2017*}$	Liczba cytowań**
	45	5,415	12
P8	**Czarnocka W.**, Fichman Y., Bernacki M., Różańska E., Sańko-Sawczenko I., Mittler R., Karpiński S. (2020) *FMO1 is involved in excess light stress-induced signal transduction and cell death signaling.* Cells 9(10): 2163		
	Punkty MNiSW$_{2020*}$	IF$_{2020*}$	Liczba cytowań**
	140	4,366	0

Podkreśleniem nazwiska wskazano publikacje, w których pełnię rolę autora korespondującego.
równy wkład autorów
* uwzględniono punktację czasopism z roku publikacji artykułów, zgodnie z komunikatem Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) obowiązującym w danym roku. Impact factor (IF) czasopisma z roku publikacji artykułu podano zgodnie danymi dostępnymi w Web of Science Core Collection.
** liczba cytowań (z autocytowaniami) wg bazy danych Scopus na dzień 12.03.2021

Podsumowanie danych bibliometrycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Sumaryczny Impact Factor (IF)	35,469
Sumaryczna liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW	615
Sumaryczna liczba cytowań wg bazy danych Scopus	174

5.2. SYNTETYCZNE OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

5.2.1. Wstęp

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na rozwój i wzrost roślin jest światło. Jednak stosunkowo niewielka część zaabsorbowanej energii świetlnej jest wykorzystywana przez rośliny do przeprowadzania procesu fotosyntezy (Foyer i in., 2012). Ilość zaabsorbowanej energii świetlnej, która jest w nadmiarze i przekracza możliwości wykorzystania jej w cyklu fotosyntetycznej redukcji węgla, nazywana jest nadmierną energią wzbudzenia (ang. excess excitation energy, EEE). Nadmierna energia wzbudzenia jest jednym z najbardziej szkodliwych czynników dla roślin, gdyż powoduje wzrost szybkości transportu elektronów, co prowadzi do zmian w stopniu utlenienia (zmian redoks) fotosyntetycznych przekaźników elektronów, przeprogramowania transkrypcji (Huang i in., 2019), wytworzenia reaktywnych form tlenu (RFT) (Pospíšil, 2016), zaburzenia homeostazy hormonów i metabolitów (Dietz, 2015) i uszkodzenia chloroplastów (Wituszyńska i in., 2015). Jeśli nadmierna energia wzbudzenia nie zostanie rozproszona przez centrum reakcji fotosystemu II (ang. photosystem II, PSII) lub karotenoidy w kompleksach zbierających światło, dochodzi do utworzenia stanu trypletowego chlorofilu, który reaguje z tlenem, dając tlen singletowy ($^1O_2$) (Mullineaux i Baker, 2010). Niedostatecznie rozproszona nadmierna energia wzbudzenia może powodować fotoinhibicję, czyli wywołaną światłem utratę aktywności transportu elektronów w PSII spowodowaną degradacją białka D1 w centrach reakcji PSII (Tyystjärvi, 2013).

Nadmiar energii wzbudzenia jest odbierany przez aparat fotosyntetyczny nie tylko w wyniku ekspozycji na nadmierne nasłonecznienie, ale także w wyniku innych stresów środowiskowych, takich jak promieniowanie UV, czy susza (Wituszyńska and Karpiński, 2013). W sytuacjach, w których efektywność fotosyntetyczna jest osłabiona przez stres, wytwarzana jest nadmierna ilość RFT, takich jak tlen singletowy ($^1O_2$), anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) czy rodnik hydroksylowy ($^{\bullet}OH$), które powodują uszkodzenia komórek poprzez utlenianie składników komórkowych: białek, pigmentów, kwasów nukleinowych i lipidów (**P1**). Jeśli produkcja RFT przekracza zdolność ich usuwania przez enzymy antyoksydacyjne, prowadzi to do uszkodzenia elementów aparatu fotosyntetycznego, co może skutkować śmiercią komórek, a w konsekwencji zmniejszeniem biomasy roślinnej i plonu (Wituszyńska i Karpiński, 2013). Stąd tak ważne jest poszukiwanie regulatorów śmierci komórki oraz badanie szlaków przekazywania sygnałów uczestniczących w tym procesie.

Unikanie i rozpraszanie nadmiernej energii wzbudzenia to mechanizmy zapewniające przetrwanie roślin w zmiennych warunkach oświetlenia. Strategie unikania obejmują przemieszczanie się chloroplastów w obrębie komórki i redukcję liczby centrów reakcji fotosystemów (Li i in., 2009). W odpowiedzi na zmieniającą się intensywność światła chloroplasty przemieszczają się w kierunku ścian komórkowych peryklinalnych lub antyklinalnych, aby odpowiednio wychwycić więcej światła lub uniknąć jego nadmiaru. Na ruch chloroplastów wpływa percepcja światła poprzez fototropiny (receptory światła niebieskiego i promieniowania UV-A/B) i fitochromy (receptory światła czerwonego i dalekiej czerwieni) oraz niereceptorowe białko o nazwie J-domain protein required for chloroplast

accumulation response 1 (JAC1) (Kong i Wada, 2016). Gatunek modelowy w biologii eksperymentalnej roślin, rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*), posiada dwie fototropiny, phot1 i phot2, które pełnią taką samą rolę w mechanizmie akumulacji chloroplastów (Sakai i in., 2001). Jednak tylko phot2 jest zaangażowana w reakcję unikania światła przez chloroplasty (Kagawa i in., 2001). Pomimo, że przemieszczanie się chloroplastów wywołane światłem u roślin okrytonasiennych nie jest bezpośrednio regulowane przez światło czerwone, fitochromy A i B hamują ruch chloroplastów w odpowiedzi na zwiększenie intensywności światła w wyniku pośredniej regulacji polegającej na zwiększeniu aktyno-zależnej ruchliwości cytoplazmatycznej, zmianach w ekspresji genów oraz modyfikacji stabilności białek (DeBlasio i in., 2003; Luesse i in., 2010). Relokacja chloroplastów u rzodkiewnika pospolitego jest zależna od krótkich włókien aktynowych zlokalizowanych wzdłuż otoczki chloroplastu, które po indukcji światłem umożliwiają przemieszczanie się tych organelli. Ruch ten zależy od aktywności białka JAC1 (Ichikawa i in., 2011). Rośliny pozbawione funkcjonalnego białka JAC1 (mutant *jac1*) mają chloroplasty zlokalizowane wzdłuż antyklinalnych ścian komórkowych komórek mezofilu i pozbawione są możliwości ich akumulacji pod powierzchnią komórki w warunkach słabego oświetlenia (Suetsugu i in., 2005). Oprócz udziału w procesie akumulacji chloroplastów, białko JAC1 uczestniczy w regulacji reakcji unikania przez chloroplasty nadmiaru światła, ponieważ u mutanta *jac1* zaburzona jest organizacja filamentów aktynowych (Ichikawa i in., 2011). Mimo, że znaczenie białek zaangażowanych w relokację chloroplastów jest dobrze opisane w procesie percepcji światła, dotychczas nikt nie podjął się zbadania ich roli w regulacji odpowiedzi roślin na stres nadmiaru energii wzbudzenia i śmierci komórki. Biorąc pod uwagę, że percepcja światła i ruchy chloroplastów są niezwykle ważne w wywołanej przez nadmierną energię wzbudzenia fotoinhibicji i śmierci komórki, rola fototropin, fitochromów i białka JAC1 w reakcji na nadmiar światła wydaje się być istotna.

W toku ewolucji, oprócz reakcji unikania nadmiernej energii wzbudzenia rośliny rozwinęły mechanizmy jej rozpraszania, takie jak emisja światła poprzez fluorescencję lub ciepło w procesie niefotochemicznego wygaszania (ang. non-photochemical quenching, NPQ) (Baker, 2008). Proces NPQ polega na przenoszeniu nadmiernej energii wzbudzenia w kompleksach zbierających światło z chlorofilu na karotenoidy, które rozpraszają ją w postaci ciepła podczas cyklu ksantofilowego (cykl wiolaksantyna - anteraksantyna - zeaksantyna (ang. VAZ)) (Demmig-Adams i Adams, 2006). Nadmierna energia wzbudzenia może zostać również zneutralizowana poprzez cykl woda-woda i fotooddychanie (Asada, 1999). Eliminacja elektronów w cyklu woda-woda polega na redukcji O_2 w fotosystemie I (PSI) do $O_2^{\bullet-}$ (reakcja Mehlera) oraz dalszej aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase, SOD), przekształcająca $O_2^{\bullet-}$ w H_2O_2 i peroksydaza askorbinianowa (ang. ascorbate peroxidase, APX), redukująca H_2O_2 do H_2O (Asada, 1999). Fotooddychanie to kolejny proces zużywający nadmiar energii, który zapobiega fotoinhibicji aparatu fotosyntetycznego poprzez wykorzystanie wyprodukowanego ATP i równoważników redukujących, takich jak NADH i $FADH_2$. Jedną z wad tego procesu jest wytwarzanie H_2O_2, który musi zostać wyeliminowany przez enzymy przeciwutleniające, takie jak katalaza (ang. catalase, CAT) (Mittler i in., 2004).

Jednak szlaki przekazywania sygnałów, indukowane przez nadmierną energię wzbudzenia i prowadzące do śmierci niektórych komórek, można również uznać za korzystne,

ponieważ umożliwiają one redystrybucję składników odżywczych z uszkodzonych komórek oraz zapoczątkowują przekazywanie sygnału do innych komórek i aklimatyzację rośliny do niekorzystnych warunków (**P1**). RFT, powstające w trakcie obumierania komórek, oprócz ich uszkadzania są ważnymi cząsteczkami sygnałowymi, które przygotowują inne komórki do walki z kolejnym lub przedłużającym się stresem (**P1**). Na przykład, H_2O_2 jest transportowany przez błony biologiczne przy udziale akwaporyn (Bienert i Chaumont, 2014) i wyzwala odpowiedź systemową na nadmierną energię wzbudzenia, określaną jako systemiczna nabyta aklimatyzacja (ang. systemic acquired acclimation, SAA) (Karpiński i in., 1999). SAA jest indukowana głównie przez zmiany stopnia utlenienia (zmiany redoks) elementów układu fotosyntetycznego i przejawia się zmianami w ekspresji genów, prowadząc do aklimatyzacji rośliny (Karpiński i in., 1999).

Przekazywanie sygnałów redoks w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne odbywa się za pośrednictwem skoordynowanego działania trzech białek, LESION SIMULATING DISEASE 1 (LSD1), ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) i PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) (Rustérucci i in., 2001; Mühlenbock i in., 2008). Rośliny pozbawione funkcjonalnego białka LSD1 (mutant *lsd1*) zostały początkowo scharakteryzowane ze względu na rozprzestrzenianie się śmierci komórki w odpowiedzi na patogeny, które było zależne od akumulacji $O_2^{\bullet-}$ i kwasu salicylowego (Dietrich i in., 1994) lub długiego/ciągłego fotoperiodu (Jabs i in., 1996). Mutant *lsd1* wykazuje zmniejszoną aktywność CAT przy braku stresu, a pod wpływem stresu biotycznego lub abiotycznego akumuluje H_2O_2, po czym następuje niekontrolowana śmierć komórek (ang. runaway cell death, RCD) (Rustérucci i in., 2001; Mateo i in., 2004). Podwójny mutant *lsd1*/*cao*, który ma zmniejszony rozmiar anteny PSII, a tym samym zmniejszoną zdolność pochłaniania światła spowodowaną mutacją w genie kodującym białko o nazwie chloroplast signal recognition particle 43 kDa (cpSRP43, cao), wykazuje odwrócenie fenotypu RCD u *lsd1*. Wskazuje to, że śmierć komórki u mutanta *lsd1* zależy od ilości energii świetlnej pochłoniętej w nadmiarze przez kompleksy zbierające światło (Mateo i in., 2004). Nieumiejętność powstrzymania śmierci komórki po jej zainicjowaniu u mutanta *lsd1* silnie zależy także od białek EDS1 i PAD4, funkcjonalnych regulatorów homeostazy RFT i hormonów w odpowiedzi na stresy środowiskowe (**P1**). Mutacja w genach *EDS1* lub *PAD4* jest w stanie zapobiec akumulacji H_2O_2 i śmierci komórki, obserwowanej u mutanta *lsd1* (Rustérucci i in., 2001; Mateo i in., 2004; Mühlenbock i in., 2008). Wykazano również, że produkcja H_2O_2 u mutanta *lsd1* jest podwyższona, gdy na rośliny działają czynniki zmniejszające pulę plastochinon, związku biorącego udział w transporcie elektronów w reakcjach zależnych od światła. Mechanizm ten jest zależny od białek EDS1 i PAD4, ponieważ wprowadzenie mutacji *eds1* lub *pad4* do roślin *lsd1*, skutkującej podwójnymi mutantami *eds1/lsd1* lub *pad4/lsd1*, odwraca reakcję specyficzną dla *lsd1* w odpowiedzi na zmniejszenie puli plastochinonu (Mühlenbock i in., 2008). Powyższe wyniki wskazują, że białko LSD1 działa jako negatywny regulator produkcji RFT i śmierci komórki wywołanej przez nadmierną energię wzbudzenia, a procesy te są zależne od białek EDS1 i PAD4.

Prace badawcze, które są podstawą niniejszego osiągnięcia, zostały podjęte przeze mnie w roku 2014 jako rozszerzenie badań prowadzonych w trakcie studiów doktoranckich nad odpornością roślin na stresy abiotyczne (doktorat obroniony w 2013 roku). Dostrzegłam potrzebę dalszej analizy roli białek odpowiadających za percepcję światła i ruch chloroplastów w regulacji odporności roślin na stresy środowiskowe, zwłaszcza w kontekście szlaków

transdukcji sygnałów zaangażowanych w śmierć komórki, która przyczynia się do strat w rolnictwie. Co więcej, pomimo wieloletnich badań nad szlakiem przekazywania sygnałów nadmiernej energii wzbudzenia, holistyczna funkcja LSD1 i funkcjonalnie związanych z nim białek była nadal niewystarczająco poznana. Z uwagi na fakt, że białka LSD1, EDS1 i PAD4 biorą udział w reakcji na zarówno stres biotyczny jak i abiotyczny, poznanie szlaków przekazywania sygnałów od nich zależnych może pomóc w odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób odporność roślin na patogeny, aklimatyzacja do nadmiaru światła i śmierć komórki są powiązane. Dlatego moim celem było wyjaśnienie roli białka LSD1 w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Istnieją dowody wskazujące, że białko LSD1 reguluje aktywność niektórych czynników transkrypcyjnych (Kaminaka i in., 2006) i zasugerowano, że białko to samo z siebie działa jako czynnik transkrypcyjny (Dietrich i in., 1997). Jednak dokładna funkcja molekularna LSD1 była do tej pory słabo poznana. Co więcej, podczas moich studiów doktoranckich odkryłam, że gen kodujący białko FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1 (FMO1) jest znacząco silniej eksprymowany w mutancie *lsd1* niż w roślinach typu dzikiego, natomiast słabiej w mutantach *eds1* i *pad4* (Wituszyńska i in., 2013). To skłoniło mnie do głębszej analizy funkcji białka FMO1 w śmierci komórki zależnej od białek LSD1, EDS1 i PAD4. Podobnie, znaczenie białek LSD1, EDS1 i PAD4 w rozwoju roślin nie zostało kompleksowo wyjaśnione. Biorąc pod uwagę ich wpływ na homeostazę RFT i hormonów, jest wysoce prawdopodobne, że LSD1, EDS1 i PAD4 biorą udział w tym procesie. Jak dotąd jedynymi opublikowanymi informacjami sugerującymi ich udział w procesach rozwojowych, były badania Mühlenbock i współautorów (2007) wskazujące, że LSD1, EDS1 i PAD4 regulują tworzenie lizogennej aerenchymy w zanurzonych w wodzie korzeniach.

Dlatego celem badań przedstawionych w niniejszym osiągnięciu naukowym było głębsze zbadanie roli, zarówno na poziomie molekularnym jak i fizjologicznym, fotoreceptorów i regulatorów ruchu chloroplastów (fototropin, fitochromów i białka JAC1), a także funkcji białka LSD1 i innych regulatorów zależnych od LSD1. Niniejsze osiągnięcie naukowe składa się z ośmiu artykułów, sześciu oryginalnych i dwóch przeglądowych, przedstawiających całkowicie nowe funkcje zarówno szlaku przekazywania sygnałów, zależnego od LSD1, jak i regulatorów odpowiedzialnych za percepcję światła oraz ruch chloroplastów w odpowiedzi roślin na czynniki środowiskowe. Wyniki zawarte w niniejszym osiągnięciu naukowym zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach, takich jak *Plant, Cell & Environment*, *Journal of Experimental Botany*, *Free Radical Biology and Medicine* czy *Cells*, co wskazuje na ich znaczenie dla społeczności biologów eksperymentalnych roślin. Niektóre z powyższych rozważań zostały przedstawione w następującym artykule przeglądowym:

P1. Czarnocka W., Karpiński S. (2018) *Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses*. Free Radical Biology and Medicine 122: 4-20

5.2.2. Cel pracy i hipotezy badawcze

Artykuły zaprezentowane w osiągnięciu naukowym stanowią realizację następujących celów badawczych:

1. Podsumowanie aktualnej wiedzy na temat produkcji, eliminowania i przekazywania sygnałów z udziałem RFT w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w przekazywaniu sygnałów zależnych od światła i białka LSD1 (artykuł przeglądowy **P1**).

2. Charakterystyka roli fotoreceptorów i ruchu chloroplastów w fotosyntezie, śmierci komórki i odpowiedzi aklimatyzacyjnej na nadmierną energię wzbudzenia. Światło stanowi kluczowy czynnik wpływający na fotosyntezę. Zatem fotoreceptory i białka regulujące ruch chloroplastów powinny mieć także pewien wpływ na ten proces. Jednak ich rola w regulacji fazy świetlnej i asymilacji CO_2 nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Jak dotąd nie przeprowadzono również badań weryfikujących potencjalny udział fotoreceptorów w szlaku przekazywania sygnałów w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Biorąc pod uwagę fakt, że percepcja światła i ruchy chloroplastów są niezwykle ważne w zapobieganiu fotoinhibicji powodowanej nadmierną energią wzbudzenia, **postawiłam hipotezę, że fototropiny, fitochromy i białko JAC1 odgrywają ważną rolę w regulacji śmierci komórki i odpowiedzi aklimatyzacyjnej roślin na nadmierną energię wzbudzenia** (artykuły oryginalne **P2**, **P3** i **P4**).

3. Zdefiniowanie roli białka EDS1 u topoli oraz podsumowanie dotychczasowej wiedzy dotyczącej roli białek LSD1, EDS1 i PAD4 w rozwoju roślin i odpowiedzi na stres. Biorąc pod uwagę fakt, że LSD1, EDS1 i PAD4 regulują homeostazę RFT i hormonów w komórkach roślinnych, **postawiłam hipotezę, że odgrywają również pewną rolę w rozwoju roślin**. Najnowsze doniesienia wykazały ich wpływ na rozwój nie tylko w roślinach zielnych, ale i drzewiastych (artykuł przeglądowy **P5** oraz artykuł oryginalny **P6**).

4. Zdefiniowanie dokładnej funkcji molekularnej białka LSD1 w szlaku przekazywania sygnałów stresu oksydacyjnego i śmierci komórki. Do tej pory, molekularna funkcja białka LSD1 pozostawała w dużej mierze nieznana. LSD1 posiada domeny palca cynkowego, które mogą być odpowiedzialne za wiązanie DNA i/lub białek. Zatem **postawiona przeze mnie hipoteza zakładała, że LSD1 jest regulatorem transkrypcji i w zależności od statusu redoks komórki oddziałuje z różnymi białkami, prowadząc do przekazywania sygnału** (artykuł oryginalny **P7**).

5. Charakterystyka roli białka FMO1 w przekazywaniu sygnału nadmiernej energii wzbudzenia oraz śmierci komórki. Istnieje coraz więcej dowodów wskazujących, że systemiczna nabyta odporność (ang. systemic acquired resistance, SAR) w odpowiedzi na stresy biotyczne oraz systemiczna nabyta aklimatyzacja (ang. systemic acquired acclimation, SAA) w odpowiedzi na stresy abiotyczne aktywują podobne mechanizmy komórkowe i wykorzystują te same szlaki przekazywania sygnałów. Jednak do tej pory zidentyfikowano niewiele białek, w tym LSD1, EDS1 i PAD4, biorących udział zarówno w procesie SAR, jak i SAA. Ze względu na prawdopodobny udział białka FMO1 w przekazywaniu sygnałów, zależnym od LSD1, EDS1 i PAD4, **postawiłam hipotezę, że FMO1, wcześniej opisywany jako regulator SAR, jest również ważnym elementem SAA** (artykuł oryginalny **P8**).

5.2.3. Omówienie wyników badań oraz metod ich wykorzystania

1. Produkcja i usuwanie RFT oraz przekazywanie sygnału z ich udziałem w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe, ze szczególnym uwzględnieniem roli RFT w przekazywaniu sygnału zależnego od światła i białka LSD1

W artykule przeglądowym (**P1**) przedstawiłam aktualny stan wiedzy, w tym najnowsze badania dotyczące wytwarzania i metabolizmu RFT oraz szlaków przekazywania sygnału z ich udziałem. Praca koncentruje się, między innymi, na organellach komórkowych (chloroplasty, peroksysomy, mitochondria, błona plazmatyczna, ściana komórkowa i retikulum endoplazmatyczne), w których RFT są wytwarzane w odpowiedzi na różne czynniki stresowe. Przegląd najnowszych doniesień literaturowych pozwolił na przedstawienie najbardziej aktualnej wiedzy na temat uszkodzeń wywoływanych przez RFT, a także na temat systemów usuwania RFT. Jednak w tym artykule przeglądowym położyłam nacisk na fakt, że RFT należy traktować również jako ważne cząsteczki sygnałowe, które regulują lokalne i systemiczne odpowiedzi aklimatyzacyjne i obronne. Omówiłam również najnowsze odkrycia dotyczące przekazywania sygnałów redoks, w których pośredniczą białka LSD1, EDS1 i PAD4. Ponadto przedyskutowałam niedawno odkryte wzajemne zależności RFT, Ca^{2+}, sygnałów hormonalnych i elektrycznych w SAR i SAA, dwóch procesach fizjologicznych niezbędnych do przetrwania i optymalnej produktywności roślin w niekorzystnych warunkach. Praca ta, opublikowana w 2018 roku, została zauważona w środowisku naukowym, o czym świadczy duża liczba cytowań wynosząca, według bazy danych Scopus, 129.
Powyższe rozważania zostały przedstawione w następującym artykule:

P1. Czarnocka W., Karpiński S. (2018) *Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses*. Free Radical Biology and Medicine 122: 4-20

- Mój wkład w tę pracę polegał na przeanalizowaniu dostępnej literatury, napisaniu manuskryptu oraz przygotowaniu grafik i rycin.

2. Fototropiny, fitochromy i białko JAC1 mają wpływ na fotosyntezę i śmierć komórki spowodowaną nadmierną energią wzbudzenia oraz reakcje aklimatyzacyjne

Światło jest kluczowym elementem oddziałującym na fotosyntezę. W związku z tym fotoreceptory i regulatory ruchu chloroplastów powinny mieć pewien wpływ na ten proces. Jednak, jak dotąd, ich wpływ na fazę świetlną i asymilację CO_2 nie został w pełni wyjaśniony. Dlatego celem moich badań było przeanalizowanie roli receptorów światła niebieskiego, fototropin 1 i 2 (phot1 i phot2), receptorów światła czerwonego i dalekiej czerwieni, fitochromów A i B (phyA i phyB) oraz niereceptorowego białka JAC1 w regulacji fotosyntezy.

Wyniki moich badań po raz pierwszy pokazały, że białko JAC1 negatywnie wpływa na intensywność fotosyntezy i zawartość barwników fotosyntetycznych, gdyż rośliny pozbawione

funkcjonalnego JAC1 (mutanty *jac1*) miały podwyższoną wartość maksymalnej wydajności kwantowej PSII (F_v/F_m) i więcej centrów reakcyjnych PSII, czemu towarzyszyła podwyższona zawartość całkowitego chlorofilu i wyższa ekspresja genów kodujących podjednostki kompleksów zbierających światło (**P2**). Ponadto udowodniłam, że JAC1 negatywnie wpływa na tempo pobierania przez roślinę CO_2. Podwyższona asymilacja CO_2 u mutanta *jac1* była najprawdopodobniej spowodowana zahamowaniem ruchu chloroplastów u tego mutanta (Suetsugu i in., 2005). Wykazano bowiem, że lokalizacja chloroplastów w pobliżu ścian komórkowych przylegających do przestrzeni międzykomórkowych pozytywnie koreluje z asymilacją CO_2, poprzez zmianę długości ścieżki dyfuzji tego gazu z przestrzeni międzykomórkowych do chloroplastu (Terashima i in., 2006). Dlatego droga dyfuzji CO_2 do stromy chloroplastów może być krótsza u mutanta *jac1*, w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Zwiększonej szybkości asymilacji CO_2 u mutanta *jac1* towarzyszyło podwyższone przewodnictwo pary wodnej i większa rozwartość szparek (**P2**). Przeprowadzone przeze mnie profilowanie transkryptomiczne wykazało, że wiele genów, eksprymowanych w komórkach szparkowych, kodujących białka zaangażowane w ruchy aparatów szparkowych, wykazywało zwiększoną transkrypcję w mutancie *jac1*, w porównaniu do roślin typu dzikiego (**P2**). Ta obserwacja wskazuje, że białko JAC1 ma wpływ na przewodnictwo szparkowe i szybkość pobierania CO_2. Odkrycia te rzucają nowe światło na rolę jednego z najważniejszych regulatorów fotorelokacji chloroplastów, wskazując, że jego funkcja jest znacznie bardziej złożona niż wcześniej sądzono.

Pomimo, że dotychczas przeprowadzono wiele badań dotyczących roli fototropin w regulacji ruchu chloroplastów, wpływ phot1 i phot2 na wydajność fotosyntezy nie został wystarczająco opisany. Wyniki moich badań wykazały pewien wpływ fototropin na fazę fotosyntezy zależną od światła i przewodnictwo aparatów szparkowych (**P3**). Parametr qP, który wskazuje na proporcję centrów reakcji PSII, które są otwarte, był niższy u podwójnego mutanta *phot1/phot2*, w porównaniu do roślin typu dzikiego. Ponadto, okazało się, że całkowita zawartość chlorofilu była znacząco niższa u mutantów *phot2* i *phot1/phot2*, w porównaniu z typem dzikim i korelowała ze zmniejszoną zawartością karotenoidów. Może to sugerować ogólnie mniejszy rozmiar anteny fotosyntetycznej u mutantów *phot2* i *phot1/phot2*, jako mechanizm fotoprotekcyjny (**P3**). Wyniki te wskazują, że białko phot2 razem z phot1 pozytywnie wpływają na zawartość barwników fotosyntetycznych i wydajność reakcji fotochemicznych. Przeprowadzone przeze mnie profilowanie transkryptomiczne wykazało, że ekspresja genów kodujących podjednostki kompleksów zbierających światło, wiążących chlorofil *a* i *b*, była znacznie podwyższona u mutantów *phot2* i *phot1/phot2*, w porównaniu z typem dzikim, co może sugerować sposób na rekompensatę stosunkowo niewielkiej anteny w tych mutantach (**P3**). Ponadto, wydajność niefotochemicznego wygaszenia była niższa u mutantów *phot1* i *phot1/phot2*, co odpowiadało niższemu stopniowi deepoksydacji ksantofili. Sugeruje to, że w mutantach fototropin zaabsorbowana energia została wykorzystana raczej na reakcje fotochemiczne niż na niefotochemiczne wygaszanie. Co ważne, wykazałam, że istnieje pozytywna zależność pomiędzy aktywnością fototropin a gęstością aparatów szparkowych (**P3**). Wpływ fototropin na otwieranie aparatów szparkowych został już opisany (Takemiya i in., 2016), ale po raz pierwszy pokazałam, że receptory te regulują również liczbę aparatów szparkowych. Zależność liczby aparatów szparkowych od aktywności obu fototropin była addytywna, ponieważ podwójny mutant *phot1/phot2* wykazywał niższą gęstość aparatów

szparkowych prawie o połowę, w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Korzystając z profilowania transkryptomicznego wykazaliśmy również, że niektóre geny, kodujące białka zaangażowane w rozwój aparatów szparkowych podlegają znacznej deregulacji u mutanta *phot1/phot2*. Udowodniłam również mniejszą akumulację biomasy u mutanta *phot1/phot2* (**P3**), co może wynikać z zaobserwowanej przeze mnie redukcji gęstości aparatów szparkowych i zwijania liści, ale także zmniejszonej grubości liści opisanej wcześniej (López-Juez i in., 2007).

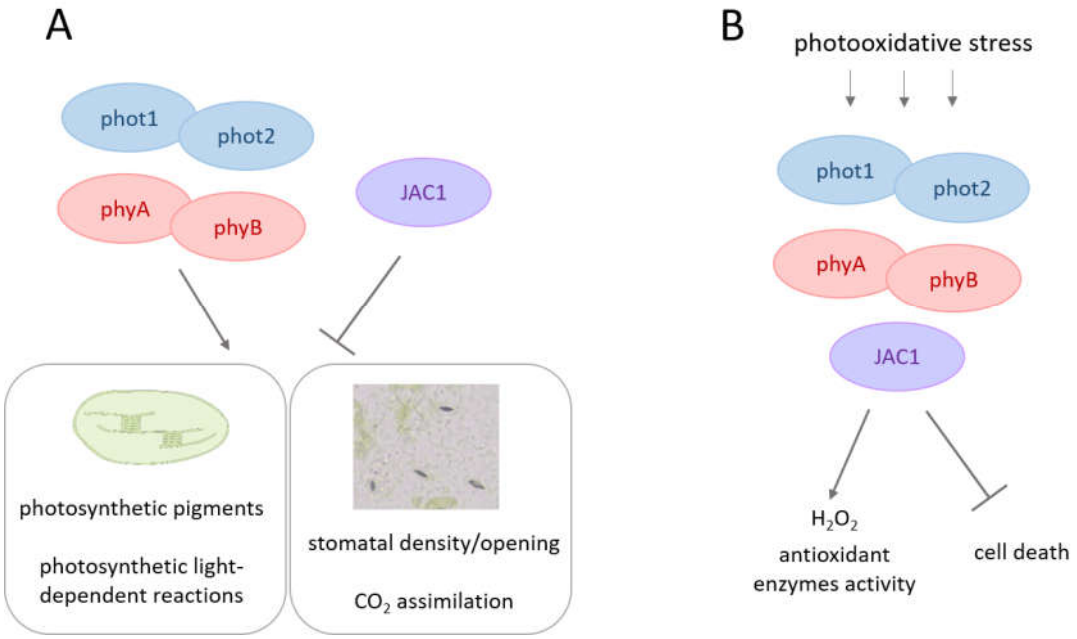
Kolejnym celem moich badań było sprawdzenie możliwej roli fitochromów, receptorów światła czerwonego i dalekiej czerwieni, w reakcjach fotosyntetycznych i asymilacji CO_2. Istotnym odkryciem w tej części mojego osiągnięcia naukowego było wykazanie niższej aktywności fotosyntetycznej u mutanta *phyB*, co było związane ze zmniejszoną zawartością chlorofili i karotenoidów (**P4**). Te wyniki są zbieżne z dowiedzioną wcześniej rolą zarówno phyA, jak i phyB, w wiązaniu czynników oddziałujących z fitochromami (ang. phytochrome-interacting factors, PIF), które regulują szlaki biosyntezy chlorofilu (Moon i in., 2008). Ponadto, istotne statystycznie zmniejszenie zawartości fotoprotekcyjnego β-karotenu u mutanta *phyB* mogło być przyczyną jego większej podatności na opisaną w dalszej części śmierć komórki, indukowaną promieniowaniem UV. Niższej zawartości barwników fotosyntetycznych u mutanta *phyB*, w porównaniu z typem dzikim, towarzyszyła zwiększona ekspresja genów kodujących podjednostki kompleksów zbierających światło (**P4**), co sugeruje rekompensatę zmniejszonej wydajności fotosyntezy u tych roślin. Podsumowując, ta część mojego osiągnięcia naukowego wykazała, że fitochromy, głównie phyB, pozytywnie wpływają na wydajność fazy fotosyntezy zależnej od światła. Co więcej, moje wyniki wykazały, że szybkość asymilacji CO_2 była zmniejszona u mutantów *phyA* i *phyB*, a jeszcze bardziej u podwójnego mutanta *phyA/phyB*, w porównaniu z roślinami typu dzikiego (**P4**). Obniżona asymilacja CO_2 u mutantów *phyB* i *phyA/phyB* korelowała z istotnie niższą przewodnością pary wodnej i gęstością aparatów szparkowych. Rola phyB w wymianie gazowej i rozwoju aparatów szparkowych została wykazana wcześniej (Boccalandro i in., 2009; Casson i in., 2009), ale dodatkowa rola phyA jako pozytywnego regulatora wymiany gazowej jest istotną nowością, zwłaszcza biorąc pod uwagę, że spadek asymilacji CO_2, przewodnictwa szparkowego i zahamowania wzrostu roślin były najbardziej widoczne u podwójnego mutanta *phyA/phyB*.

Ruch chloroplastów jest ważnym mechanizmem unikania nadmiernej energii wzbudzenia. Zatem kolejnym zadaniem w toku moich badań było określenie roli fototropin, fitochromów i białka JAC1 w aktywacji odpowiedzi aklimatyzacyjnej, wywołanej stresem oksydacyjnym. Wykazano, że promieniowanie UV powoduje uszkodzenie PSII podobne do tego, które obserwuje się przy ekspozycji na intensywne światło (Ohnishi i in., 2005). Stres oksydacyjny i zmiany w obrębie chloroplastów to pierwsze obserwowane objawy stresu spowodowanego promieniowaniem UV (Wituszyńska i in., 2015). Dlatego ekspozycja na promieniowanie UV jest wygodną metodą badania wpływu określonych regulatorów na fotoinhibicję, fotooksydacyjną odpowiedź na stres oraz śmierć komórki.

Moim największym osiągnięciem w tej części badań było wykazanie nowej funkcji białek phot1, phot2, phyA, phyB i JAC1 w regulacji zawartości H_2O_2 w liściach, aktywności enzymów przeciwutleniających i śmierci komórki po stresie fotoksydacyjnym, wywołanym promieniowaniem UV (**P2**, **P3** i **P4**). Śmierć komórki zaindukowana ekspozycją na UV była bardziej dostrzegalna w roślinach pozbawionych funkcjonalnych białek phot1, phot2, phyB i

JAC1, co wskazuje, że białka te działają jako pozytywne regulatory aklimatyzacji roślin do stresu fotooksydacyjnego. Ponadto, mutanty *phot1*, *phot2, phyA*, *phyB* i *jac1*, poddane działaniu UV, wykazywały większą wydajność fotosyntezy, w porównaniu z typem dzikim, co sugeruje, że aktywność fototropin, fitochromów, a także JAC1 negatywnie wpływa na ochronę PSII przed stresem oksydacyjnym. Mutanty *phot*, *phy* i *jac1*, poddane działaniu promieniowania UV, miały niższą zawartość H_2O_2, co u większości mutantów korelowało ze zmniejszoną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych. Wyniki te są pierwszym doniesieniem, że fototropiny, fitochromy i JAC1 wpływają na aktywność systemu antyoksydacyjnego. Jednak zmniejszona zawartość RFT u badanych mutantów nie była w stanie zahamować postępującej śmierci komórki. Może to sugerować, że produkcja RFT w tych roślinach nie jest kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za śmierć komórki. Dlatego regulacja zawartości RFT przez fototropiny, fitochromy i białko JAC1 jest raczej częścią bardziej wyrafinowanego systemu przekazywania sygnału stresu.

Podsumowując, **pozytywnie zweryfikowałam hipotezę, że fototropiny, fitochromy i białko JAC1 odgrywają ważną rolę w regulacji śmierci komórki i odpowiedzi aklimatyzacyjnej roślin na nadmierną energię wzbudzenia.** Z szerszej perspektywy prace te dowodzą, że zmiany w pozycjonowaniu chloroplastów w obrębie komórki zależne od fototropin, fitochromów i białka JAC1 wpływają na wydajność fotosyntetyczną roślin, zawartość H_2O_2 w liściach, aktywność enzymów przeciwutleniających i śmierć komórki po stresie fotoksydacyjnym (Ryc. 1).



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie wpływu fototropin (phot1 i phot2), fitochromów (phyA i phyB) i białka JAC1 na fotosyntezę, przewodność szparkową (A), zawartość H_2O_2 i aktywność enzymów przeciwutleniających w liściach oraz śmierć komórki indukowaną stresem fotooksydacyjnym (B).

Przedstawione powyżej wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach:

P2. **Czarnocka W**., Rusaczonek A., Willems P., Sujkowska-Rybkowska M., Van Breusegem F., Karpiński S. (2020) *Novel role of JAC1 in influencing photosynthesis, stomatal conductance and photooxidative stress signalling pathway in* Arabidopsis thaliana. Frontiers in Plant Science 11: 1124

- Mój wkład w tę pracę polegał na sformułowaniu hipotez badawczych, zaplanowaniu eksperymentów, pomiarze zawartości nadtlenku wodoru oraz barwników fotosyntetycznych, analizie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, przygotowaniu RNA do sekwencjonowania (RNAseq), analizie funkcjonalnej danych RNAseq, przeprowadzeniu reakcji PCR w czasie rzeczywistym oraz napisaniu manuskryptu. Jako autor korespondujący odpowiadałam na recenzje oraz ostatecznie zredagowałam manuskrypt po recenzjach.

P3. Rusaczonek A., **Czarnocka W**., Willems P., Sujkowska-Rybkowska M., Van Breusegem F., Karpiński S. (2021) *Phototropin 1 and 2 influence photosynthesis, UV-C induced photooxidative stress responses, and cell death.* Cells 10: E200

- Mój wkład w tę pracę polegał na sformułowaniu hipotez badawczych, zaplanowaniu eksperymentów, przeprowadzeniu pomiaru wielkości roślin, suchej masy, gęstości aparatów szparkowych, wydajności zużycia wody, analizie zawartości nadtlenku wodoru i aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz przygotowaniu rycin.

P4. Rusaczonek A., **Czarnocka W**., Kacprzak S., Witoń D., Ślesak I., Szechyńska-Hebda M., Gawroński P., Karpiński S. (2015) *Role of phytochromes A and B in the regulation of cell death and acclimatory responses to UV stress in* Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany 66: 6679-6695

- Mój wkład w tę pracę polegał na zaplanowaniu eksperymentów, analizie śmierci komórki, pomiarze parametrów fotosyntetycznych, przeprowadzeniu analiz transkryptomicznych oraz napisaniu manuskryptu.

3. Białka LSD1, EDS1 i PAD4 odgrywają ważną rolę w rozwoju roślin i odpowiedzi na stres nie tylko u roślin zielnych, ale także u roślin drzewiastych

Wpływ białek LSD1, EDS1 i PAD4 na odporność roślin na stres czyni je dobrymi kandydatami do przetestowania w programach hodowlanych roślin uprawnych. W artykule przeglądowym dotyczącym potencjału biotechnologicznego *LSD1*, *EDS1* i *PAD4* (**P5**) omówiliśmy korzyści wynikające z modyfikacji tych genów w kontekście wyższej produkcji biomasy i plonu nasion oraz odporności na stresy środowiskowe. Nasze badania dowiodły, że białko LSD1, wraz z EDS1 i PAD4 poza tym, że pełni ważną rolę w odpowiedzi rośliny na stres abiotyczny i biotyczny, ma również wpływ na procesy warunkujące kondycję roślin, takie jak fotosynteza, efektywność wykorzystania wody, homeostaza RFT i hormonów (Wituszyńska

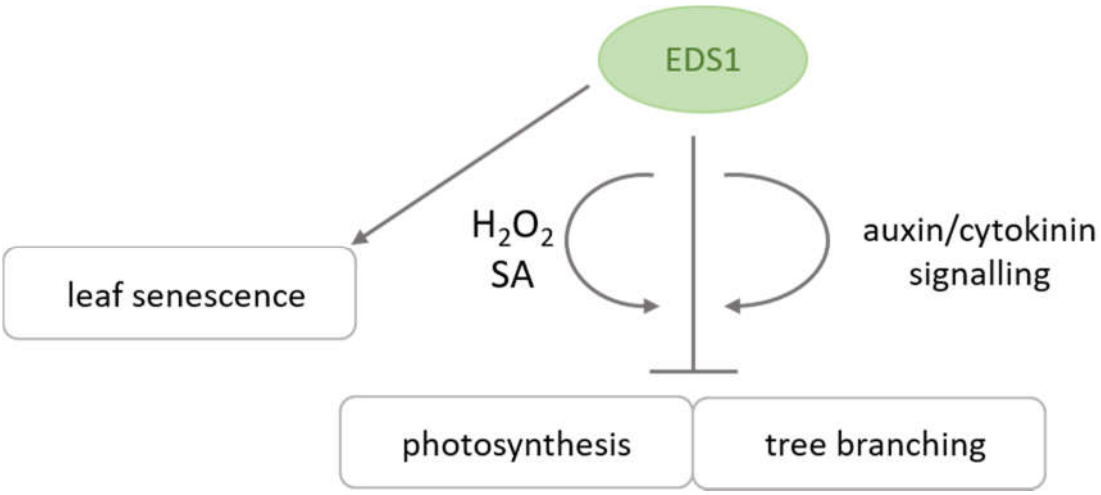
i in., 2013 i 2015). Geny *LSD1*, *EDS1* i *PAD4* zidentyfikowano u wielu gatunków roślin, w tym roślin uprawnych, takich jak *Oryza sativa* (ryż), *Solanum lycopersicum* (pomidor), *Vitis vinifera* (winorośl), *Pisum sativum* (groch) czy *Gossypium barbadense* (bawełna) (**P5**). Wyciszenie genu *LSD1* w ryżu prowadziło do powstawania charakterystycznych uszkodzeń, dowodzących, że LSD1 w ryżu jest także negatywnym regulatorem śmierci komórki, podobnie jak u rzodkiewnika pospolitego (Wang i in., 2005). Białka LSD1 u grochu i pszenicy są również zaangażowane w regulację śmierci komórki (He i in., 2011; Guo i in., 2013). Ponadto, ortologi EDS1 i PAD4 w winorośli miały taki sam wpływ na odporność roślin, jak u rzodkiewnika pospolitego (Gao i in., 2010). Dowiedziono, że ekspresja genów *EDS1* i *PAD4* w bawełnie była silnie indukowana w odpowiedzi na patogeny, a wyciszanie *EDS1* skutkowało znacznym zmniejszeniem akumulacji H_2O_2 i kwasu salicylowego (Zhang i in., 2012; Yan i in., 2016). Wykazano również, że EDS1 u pomidora bierze udział w akumulacji kwasu salicylowego, ponieważ jego poziom był znacznie obniżony w mutantach *eds1* pomidora, które miały także zaburzoną oporność na patogeny wirusowe i bakteryjne (Hu i in., 2005).

W artykule przeglądowym (**P5**) omówiliśmy również nowe odkrycia związane z zastosowaniem zmian w ekspresji *LSD1*, *EDS1* i *PAD4* w modyfikowaniu właściwości roślin zielnych i drzewiastych do różnych zastosowań biotechnologicznych. Na przykład białka LSD1, EDS1 i PAD4 regulują tworzenie lizogennej aerenchymy w korzeniach roślin w odpowiedzi aklimatyzacyjnej na niską dostępność tlenu w glebie, np. w czasie zalania systemu korzeniowego. Białka LSD1, EDS1 i PAD4 wykazały również wpływ na skład ścian komórkowych i strukturę drewna topoli (Szechyńska-Hebda i in., 2016). Wzrost zawartości hemicelulozy i obniżenie zawartości celulozy i ligniny zmniejszyły stabilność drewna linii topoli z wyciszonym genem *LSD1*. Umożliwiało to jednocześnie łatwiejszą degradację drewna, w porównaniu z drewnem drzew typu dzikiego, co może mieć znaczenie w zastosowaniach przemysłowych. W przeciwieństwie do linii topoli z wyciszonym *LSD1*, ściana komórkowa linii z wyciszonym *PAD4* zawierała więcej celulozy i ligniny, a poprzez to była odporniejsza na degradację. Z gospodarczego punktu widzenia, produkcja papieru i bioetanolu z łatwiej rozkładającego się drewna jest mniej szkodliwa dla środowiska.

Prowadząc bardziej szczegółowe badania na liniach topoli z wyciszonym *EDS1* wykazaliśmy, że niższa aktywność EDS1 ma także wpływ na wzrost topoli (**P6**). Linie topoli z wyciszonym *EDS1* tworzyły więcej pędów bocznych. Wyniki te poszerzają tradycyjny pogląd na rolę EDS1 w obronie i aklimatyzacji, poprzez udowodnienie jego wpływu na wzrost i rozwój roślin. Udział EDS1 w kształtowaniu cech morfologicznych może być spowodowany dobrze opisaną rolą tego białka w regulacji homeostazy RFT i hormonów. Wykazano, że białka LSD1, EDS1 i PAD4 biorą udział w szlakach przekazywania sygnałów zależnych od RFT i kwasu salicylowego (Rustérucci i in., 2001; Mateo i in., 2004; Wituszyńska i in., 2013), których rola podczas wzrostu i rozwoju roślin jest już dobrze poznana (Rivas-San Vicente i Plasencia, 2011; Mhamdi i Van Breusegem, 2018; Koo i in., 2020). Linie topoli z wyciszonym genem *EDS1* produkowały mniej H_2O_2 i kwasu salicylowego (**P6**). Przeprowadzona przeze mnie analiza transkryptomiczna wykazała, że wiele genów kodujących białka zaangażowanych w regulację rozwoju roślin oraz kontrolę homeostazy RFT i hormonów, miało zmienioną ekspresję w linii z wyciszonym *EDS1* w porównaniu do drzew typu dzikiego. Stosunkowo dużo było wśród nich genów kodujących białka metabolizujące, transportujące i przekazujące sygnały z udziałem auksyn i cytokinin (**P6**). Auksyny działają jako sygnał hamujący rozwój pędów bocznych, podczas gdy cytokininy wykazują działanie przeciwne (Müller i Leyser, 2011). Dlatego rola

białka EDS1 w regulacji cech morfologicznych topoli może być związana z regulacją homeostazy tych hormonów. Białko EDS1 nie posiada domen wiążących DNA, stąd jego wpływ na ekspresję genów jest raczej pośredni. Co ciekawe, w rzodkiewniku pospolitym EDS1 oddziałuje w jądrze komórkowym z białkiem LSD1, które zostało opisane jako regulator transkrypcji (**P7**), co wskazuje na możliwą rolę EDS1 w pośredniej regulacji ekspresji genów.

Ponadto, wyniki tej części moich badań wykazały, że biało EDS1 wpływa negatywnie na sprawność działania PSII, wymianę gazową, asymilację CO_2 i zawartość chlorofilu w liściach topoli, co może być związane z akumulacją kwasu salicylowego zależną od EDS1. Mutanty rzodkiewnika pospolitego mające wysoką zawartość kwasu salicylowego wykazywały zmniejszoną wydajność PSII, zmniejszoną przewodność szparkową i niższą wydajność asymilacji CO_2 (Mateo i in., 2006). Podobnie, drzewa hybrydowe *Populus tremula* × *P. alba*, akumulujące duże ilości kwasu salicylowego, dzięki ekspresji bakteryjnej syntazy tego hormonu, miały obniżoną wydajność fotosyntezy, niższe przewodnictwo szparkowe i szybkość transpiracji (Xue i in., 2013). Dlatego wpływ białka EDS1 na parametry fotosyntezy, transpirację i asymilację można powiązać z zmienioną zawartością kwasu salicylowego. W drzewach z wyciszoną ekspresją genu *EDS1*, ilość H_2O_2 w liściach była mniejsza i korelowała z wyższą wydajnością fotosyntezy, jako, że dowiedziono korzystny wpływ obniżonego stężenia RFT na aparat fotosyntetyczny (Foyer i in., 2012). Co więcej, zaobserwowano także wzrost aktywności SOD i CAT w liniach z wyciszonym *EDS1*, w porównaniu z roślinami typu dzikiego, co wskazuje, że niższa ekspresja *EDS1* przyczynia się do wydajniejszej dysmutacji $O_2^{\bullet-}$ do H_2O_2 oraz zwiększonego rozkładu H_2O_2 do H_2O. Wyższa aktywność CAT w drzewach z wyciszonym *EDS1* była związana ze zwiększoną ekspresją genu *CATALASE 2* (*CAT2*). Podobne wyniki dla ilości RFT i aktywności CAT otrzymałam w moich poprzednich badaniach na rzodkiewniku pospolitym (Wituszyńska i in., 2015). Wyniki tej części mojego osiągnięcia naukowego wskazują na ważną rolę białka EDS1 w regulacji homeostazy RFT nie tylko u rzodkiewnika, ale także u roślin drzewiastych. Co ciekawe, pokazaliśmy, że aktywność EDS1 u topoli przyspiesza starzenie liści i zmiany w aparacie fotosyntetycznym jesienią, w końcowym okresie sezonu wegetacyjnego. U rzodkiewnika pospolitego białko EDS1 fizycznie oddziałuje z regulatorem starzenia, SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101 (SAG101) (He i Gan, 2002; Feys i in., 2005). Występowanie tej interakcji nie zostało jeszcze zweryfikowane u topoli, ale nie można odrzucić go jako sposobu regulacji tempa starzenia się liści. Co więcej, z uwagi na to, że EDS1 w rzodkiewniku pozytywnie reguluje śmierć komórek wywołaną różnymi stresami (Rustérucci i in., 2001; Chen i in., 2015; Wituszyńska i in., 2015), a starzenie się liści wiąże się także ze śmiercią komórek (Wu i in., 2012), opóźnione starzenie w liniach z wyciszoną ekspresją genu *EDS1* może wskazywać, że EDS1 pozytywnie wpływa na śmierć komórki u topoli, podobnie jak jego ortolog u rzodkiewnika. Zatem z aplikacyjnego punktu widzenia, cennymi cechami mogą być zwiększona asymilacja CO_2 i wydajność fotosyntezy oraz opóźnione procesy starzenia w liniach topoli z wyciszonym genem *EDS1* (Ryc. 2) (**P6**).



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie wpływu białka EDS1 na cechy morfologiczne i fizjologiczne drzew topoli. SA – kwas salicylowy (z ang. salicylic acid).

Przedstawione powyżej wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach:

P5. Bernacki M.J., **Czarnocka W.**, Szechyńska-Hebda M., Mittler R., Karpiński S. (2019) *Biotechnological potential of LSD1, EDS1, and PAD4 in the improvement of crops and industrial plants*. Plants (Basel) 8: 290

- Mój wkład w tę pracę polegał na pisaniu manuskryptu.

P6. Bernacki M.J.[#], **Czarnocka W.**[#], Witoń D., Rusaczonek A., Szechyńska-Hebda M., Ślesak I., Dąbrowska-Bronk J., Karpiński S. (2018) *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) affects development, photosynthesis and hormonal homeostasis in hybrid aspen (*Populus tremula *L.* × P. tremuloides*).* Journal of Plant Physiology 226: 91-102
[#] równy wkład autorów

- Mój wkład w tę pracę polegał na sformułowaniu hipotez badawczych, zaplanowaniu eksperymentów, przygotowaniu RNA do sekwencjonowania (RNAseq), analizie funkcjonalnej danych RNAseq, analizie statystycznej rezultatów qPCR oraz pisaniu manuskryptu.

4. LSD1 jest białkiem węzłowym i regulatorem transkrypcji zależnym od statusu redoks

Od czasu jego odkrycia, ponad dwie dekady temu, jako ważnego regulatora śmierci komórki, rola białka LSD1 była intensywnie badana pod kątem roli w reakcji na stresy zarówno biotyczne, jak i abiotyczne. Jednak molekularny mechanizm działania LSD1 pozostawał nieuchwytny i pomimo jego znaczenia w regulacji śmierci komórki i aklimatyzacji roślin, bardzo niewiele było wiadomo na temat szlaków przekazywania sygnałów angażujących białko LSD1. Białko to posiada trzy domeny palca cynkowego (ang. Zn-finger domains) na swoim N-końcu. Zostało udowodnione, że tego typu domeny pośredniczą w interakcji danego białka z partnerami białkowymi oraz w wiązaniu DNA i/lub RNA, a białka zawierające domeny palca cynkowego odgrywają ważną rolę w transdukcji sygnału, rozwoju roślin i śmierci komórki

(Ciftci-Yilmaz i Mittler, 2008). Domeny typu palca cynkowego w białku LSD1 zostały sklasyfikowane jako typ C2C2, który jest charakterystyczny dla niektórych czynników transkrypcyjnych (Gupta i in., 2012). Dlatego postawiłam hipotezę, że LSD1 działa jako białko szkieletowe i/lub regulator transkrypcji. W kolejnej fazie moich badań podjęłam próbę zdefiniowania funkcji molekularnej białka LSD1, co było niezbędne dla lepszego zrozumienia mechanizmu śmierci komórki u roślin. Zastosowałam różne techniki molekularne, które umożliwiły scharakteryzowanie subkomórkowej lokalizacji LSD1 i białek oddziałujących z LSD1 *in vivo*, zarówno przy braku stresu, jak i w czasie stresu oksydacyjnego. Ponadto moim celem było zidentyfikowanie genów regulowanych przez aktywność LSD1 i ocena, czy LSD1 może działać jako regulator transkrypcji.

Wykazałam, że białko fuzyjne LSD1-GFP, pod kontrolą endogennego promotora *pLSD1*, zostało wykryte w cytoplazmie i jądrze komórkowym (**P7**). Ponadto, okazało się, że LSD1 tworzy homodimery zlokalizowane głównie w jądrze komórkowym, ale występujące także w cytoplazmie. Genetyczna współzależność białek LSD1, EDS1 i PAD4 w regulacji śmierci komórki została dobrze udokumentowana (Wituszyńska i in., 2013 i 2015), dlatego chciałam sprawdzić, czy białko LSD1 jest w stanie fizycznie oddziaływać *in vivo* z białkami EDS1 i PAD4. Przeprowadzone przeze mnie doświadczenie bimolekularnej komplementacji fluorescencji (ang. Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC) potwierdziło wykazaną wcześniej homodimeryzację białka EDS1 i bezpośrednie oddziaływanie EDS1 z PAD4 (Feys i in., 2001; Zhu i in., 2011). Co najważniejsze, wykazałam interakcję LSD1 z EDS1 (**P7**). Jednak podczas moich badań nie udało się wykryć żadnych heterodimerów LSD1-PAD4, co wskazuje, że wpływ białka LSD1 na regulowaną przez PAD4 śmierć komórki może zachodzić poprzez ich wspólnego partnera – białko EDS1.

Odkryta bezpośrednia interakcja pomiędzy białkami LSD1 i EDS1 umożliwiła postawienia hipotezy, że istnieje więcej białek oddziałujących z LSD1 *in vivo*. Rozprzestrzenianie się śmierci komórki u mutanta rzodkiewnika pospolitego pozbawionego funkcjonalnego białka LSD1 (mutant *lsd1*) było skorelowane z akumulacją RFT (Jabs i in., 1996; Wituszyńska i in., 2013 i 2015). Z tego powodu przeanalizowałam białka wchodzące w interakcję z LSD1 zarówno w warunkach braku stresu, jak i podczas stresu oksydacyjnego. Oczyszczanie kompleksów białkowych metodą Tandem Affinity Purification (TAP), pozwoliło wykazać, że interakcje LSD1 z innymi białkami zależą od warunków. Oddziaływania tworzone przez białko LSD1 przy braku stresu okazały się inne, niż podczas stresu oksydacyjnego (**P7**). Analiza białek metodą spektrometrii mas doprowadziła do zidentyfikowania 38 nowych białek wchodzących w interakcję z LSD1, odpowiednio 25 i 16 białek oddziałujących z LSD1 w warunkach kontrolnych i stresu oksydacyjnego, z jedynie trzema białkami wspólnymi (P7). Pozwoliło to na **pozytywne zweryfikowanie hipotezy, że LSD1 oddziałuje z różnymi białkami w zależności od statusu redoks komórki** (Ryc. 3). Wyniki te wskazały także, że LSD1 działa jako białko węzłowe pośredniczące w interakcjach pomiędzy licznymi białkami. Węzły sieci białkowych ułatwiają wiązanie wielu białek, regulując w ten sposób różne procesy komórkowe. Brak określonego białka węzłowego często prowadzi do poważnych zaburzeń homeostazy komórkowej (He i Zhang, 2006), co może wyjaśniać powszechnie znany fakt, że rośliny pozbawione funkcjonalnego białka LSD1 (mutanty *lsd1*) wykazują wysoką niestabilność po ekspozycji na stres (Rustérucci i in., 2001; Wituszyńska i in., 2013).

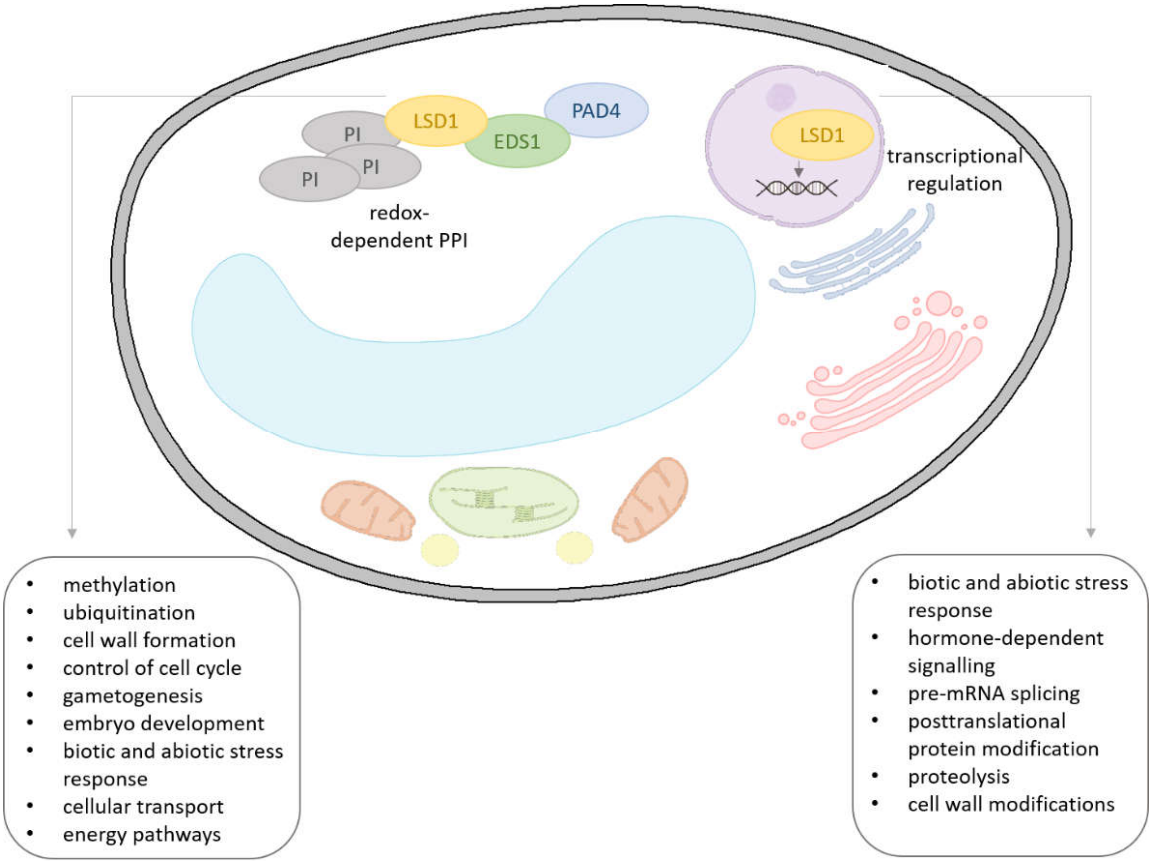
Białka oddziałujące z LSD1 okazały się być zaangażowane w różne szlaki molekularne, takie jak reakcje metylacji, ubikwitynacji, synteza ściany komórkowej, kontrola cyklu komórkowego, gametogeneza i rozwój zarodka (**P7**). W warunkach stresu oksydacyjnego więcej białek oddziałujących z LSD1 było zlokalizowanych w apoplaście, błonie komórkowej

i chloroplastach, w porównaniu z warunkami kontrolnymi. Co więcej, traktowanie H_2O_2 spowodowało, że białko LSD1 oddziaływało z większą liczbą białek biorących udział w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne, komórkowe szlaki transportowe i energetyczne. Sugeruje to, że w warunkach stresu oksydacyjnego funkcja LSD1 przestawia się w kierunku regulacji szlaków sygnałowych. Chociaż w białku LSD1 nie znaleziono żadnego sygnału lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization signal, NLS), w warunkach stresu oksydacyjnego oddziaływało ono z autopeptydazą nukleoporynową, białkiem kompleksu porów jądrowych, co wskazuje, że LSD1 może być aktywnie transportowane przez pory jądrowe. Fakt, że LSD1 oddziałuje z białkami zaangażowanymi w cykl komórkowy i syntezę ściany komórkowej, sugeruje jego funkcję w regulacji podziałów komórkowych, na co wskazują również mniejsze wymiary komórek mezofilu i ich większa gęstość w mutancie *lsd1*, podczas gdy odwrotna sytuacja ma miejsce u roślin z nadekspresją genu *LSD1* (**P7**). Wyniki te są zgodne z naszymi ostatnimi badaniami, w których wykazano zależne od LSD1 zmiany w składzie ściany komórkowej zarówno u rzodkiewnika pospolitego, jak i u topoli, oraz różnice w przebiegu podziałów i różnicowania się komórek (Szechyńska-Hebda i in., 2016). Ponadto, mniejsza ilość monomerów białka LSD1 w warunkach stresu oksydacyjnego może wskazywać, że w interakcjach białka LSD1 z jego partnerami biorą udział wewnątrzcząsteczkowe wiązania dwusiarczkowe, powstające w warunkach stresu oksydacyjnego. Jest to tym bardziej prawdopodobne z uwagi na obecność w obrębie każdej z domen typu palca cynkowego białka LSD1 motywu podobnego do tioredoksyny, występującego w białkach katalizujących tworzenie lub rozszczepianie mostków dwusiarczkowych (Carvalho i in., 2008), oraz z uwagi na wysoką zawartość reszt cysteiny we wszystkich białkach oddziałujących z LSD1 (**P7**).

Moim następnym celem było sprawdzenie, czy LSD1 może działać jako regulator transkrypcji. Po nawiązaniu współpracy z Prof. Berndem Mueller-Roeber'em wyjechałam na 3-miesięczny staż do Instytutu Molekularnej Fizjologii Roślin im. Maxa Plancka w Poczdamie. Aby zidentyfikować potencjalne sekwencje promotorowe, regulowane przez białko LSD1, wygenerowałam linie rzodkiewnika pospolitego z nadekspresją białka fuzyjnego LSD1-GFP (35Spro:*LSD1-GFP*) oraz linię, w której traktowanie deksametazonem (DEX) prowadziło do translokacji białka fuzyjnego LSD1 z receptorem glukokortykoidowym (GR) (35Spro:*LSD1-GR*) do jądra komórkowego. Powyższe linie rzodkiewnika wraz z typem dzikim i mutantem *lsd1* poddano profilowaniu transkryptomicznemu, co umożliwiło identyfikację 27 genów wykazujących przeciwne wzorce ekspresji w zależności od braku lub nadekspresji aktywnego białka LSD1 (**P7**). Okazało się, że geny te kodują białka zaangażowane w odpowiedź na stresy abiotyczne i biotyczne, transdukcję sygnału i modyfikacje ściany komórkowej. Kolejnym etapem było przeprowadzenie immunoprecypitacji chromatyny (ang. chromatin immunoprecipitation, ChIP) w połączeniu z ilościowym PCR w czasie rzeczywistym dla sekwencji promotorowych zidentyfikowanych genów. Dzięki temu podejściu wykazałam wiązanie białka LSD1 z sekwencjami promotorowymi 15 genów w roślinach uprawianych w warunkach laboratoryjnych i 13 genów ulegających ekspresji w roślinach uprawianych w warunkach szklarniowych (**P7**). **Moje wyniki pozwoliły na pozytywne zweryfikowanie hipotezy, że LSD1 jest regulatorem transkrypcji** (Ryc. 3).

Geny, których promotory były regulowane przez LSD1 kodowały białka zaangażowane w różne szlaki komórkowe, takie jak odpowiedź na stres, szlaki sygnałowe zależne od hormonów, dojrzewanie pre-mRNA, potranslacyjna modyfikacja białek, proteoliza czy modyfikacja ścian komórkowych. Co ciekawe, białko LSD1 oddziaływało z promotorami dwóch genów związanych z patogenezą (*PR1* i *CAP*), ale tylko w próbkach uzyskanych z roślin uprawianych w stabilnych warunkach laboratoryjnych. Jest to zgodne z naszymi

wcześniejszymi danymi wskazującymi, że ekspresja *PR1* jest indukowana w roślinach mutanta *lsd1* rosnących w stabilnych warunkach laboratoryjnych, ale nie w zmiennych warunkach polowych (Wituszyńska i in., 2013). Tak więc wpływ LSD1 na ekspresję, przynajmniej niektórych genów, wydaje się być również zależny od warunków, co dodatkowo potwierdza obserwacje, że funkcja LSD1 silnie zależy od statusu redoks komórki. Różnorodność zidentyfikowanych sekwencji promotorowych oraz fakt, że trzy spośród enzymów oddziałujących z LSD1 są odpowiedzialne za metylację DNA lub histonów, sugeruje, że LSD1 może regulować ekspresję genów poprzez modyfikację aktywności transkrypcyjnej chromatyny. Jednak nie można wykluczyć, że LSD1 reguluje ekspresję genów pośrednio, wpływając na inne specyficzne czynniki transkrypcyjne lub represory.



Rycina 3. Schematyczne przedstawienie roli LSD1 jako białka węzłowego, pośredniczącego w interakcjach z białkami o rożnych funkcjach molekularnych oraz czynnika regulującego ekspresję genów. PI – protein interactor, PPI – protein-protein interactions.

Przedstawione powyżej wyniki zostały opublikowane w następującym artykule:

P7. Czarnocka W., Van Der Kelen K., Willems P., Szechyńska-Hebda M., Shahnejat-Bushehri S., Balazadeh S., Rusaczonek A., Mueller-Roeber B., Van Breusegem F., Karpiński S. (2017) *The dual role of LESION SIMULATING DISEASE 1 as a condition-dependent scaffold protein and transcription regulator.* Plant, Cell and Environment 40: 2644-2662

- Mój wkład w tę pracę polegał na sformułowaniu hipotez badawczych, zaplanowaniu eksperymentów, przygotowaniu wszystkich konstruktów genetycznych,

przeprowadzeniu lokalizacji subkomórkowej przy pomocy BiFC, wykonaniu immunoblotów, przygotowaniu RNA do sekwencjonowania, wykonaniu wszystkich reakcji qPCR, przeprowadzeniu immunoprecypitacji chromatyny i analizie interakcji białek przy pomocy metody TAP oraz napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rycin.

5. FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1 (FMO1) to nowe białko zaangażowane w zależny od LSD1 szlak przekazywania sygnałów podczas aklimatyzacji do nadmiernej energii wzbudzenia

Podczas badań nad genami, których ekspresja zależy od LSD1 udowodniłam, że jednym z genów o najbardziej podwyższonej ekspresji u mutanta *lsd1* był gen kodujący białko FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1 (FMO1) (Wituszyńska i in., 2013). Co ciekawe, u mutantów *eds1* i *pad4* ekspresja *FMO1* była obniżona, co sugeruje, że białko FMO1 może być składnikiem mechanizmu indukcji śmierci komórki, w której pośredniczą białka LSD1, EDS1 i PAD4. Białka należące do rodziny monooksygenaz zawierających flawinę wykorzystują NAD(P)H i O_2 do utleniania związków o niskiej masie cząsteczkowej (Rossner i in., 2017). FMO1 bierze udział w odpowiedzi na stres biotyczny - po ataku patogenu rośliny rzodkiewnika pospolitego pozbawione funkcjonalnego białka FMO1 (mutant *fmo1*) nie potrafiły zahamować rozprzestrzeniania się infekcji (Bartsch i in., 2006). Ponadto mutant *fmo1* ma zaburzony mechanizm indukcji SAR (Mishina i Zeier, 2006). Uruchomienie SAR obejmuje przeprogramowanie transkrypcyjne niektórych genów związanych z obroną, wytwarzanie RFT i kwasu salicylowego, a następnie śmierć zakażonych komórek, która hamuje rozprzestrzeniania się patogenów (**P1**). Ale nie tylko patogeny wywołują systemiczną transdukcję sygnału. Wykazano, że traktowanie liścia nadmiarem światła indukuje rozprzestrzenianie się sygnału systemicznego, który jest przenoszony do dystalnych liści, co skutkuje reakcją aklimatyzacyjną, zwaną systemiczną nabytą aklimatyzacją (SAA), zwiększającą tolerancję na kolejny stres (Karpiński i in., 1999). Mechanizm SAA polega na przeprogramowaniu transkryptomicznym, produkcji RFT i przekazywaniu sygnałów z udziałem tych cząsteczek i hormonów oraz sygnalizacji elektrycznej (**P1**). Transdukcja SAA zależy także od bezpośrednich połączeń wiązek przewodzących, a coraz więcej dowodów wskazuje, że jej sygnał jest rozprowadzany przez parenchymatyczne komórki pochew okołowiązkowych (Szechyńska-Hebda i in., 2010; Carmody i in., 2016). Potwierdza to także fakt, że ekspresja genów markerowych SAA u rzodkiewnika pospolitego, *ASCORBATE PEROXIDASE 2* (*APX2*) i *ZINC-FINGER OF ARABIDOPSIS 10* (*ZAT10*) ma miejsce w komórkach pochew okołowiązkowych (Fryer i in., 2003; Galvez-Valdivieso i in., 2009). Chociaż SAR i SAA były wcześniej uważane za oddzielne procesy, coraz więcej dowodów wskazuje na kilka łączących je elementów, takich jak RFT, kwas salicylowy, etylen i sygnalizacja fotoelektrofizjologiczna (Baxter i in., 2014). Ponadto, indukcja obydwu tych procesów jest związana ze śmiercią komórek, regulowaną przez białka LSD1, EDS1 i PAD4 (Rustérucci i in., 2001; Wituszyńska i in., 2013).

Indukcja ekspresji *FMO1* w miejscu zakażenia patogenem jest zniesiona w mutantach rzodkiewnika pospolitego *eds1* i *pad4* (Mishina i Zeier, 2006). Zależna od białka FMO1 aktywacja SAR wymaga funkcjonalnych białek EDS1 i PAD4, a FMO1 pozytywnie reguluje zależną od EDS1 śmierć komórki (Bartsch i in., 2006). W pracy autorstwa Mishina i Zeier (2006) zasugerowano, że białko FMO1 uczestniczy w syntezie nieznanego jeszcze metabolitu,

który jest niezbędny do systemicznej transdukcji sygnału. Potwierdziło te przypuszczenia niedawne odkrycie, że FMO1 katalizuje biochemiczną konwersję kwasu pipekolowego (Pip) do wcześniej nieopisanego metabolitu roślinnego zaangażowanego w SAR, kwasu N-hydroksy-pipekolowego (N-OH-Pip) (Chen i in., 2018; Hartmann i in., 2018).

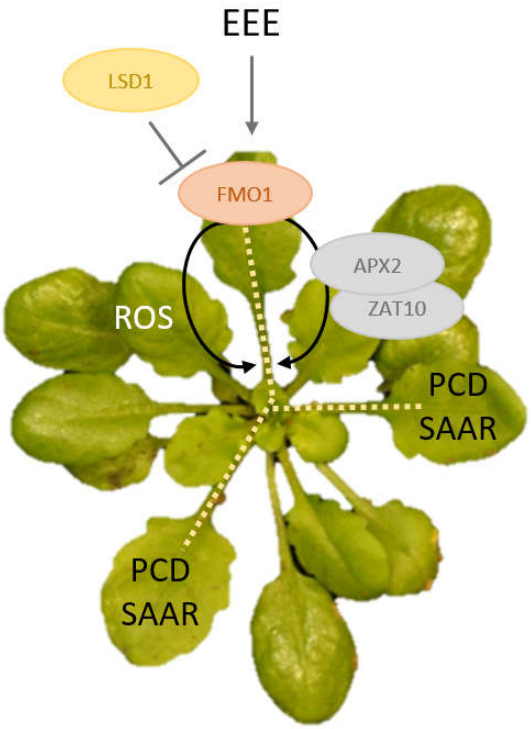
Procesy SAR i SAA posiadają pewne wspólne szlaki przekazywania sygnałów, zależne od LSD1, EDS1 i PAD4. Z tego powodu postawiłam hipotezę, że białko FMO1, uważane wyłącznie za regulator odpowiedzi na stres biotyczny, jest również ważnym elementem odpowiedzi na stres abiotyczny. Z uwagi na fakt, iż ekspresja genu *FMO1* jest silnie indukowana u mutanta *lsd1* (Wituszyńska i in., 2013), moja następna hipoteza zakładała, że białka LSD1 i FMO1 wspólnie regulują niektóre procesy, na przykład akumulację RFT, czy śmierć komórki. Przeprowadzona analiza ekspresji genów, przy pomocy ilościowego PCR w czasie rzeczywistym dowiodła, że ekspresja genu *FMO1* była indukowana po działaniu stresem nadmiernego światła zarówno na liściach traktowanych (lokalnych), jak i liściach nietraktowanych (systemicznych) (**P8**).

RFT należą do najważniejszych cząsteczek sygnałowych w SAA (**P1**). Dlatego w kolejnym etapie badań chciałam sprawdzić, czy białko FMO1 odgrywa jakąkolwiek rolę w systemicznym rozchodzeniu się sygnałów z udziałem RFT. U roślin rzodkiewnika pospolitego typu dzikiego 2-minutowe działanie nadmiarem światła na lokalny liść było wystarczające, aby zwiększyć koncentrację RFT (**P8**). Mutant *lsd1* wykazywał szybszą produkcję RFT, a mutant *fmo1* - wolniejszą, w porównaniu z typem dzikim. Co ważne, podwójny mutant *lsd1/fmo1* miał podobną zawartość RFT jak typ dziki, co wskazuje, że białko FMO1 sprzyja produkcji RFT i jest zaangażowane w zależny od LSD1 szlak sygnałowy RFT. Funkcjonalne białko FMO1 okazało się również niezbędne do systemicznej indukcji genów markerowych SAA: *APX2* i *ZAT10* (**P8**). **Wyniki te pozwoliły na pozytywne zweryfikowanie hipotezy, że FMO1 jest ważnym regulatorem SAA** (Ryc. 4).

Postanowiłam także sprawdzić, czy białko FMO1 uczestniczy w śmierci komórki, która pozostaje pod negatywną kontrolą białka LSD1. Dlatego potraktowałam lokalne liście nadmiarem światła i analizowałam postęp śmierci komórek w liściach lokalnych i systemicznych, barwiąc je błękitem trypanu, który uwidocznia mikrouszkodzenia (niewielkie obszary w obrębie liścia, składające się z jednej lub kilku martwych komórek). Tworzenie mikrouszkodzeń w liściach systemicznych następowało w odpowiedzi na atak patogenów podczas SAR (Alvarez i in., 1998). Jak dotąd nie było jednak dowodów na rozwój mikrouszkodzeń podczas SAA. Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty po raz pierwszy dowiodły, że miejscowe traktowanie nadmiarem światła może wywołać mikrouszkodzenia zarówno w liściach poddanych działaniu stresu, jak i w liściach odległych od działania stresu (**P8**). Co ciekawe, w liściach systemicznych zaobserwowałam większą liczbę mikrouszkodzeń niż w liściach lokalnych. Jednak, co najważniejsze, wykazałam, że białko FMO1 jest pozytywnym regulatorem rozprzestrzeniania się sygnału śmierci komórki i bierze udział w zależnym od LSD1 szlaku regulacji śmierci komórki (Ryc. 4).

Opierając się na wynikach przedstawionych w tej części mojego osiągnięcia naukowego, zaproponowałam model udziału białka FMO1 w sygnalizacji RFT i śmierci komórki po zadziałaniu światła o nadmiernej energii wzbudzenia. W tym modelu białko LSD1 negatywnie wpływa na ścieżki przekazywania sygnału zależne od FMO1, takie jak rozchodzenie się sygnałów RFT z liści lokalnych do systemicznych, jak również przekazywanie sygnałów zależnych od APX2 i ZAT10. Rozprzestrzenianie się RFT, pozytywnie regulowane przez białko FMO1, prowadzi do śmierci komórki i jednocześnie do SAA (Ryc. 4). Dzięki temu

białko FMO1 zostało zidentyfikowane jako kolejny wspólny element w indukcji SAR i SAA, dla których zaproponowano wspólne miano systemiczna nabyta aklimatyzacja i oporność (ang. systemic acquired acclimation and resistance, SAAR) (**P8**). Wcześniej wykazano, że gen *FMO1* ulega ekspresji w tkankach otaczających wiązki przewodzące (Olszak i in., 2006), a biorąc pod uwagę sugerowane rozprzestrzenianie sygnału SAA poprzez komórki pochew okołowiązkowych (Szechyńska-Hebda i in., 2010), wydaje się prawdopodobnym, że zależna od białka FMO1 transdukcja sygnału może zachodzić właśnie poprzez komórki miękiszowe otaczające wiązki przewodzące.



Rycina 4. Proponowany model udziału białka FMO1 w przekazywaniu sygnału RFT, systemicznej nabytej aklimatyzacji i oporności (SAAR) oraz śmierci komórki (PCD z ang. programmed cell death) w odpowiedzi na nadmierną energię wzbudzenia (EEE z ang. excess excitation energy).

Przedstawione powyżej wyniki zostały opublikowane w następującym artykule:

P8. **Czarnocka W**., Fichman Y., Bernacki M., Różańska E., Sańko-Sawczenko I., Mittler R., Karpiński S. (2020) *FMO1 is involved in excess light stress-induced signal transduction and cell death signaling*. Cells 9: 2163

- Mój wkład w tę pracę polegał na sformułowaniu hipotez badawczych, zaplanowaniu eksperymentów, izolacji RNA, syntezy cDNA, przeprowadzeniu reakcji qPCR, przygotowaniu konstrukcji genetycznej i stabilnej transformacji roślin, selekcji pokolenia T4 stabilnych transformantów roślin FMO1-OE, przeprowadzeniu wycieku jonowego i analizy mikro-uszkodzeń liści, analizie *in silico*, napisaniu manuskryptu oraz przygotowaniu rycin. Jako autor korespondujący odpowiadałam na recenzje oraz ostatecznie zredagowałam manuskrypt po recenzjach.

5.2.4. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań

Podsumowując wyniki niniejszego osiągnięcia naukowego, udało mi się wykazać rolę fotoreceptorów oraz ruchu chloroplastów w regulacji procesów fotosyntetycznych oraz odpowiedzi roślin na stres oksydacyjny. Ponadto, moje badania wskazują na duży potencjał biotechnologiczny białek LSD1, EDS1 oraz PAD4 w regulacji rozwoju oraz odporności na czynniki środowiskowe, nie tylko u roślin zielnych, ale także drzewiastych. Rezultaty, wchodzące w skład niniejszego osiągnięcia naukowego doprowadziły także do głębszego poznania funkcji białka LSD1 jako białka węzłowego, wchodzącego w interakcje z różnego rodzaju regulatorami komórkowymi oraz dowiodły roli LSD1 jako regulatora ekspresji genów. Wykazałam także, że białko FMO1 jest elementem szlaku przekazywania sygnału nadmiernej energii wzbudzenia zależnego od LSD1 i że bierze ono udział w regulacji śmierci komórki.

Wykazana przeze mnie szeroka sieć interakcji białka LSD1 stanowi punkt startowy do jeszcze lepszego poznania jego roli jako niezbędnego regulatora śmierci komórki. Dalsze badania powinny być prowadzone w kierunku szczegółowego zbadania szlaków przekazywania sygnałów, na przykład poprzez analizę fenotypu podwójnych mutantów *lsd1* oraz mutantów genów kodujących białka, z którymi LSD1 wchodzi w interakcję. Moje badania sugerują, że białko LSD1 jest raczej pośrednim regulatorem transkrypcji, więc warto byłoby zidentyfikować czynniki transkrypcyjne, które mogą być przez niego regulowane. Ciekawą wydaje się też być rola białka FMO1 w SAAR. Szlaki metaboliczne i przekazywania sygnałów z udziałem tego białka pozostają nadal słabo poznane. Dlatego interesujące byłoby zidentyfikowanie białek wchodzących w interakcję z białkiem FMO1, co pozwoliłoby określić jego rolę w przekazywaniu sygnałów w odpowiedzi na zarówno stresy biotyczne, jak i abiotyczne.

5.2.5. Wykaz cytowanej literatury

Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92: 773–784

Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 601–639

Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Annu Rev Plant Biol 59: 89–113

Bartsch M, Gobbato E, Bednarek P, Debey S, Schultze JL, Bautor J, Parker JE (2006) Salicylic acid–independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in Arabidopsis immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the Nudix hydrolase NUDT7. Plant Cell 18: 1038–1051

Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014) ROS as key players in plant stress signalling. J Exp Bot 65: 1229–1240

Bienert GP, Chaumont F (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta 1840: 1596–1604

Boccalandro HE, Rugnone ML, Moreno JE, Ploschuk EL, Serna L, Yanovsky MJ, Casal JJ (2009) Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in Arabidopsis. Plant Physiol 150: 1083–1092

Carmody M, Crisp PA, d'Alessandro S, Ganguly D, Gordon M, Havaux M, Albrecht-Borth V, Pogson BJ (2016) Uncoupling high light responses from singlet oxygen retrograde signaling and spatial-temporal systemic acquired acclimation. Plant Physiol 171: 1734–1749

Carvalho ATP, Swart M, van Stralen JNP, Fernandes PA, Ramos MJ, Bickelhaupt FM (2008) Mechanism of thioredoxin-catalyzed disulfide reduction. Activation of the buried thiol and role of the variable active-site residues. J Phys Chem B 112: 2511–2523

Casson SA, Franklin KA, Gray JE, Grierson CS, Whitelam GC, Hetherington AM (2009) phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity. Curr Biol 19: 229–234

Chen Q-F, Xu L, Tan W-J, Chen L, Qi H, Xie L-J, Chen M-X, Liu B-Y, Yu L-J, Yao N, i in (2015) Disruption of the Arabidopsis defense regulator genes SAG101, EDS1, and PAD4 confers enhanced freezing olerance. Mol Plant 8: 1536–1549

Chen Y-C, Holmes EC, Rajniak J, Kim J-G, Tang S, Fischer CR, Mudgett MB, Sattely ES (2018) N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 115: E4920–E4929

Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2008) The zinc finger network of plants. Cell Mol Life Sci 65: 1150–1160

DeBlasio SL, Mullen JL, Luesse DR, Hangarter RP (2003) Phytochrome modulation of blue light-induced chloroplast movements in Arabidopsis. Plant Physiol 133: 1471–1479

Demmig-Adams B, Adams WW (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. New Phytol 172: 11–21

Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals JA, Dangl JL (1994) Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. Cell 77: 565–577

Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C, Dangl JL (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the Arabidopsis *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. Cell 88: 685–694

Dietz K-J (2015) Efficient high light acclimation involves rapid processes at multiple mechanistic levels. J Exp Bot 66: 2401–2414

Feys BJ, Moisan LJ, Newman M-A, Parker JE (2001) Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. EMBO J 20: 5400–5411

Feys BJ, Wiermer M, Bhat RA, Moisan LJ, Medina-Escobar N, Neu C, Cabral A, Parker JE (2005) Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. Plant Cell 17: 2601–2613

Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. J Exp Bot 63: 1637–1661

Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpiński S, Mullineaux PM, Baker NR (2003) Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. Plant J 33: 691–705

Galvez-Valdivieso G, Fryer MJ, Lawson T, Slattery K, Truman W, Smirnoff N, Asami T, Davies WJ, Jones AM, Baker NR, i in (2009) The high light response in Arabidopsis involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. Plant Cell 21: 2143–2162

Gao F, Shu X, Ali MB, Howard S, Li N, Winterhagen P, Qiu W, Gassmann W (2010) A functional *EDS1* ortholog is differentially regulated in powdery mildew resistant and susceptible grapevines and complements an Arabidopsis *eds1* mutant. Planta 231: 1037–1047

Guo J, Bai P, Yang Q, Liu F, Wang X, Huang L, Kang Z (2013) Wheat zinc finger protein TaLSD1, a negative regulator of programmed cell death, is involved in wheat resistance against stripe rust fungus. Plant Physiol Biochem 71: 164–172

Gupta SK, Rai AK, Kanwar SS, Sharma TR (2012) Comparative analysis of zinc finger proteins involved in plant disease resistance. PLoS One 7: e42578

Hartmann M, Zeier T, Bernsdorff F, Reichel-Deland V, Kim D, Hohmann M, Scholten N, Schuck S, Bräutigam A, Hölzel T, i in. (2018) Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipecolic acid is a critical element of plant systemic immunity. Cell 173: 456-469

He S, Huang K, Zhang X, Yu X, Huang P, An C (2011) The LSD1-type zinc finger motifs of *Pisum sativa* LSD1 are a novel nuclear localization signal and interact with importin alpha. PLoS One 6: e22131

He X, Zhang J (2006) Why do hubs tend to be essential in protein networks? PLoS Genet. 2: e88

He Y, Gan S (2002) A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in Arabidopsis. Plant Cell 14: 805–815

Hu G, deHart AKA, Li Y, Ustach C, Handley V, Navarre R, Hwang C-F, Aegerter BJ, Williamson VM, Baker B (2005) EDS1 in tomato is required for resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene Ve. Plant J 42: 376–391

Huang J, Zhao X, Chory J (2019) The Arabidopsis transcriptome responds specifically and dynamically to high light stress. Cell Rep 29: 4186-4199

Ichikawa S, Yamada N, Suetsugu N, Wada M, Kadota A (2011) Red light, Phot1 and JAC1 modulate Phot2-dependent reorganization of chloroplast actin filaments and chloroplast avoidance movement. Plant Cell Physiol 52: 1422–1432

Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL (1996) Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide. Science 273: 1853–1856

Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M (2001) Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. Science 291: 2138–2141

Kaminaka H, Näke C, Epple P, Dittgen J, Schütze K, Chaban C, Holt BF, Merkle T, Schäfer E, Harter K, i in. (2006) bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. EMBO J 25: 4400–4411

Karpiński S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. Science 284: 654–657

Kong S-G, Wada M (2016) Molecular basis of chloroplast photorelocation movement. J Plant Res 129: 159–166

Koo YM, Heo AY, Choi HW (2020) Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. Plant Pathol J 36: 1–10

Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK (2009) Sensing and responding to excess light. Annu Rev Plant Biol 60: 239–260

López-Juez E, Bowyer JR, Sakai T (2007) Distinct leaf developmental and gene expression responses to light quantity depend on blue-photoreceptor or plastid-derived signals, and can occur in the absence of phototropins. Planta 227: 113–123

Luesse DR, DeBlasio SL, Hangarter RP (2010) Integration of phot1, phot2, and PhyB signalling in light-induced chloroplast movements. J Exp Bot 61: 4387–4397

Mateo A, Funck D, Mühlenbock P, Kular B, Mullineaux PM, Karpiński S (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. J Exp Bot 57: 1795–1807

Mateo A, Mühlenbock P, Rustérucci C, Chang CC-C, Miszalski Z, Karpinska B, Parker JE, Mullineaux PM, Karpiński S (2004) LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. Plant Physiol 136: 2818–2830

Mhamdi A, Van Breusegem F (2018) Reactive oxygen species in plant development. Development 145: 164376

Mishina TE, Zeier J (2006) The Arabidopsis flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. Plant Physiol 141: 1666–1675

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci 9: 490–498

Moon J, Zhu L, Shen H, Huq E (2008) PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 9433–9438

Mühlenbock P, Plaszczyca M, Plaszczyca M, Mellerowicz E, Karpiński S (2007) Lysigenous aerenchyma formation in Arabidopsis is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. Plant Cell 19: 3819–3830

Mühlenbock P, Szechyńska-Hebda M, Plaszczyca M, Baudo M, Mateo A, Mullineaux PM, Parker JE, Karpinska B, Karpiński S (2008) Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. Plant Cell 20: 2339–2356

Müller D, Leyser O (2011) Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. Ann Bot 107: 1203–1212

Mullineaux PM, Baker NR (2010) Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? Plant Physiol 154: 521–525

Ohnishi N, Allakhverdiev SI, Takahashi S, Higashi S, Watanabe M, Nishiyama Y, Murata N (2005) Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. Biochemistry 44: 8494–8499

Olszak B, Malinovsky FG, Brodersen P, Grell M, Giese H, Petersen M, Mundy J (2006) A putative flavin-containing mono-oxygenase as a marker for certain defense and cell death pathways. Plant Sci 170: 614–623

Pospíšil P (2016) Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. Front Plant Sci. 7: 1950

Rivas-San Vicente M, Plasencia J (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. J Exp Bot 62: 3321–3338

Rossner R, Kaeberlein M, Leiser SF (2017) Flavin-containing monooxygenases in aging and disease: Emerging roles for ancient enzymes. J Biol Chem 292: 11138–11146

Rustérucci C, Aviv DH, Holt BF, Dangl JL, Parker JE (2001) The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in Arabidopsis. Plant Cell 13: 2211–2224

Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K (2001) Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 6969–6974

Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R (1996) The no apical meristem gene of Petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. Cell 85: 159–170

Suetsugu N, Kagawa T, Wada M (2005) An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in Arabidopsis. Plant Physiol 139: 151–162

Szechyńska-Hebda M, Czarnocka W, Hebda M, Bernacki MJ, Karpiński S (2016) PAD4, LSD1 and EDS1 regulate drought tolerance, plant biomass production, and cell wall properties. Plant Cell Rep 35: 527–539

Szechyńska-Hebda M, Kruk J, Górecka M, Karpińska B, Karpiński S (2010) Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in Arabidopsis. Plant Cell 22: 2201–2218

Takemiya A, Doi A, Yoshida S, Okajima K, Tokutomi S, Shimazaki K-I (2016) Reconstitution of an initial step of phototropin signaling in stomatal guard cells. Plant Cell Physiol 57: 152–159

Terashima I, Hanba YT, Tazoe Y, Vyas P, Yano S (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO_2 diffusion. J Exp Bot 57: 343–354

Tyystjärvi E (2013) Photoinhibition of photosystem II. Int Rev Cell Mol Biol. 300: 243–303.

Wang L, Pei Z, Tian Y, He C (2005) OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. Mol Plant-Microbe Interact 18: 375–384

Wituszyńska W, Karpiński S. (2013) Programmed cell death as the response to high light, UV and drought stress in plants. W: Abiotic Stress Plant Responses and Applications in Agriculture, Vahdati K., Leslie Ch., (red.). In Tech, ISBN 980-953-307-673-2

Wituszyńska W, Slesak I, Vanderauwera S, Szechyńska-Hebda M, Kornas A, Van Der Kelen K, Mühlenbock P, Karpinska B, Mackowski S, Van Breusegem F, i in. (2013) Lesion simulating disease1, enhanced disease susceptibility1, and phytoalexin deficient4 conditionally regulate cellular signaling homeostasis, photosynthesis, water use efficiency, and seed yield in Arabidopsis. Plant Physiol 161: 1795–1805

Wituszyńska W, Szechyńska-Hebda M, Sobczak M, Rusaczonek A, Kozłowska-Makulska A, Witoń D, Karpiński S (2015) Lesion simulating disease 1 and enhanced disease susceptibility 1

differentially regulate UV-C-induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ 38: 315–330

Wu X-Y, Kuai B-K, Jia J-Z, Jing H-C (2012) Regulation of leaf senescence and crop genetic improvement. J Integr Plant Biol 54: 936–952

Xue L-J, Guo W, Yuan Y, Anino EO, Nyamdari B, Wilson MC, Frost CJ, Chen H-Y, Babst BA, Harding SA, i in. (2013) Constitutively elevated salicylic acid levels alter photosynthesis and oxidative state but not growth in transgenic populus. Plant Cell 25: 2714–2730

Yan Z, Xingfen W, Wei R, Jun Y, Zhiying M (2016) Island cotton Enhanced Disease Susceptibility 1 gene encoding a lipase-like protein plays a crucial role in response to *Verticillium dahliae* by regulating the SA Level and H_2O_2 Accumulation. Front Plant Sci 7: 1830

Zhang B, Yang Y, Chen T, Yu W, Liu T, Li H, Fan X, Ren Y, Shen D, Liu L, i in. (2012) Island cotton *Gbve1* gene encoding a receptor-like protein confers resistance to both defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*. PLoS One 7: e51091

Zhu S, Jeong R-D, Venugopal SC, Lapchyk L, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2011) SAG101 forms a ternary complex with EDS1 and PAD4 and is required for resistance signaling against Turnip Crinkle Virus. PLoS Pathog 7: e1002318

6. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

6.1. Wykaz pozostałych publikacji wraz z danymi bibliometrycznymi

Artykuły indeksowane w Journal Citation Reports (JCR):

Lp.	Publikacja	IF* MNiSW* liczba cyt.**
1.	Scharrer U., Skrzypczak-Zielinska M., **Wituszyńska W**., Mierzejewski M., Krause K., Cybulski C., Froster U.G. (2010) *A simple method of investigating mutations in* CHEK2 *by DHPLC: a study of the German populations of Saxony, Saxony-Anhalt, and Thuringia*. Cancer Genetics and Cytogenetics 199: 48-52	1,551 20 7
2.	**Wituszyńska W**., Ślesak I., Vanderauwera S., Szechyńska-Hebda M., Kornaś A., Van Der Kelen K., Mühlenbock P., Karpińska B., Maćkowski S., Van Breusegem F., Karpiński S. (2013) *LESION SIMULATING DISEASE1, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1, and PHYTOALEXIN DEFICIENT4 conditionally regulate cellular signaling homeostasis, photosynthesis, water use efficiency, and seed yield in Arabidopsis*. Plant Physiology 161: 1795-1805	7,394 45 53
3.	**Wituszyńska W**., Gałązka K., Rusaczonek A., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Karpiński S. (2013) *Multivariable environmental conditions promote photosynthetic adaptation potential in* Arabidopsis thaliana. Journal of Plant Physiology 170: 548-559	2,770 35 23
4.	Karpiński S., Szechyńska-Hebda M., **Wituszyńska W**., Burdiak P. (2013) *Light acclimation, retrograde signaling, cell death, and immune defenses in plants.* Plant, Cell and Environment 36: 736-744	5,906 45 106

5.	**Wituszyńska W**., Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Rusaczonek A., Kozłowska-Makulska A., Witoń D., Karpiński S. (2015) *LESION SIMULATING DISEASE1 and ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 differentially regulate UV-C induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in* Arabidopsis thaliana. Plant, Cell and Environment 38: 315–330	6,169 45 37
6.	Witoń D., Gawroński P., **Czarnocka W**., Ślesak I., Rusaczonek A., Sujkowska-Rybkowska M., Bernacki M.J., Dąbrowska-Bronk J., Tomsia N., Szechyńska-Hebda M., Karpiński S. (2016) *Mitogen activated protein kinase 4 (MPK4) influences growth in* Populus tremula *L. x* tremuloides. Environmental and Experimental Botany 130: 189-205	4,369 40 7
7.	Szechyńska-Hebda M., **Czarnocka W**., Hebda M., Bernacki M.J., Karpiński S. (2016) *PAD4, LSD1 and EDS1 regulate drought tolerance, plant biomass production, and cell wall properties*. Plant Cell Reports 35: 527-539	2,869 35 27
8.	Sańko-Sawczenko I., Łotocka B., **Czarnocka W**. (2016) *Expression analysis of* PIN *genes in root tips and nodules of* Medicago truncatula. International Journal of Molecular Sciences 17: 1197	3,226 30 14
9.	Sujkowska-Rybkowska M., **Czarnocka W**., Sańko-Sawczenko I., Witoń D. (2018) *Effect of short-term aluminum stress and mycorrhizal inoculation on nitric oxide metabolism in* Medicago truncatula *roots*. Journal of Plant Physiology 220: 145-154	2,833 35 4
10.	Labudda M., Różańska E., **Czarnocka W**., Sobczak M., Dzik J.M. (2018) *Systemic changes in photosynthesis and reactive oxygen species homeostasis in shoots of* Arabidopsis thaliana *infected with the beet cyst nematode* Heterodera schachtii. Molecular Plant Pathology 19: 1690-1704	2,989 40 16
11.	Różańska E., **Czarnocka W**., Baranowski Ł., Mielecki J., de Almeida Engler J., Sobczak M. (2018) *Expression of both Arabidopsis γ-tubulin genes is essential for development of a functional syncytium induced by* Heterodera schachtii. Plant Cell Reports 37: 1279-1292	3,499 35 1
12.	Bernacki M.J., **Czarnocka W**., Rusaczonek A., Witoń D., Kęska S., Czyż J., Szechyńska-Hebda M., Karpiński S. (2019) *LSD1, EDS1 and PAD4-dependent conditional correlation among salicylic acid, hydrogen peroxide, water use efficiency, and seed yield in* Arabidopsis thaliana. Physiologia Plantarum 165: 369-382	4,148 40 5
13.	Sańko-Sawczenko I., Dmitruk D., Łotocka B., Różańska E., **Czarnocka W**. (2019) *Expression analysis of* PIN *genes in root tips and nodules of* Lotus japonicus. International Journal of Molecular Sciences 20: 235	4,556 100 4
14.	Sańko-Sawczenko I., Łotocka B., Mielecki J., Rekosz-Burlaga H., **Czarnocka W.** (2019) *Transcriptomic changes in* Medicago truncatula *and* Lotus japonicus *root nodules during drought stress*. International Journal of Molecular Sciences 20: 1204	4,556 100 3
15.	Bernacki M.J., **Czarnocka W**., Zaborowska M., Różańska E., Labudda M., Rusaczonek A., Witoń D., Karpiński S. (2020) *EDS1-dependent cell death and the antioxidant system in Arabidopsis leaves is deregulated by the mammalian Bax*. Cells 9: E2454	4,366 140 1

Podkreśleniem nazwiska wskazano publikacje, w których pełnię rolę autora korespondującego.

[*] uwzględniono punktację czasopism z roku publikacji artykułów, zgodnie z komunikatem Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) obowiązującym w danym roku. Impact factor (IF) czasopisma z roku publikacji artykułu podano zgodnie danymi dostępnymi w Web of Science Core Collection.

[**] liczba cytowań (z autocytowaniami) wg bazy danych Scopus na dzień 12.03.2021

Rozdziały w monografiach:

1. **Wituszyńska W**., Karpiński S. (2013) *Programmed cell death as the response to high light, UV and drought stress in plants*. W: *Abiotic Stress Plant Responses and Applications in Agriculture*, Vahdati K., Leslie Ch., (red.). In Tech, ISBN 980-953-307-673-2

2. Skawińska M., Sańko-Sawczenko I., Dmitruk D., **Czarnocka W**., Łotocka B. (2020) *Organization and ultrastructure of* Medicago truncatula *root nodule meristem*. W: *The Model Legume* Medicago truncatula., de Bruijn F.J. (red.). Wiley-Blackwell Publishers, Chichester, UK. ISBN 9781119409168

3. Skawińska M., Sańko-Sawczenko I., Dmitruk D., **Czarnocka W**., Łotocka B. (2020) *Organization and ultrastructure of* Medicago truncatula *root apical meristem*. W: *The Model Legume* Medicago truncatula., de Bruijn F.J. (red.). Wiley-Blackwell Publishers, Chichester, UK. ISBN 9781119409168

6.2. Obszary zainteresowań naukowych wraz z omówieniem pozostałych, najważniejszych osiągnięć naukowo-badawczych

Pracą naukową zainteresowałam się już podczas ostatnich semestrów studiów magisterskich i z tego też powodu w 2008 roku zdobyłam finansowanie w ramach uczelnianego funduszu stypendialnego i wyjechałam na 3-miesięczny staż naukowy do Institut für Humangenetik w Lipsku (Niemcy), gdzie prowadziłam badania nad częstością występowania mutacji w genie *CHEK2*, warunkujących powstawanie różnego rodzaju nowotworów. Wyniki uzyskane w ramach tego stażu zaowocowały publikacją:

Scharrer U., Skrzypczak-Zielinska M., **Wituszyńska W**., Mierzejewski M., Krause K., Cybulski C., Froster U.G. (2010) *A simple method of investigating mutations in* CHEK2 *by DHPLC: a study of the German populations of Saxony, Saxony-Anhalt, and Thuringia*. Cancer Genetics and Cytogenetics 199: 48-52

Po ukończeniu studiów magisterskich zostałam laureatką stypendium doktoranckiego Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w ramach projektu WELCOME 2008/1, pt. „Functional analysis of genetic, molecular and quantum mechanisms that regulate plants productivity, and biotechnologies for cell wall degradation and hydrogen production", przyznanego Prof. dr Stanisławowi Karpińskiemu. W latach 2009-2013 byłam doktorantką Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, prowadząc prace badawcze w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Rezultaty moich badań wskazały na istotną rolę białek LSD1, EDS1 i PAD4 w regulacji śmierci komórki w odpowiedzi na nadmierną energię wzbudzenia. Ponadto, wyniki moich prac dowiodły, że rośliny rzodkiewnika pospolitego zaaklimatyzowane do warunków polowych wykazują większą wydajność fotosyntetyczną oraz są bardziej odporne na zmienne natężenie światła i dostępność CO_2 niż rośliny rosnące w stabilnych warunkach laboratoryjnych. Wykazałam także, że za te zmiany odpowiedzialna jest reorganizacja w obrębie kompleksów zbierających światło oraz PSII, razem ze zmienionym składem barwników fotosyntetycznych. Ponadto, używając profilowania transkryptomicznego, wytłumaczyłam molekularne podłoże tych

adaptacji. Tak znaczące zmiany w strukturze i wydajności aparatu fotosyntetycznego pomiędzy roślinami rosnącymi w różnych środowiskach zainspirowały mnie do analizy funkcji białek LSD1, EDS1 i PAD4 w dostosowaniu roślin do stałych bądź zmiennych warunków wzrostu. Wyniki moich prac badawczych dowiodły, że recesywny mutant w genie LSD1 (*lsd1*), który wykazuje tzw. uciekającą śmierć komórki (RCD z ang. runaway cell death) w warunkach stresu, jest bardziej odporny na jednoczesny stres suszy i wysokiego natężenia światła niż rośliny typu dzikiego. Ponadto, zależnie od warunków wzrostu, wykazywał różnice w wydajności zużycia wody, w homeostazie RFT i hormonów, maksymalnej wydajności PSII oraz w ekspresji genów. Jednak pomimo tych zmian, mutant *lsd1* miał podobny plon nasion we wszystkich testowanych warunkach wzrostu, a powyższe cechy zależały od białek EDS1 oraz PAD4. Dowiedliśmy zatem, że LSD1, EDS1 i PAD4 biorą udział w regulacji wielu procesów molekularnych i fizjologicznych, które wpływają na dostosowanie roślin rzodkiewnika pospolitego do otaczającego środowiska. Podkreśliliśmy także, że rola tak ważnych regulatorów jak LSD1, EDS1 i PAD4 nie powinna być definiowana jedynie na podstawie badań przeprowadzonych w stabilnych warunkach laboratoryjnych, ale także w naturalnym środowisku, obfitującym w różnorodne stresy. Powyższe wyniki znalazły się w mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Genetyczne oraz molekularne mechanizmy kontrolujące programowaną śmierć komórki oraz przystosowanie roślin w odpowiedzi na stresy abiotyczne", obronionej w czerwcu 2013 roku, i zostały opublikowane w trzech artykułach oryginalnych, jednym artykule przeglądowym oraz w jednym rozdziale w monografii. Rezultaty te stały się także inspiracją do zgłoszenia patentowego.

Artykuły indeksowane w Journal Citation Reports (JCR):

Wituszyńska W., Ślesak I., Vanderauwera S., Szechyńska-Hebda M., Kornaś A., Van Der Kelen K., Mühlenbock P., Karpińska B., Maćkowski S., Van Breusegem F., Karpiński S. (2013) *LESION SIMULATING DISEASE1, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1, and PHYTOALEXIN DEFICIENT4 conditionally regulate cellular signaling homeostasis, photosynthesis, water use efficiency, and seed yield in Arabidopsis*. Plant Physiology 161: 1795-1805

Wituszyńska W., Gałązka K., Rusaczonek A., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Karpiński S. (2013) *Multivariable environmental conditions promote photosynthetic adaptation potential in* Arabidopsis thaliana. Journal of Plant Physiology 170: 548-559

Karpiński S., Szechyńska-Hebda M., **Wituszyńska W**., Burdiak P. (2013) *Light acclimation, retrograde signaling, cell death, and immune defenses in plants* Plant, Cell and Environment 36: 736-744

Wituszyńska W., Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Rusaczonek A., Kozłowska-Makulska A., Witoń D., Karpiński S. (2015) *LESION SIMULATING DISEASE1 and ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 differentially regulate UV-C induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in* Arabidopsis thaliana. Plant, Cell and Environment 38: 315-330

Rozdział w monografii:

Wituszyńska W., Karpiński S. (2013) *Programmed cell death as the response to high light, UV and drought stress in plants*. W: *Abiotic Stress Plant Responses and Applications in Agriculture*, Vahdati K., Leslie Ch., (red.). In Tech, ISBN 980-953-307-673-2

Zgłoszenie patentowe:

Karpiński S., Szechyńska-Hebda M., Ślesak I., **Wituszyńska W**. (2013) Plant treatment methods and means therefor. Zgłoszenie patentowe: WO/2013/093637. Międzynarodowy numer aplikacji: PCT/IB2012/003045. Data publikacji w World Intellectual Property Organization (WIPO): 27.06.2013, zakres terytorialny: USA, Europa (EPO, EAPO), Afryka (ARIPO, OAPI)

Już podczas studiów doktoranckich moim celem było określenie dokładnej molekularnej roli białka LSD1. W tym celu nawiązałam współpracę z Prof. Frankiem Van Breusegemem z Department of Plant Systems Biology, Flanders Institute for Biotechnology (VIB) w Gandawie (Belgia). Udało mi się zdobyć finansowanie, początkowo z funduszu na wymianę naukową Polskiej Akademii Nauk, a później w ramach projektu REGPOT-2011-1-286093 pt. "Warsaw Plant Health Initiative", współfinansowanego ze środków 7. Programu Ramowego Unii Europejskiej (7FP), które umożliwiło mi wyjazd na 9-miesięczny staż naukowy (11.2011 – 05.2012 oraz 11.2012 – 01.2013). Podczas tego stażu nauczyłam się wielu technik molekularnych oraz przeprowadziłam badania nad rolą LSD1 w stresie oksydacyjnym.

Po obronie pracy doktorskiej, w 2013 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Botaniki Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, gdzie rozpoczęłam pracę badawczą nad rolą receptorów światła w śmierci komórki oraz kontynuowałam badania nad rolą białka LSD1. W szczególności chciałam zweryfikować swoją hipotezę badawczą dotyczącą roli białka LSD1 w regulacji ekspresji genów. W tym celu zdobyłam finansowanie na kolejny staż naukowy, w ramach projektu UDA-POKL-04.03.00-00-042/12-00 pt. „Program doskonalenia dydaktyki SGGW w dziedzinie pozyskiwania surowców roślinnych dla energetyki w kontekście celów Strategii Europa 2020", finansowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki Europejskiego Funduszu Społecznego. W ramach tego projektu otrzymałam grant na 3-miesięcny (01.2015 – 04.2015) wyjazd do laboratorium Prof. Bernda Mueller-Roeber'a w Max-Planck Institut für molekulare Pflanzenphysiologie w Poczdamie (Niemcy). W czasie tego stażu przeprowadziłam szereg eksperymentów, dowodzących, że białko LSD1 jest regulatorem transkrypcji. Wyniki te znalazły się w publikacji wykazanej w niniejszym osiągnięciu naukowym (**P7**). Równolegle, wspólnie z mgr Maciejem Bernackim, doktorantem, w którego przewodzie doktorskim pełniłam rolę promotora pomocniczego, kontynuowałam prace badawcze nad rolą białek LSD1, EDS1, PAD4 oraz MAP KINASE 4 (MPK4), zarówno u rzodkiewnika pospolitego, jak i u topoli. Rezultaty naszych badań dowiodły, że MPK4 topoli reguluje homeostazę RFT i hormonów, wpływa na wydajność fotosyntezy i wzrost drzew. Ponadto, dowiedliśmy roli białek LSD1, EDS1 i PAD4 w modyfikacji właściwości drewna topoli, a także wykazaliśmy matematyczną korelację pomiędzy zawartością H_2O_2 i kwasu salicylowego a wydajnością zużycia wody i plonem nasion u rzodkiewnika pospolitego. Nasze najnowsze badania dowiodły także, że zwierzęce białko Bax wpływa na śmierć komórki zależną od EDS1, co dowodzi

pewnych wspólnych elementów pomiędzy procesami śmierci komórki u roślin i zwierząt. Powyższe wyniki weszły w skład następujących artykułów naukowych:

Witoń D., Gawroński P., **Czarnocka W**., Ślesak I., Rusaczonek A., Sujkowska-Rybkowska M., Bernacki M.J., Dąbrowska-Bronk J., Tomsia N., Szechyńska-Hebda M., Karpiński S. (2016) *Mitogen activated protein kinase 4 (MPK4) influences growth in* Populus tremula *L. x* tremuloides. Environmental and Experimental Botany 130: 189-205

Szechyńska-Hebda M., **Czarnocka W**., Hebda M., Bernacki M.J., Karpiński S. (2016) *PAD4, LSD1 and EDS1 regulate drought tolerance, plant biomass production, and cell wall properties*. Plant Cell Reports 35: 527-539

Bernacki M.J., **Czarnocka W**., Rusaczonek A., Witoń D., Kęska S., Czyż J., Szechyńska-Hebda M., Karpiński S. (2019) *LSD1, EDS1 and PAD4-dependent conditional correlation among salicylic acid, hydrogen peroxide, water use efficiency, and seed yield in* Arabidopsis thaliana. Physiologia Plantarum 165: 369-382

Bernacki M.J., **Czarnocka W**., Zaborowska M., Różańska E., Labudda M., Rusaczonek A., Witoń D., Karpiński S. (2020) *EDS1-dependent cell death and the antioxidant system in Arabidopsis leaves is deregulated by the mammalian Bax*. Cells 9: E2454

Pracując w Katedrze Botaniki zainteresowałam się reakcjami symbiotycznymi pomiędzy roślinami z rodziny bobowatych a bakteriami glebowymi, zdolnymi do symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego, nazywanymi wspólnym mianem ryzobia. Dostrzegłam lukę w obrębie dostępnej wiedzy na temat szlaków molekularnych warunkujących podtrzymywanie aktywności merystematycznej specyficznych organów, powstających w wyniku tej symbiozy, brodawek korzeniowych. W 2015 roku zdobyłam grant w ramach programu Iuventus Plus (0512/IP1/2015/73) z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na finansowanie badań w ramach projektu pt. "Analiza różnic w transkryptomach brodawek korzeniowych *Medicago truncatula* oraz *Lotus japonicus* w warunkach optymalnych i w warunkach stresu suszy przy pomocy sekwencjonowania RNA następnej generacji (NGS)". W ramach tego projektu, wspólnie z mgr inż. Izabelą Sańko-Sawczenko, doktorantką, w której przewodzie doktorskim pełniłam funkcję promotora pomocniczego, wykazałyśmy zmiany w obrębie transkryptomów zarówno roślinnych, jak i bakteryjnych, w zależności od typu merystemu brodawki. Ponadto, w ramach powyższego projektu zlokalizowałyśmy ekspresję genów *PIN* w brodawkach korzeniowych, na różnych etapach ich rozwoju. Nasze rezultaty dowiodły, że białka PIN, zlokalizowane w błonie retikulum endoplazmatycznego i biorące udział w regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy auksyn, mają znaczący udział podczas inicjacji brodawkowania, ale także w podtrzymywaniu aktywności merystematycznej brodawek korzeniowych lucerny. Powyższe wyniki zostały zaprezentowane w trzech pracach oryginalnych, w których pełniłam rolę autora korespondującego oraz w dwóch rozdziałach w monografii.

Artykuły indeksowane w Journal Citation Reports (JCR):

Sańko-Sawczenko I., Łotocka B., **Czarnocka W.** (2016) *Expression analysis of* PIN *genes in root tips and nodules of* Medicago truncatula. International Journal of Molecular Sciences 17: 1197

Sańko-Sawczenko I., Dmitruk D., Łotocka B., Różańska E., **Czarnocka W**. (2019) *Expression analysis of* PIN *genes in root tips and nodules of* Lotus japonicus. International Journal of Molecular Sciences 20: 235

Sańko-Sawczenko I., Łotocka B., Mielecki J., Rekosz-Burlaga H., **Czarnocka W.** (2019) *Transcriptomic changes in* Medicago truncatula *and* Lotus japonicus *root nodules during drought stress*. International Journal of Molecular Sciences 20: 1204

Rozdziały w monografii:

Skawińska M., Sańko-Sawczenko I., Dmitruk D., **Czarnocka W**., Łotocka B. (2020) *Organization and ultrastructure of* Medicago truncatula *root nodule meristem*. W: *The Model Legume* Medicago truncatula., de Bruijn F.J. (red.). Wiley-Blackwell Publishers, Chichester, UK. ISBN 9781119409168

Skawińska M., Sańko-Sawczenko I., Dmitruk D., **Czarnocka W**., Łotocka B. (2020) *Organization and ultrastructure of* Medicago truncatula *root apical meristem*. W: *The Model Legume* Medicago truncatula., de Bruijn F.J. (red.). Wiley-Blackwell Publishers, Chichester, UK. ISBN 9781119409168

Realizacja zadań badawczych w ramach tego projektu zaowocowała także ciekawymi wynikami na temat genów *SHORT-ROOT* i *SCARECROW* w procesie rozwoju brodawek korzeniowych i podtrzymywania ich aktywności merystematycznej, więc moim celem było zgłębienie ich roli w brodawkowaniu, co umożliwiło mi uzyskane finansowanie w ramach projektu Miniatura (2020/04/X/NZ3/00416) z Narodowego Centrum Nauki na działanie naukowe pt. „Analiza poziomu oraz wzoru ekspresji genów *SHORT-ROOT* i *SCARECROW* podczas rozwoju brodawek korzeniowych lucerny", które jest w trakcie realizacji.

Ponadto, w trakcie mojej pracy badawczej współpracowałam z innymi zespołami, pracującymi nad analizą interakcji roślin z grzybami mikoryzowymi oraz nicieniami. Współpraca ta zaowocowała poniższymi artykułami naukowymi:

Sujkowska-Rybkowska M., **Czarnocka W**., Sańko-Sawczenko I., Witoń D. (2018) *Effect of short-term aluminum stress and mycorrhizal inoculation on nitric oxide metabolism in* Medicago truncatula *roots*. Journal of Plant Physiology 220: 145-154

Labudda M., Różańska E., **Czarnocka W**., Sobczak M., Dzik J.M. (2018) *Systemic changes in photosynthesis and reactive oxygen species homeostasis in shoots of* Arabidopsis thaliana *infected with the beet cyst nematode* Heterodera schachtii. Molecular Plant Pathology 19: 1690-1704

Różańska E., **Czarnocka W**., Baranowski Ł., Mielecki J., de Almeida Engler J., Sobczak M. (2018) *Expression of both Arabidopsis γ-tubulin genes is essential for development of a functional syncytium induced by* Heterodera schachtii. Plant Cell Reports 37: 1279-1292

7. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

Staże zagraniczne:

02.2015 – 04.2015	**Max-Planck Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Poczdam, Niemcy**: staż naukowy, własny projekt badawczy pt. „Analiza funkcjonalna białka LSD1 jako potencjalnego czynnika transkrypcyjnego u roślin”
11.2011 – 05.2012 oraz 11.2012 – 01.2013	**Department of Plant Systems Biology, Flanders Institute for Biotechnology (VIB), Gandawa, Belgia**: staż naukowy, własny projekt badawczy pt. “Funkcjonalna charakterystyka białka LSD1 w regulacji programowanej śmierci komórki”
06 – 09.2008	**Institut für Humangenetik, Lipsk, Niemcy**: staż naukowy, własny projekt badawczy pt. “Badanie częstości występowania mutacji w genie *CHEK2* w populacji niemieckiej”

8. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POULARYZUJACYCH NAUKĘ

8.1. Funkcja promotora pomocniczego w przewodach doktorskich

10.2015 - 03.2021	opieka naukowa nad doktorantką Izabelą Sańko-Sawczenko, tytuł rozprawy doktorskiej: „Wybrane mechanizmy molekularne zaangażowane w podtrzymywanie aktywności merystematycznej brodawek korzeniowych u gatunków modelowych z rodziny Fabaceae”
10.2017 - 07.2020	opieka naukowa nad doktorantem Maciejem Jerzym Bernackim, tytuł rozprawy doktorskiej: „Biotechnologiczne aspekty śmierci komórki zależnej od białek LSD1, EDS1 i PAD4 u *Populus tremula x tremuloides* oraz *Arabidopsis thaliana*”

8.2. Funkcja promotora prac magisterskich

10.2019 - 06.2021	promotorstwo pracy magisterskiej Wiktorii Frączek, Wydział Rolnictwa i Biologii, kierunek Biologia, tytuł pracy magisterskiej: „Analiza wzoru ekspresji genów *SHORT-ROOT* i *SCARECROW* w brodawkach korzeniowych *Medicago truncatula*”
06.2014 - 06.2015	promotorstwo pracy magisterskiej Izabeli Sańko-Sawczenko, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury krajobrazu, kierunek

Biotechnologia, tytuł pracy magisterskiej: „Badanie roli białek PIN w podtrzymywaniu aktywności brodawek korzeniowych typu niezdeterminowanego u *Medicago truncatula*”

8.3. Zajęcia dydaktyczne

Od 2013 roku prowadzę zajęcia, zarówno ćwiczenia, jak i wykłady, ze studentami kierunków Biologia, Biotechnologia, Inżyniera ekologiczna, Rolnictwo oraz kierunku, prowadzonego całkowicie w języku angielskim – Organic Agriculture and Food Production (OAFP). Jestem koordynatorem przedmiotu „Basics of Botany” dla kierunku OAFP, będąc jednocześnie autorem treści wykładowych i ćwiczeniowych w języku angielskim. Prowadzę także autorskie wykłady w ramach zajęć fakultatywnych "Nowe trendy w fizjologii roślin".

Przedmiot	**Stopień studiów**	**Kierunek**	**Wydział**
Basics of botany (wykłady w j. angielskim)	I	Organic Agriculture and food Production	Rolnictwa i Biologii
Basics of botany (ćwiczenia w j. angielskim)	I	Organic Agriculture and food Production	Rolnictwa i Biologii
Botanika (ćwiczenia)	I	Biologia, Inżynieria ekologiczna, Rolnictwo	Rolnictwa i Biologii
Botanika (ćwiczenia)	I	Biotechnologia	Ogrodnictwa i Biotechnologii
Systematyka roślin (ćwiczenia)	I	Biologia, Inżynieria ekologiczna, Rolnictwo	Rolnictwa i Biologii
Biologia komórki (ćwiczenia)	II	Biotechnologia	Ogrodnictwa i Biotechnologii
Mikroskopowe metody wizualizacji procesów i związków chemicznych (wykłady)	II	Biologia	Rolnictwa i Biologii
Mikroskopowe metody wizualizacji procesów I związków chemicznych (ćwiczenia)	I	Biotechnologia	Ogrodnictwa i Biotechnologii
Propedeutyka analizy naukowej bibliografii anglojęzycznej (zajęcia fakultatywne)	I	Biologia	Rolnictwa i Biologii
Redakcja prac naukowych (zajęcia fakultatywne)	II	Biologia	Rolnictwa i Biologii
Nowe trendy w fizjologii roślin (zajęcia fakultatywne)	II	Biologia	Rolnictwa i Biologii

8.4. Doświadczenie w tworzeniu oferty programowej uczelni

Współtworzyłam program studiów podyplomowych "Przyroda i biologia" w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie skierowanych dla nauczycieli szkół podstawowych, nauczających przedmiotów innych niż biologia, chcących poszerzyć swoje kompetencje zawodowe.

8.5. Popularyzacja nauki

Przygotowałam program oraz przeprowadziłam zajęcia w ramach przedsięwzięcia edukacyjnego „Uniwersytet Dzieci". Były to dwa całodzienne zajęcia warsztatowe z fizjologii roślin dla dzieci w wieku 10-11 lat.

9. STUDIA PODYPLOMOWE, KURSY I SZKOLENIA

26.10.2019 - obecnie	Liderskie studia podyplomowe w Akademii Leona Koźmińskiego, Warszawa
23.10.2015	Mentoring jako narzędzie wsparcia indywidualnego rozwoju naukowca – Warszawa, Polska
13 – 28.04.2015	Introduction to Linux and Scripting for Biologists – Poczdam, Niemcy
24 – 28.03.2014	1st TALEN and CRISPR Training School – Halle, Niemcy
12.07.2013	Optimization of selected techniques of protein analysis – Warszawa, Polska
25.11 – 5.12.2012	Generation and Analysis of Next Generation Sequencing Data – Gandawa, Belgia
23.11.2012	Visualizing and exploring biological networks with Cytoscape – Gandawa, Belgia
15/20.11.2012	Basic Statistics in "R" – Gandawa, Belgia
6/9.11.2012	Analysis of public microarray data using Genevestigator – Gandawa, Belgia
26.10.2012	Mechanisms of plant pest interaction – discovery and characterization workshop – Warszawa, Polska
3.10.2012	The Craft of Scientific Presentations – Warszawa, Polska
5.09.2012	People Management – Gandawa, Belgia

5.09.2012	How to Get Published workshop – Gandawa, Belgia
2/9.03.2012	Basic Bioinformatics concepts, databases and tools – Gandawa, Belgia
7.02.2012	CLC Genomics Workbench 4.5 – Warszawa, Polska
13-15.11.2009	Perl Programming – Warszawa, Polska
9-12.11.2009	Administracja systemem Linux – Warszawa, Polska
7-8.11.2009	Microsoft Office Excel Professional – Warszawa, Polska

Weronika Czarnocka