
AUTOREFERAT

dr inż. Piotr Gawroński

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2023

1 Dane osobowe

Dr inż. Piotr Gawroński
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
Orcid ID: 0000-0002-9773-3109

2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2009 – 2014 – doktor nauk biologicznych, w dyscyplinie biochemia, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, temat: „Molecular, physiological and bioinformatic analysis of the cellular signalling for regulation of biotic and abiotic stress responses in higher plants”, 24 czerwca 2014, praca obroniona z wyróżnieniem

2003 – 2008 – magister inżynier biotechnologii w produkcji roślinnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, temat: „Analiza molekularna wybranych mitochondrialnych klonów BAC ogórka (*Cucumis sativus* L.)”, wrzesień 2008

3 Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

1.10.2019 – obecnie adiunkt – Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

1.10.2017 – 30.09.2019 adiunkt – Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

09.2014 – 30.09.2017 samodzielny biotechnolog – Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

4 Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Określenie roli translacji w chloroplastach i komunikacji chloroplast-jądro w odpowiedzi na stresy abiotyczne

4.2 Wykaz cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie wraz z danymi bibliometrycznymi

autor korespondencyjny

* równorzędny udział

Liczba cytowań podana wg Web Of Science (8.05.2023)

MNiSW – Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

MEiN – Ministerstwo Edukacji i Nauki

IF – Impact Factor

P1. Gawroński, P., Burdiak, P., Scharff, L.B., Mielecki, J., Górecka, M., Zaborowska, M., Leister, D., Waszczak, C., Karpiński, S. (2021). CIA2 and CIA2-LIKE are required for optimal photosynthesis and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 105: 619–638.

IF 2021 = 7,091

Lista MEiN 2021 = 140

Liczba cytowań = 16

P2. Gawroński, P., Jensen, P.E., Karpiński, S., Leister, D., Scharff, L.B. (2018). Pausing of chloroplast ribosomes is induced by multiple features and is linked to the assembly of photosynthetic complexes. *Plant Physiol.* 176: 2557–2569.

IF 2018 = 6,305

Lista MNiSW 2018 = 45

Liczba cytowań = 22

IF 2021 = 8,005

Lista MEiN 2021 = 140

P3. Gawroński, P[#], Pałac, A., Scharff, L.B[#]. (2020). Secondary structure of chloroplast mRNAs in vivo and in vitro. *Plants* 9: 323.

IF 2020 = 3,935

Lista MEiN 2020 = 70

Liczba cytowań = 5

IF 2021 = 4,658

P4. Gawroński, P*., Enroth, C*., Kindgren, P., Marquardt, S., Karpiński, S., Leister, D., Jensen, P., Vinther, J., Scharff, L. (2021). Light-dependent translation change of *Arabidopsis* psbA correlates with RNA structure alterations at the translation initiation region. *Cells* 10: 322.

IF 2021 = 7,666

Lista MEiN 2021 = 140

Liczba cytowań = 7

P5. Qureshi, M.K., Gawroński, P., Munir, S., Jindal, S., Kerchev, P. (2022). Hydrogen peroxide-induced stress acclimation in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 79: 129.

IF 2021 = 9,234

Lista MEiN 2022 = 140

Liczba cytowań = 2

Podsumowanie danych bibliometrycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

Sumaryczny IF:	34,2
Sumaryczna liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MEiN:	630
Sumaryczna liczba cytowań wg bazy danych Web of Science:	52

4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1 Wstęp

Chloroplasty są organellami występującymi w komórkach roślin i glonów, odpowiadającymi za proces fotosyntezy, w trakcie którego energia świetlna jest konwertowana do energii chemicznej. Podczas fotosyntezy chloroplasty wykorzystują barwniki fotosyntetyczne potrzebne do absorpcji fotonów światła i późniejszej konwersji zaabsorbowanej energii do wiązań chemicznych. W początkowym etapie fotosyntezy zaabsorbowana energia służy do syntezy ATP i NADPH, które później wykorzystywane są do syntezy cukrów oraz innych związków organicznych. Czyni to fotosyntezę procesem niezbędnym do utrzymania życia na Ziemi i źródłem energii dla większości organizmów żywych.

Oprócz pełnienia kluczowej funkcji w procesie fotosyntezy, chloroplasty są zaangażowane w syntezę kwasów tłuszczowych, metabolizm aminokwasów oraz mechanizmy aklimatyzacyjne pozwalające na dostosowanie funkcjonowania komórki do stresów abiotycznych i biotycznych (Schwenkert i in., 2022). Niekorzystne warunki środowiskowe mogą powodować wystąpienie stresu oksydacyjnego i zaburzyć działanie membran oraz białek, prowadząc do zahamowania wzrostu i ograniczenia produkcji biomasy. Ze względu na osiadły tryb życia rośliny wykształciły liczne mechanizmy pozwalające im dostosowywać się do występujących stresów środowiskowych. Chloroplasty odgrywają zasadniczą rolę w tych procesach, ponieważ są głównym źródłem reaktywnych form tlenu (RFT), aktywujących ścieżki sygnałne prowadzące do aklimatyzacji (Suzuki i in., 2012). Równocześnie, stresy środowiskowe mogą bezpośrednio wpływać na działanie chloroplastów i zmniejszyć wydajność fotosyntezy. Dlatego zrozumienie w jaki sposób chloroplasty reagują na stresy środowiskowe ma zasadnicze znaczenie w opracowaniu rozwiązań pozwalających na poprawę funkcjonowania i plonowania roślin w niekorzystnych warunkach.

Chloroplasty są organellami półautonomicznymi, ponieważ posiadają własny genom i maszynę pozwalającą na jego ekspresję. Genom chloroplastowy jest pozostałością po genomie bakterii fotosyntetyzującej, będącej przodkiem dzisiejszych cyjanobakterii. Bakteria fotosyntetyzująca wniknęła do pierwotnej komórki eukariotycznej około jednego mld lat temu. W trakcie ko-ewolucji genomu bakteryjnego z genomem eukariotycznym doszło to transferu znakomitej większości genów bakteryjnych do jądra (Leister, 2016). W porównaniu do genomów cyjanobakterii dzisiejsze genomy chloroplastowe są silnie zredukowane i kodują tylko niewielką część wszystkich białek znajdujących się w chloroplastach. Wśród około osiemdziesięciu białek kodowanych przez genomy chloroplastowe znaleźć można głównie białka zaangażowane w fotosyntezę i ekspresję genów chloroplastowych (Green, 2011). Wydajna ekspresja genów chloroplastowych, w szczególności translacja, jest niezwykle istotna, ponieważ w jej wyniku powstaje do 50 % całkowitego białka w liściach. W wyniku translacji w chloroplastach powstaje między innymi duża podjednostka enzymu RuBisCo (karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu), odpowiedzialnego za asymilację CO₂ i będącego jednocześnie najliczniej występującym białkiem na Ziemi (Hayer-Hartl & Hartl, 2020).

Synteza białek w chloroplastach przebiega w rybosomach typu prokariotycznego (70S) (Zoschke & Bock, 2018). Pomimo wielu podobieństw do organizmów prokariotycznych translacja w chloroplastach posiada również cechy specyficzne dla tych organelli. Rybosomy chloroplastowe są większe od swoich bakteryjnych odpowiedników wskutek wiązania specyficznych białek plastydowych. Ponadto, translacja w chloroplastach jest uważana za główny etap regulacji ekspresji genów. Pozwala to na szybkie dostosowanie metabolizmu chloroplastów do zmian w środowisku bez potrzeby wpływania na wcześniejsze etapy ekspresji genów. Co za tym idzie, translacja w chloroplastach jest ściśle regulowana przez czynniki rozwojowe i środowiskowe, do których zaliczyć można zmiany intensywności światła oraz fluktuacje temperatury (Chotewutmontri & Barkan, 2016; Gao i in., 2022; Schuster i in., 2020).

Podjednostki wchodzące w skład wielu kompleksów białkowych występujących w chloroplastach mogą być kodowane przez geny znajdujące się w różnych genomach. Dobrym przykładem ilustrującym to zjawisko jest RuBisCo. W skład RuBisCo wchodzi dwa rodzaje podjednostek: duża podjednostka, która jest kodowana przez gen *rbcL* znajdujący się w genomie chloroplastowym, oraz mała podjednostka, kodowana przez jądrowy gen *RbcS* (Hayer-Hartl & Hartl, 2020). Rozdzielenie genów pomiędzy różnymi genomami rodzi potrzebę koordynacji ekspresji genów z różnych przedziałów komórkowych, dlatego rośliny wykształciły mechanizmy pozwalające na przepływ informacji między chloroplastami a jądrem komórkowym (Mielecki i in., 2020). Z jednej strony jądro komórkowe sprawuje kontrolę nad ekspresją genów w chloroplastach (ang. *anterograde signals*), ponieważ genom jądrowy koduje wiele białek zaangażowanych w transkrypcję i translację w chloroplastach, np. podjednostki sigma polimerazy RNA i niektóre białka rybosomalne, z drugiej zaś strony chloroplasty mogą wysyłać specyficzne sygnały (np. reaktywne formy tlenu [RFT] lub metabolity), które wpływają na ekspresję genów jądrowych (ang. *retrograde signals*). Współzależność ekspresji genów chloroplastowych i jądrowych ma na celu utrzymanie homeostazy komórkowej i optymalne wykorzystanie energii. Sprawna komunikacja chloroplast-jądro jest szczególnie istotna podczas zmian rozwojowych i w odpowiedzi na stresy środowiskowe, które wpływają na procesy zachodzące w chloroplastach. Przykładem takiego wpływu może być stres wysokiego natężenia światła, który prowadzi do fotoinhibicji i zmniejszenia wydajności fotosyntetycznego transportu elektronów. Przywrócenie poprawnego funkcjonowania wiąże się ze znacznymi zmianami ekspresji genów jądrowych i chloroplastowych.

Wewnątrzkomórkowa komunikacja między jądrem komórkowym a chloroplastami reguluje procesy fizjologiczne, w tym rozwój, wzrost i reakcje na stresy środowiskowe. Sygnały wysyłane z chloroplastów pozwalają na koordynację ekspresji genów jądrowych i chloroplastowych zapewniając wydajną aklimatyzację. Sygnały z chloroplastów są indukowane podczas zaburzenia funkcjonowania tych organelli, do których zalicza się zahamowanie syntezy tetrapiroli, inhibicję translacji czy zwiększenie poziomu RFT, w tym podczas stresu wysokiego natężenia światła (Chan i in., 2016). Na poziomie molekularnym zmiany natężenia światła powodują zmiany statusu redoks przekaźników elektronów prowadząc do nadprodukcji RFT, takich jak tlen singletowy i nadtlenek wodoru (H_2O_2). Przykładem zaangażowania RFT w komunikację chloroplast-jądro może być H_2O_2 , który podczas stresów suszy i wysokiego natężenia światła wpływa na metabolizm 3'-fosfoadenozyno-5'-fosforanu (PAP). W normalnych warunkach stężenie PAP jest na niskim poziomie, jednak w trakcie tych stresów PAP akumuluje się w chloroplastach, a jego część trafia do jądra komórkowego, gdzie wpływa na ekspresję wielu genów prowadząc do aklimatyzacji (Estavillo i in., 2011). Oprócz aktywowania specyficznej ścieżki sygnałnej H_2O_2 produkowany w chloroplastach może również bezpośrednio lub poprzez stromule trafiać do jądra komórkowego i wpływać na ekspresję genów (Caplan i in., 2015; Exposito-Rodriguez i in., 2017). Kolejnym RFT, który bierze udział w komunikacji chloroplast-jądro, jest tlen singletowy, jednak przez niską stabilność nie może zostać przetransportowany do jądra komórkowego. Działanie tlenu singletowego polega na aktywacji specyficznych przekaźników sygnału w chloroplastach. Dotychczas zostały opisane dwie ścieżki sygnałne zależne od tlenu singletowego. Zaliczamy do nich ścieżkę zależną od β -cyklocitralu będącego produktem utlenienia β -karotenu oraz ścieżkę zależną od kodowanych jądrowo białek EXECUTER 1 i 2 (Dogra i in., 2019; Ramel i in., 2012). Obie ścieżki regulują ekspresję różnych i specyficznych dla siebie grup genów.

Aktywność wielu czynników transkrypcyjnych (ang. *transcription factors*) jest regulowana przez sygnały z organelli. Czynniki ANAC013 i ANAC017 są kontrolowane przez zmiany statusu redoks w mitochondriach. Za pomocą domeny trans-błonowej są one przyłączone do retikulum endoplazmatycznego, jednak w reakcji na zaburzenie kompleksu III w mitochondriach dochodzi do ich odcięcia, w konsekwencji czego są transportowane do jądra komórkowego wpływając na ekspresję genów (De Clercq i in., 2013; Ng i in., 2013). Tak więc czynniki transkrypcyjne o podwójnej lokalizacji mogą brać udział w komunikacji między organellami a jądrem. Analizy *in silico* wykazały, że spośród około 2000 czynników transkrypcyjnych kodowanych przez genom *Arabidopsis thaliana*,

prawdopodobnie 50-80 jest lokalizowanych w plastydach (Schwacke i in., 2007; Wagner & Pfannschmidt, 2006).

4.3.2 Cel pracy i hipotezy badawcze

Regulacja translacji w chloroplastach oraz komunikacja chloroplast-jądro są istotnymi elementami procesów aklimatyzacyjnych u roślin. Dlatego celem przedstawionego osiągnięcia, na które składają się cztery prace oryginalne (**P1 – P4**) oraz jedna praca przeglądowa (**P5**), było poznanie molekularnych podstaw regulacji translacji w chloroplastach oraz identyfikacja i charakterystyka nowych czynników oraz ścieżek sygnałnych biorących udział w komunikacji chloroplast-jądro, szczególnie w reakcji na stresy zaburzające poprawne funkcjonowanie chloroplastów. Opisane badania są badaniami podstawowymi prowadzonymi na roślinie modelowej *A. thaliana*, jednak w szerszej perspektywie mogą się one przyczynić do opracowania rozwiązań pozwalających na uzyskanie nowych odmian roślin o zwiększonej tolerancji na stresy środowiskowe.

W ramach przedstawionego osiągnięcia zweryfikowano następujące hipotezy badawcze:

- czynniki transkrypcyjne o podwójnej lokalizacji, chloroplastowo-jądrowej, biorą udział w komunikacji między tymi organellami i pełnią istotną funkcję w procesie aklimatyzacji do stresów abiotycznych,
- stabilna struktura II-rzędowa oraz inne cechy mRNA, i syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego powodują pauzowanie rybosomów w chloroplastach,
- cechy mRNA takie jak obecność sekwencji Shine-Dalgarno w obrębie CDS i stabilna struktura II-rzędowa powodujące pauzowanie rybosomów są ewolucyjnie konserwowane,
- zmiany wydajności translacji genów chloroplastowych podczas aklimatyzacji do stresu wysokiego natężenia światła zależą od zmian struktury II-rzędowej mRNA.

4.3.3 Omówienie wyników badań

Czynnik transkrypcyjny *CHLOROPLAST IMPORT APPARATUS2 (CIA2)* lokalizuje się w chloroplastach i jądrze komórkowym i jest pozytywnym regulatorem odpowiedzi na stres fotooksydacyjny

Celem pracy **P1** było poznanie i scharakteryzowanie czynników transkrypcyjnych o podwójnej lokalizacji, zarówno jądrowej jak i chloroplastowej, biorących udział w komunikacji między tymi organellami, w roślinie modelowej *A. thaliana*. Praca **P1** w *Plant Journal* (2021) była pierwszą próbą identyfikacji czynników transkrypcyjnych o podwójnej lokalizacji chloroplastowo-jądrowej biorących udział w komunikacji między tymi organellami. Punktem wyjścia prowadzonych przeze mnie badań było wykorzystanie strategii ukierunkowanej odwrotnej genetyki (ang. *reverse genetics*). Na początku przeszukano bazy danych znanych czynników transkrypcyjnych (Jin i in., 2014; Pérez-Rodríguez i in., 2009) oraz białek chloroplastowych (Myouga i in., 2013; Schwacke i in., 2003; Sun i in., 2009) i wytypowano zbiór genów jądrowych kodujących czynniki transkrypcyjne, które potranslacyjnie mogą być transportowane do chloroplastów. W kolejnym etapie uzyskano 67 homozygotycznych mutantów insercyjnych T-DNA w 53 genach. Mutanty te poddano analizie w warunkach stresów zaburzających działanie chloroplastów (stres wysokiego natężenia światła w niskiej temperaturze [cHL] i stres UV-AB). Założono, że jeśli badany czynnik transkrypcyjny jest zaangażowany w komunikację chloroplast-jądro, to jego brak (tak jak w mutancie) będzie skutkował zwiększoną wrażliwością na stresy. Większość analizowanych mutantów nie wykazywała zwiększonej wrażliwości na stresy w porównaniu do roślin typu dzikiego. Wyjątek stanowiły mutanty w ośmiu genach, które wykazywały większą wrażliwość na cHL i/lub UV-AB. Następnie skupiono się na sześciu spośród ośmiu analizowanych genów, które sklonowano, aby sprawdzić czy kodują białka lokalizujące się w chloroplastach. Analizę wykonano wykorzystując przejściową transformację siewek *A. thaliana*, w których następowała ekspresja badanego białka w fuzji z białkiem żółtej fluorescencji (YFP) pod kontrolą konstytutywnego promotora 35S. Spośród analizowanych białek tylko białko fuzyjne AT5G57180-YFP lokalizowało się

w chloroplastach i jądrze komórkowym. Dlatego dalsze badania prowadzono na genie AT5G57180 kodującym białko CHLOROPLAST IMPORT APPARATUS2 (CIA2), które wcześniej opisano jako biorące udział w imporcie białek do chloroplastów i translacji w chloroplastach (Sun i in., 2001, 2009). CIA2 posiada domenę CCT na C-końcu, charakterystyczną dla białek zaangażowanych w proces przekazywania sygnałów zależnych od światła. Zwiększona wrażliwość na analizowane stresy chloroplastowe mutantu SALK_045340 (*cia2-4*) sugeruje, że CIA2 jest zaangażowane w procesy aklimatyzacyjne w odpowiedzi na cHL i UV-AB.

CIA2 i CIA2-LIKE (CIL) działają synergistycznie w trakcie stresu fotooksydacyjnego ale tylko CIA2 posiada funkcjonalny chloroplastowy peptyd tranzytowy

Aby potwierdzić rolę CIA2 w procesie aklimatyzacji do stresu, wyizolowano mutanty *cia2-2* (SALK_004037) i *cia2-3* (SGT49) z insercjami T-DNA w pierwszym egzonie. Analiza zawartości barwników fotosyntetycznych wykazała, że mutanty *cia2* mają ich mniej niż rośliny typu dzikiego. Na poziomie aminokwasowym CIA2 jest w 54 % identyczny z białkiem CIA2-LIKE (CIL, AT4G25990). Analiza lokalizacji białka CIL-YFP wykazała, że w przeciwieństwie do CIA2-YFP, CIL-YFP lokalizuje się tylko w jądrze komórkowym. Następnie sprawdziliśmy redundancję genów *CIA2* i *CIL* krzyżując mutanty *cia2* z uzyskanymi mutantami *cil-1* (SAIL_228_C01) i *cil-2* (SK14786). Mutanty *cil* nie różniły się fenotypowo od roślin typu dzikiego. Zaobserwowano, że podwójne mutanty *cia2 cil* miały niższą zawartość pigmentów fotosyntetycznych niż pojedyncze mutanty i rośliny typu dzikiego. Sugeruje to, że geny *CIA2* i *CIL* działają synergistycznie i są niezbędne do optymalnego funkcjonowania fotosystemów i fotosyntezy.

Początkowo w analizie wrażliwości na stresy chloroplastowe (UV-AB i cHL) wykorzystano mutant *cia2-4*, dlatego kolejne eksperymenty rozszerzono o inne allele mutantów *cia2* i *cil*, oraz podwójne mutanty *cia2 cil*. Analiza fenotypów mutantów wykazała, że *CIA2* i *CIL* są potrzebne do optymalnej odpowiedzi fizjologicznej na stres fotooksydacyjny, z tym że *CIA2* pełni dominującą rolę. Mutanty *cil* nie różniły się znacząco reakcją od roślin typu dzikiego ale wprowadzenie mutacji *cil* do tła genetycznego *cia2*, jak miało to miejsce w podwójnym mutancie *cia2 cil*, zwiększało jego wrażliwość na analizowane stresy. Zwiększona wrażliwość analizowanych mutantów na HL i UV-AB może być konsekwencją upośledzenia procesu rozpraszania nadmiaru energii wzbudzenia (Karpiński i in., 1999). Dlatego zbadano proces niefotochemicznego wygaszania (NPQ) za pomocą analizy fluorescencji chlorofilu a oraz pomiaru gradientu protonów w poprzek błony tylakoidów. Oba eksperymenty wykazały, że mutanty *cia2 cil* nie są w stanie zaindukować NPQ do poziomu obserwowanego w roślinach typu dzikiego, zwłaszcza w młodych, rozwijających się liściach. Dodatkowo zbadano wydajność fotosyntezy wykorzystując pomiar asymilacji CO₂. Uzyskane wyniki wskazują, że rośliny *cia2 cil* mają istotnie obniżone tempo asymilacji CO₂ co dobrze koreluje z obniżonym tempem wzrostu tych roślin.

Ekspresja chloroplastowych białek rybosomalnych i dojrzewanie 23S rRNA zależą od aktywności CIA2 i CIL

Wcześniejsze badania sugerowały, że CIA2 jest istotnym czynnikiem wpływającym na translację w chloroplastach poprzez regulację ekspresji genów jądrowych kodujących niektóre białka rybosomu chloroplastowego (Sun i in., 2009). Aby sprawdzić czy podobny efekt jest obserwowany w analizowanych mutantach *cia2* oraz czy ekspresja genów rybosomalnych zależy od aktywności CIL, przeprowadzono analizę ekspresji za pomocą qRT-PCR i sekwencjonowania RNA (RNA-seq). Ekspresja 21 spośród 66 analizowanych genów rybosomalnych była obniżona w *cia2* i podwójnym mutancie *cia2 cil*. Obserwowany efekt był silniejszy w podwójnym niż w pojedynczym mutancie *cia2* (*cil* nie różnił się od roślin typu dzikiego), co sugeruje, że CIA2 i CIL współuczestniczą w regulacji ekspresji genów rybosomalnych. W celu sprawdzenia, czy CIA2 i CIL wpływają na translację w chloroplastach przeprowadzono analizę polisomów poprzez badanie wiązania mRNA *psbD* z rybosomami chloroplastowymi z wykorzystaniem frakcjonowania w gradiencie sacharozy. Eksperyment wykazał, że w roślinach *cia2 cil* mRNA *psbD* było związane z mniejszą ilością

rybosomów niż w roślinach typu dzikiego, co wskazuje na obniżoną translację chloroplastową w tym genotypie. Dodatkowym potwierdzeniem wskazującym na rolę CIA2 i CIL w procesie translacji w chloroplastach była analiza rybosomalnego RNA (rRNA). Wykazano, że dojrzewanie 23S rRNA, wchodzącego w skład dużej podjednostki rybosomu, jest zaburzone w mutantach *cia2 cil*. Rośliny o obniżonej wydajności translacji w chloroplastach często wykazują większą wrażliwość na niektóre antybiotyki będące inhibitorami translacji (np. spektynomycynę). Zgodnie z oczekiwaniami wzrost i rozwój roślin *cia2 cil* był silnie zaburzony na podłożu zawierającym spektynomycynę potwierdzając, że CIA2 i CIL odgrywają istotną rolę w translacji w chloroplastach.

Analiza wyników RNA-seq wykazała, że wiele genów zaangażowanych w odpowiedź na stres wysokiej temperatury (np. *HSP*) ma konstytutywnie podwyższoną ekspresję w roślinach *cia2 cil*. Co więcej, zaobserwowano, że rośliny *cia2 cil* lepiej radzą sobie w podwyższonej temperaturze niż rośliny kontrolne, co sugeruje że CIA2 i CIL wpływają na termotolerancję, prawdopodobnie przez regulację ekspresji genów *HSP*. **Podsumowując, w pracy P1 opisano nową rolę czynników transkrypcyjnych CIA2 i CIL w procesie komunikacji chloroplast-jądro w trakcie stresu fotooksydacyjnego oraz w regulacji translacji w chloroplastach.** Ostatnio opublikowane prace innych zespołów (Li i in., 2021; Yang i in., 2022; Yang & Sun, 2020) potwierdzają rolę tych białek i wskazują, że są to ciekawe obiekty do dalszych badań.

Profilowanie rybosomów pozwoliło na identyfikację licznych miejsc pauzowania rybosomów na mRNA w chloroplastach

Celem publikacji **P2** było scharakteryzowanie czynników wpływających na elongację translacji i pauzowanie rybosomów w chloroplastach oraz zrozumienie biologicznej roli pauzowania. Badania przeprowadzono na młodych liściach *A. thaliana* z wykorzystaniem techniki profilowania rybosomów (Ribo-seq). Przeprowadzono trawienie polisomów za pomocą MNazy po czym uzyskane ślady rybosomów (ang. *ribosome footprints*) zostały zsekwencjonowane na platformie Illumina. Uzyskane odczyty przefiltrowano pod względem jakości, przycięto i zmapowano na sekwencjach kodujących (CDS) genów chloroplastowych. Takie podejście eksperymentalne pozwoliło na identyfikację 78 miejsc pauzowania rybosomów z dużą dokładnością. Co istotne, uzyskane wyniki porównano bioinformatycznie z danymi pochodzącymi z kukurydzy (Chotewutmontri & Barkan, 2016) i jęczmienia (Kim i in., 1991). **W pracy P2 analizowano w szczególności wpływ właściwości mRNA oraz nowo syntetyzowanego łańcucha peptydowego (ang. *nascent peptide chain*) na pauzowanie rybosomów.**

Pauzowanie rybosomów jest spowodowane stabilną strukturą II-rzędową mRNA

Badania rozpoczęto od analizy wpływu struktury II-rzędowej mRNA na elongację translacji. Założono, że jeśli stabilna struktura powoduje pauzowanie rybosomu, powinna się ona znajdować poniżej pauzującego rybosomu. Zgodnie z przewidywaniami zaobserwowano, że większe prawdopodobieństwo wystąpienia stabilnej struktury II-rzędowej mRNA występuje 31 nukleotydów poniżej miejsc pauzowania rybosomów niż w losowo wybranych miejscach mRNA. Warto zauważyć, że uzyskano zgodne wyniki zarówno dla bioinformatycznej predykcji struktury mRNA jak i struktury opisanej eksperymentalnie (Ding i in., 2014). Analiza przeprowadzona w odwrotnym kierunku, polegająca na sprawdzeniu, czy powyżej miejsc o najstabilniejszej strukturze mRNA występuje większe prawdopodobieństwo pauzowania rybosomów, doprowadziła do analogicznych wniosków. Na podstawie analizy bioinformatycznej wyników profilowania rybosomów u kukurydzy (Chotewutmontri & Barkan, 2016), wykazano również, że występuje korelacja między strukturą II-rzędową mRNA a pauzowaniem rybosomów u tego gatunku. Uzyskane wyniki wskazują, że struktura mRNA i pauzowanie rybosomów w chloroplastach są funkcjonalnie powiązane.

Sekwencja Shine-Dalgarno w obrębie CDS może wpływać na pauzowanie rybosomów w chloroplastach

Wcześniejsze badania (Li i in., 2012), wskazywały, że kolejnym czynnikiem mogącym wpływać na pauzowanie rybosomów, może być występowanie w obrębie CDS sekwencji Shine-Dalgarno (SD),

która odpowiada za prawidłowe pozycjonowanie małej podjednostki rybosomu i rozpoznanie kodonu start w trakcie inicjacji translacji. Zgodnie z tym założeniem sekwencje SD powinny znajdować się powyżej miejsc pauzowania rybosomów, aby mogło dojść do hybrydyzacji z sekwencją anti-SD znajdującą się na końcu 3' 16S rRNA. Uzyskane wyniki i analiza danych z kukurydzy wskazują, że podobnie jak w przypadku struktury II-rzędowej, obecność SD w CDS koreluje z miejscami pauzowania rybosomów i jest czynnikiem wpływającym na pauzowanie w chloroplastach.

Oddziaływania elektrostatyczne między dodatnio naładowanymi aminokwasami a ujemnie naładowanym tunelem wyjściowym rybosomu wpływają na pauzowanie rybosomów w chloroplastach

Poza mRNA, również cechy syntetyzowanego łańcucha peptydowego mogą powodować pauzowanie rybosomów. Można do nich zaliczyć obecność dodatnio naładowanych aminokwasów, które oddziałują elektrostatycznie z ujemnie naładowanym tunelem wyjściowym rybosomu (Charneski & Hurst, 2013) i obecność bogatych w prolinę peptydów, które mogą powodować pauzowanie rybosomów, zahamowanie elongacji i przedwczesną terminację translacji (Woolstenhulme i in., 2013). W chloroplastach zaobserwowano, że dodatnio naładowane aminokwasy mogą być czynnikiem wpływającym na pauzowanie rybosomów. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że nie zauważono korelacji między występowaniem proliny oraz rodzajem kodonu a pauzowaniem rybosomu.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że **czynnikami wpływającymi na pauzowanie rybosomów w chloroplastach są: i) struktura II-rzędowa mRNA, ii) obecność SD w CDS oraz iii) występowanie dodatnio naładowanych aminokwasów w rosnącym łańcuchu polipeptydowym.** Do 95 % wszystkich miejsc pauzowania w chloroplastach może być wyjaśnionych za pomocą wyżej opisanych czynników. Dobrym przykładem jest mRNA *psbC*, gdzie wszystkie miejsca pauzowania rybosomów mogą być opisane za pomocą jednego lub więcej wyżej wymienionych czynników.

Pauzowanie rybosomów może być istotne dla kotranslacyjnego wiązania białek z błonami oraz wiązania kofaktorów

Pauzowanie rybosomów może być istotne w procesie kotranslacyjnego fałdowania białek. Dlatego postanowiono sprawdzić, czy w chloroplastach pauzowanie może być skorelowane z fałdowaniem białek i integracją białek z błonami. W tym celu porównano miejsca pauzowania z występowaniem domen transbłonowych (TM). Zauważono, że w odległości 34 aminokwasów poniżej rejonu TM typu I (koniec N znajduje się w lumen tylakoidów) znajdują się miejsca pauzowania rybosomów. Taka odległość pozwala na opuszczenie tunelu wyjściowego rybosomu przez N-koniec domeny TM i prawdopodobnie rekrutację czynników ułatwiających integrację z błoną. Podobny mechanizm zaobserwowano w *Escherichia coli* (Fluman i in., 2014), *Saccharomyces cerevisiae* (Pechmann i in., 2014) i danych analizowanych w pracy **P2** pochodzących z kukurydzy (Chotewutmontri & Barkan, 2016). Zauważono również, że miejsca pauzowania rybosomów korespondują z miejscami wiązania kofaktorów, takich jak centra żelazowo-siarkowe do białek fotosystemu I (PSI) oraz pierwszym miejscem wiązania Mn_4CaO_5 w białku D1 wchodzącym w skład centrum reakcyjnego fotosystemu II (PSII). Analogiczne miejsca pauzowania rybosomów były opisane również u jęczmienia (Kim i in., 1991). Podsumowując, **po raz pierwszy wykazano, że rolą pauzowania rybosomów w chloroplastach może być umożliwienie wiązania białek z błonami i wiązanie kofaktorów.**

Cechy mRNA powodujące pauzowanie rybosomów w chloroplastach są ewolucyjnie konserwowane

Jeśli miejsca pauzowania rybosomów są istotne z biologicznego punktu widzenia, to powinny być ewolucyjnie konserwowane. Aby to sprawdzić, postanowiono przeanalizować wybrane miejsca pauzowania m. in. w mRNA *rbcL* w pozycji kodonu Ser-398. Pauzowanie w tym miejscu może być istotne dla rekrutacji białek opiekuńczych i fałdowania dużej podjednostki RuBisCo. Jest ono spowodowane obecnością sekwencji SD i stabilnej struktury II-rzędowej mRNA. Co istotne, cechy te są konserwowane u roślin nasiennych i mszaków. Stabilna struktura mRNA występuje również w tym

miejsu w jednokomórkowym glonie *Chlamydomonas reinhardtii*. Co ciekawe, zauważono również zróżnicowany stopień konserwacji SD u roślin pasożytniczych z rodzaju *Cuscuta*. Porównano bioinformatycznie dwa gatunki o zredukowanej aktywności fotosyntetycznej (*C. reflexa* i *C. exalata*) do dwóch gatunków o szczątkowej aktywności fotosyntetycznej (*C. gronovii* i *C. obtusiflora*). U pierwszych gatunków sekwencja SD jest obecna, ale nie występuje u ostatnich dwóch gatunków. Wyniki te są dodatkowym potwierdzeniem wskazującym na **istotność pauzowania rybosomów w procesach, takich jak fałdowanie białek, włączanie rejonów TM do błon czy składanie kompleksów fotosyntetycznych.**

Struktura wszystkich czterech nukleotydów w RNA chloroplastowym może być odczytana za pomocą siarczanu dimetylu (DMS) i odwrotnej transkryptazy TGIRT

W pracach **P3** i **P4** po raz pierwszy scharakteryzowano wpływ struktury II-rzędowej mRNA na translację w chloroplastach *in vivo*. Wcześniejsze prace sugerowały, że zmiana struktury mRNA w regionie inicjacji translacji może wpływać na wydajność inicjacji translacji (Hammani i in., 2012; Prikryl i in., 2011). Jednak prace te bazowały na predykcji struktury RNA na podstawie sekwencji nukleotydowej lub w oparciu o eksperymenty *in vitro*. Uzyskane w ten sposób informacje o strukturze nie odzwierciedlają w pełni struktury mRNA *in vivo*. W pracy **P3** przeanalizowano strukturę RNA *in vivo* w młodych, 17-18 dniowych roślinach *A. thaliana* i porównano ją do struktury RNA, które zostało sfałdowane *in vitro* bez obecności białek. W tym celu RNA zostało zmodyfikowane za pomocą siarczanu dimetylu (DMS), który powoduje metylację jednoniciowych i dostępnych dla rozpuszczalnika nukleotydów. Miejsca metylacji zostały zidentyfikowane za pomocą profilowania mutacyjnego (ang. *mutational profiling [MaP]*) z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy TGIRT i sekwencjonowania typu Illumina (metoda DMS-MaPseq). Częstość występowania mutacji w danej pozycji w cDNA odzwierciedla prawdopodobieństwo, z jakim dany nukleotyd jest dostępny dla rozpuszczalnika i nie hybryduje z komplementarnym nukleotydem (jest niesparowany). W omawianej pracy przeprowadzono analizę struktury II-rzędowej wybranych mRNA chloroplastowych różniących się poziomem ekspresji oraz organizacją CDS. Jako kontrolę ze znaną strukturą II-rzędową wykorzystano 16S rRNA będące komponentem małej podjednostki rybosomu chloroplastowego.

Uzyskana liczba odczytów, które poprawnie zmapowano na transkryptach chloroplastowych, pozwoliła na analizę struktury RNA wszystkich badanych genów. Wykazano, że wykorzystana metoda jest wiarygodna i dobrze odzwierciedla strukturę 16S rRNA. Co ciekawe, w klasycznych eksperymentach z użyciem DMS związek ten wykorzystywany jest do odczytywania statusu strukturalnego adeniny i cytozyny, jednak ostatnie badania wskazują, że w lekko zasadowym środowisku może być również wykorzystany do analizy guaniny i uracylu (Mustoe i in., 2019). **W chloroplastach, gdzie pH stromy jest lekko alkaliczne, zauważono, że informacja o statusie strukturalnym guaniny i uracylu jest zachowana, jednak ma niższą jakość niż w przypadku adeniny i cytozyny.**

Inicjacja translacji genów chloroplastowych może zależeć od struktury mRNA w regionie 5'UTR

Okolo 30 % genów chloroplastowych nie posiada sekwencji Shine–Dalgarno (SD) pozwalającej na prawidłowe rozpoznanie kodonu start. W takich przypadkach uważa się, że lokalne minima struktury II-rzędowej odpowiadają za prawidłowe pozycjonowanie rybosomu i wydajną inicjację translacji. Gen *clpP* nie posiada sekwencji SD i zauważono, że kodon start i region inicjacji translacji ma większą reaktywność DMS, czyli ma mniej stabilną strukturę II-rzędową w warunkach *in vivo* niż *in vitro*. Mniej stabilna struktura w komórce może być skutkiem wiązania białka uniemożliwiającego przyjęcie bardziej stabilnej struktury przez RNA. W przypadku *clpP* wcześniejsze badania (Ruwe i in., 2016) wykazały obecność śladu (ang. *footprint*) nieznanego białka wiążącego RNA w regionie 5'UTR. Wiązanie tego białka do RNA może hamować tworzenie struktury spinki do włosów i tym samym zwiększać dostępność kodonu start umożliwiając wydajną inicjację translacji. Analiza pozostałych genów

wskazała, że struktura II-rzędowa regionu inicjacji translacji jest mniej stabilna w warunkach *in vivo* niż *in vitro*, co pozwala na osiągnięcie wysokiej wydajności translacji w chloroplastach.

Większość regionów kodujących genów chloroplastowych wykazuje mniej stabilną strukturę II-rzędową in vivo niż in vitro

Uważa się, że struktura II-rzędowa regionów kodujących (CDS) może się różnić *in vivo* (ze związanymi rybosomami i białkami wiążącymi RNA) od struktury *in vitro* (bez związanych białek). Dla genów chloroplastowych większość regionów CDS miała mniej stabilną strukturę *in vivo* niż *in vitro* prawdopodobnie dzięki aktywności helikazy RNA rybosomu. Zgodnie z oczekiwaniami struktura 16S rRNA była bardziej stabilna w warunkach *in vivo*. Prawdopodobnie wiązanie do rRNA białek rybosomalnych i kompaktowa struktura 16S rRNA ogranicza dostępność DMS, przez co zmniejsza reaktywność tej cząsteczki. Podobny trend zaobserwowano w genie *psbA*, kodującym białko D1. CDS *psbA* ma stabilniejszą strukturę *in vivo* niż *in vitro*. Co istotne, struktura II-rzędowa *psbA* w analizowanych warunkach (rośliny były uprawiane w niskim natężeniu światła) jest stabilniejsza niż u innych genów kodujących białka. Warto zwrócić uwagę na fakt, że mniejsza reaktywność DMS *psbA* *in vivo* może być również skutkiem wiązania wielu białek (Watkins i in., 2020), które ograniczają dostępność dla tej substancji, tak jak ma to miejsce w 16S rRNA.

Zwiększenie natężenia światła powoduje wzrost wydajności translacji *psbA* (Chotewutmontri & Barkan, 2018; Schuster i in., 2020). Jest to oczekiwane, ponieważ białko D1 kodowane przez *psbA* jest wrażliwe na stres fotooksydacyjny i musi być zastąpione przez nowo zsyntetyzowane białko, aby utrzymać poprawne funkcjonowanie PSII. Uważa się, że w tych warunkach regulacja translacji odbywa się na etapie inicjacji (Chotewutmontri & Barkan, 2018; Schuster i in., 2020). Jednak molekularny mechanizm regulacji inicjacji translacji w chloroplastach nie jest wystarczająco dobrze zrozumiany, aby wyjaśnić zmiany wydajności translacji *psbA* na świetle. Badania *in vitro* (Hammani i in., 2012; Prikryl i in., 2011) oraz wyniki pracy **P3** sugerują, że białka wiążące się do regionu inicjacji translacji mogą wpływać na strukturę II-rzędową RNA i przez to promować wiązanie rybosomu i inicjację translacji. Aby zweryfikować tę hipotezę w warunkach *in vivo*, w **pracy P4 wykorzystano nowatorskie metody (Ribo-seq, DMS-MaPseq i SHAPE-seq) pozwalające na badanie struktury II-rzędowej mRNA w chloroplastach *A. thaliana* przy zmianie natężenia światła.**

Rozluźnienie struktury II-rzędowej 5'UTR koreluje ze zwiększeniem wydajności translacji psbA w wysokim natężeniu światła

W pracy **P4** wykorzystano metodę DMS-MaPseq do oceny struktury II-rzędowej mRNA *in vivo* w roślinach *A. thaliana* rosnących w niskim lub wysokim natężeniu światła. Zaobserwowano różnice reaktywności regionu inicjacji translacji w *psbA*, zwłaszcza w pobliżu kodonu start oraz sekwencji SD. W warunkach wysokiego natężenia światła regiony te wykazywały zwiększoną reaktywność na DMS. Zwiększona reaktywność na DMS wskazuje, że analizowany region RNA przyjmuje mniej stabilną strukturę II-rzędową (bardziej jednoniciową) przy wysokim natężeniu światła, co jest zgodne ze wzrostem wydajności translacji *psbA*. Ponadto region komplementarny do SD również wykazywał zwiększoną reaktywność na DMS przy wysokim natężeniu światła, co sugeruje, że może on hybrydyzować z SD w niskim, ale nie przy wysokim natężeniu światła. Byłoby to zgodne z hipotezą, że wydajność translacji jest niska, gdy sekwencja SD i/lub kodon startowy są w regionie dwuniciowym. Otwarcie struktury uczyniłoby te elementy bardziej dostępnymi, co powinno zwiększyć wydajność translacji. Aby potwierdzić zmiany strukturalne w mRNA *psbA*, zastosowano niezależną metodę polegającą na selektywnej acylacji grupy hydroksylowej w pozycji 2' w rybozie (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension [SHAPE]*) z wykorzystaniem związku 1-(2-metylonikotynoilo)imidazol (ang. *2-methylnicotinic acid imidazolide azide [NAI-N₃]*). NAI-N₃ reaguje z dużym prawdopodobieństwem z rybozą, jeśli RNA przyjmuje w danym miejscu strukturę jednoniciową. Podobnie jak w przypadku DMS reaktywność poszczególnych nukleotydów na NAI-N₃ może być odczytana za pomocą sekwencjonowania Illumina (metoda SHAPE-seq). Co ważne, reaktywność SHAPE dobrze korelowała z sygnałem DMS-MaPseq obserwowanym w regionie inicjacji

translacji *psbA* w analizowanych warunkach. Używając zatem dwóch różnych sond chemicznych, stwierdzono, że region inicjacji translacji *psbA* staje się bardziej dostępny w warunkach wysokiego natężenia światła, co prawdopodobnie odpowiada za zwiększenie wydajności translacji.

Wiązanie białka do 5'UTR *psbA* może powodować zmianę jego struktury

Analizując wyniki sekwencjonowania krótkich RNA, zaobserwowano obecność śladu (ang. *footprint*) w obszarze 5'UTR *psbA*, który może być konsekwencją wiązania białka do tego regionu. W dalszej kolejności potwierdzono obecność śladu za pomocą hybrydyzacji typu Northern i zauważono, że jego poziom rośnie w wysokim natężeniu światła. Zaobserwowany ślad w części środkowej został wcześniej opisany jako miejsce wiązania białka HCF173 (McDermott i in., 2019), które aktywuje translację *psbA*. **W pracy P4 oceniono wpływ wiązania HCF173 na strukturę regionu inicjacji translacji *psbA*** wykorzystując reaktywność na DMS jako dane wejściowe. Predykcja struktury II-rzędowej ujawniła, że region śladu (wiązany przez HCF173) może hybrydyzować z sekwencją SD i kodonem start. W niskim natężeniu światła przedstawione *cis*-elementy są częścią dwuniciowej struktury, natomiast w wysokim natężeniu światła, sekwencja Shine-Dalgarno i kodon start znajdują się w większości w strukturze jednociowej i dlatego są bardziej dostępne.

Translacja mRNA ze słabymi sekwencjami SD zależy strukturalnej dostępności tego elementu

Jak pokazano powyżej, zmiany strukturalne mRNA są istotne dla indukowanej wysokim natężeniem światła aktywacji translacji mRNA *psbA*. Postanowiono sprawdzić, czy istnieje ogólna korelacja między zmianami strukturalnymi a wydajnością translacji, czy też jest to zjawisko unikalne dla *psbA*. Eksperyment SHAPE-seq miał wystarczające pokrycie sekwencjonowania, aby umożliwić analizę struktury 16 genów chloroplastowych. W tym samym układzie eksperymentalnym przeanalizowano translację wykorzystując profilowanie rybosomów (Ribo-seq). Ribo-seq w połączeniu z sekwencjonowaniem RNA (RNA-seq) pozwala na ocenę wydajności translacji analizowanych mRNA. Jeśli duża część mRNA jest regulowana przez zmiany strukturalne RNA podobne do tych, które zaobserwowano dla *psbA* po ekspozycji na wysokie natężenie światła, należałoby oczekiwać korelacji pomiędzy zmianami w wydajności translacji a zmianami strukturalnymi w kodonie start i/lub sekwencji SD. Tego rodzaju korelacja nie była obserwowana dla wszystkich analizowanych genów, jednak dla genów ze słabymi sekwencjami SD, do których zaliczyć można *psbA*, można zauważyć korelację między zmianą wydajności translacji a zmianą reaktywności na NAI-N₃ w obrębie sekwencji SD w analizowanych warunkach. **Uzyskane wyniki sugerują więc, że strukturalna dostępność regionu SD jest kluczowa dla zależnej od światła regulacji translacji mRNA ze słabymi sekwencjami SD (tak jak w przypadku *psbA*)**, podczas gdy inne mechanizmy są prawdopodobnie ważniejsze dla mRNA z silnymi sekwencjami SD. Dla mRNA *psbA* regulacja translacji wydaje się zależeć od rekrutacji specyficznych białek do regionu 5'UTR i późniejszej reorganizacji struktury RNA.

W pracy przeglądowej **P5** skupiono się na wpływie H₂O₂ na regulację ekspresji genów, która jest kluczowa podczas aklimatyzacji do warunków stresowych i omówiono perspektywy dalszych badań. W czasie stresu wysokiego natężenia światła chloroplasty są głównym źródłem H₂O₂. H₂O₂ może działać lokalnie (w chloroplastach), ale może być również transportowany do innych przedziałów komórkowych przez akwaporyny. Wpływ H₂O₂ na regulację transkrypcji genów jądrowych jest dobrze poznany. Dlatego w pracy **P5** skupiono się na opisanie roli tej molekuly w regulacji procesów potranskrypcyjnych. Coraz więcej dowodów wskazuje, że H₂O₂ może wpływać na modyfikację i degradację RNA, splicing pre-mRNA (w tym alternatywny splicing) i translację (poprzez wpływ na strukturę i modyfikacje potranslacyjne rybosomu, aktywację ścieżek modulujących translację i regulację poziomu tRNA). Stąd uważa się, że H₂O₂ odgrywa kluczową rolę w komunikacji chloroplast-jądro.

H₂O₂ może potranskrypcyjnie wpływać na ekspresję genów poprzez modulowanie translacji i modyfikację RNA

W pracy przeglądowej **P5** opisano, że poszczególne białka rybosomalne mogą być kodowane przez więcej niż jeden gen jądrowy, co może prowadzić do dużej liczby możliwych konformacji

rybosomów. Rybosomy mogą również wykazywać heterogeniczność ze względu na modyfikacje potranslacyjne, wiązanie białek oraz różnice w sekwencjach rRNA. Istnieją przesłanki, że różne konformacje rybosomów mogą regulować translację specyficznych mRNA. Ekspresja genów rybosomalnych może być regulowana przez stres oksydacyjny, a wysoki poziom H_2O_2 powoduje starzenie się rybosomów. Kolejnym czynnikiem wpływającym na heterogeniczność rybosomów są modyfikacje potranslacyjne. Fosforylacja białek rybosomalnych, będąca najpowszechniej występującą modyfikacją, może być kontrolowana przez szlak TOR (ang. *target of rapamycin*). Szlak TOR jest aktywowany przez H_2O_2 i prawdopodobnie wpływa na wydajność translacji w roślinach. TOR aktywuje translację i stymuluje transkrypcję rRNA i tRNA. TOR hamuje również białko MAF1, represor polimerazy RNA III, co prowadzi do aktywacji transkrypcji tRNA, 5S rRNA i małych RNA i prawdopodobnie wpływa na wydajność translacji. Co ciekawe, inaktywacja MAF1 prowadzi do nadwrażliwości na H_2O_2 . W dalszej części artykułu **P5** przedyskutowano wpływ H_2O_2 na powstawanie modyfikacji potranskrypcyjnych w RNA i ich wpływ na translację. Utlenienie mRNA będące skutkiem wysokiego poziomu H_2O_2 prowadzi do powstania 8-hydroksyguanozyny (8-oxo-G). 8-oxo-G może tworzyć niespecyficzne wiązania wodorowe, co prowadzi do zahamowania elongacji translacji i przedwczesnej terminacji. Obecność 8-oxo-G opisano w mRNA chloroplastowym i cytoplazmatycznym. H_2O_2 może prowadzić również do utlenienia zarówno mRNA, jak rRNA i tRNA. Dane literaturowe wskazują, że chloroplast może sprawować kontrolę nad translacją w cytozolu, a H_2O_2 może wpływać na translację poprzez zmiany w składzie rybosomów, potranslacyjne modyfikacje białek rybosomalnych, modyfikacje potranskrypcyjne mRNA i biogenezę oraz modyfikacje tRNA i rRNA.

Za najważniejsze dokonania prac składających się na osiągnięcie naukowe uważam:

- identyfikację i charakterystykę roli czynnika transkrypcyjnego CIA2 i jego homologa CIL w komunikacji chloroplast-jądro w trakcie stresu fotooksydacyjnego (**P1**),
- poznanie roli CIA2 i CIL w regulacji translacji w chloroplastach i aklimatyzacji roślin do stresu wysokiej temperatury (**P1**),
- opisanie czynników wpływających na elongację translacji w chloroplastach, a w szczególności zrozumienie roli struktury II-rzędowej RNA, występowania sekwencji Shine-Dalgarno w obrębie CDS i obecności dodatnio naładowanych aminokwasów w syntetyzowanym łańcuchu polipeptydowym w pauzowaniu rybosomów (**P2**),
- poznanie funkcji pauzowania rybosomów w procesach odbywających się kotranslacyjnie, takich jak wiązanie białek z błonami i wiązanie kofaktorów (**P2**),
- opracowanie metody badania struktury II-rzędowej RNA w chloroplastach (**P3 i P4**),
- charakterystykę zmian struktury II-rzędowej mRNA w warunkach stresu wysokiego natężenia światła i jej wpływ na wydajność translacji *psbA* w chloroplastach (**P4**),
- szczegółową ocenę wpływu H_2O_2 na regulację translacji i modyfikacje potranskrypcyjne RNA (**P5**).

4.3.4 Literatura

- Caplan, J. L., Kumar, A. S., Park, E., Padmanabhan, M. S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K., & Dinesh-Kumar, S. P. (2015). Chloroplast stromules function during innate immunity. *Developmental Cell*, 34(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.011>
- Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., McQuinn, R., & Pogson, B. J. (2016). Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond. *Annual Review of Plant Biology*, 67(1), 25–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111854>
- Charneski, C. A., & Hurst, L. D. (2013). Positively charged residues are the major determinants of ribosomal velocity. *PLOS Biology*, 11(3), e1001508. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001508>
- Chotewutmontri, P., & Barkan, A. (2016). Dynamics of chloroplast translation during chloroplast differentiation in maize. *PLOS Genetics*, 12(7), e1006106. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006106>
- Chotewutmontri, P., & Barkan, A. (2018). Multilevel effects of light on ribosome dynamics in chloroplasts program genome-wide and psbA-specific changes in translation. *PLOS Genetics*, 14(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007555>
- De Clercq, I., Vermeirssen, V., Van Aken, O., Vandepoele, K., Murcha, M. W., Law, S. R., Inzé, A., Ng, S., Ivanova, A., Rombaut, D., van de Cotte, B., Jaspers, P., Van de Peer, Y., Kangasjärvi, J., Whelan, J., & Van Breusegem, F. (2013). The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(9), 3472–3490. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117168>
- Ding, Y., Tang, Y., Kwok, C. K., Zhang, Y., Bevilacqua, P. C., & Assmann, S. M. (2014). In vivo genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features. *Nature*, 505(7485), 696–700. <https://doi.org/nature12756> [pii]r10.1038/nature12756
- Dogra, V., Li, M., Singh, S., Li, M., & Kim, C. (2019). Oxidative post-translational modification of EXECUTER1 is required for singlet oxygen sensing in plastids. *Nature Communications*, 10(1), 2834. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10760-6>
- Estavillo, G. M., Crisp, P. a., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E., & Pogson, B. J. (2011). Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(11), 3992–4012. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091033>
- Exposito-Rodriguez, M., Laissue, P. P., Yvon-Durocher, G., Smirnov, N., & Mullineaux, P. M. (2017). Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nature Communications*, 8(1), 49. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00074-w>
- Fluman, N., Navon, S., Bibi, E., & Pilpel, Y. (2014). mRNA-programmed translation pauses in the targeting of *E. coli* membrane proteins. *eLife*, 3, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.03440>
- Gao, Y., Thiele, W., Saleh, O., Scossa, F., Arabi, F., Zhang, H., Sampathkumar, A., Kühn, K., Fernie, A., Bock, R., Schöttler, M. A., & Zoschke, R. (2022). Chloroplast translational regulation uncovers nonessential photosynthesis genes as key players in plant cold acclimation. *The Plant Cell*, 34(5), 2056–2079. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac056>
- Green, B. R. (2011). Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant Journal*, 66(1), 34–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04541.x>
- Hammani, K., Cook, W. B., & Barkan, A. (2012). RNA binding and RNA remodeling activities of the half-a-tetratricopeptide (HAT) protein HCF107 underlie its effects on gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5651–5656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200318109>
- Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2020). Chaperone machineries of Rubisco – the most abundant enzyme. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(9), 748–763. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.05.001>
- Jin, J., Zhang, H., Kong, L., Gao, G., & Luo, J. (2014). PlantTFDB 3.0: A portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 1182–1187. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1016>

- Karpiński, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., & Mullineaux, P. M. (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5414), 654–657. <https://doi.org/10.1126/science.284.5414.654>
- Kim, J., Klein, P. G., & Mullet, J. E. (1991). Ribosomes pause at specific sites during synthesis of membrane-bound chloroplast reaction center protein D1. *J. Biol. Chem.*, 266(23), 14931–14938.
- Leister, D. (2016). Towards understanding the evolution and functional diversification of DNA-containing plant organelles. *F1000Research*, 5, 330. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7915.1>
- Li, G.-W., Oh, E., & Weissman, J. S. (2012). The anti-Shine–Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature*, 484(7395), 538–541. <https://doi.org/10.1038/nature10965>
- Li, M., Ruwe, H., Melzer, M., Junker, A., Hensel, G., Tschiersch, H., Schwenkert, S., Chamas, S., Schmitz-Linneweber, C., Börner, T., & Stein, N. (2021). The Arabidopsis AAC proteins CIL and CIA2 are sub-functionalized paralogs involved in chloroplast development. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.681375>
- McDermott, J. J., Watkins, K. P., Williams-Carrier, R., & Barkan, A. (2019). Ribonucleoprotein capture by in vivo expression of a designer pentatricopeptide repeat protein in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 31(8), 1723–1733. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00177>
- Mielecki, J., Gawroński, P., & Karpiński, S. (2020). Retrograde signaling: understanding the communication between organelles. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6173. <https://doi.org/10.3390/ijms21176173>
- Mustoe, A. M., Lama, N. N., Irving, P. S., Olson, S. W., & Weeks, K. M. (2019). RNA base-pairing complexity in living cells visualized by correlated chemical probing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(49), 24574–24582. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905491116>
- Myouga, F., Akiyama, K., Tomonaga, Y., Kato, A., Sato, Y., Kobayashi, M., Nagata, N., Sakurai, T., & Shinozaki, K. (2013). The chloroplast function database II: A comprehensive collection of homozygous mutants and their phenotypic/genotypic traits for nuclear-encoded chloroplast proteins. *Plant and Cell Physiology*, 54(2), 1–10. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs171>
- Ng, S., Ivanova, A., Duncan, O., Law, S. R., Van Aken, O., De Clercq, I., Wang, Y., Carrie, C., Xu, L., Kmiec, B., Walker, H., Van Breusegem, F., Whelan, J., & Giraud, E. (2013). A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(9), 3450–3471. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113985>
- Pechmann, S., Chartron, J. W., & Frydman, J. (2014). Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(12), 1100–1105. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2919>
- Pérez-Rodríguez, P., Riaño-Pachón, D. M., Corrêa, L. G. G., Rensing, S. A., Kersten, B., & Mueller-Roeber, B. (2009). PlnTFDB: Updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL.1), 822–827. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp805>
- Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G., & Barkan, A. (2011). Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 415–420. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012076108>
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylides, C., & Havaux, M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5535–5540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115982109>
- Ruwe, H., Wang, G., Gusewski, S., & Schmitz-Linneweber, C. (2016). Systematic analysis of plant mitochondrial and chloroplast small RNAs suggests organelle-specific mRNA stabilization mechanisms. *Nucleic Acids Research*, 44(15), 7406–7417. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw466>
- Schuster, M., Gao, Y., Schöttler, M. A., Bock, R., & Zoschke, R. (2020). Limited responsiveness of chloroplast gene expression during acclimation to high light in tobacco. *Plant Physiology*, 182(1), 424–435. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00953>

- Schwacke, R., Fischer, K., Ketelsen, B., Krupinska, K., & Krause, K. (2007). Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(6), 631–646. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0214-4>
- Schwacke, R., Schneider, A., Van Der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flügge, U. I., & Kunze, R. (2003). ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiology*, 131(1), 16–26. <https://doi.org/10.1104/pp.011577>
- Schwenkert, S., Fernie, A. R., Geigenberger, P., Leister, D., Möhlmann, T., Naranjo, B., & Neuhaus, H. E. (2022). Chloroplasts are key players to cope with light and temperature stress. *Trends in Plant Science*, 27(6), 577–587, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.12.004>
- Sun, C.-W., Chen, L.-J., Lin, L.-C., & Li, H. (2001). Leaf-specific upregulation of chloroplast translocon genes by a CCT motif-containing protein, CIA2. *The Plant Cell*, 13(9), 2053–2061. <https://doi.org/10.1105/TPC.010148>
- Sun, C.-W., Huang, Y.-C., & Chang, H.-Y. (2009). CIA2 Coordinately up-regulates protein import and synthesis in leaf chloroplasts. *Plant Physiology*, 150(2), 879–888. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137240>
- Sun, Q., Zybaylov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P. D. B., & van Wijk, K. J. (2009). PPDB, the plant proteomics database at Cornell. *Nucleic Acids Research*, 37, D969–D974. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn654>
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., & Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 259–270, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>
- Wagner, R., & Pfannschmidt, T. (2006). Eukaryotic transcription factors in plastids - Bioinformatic assessment and implications for the evolution of gene expression machineries in plants. *Gene*, 381(1–2), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.06.022>
- Watkins, K. P., Williams-Carrier, R., Chotewutmontri, P., Friso, G., Teubner, M., Belcher, S., Ruwe, H., Schmitz-Linneweber, C., Wijk, K. J., & Barkan, A. (2020). Exploring the proteome associated with the mRNA encoding the D1 reaction center protein of Photosystem II in plant chloroplasts. *The Plant Journal*, 102(2), 369–382. <https://doi.org/10.1111/tpj.14629>
- Woolstenhulme, C. J., Parajuli, S., Healey, D. W., Valverde, D. P., Petersen, E. N., Starosta, A. L., Guydosh, N. R., Johnson, W. E., Wilson, D. N., & Buskirk, A. R. (2013). Nascent peptides that block protein synthesis in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), E878–E887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219536110>
- Yang, C. Y., & Sun, C. W. (2020). Sequence analysis and protein interactions of Arabidopsis CIA2 and CIL proteins. *Botanical Studies*, 61(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S40529-020-00297-Z/TABLES/2>
- Yang, C. Y., Yan, W. Y., Chang, H. Y., & Sun, C. W. (2022). Arabidopsis CIA2 and CIL have distinct and overlapping functions in regulating chloroplast and flower development. *The Plant Direct*, 6(1). <https://doi.org/10.1002/pld3.380>
- Zoschke, R., & Bock, R. (2018). Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control, and regulation. *The Plant Cell*, 30(4), 745–770. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00016>

5 Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W trakcie swojej kariery naukowej odbyłem **trzy staże w zagranicznych, renomowanych ośrodkach naukowych w Holandii, Wielkiej Brytanii i Danii**. Łączny czas trwania wymienionych staży to **jeden rok i siedem miesięcy**. Najdłuższy staż odbyłem po zakończeniu doktoratu w Copenhagen Plant Science Centre w Danii. Staże znacząco wpłynęły na przebieg mojej kariery naukowej i przyczyniły się do uzyskania stypendium doktoranckiego w ramach projektu Welcome FNP w 2009 oraz otrzymania projektów NCN na realizację własnych badań.

5.1 Wageningen University, Laboratory of Nematology, Holandia (11.2008 - 04.2009)

Po obronie pracy magisterskiej wyjechałem na pięciomiesięczny staż do Uniwersytetu w Wageningen w Holandii. Prowadziłem tam badania w zespole dr Geerta Smanta nad molekularnymi podstawami interakcji między nicieniami a komórkami roślinnymi. W trakcie stażu analizowałem ekspresję genów z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Moim drugim zadaniem było klonowanie genów w celu potwierdzenia interakcji między białkami w systemie BiFC z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Doświadczenie zdobyte na Uniwersytecie w Wageningen w znaczący sposób wpłynęło na przebieg mojej dalszej kariery naukowej. Pozwoliło mi na uzyskanie stypendium doktoranckiego w ramach projektu Welcome FNP w 2009 r. i pracę w zespole prof. Stanisława Karpińskiego. Staż w Holandii zaowocował również publikacją, w której zaprezentowano część z uzyskanych przeze mnie wyników:

- Lozano-Torres, J. L., Wilbers, R. H. P., **Gawronski, P.**, Boshoven, J. C., Finkers-Tomczak, A., Cordewener, J. H. G., America, A. H. P., Overmars, H. a, Van 't Klooster, J. W., Baranowski, L., Sobczak, M., Ilyas, M., van der Hoorn, R. a L., Schots, A., de Wit, P. J. G. M., Bakker, J., Goverse, A., & Smant, G. (2012). Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(25), 10119–10124.

5.2 University of Leeds, Wielka Brytania (05.2013 - 08.2013)

Pod koniec doktoratu wyjechałem na trzymiesięczny staż do laboratorium prof. Christine Foyer na Uniwersytecie w Leeds w ramach projektu FP7-REGPOT (Warsaw Plant Health Initiative, EU FP7, n°286093). W trakcie pobytu w Wielkiej Brytanii skupiłem się na badaniu roli białka Aladin. Badania prowadzone w zespole prof. Christine Foyer wskazywały, że Aladin lokalizuje się w porach jądrowych *A. thaliana* i może wpływać na wydajność fotosyntezy. Moją rolą było dokładne zbadanie wpływu mutacji *aladin* na fotosyntezę. Wykazałem, że asymilacja CO₂ oraz wydajność kwantowa PSII jest znacznie obniżona w roślinach *aladin*. Równolegle do badań nad mutantem *aladin* brałem udział w badaniu zmian statusu redoks różnych komponentów układu antyoksydacyjnego w chloroplastach. Zdobyte doświadczenie pozwoliło mi na dokończenie eksperymentów do rozprawy doktorskiej, której celem była analiza wpływu MPK4 i syntezy kwasu salicylowego na fotosyntezę. Staż na Uniwersytecie w Leeds przyczynił się wydania publikacji:

- **Gawroński, P.**, Witoń, D., Vashutina, K., Bederska, M., Betliński, B., Rusaczonek, A., & Karpiński, S. (2014). Mitogen-activated protein kinase 4 is a salicylic acid-independent regulator of growth but not of photosynthesis in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 7(7), 1151–1166.

5.3 *Copenhagen Plant Science Centre, Dania (03.2015 - 02.2016)*

Po ukończeniu doktoratu kontynuowałem pracę w zespole prof. Stanisława Karpińskiego jako główny wykonawca w projekcie OPUS NCN pt. „Identyfikacja i analiza funkcjonalna genów kodujących potencjalne czynniki biorące udział w retroaktywnych sygnałach z chloroplastów do jądra podczas odpowiedzi obronnych i aklimatyzacyjnych u *Arabidopsis*”. W trakcie realizacji projektu wyjechałem w ramach tego projektu na roczny staż do zespołu prof. Dario Leistera w Kopenhadze, aby przeprowadzić eksperymenty mające na celu identyfikację i charakterystykę nowych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w komunikację chloroplast-jądro. Innym wątkiem prowadzonych przeze mnie badań na Uniwersytecie w Kopenhadze była analiza elongacji translacji w chloroplastach. W trakcie stażu nawiązałem współpracę z doktorem Larsem Scharffem, z którym kontynuowałem wspólne badania przez następnych sześć lat. Wynikiem mojej pracy zainicjowanej w Danii było współautorstwo w następujących publikacjach:

- Pulido, P., Zagari, N., Manavski, N., **Gawroński, P.**, Matthes, A., Scharff, L. B., Meurer, J., & Leister, D. (2018). CHLOROPLAST RIBOSOME ASSOCIATED supports translation under stress and interacts with the ribosomal 30S subunit. *Plant Physiology*, 177(4), 1539–1554.
- **Gawroński, P.**, Jensen, P. E., Karpiński, S., Leister, D., & Scharff, L. B. (2018). Pausing of chloroplast ribosomes is induced by multiple features and is linked to the assembly of photosynthetic complexes. *Plant Physiology*, 176(3), 2557–2569.
- **Gawroński, P.**, Burdiak, P., Scharff, L. B., Mielecki, J., Górecka, M., Zaborowska, M., Leister, D., Waszczak, C., & Karpiński, S. (2021). CIA2 and CIA2-LIKE are required for optimal photosynthesis and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 105(3), 619–638.
- **Gawroński, P.**, Enroth, C., Kindgren, P., Marquardt, S., Karpiński, S., Leister, D., Jensen, P., Vinther, J., & Scharff, L. (2021). Light-dependent translation change of *Arabidopsis* psbA correlates with RNA structure alterations at the translation initiation region. *Cells*, 10(2), 322.
- **Gawroński, P.**, Pałac, A., & Scharff, L. B. (2020). Secondary structure of chloroplast mRNAs in vivo and in vitro. *Plants*, 9(3), 323.

Doświadczenie zdobyte podczas stażu w Copenhagen Plant Science Centre pozwoliło mi na uzyskanie projektu SONATA NCN pt. „Regulacja elongacji translacji w chloroplastach przez reaktywne formy tlenu, status redoks i gradient protonowy”. Prace dotyczące badania mechanizmów regulacji translacji w chloroplastach, które zapoczątkowałem podczas stażu w Kopenhadze, są aktualnie kontynuowane w kierowanym przeze mnie projekcie SONATA-BIS NCN pt. „Rola ekspresji i modyfikacji tRNA w procesie translacji w chloroplastach podczas stresu”. Dlatego też uważam, że kompetencje i wiedza zdobyta podczas tego stażu były kluczowe dla rozwoju mojej kariery naukowej.

5.4 *University of Helsinki, Finlandia*

Współpracuję z dwoma naukowcami z Uniwersytetu w Helsinkach: z doktorem Cezarym Waszczakiem oraz doktorem Peterem Sarinem. Z doktorem Cezarym Waszczakiem współpracowałem nad projektem charakteryzującym rolę CIA2 i CIL w komunikacji chloroplast-jądro. W trakcie prowadzonych badań pan Konrad Łosiński wykonujący pracę inżynierską pod moim kierownictwem wyjechał na staż na Uniwersytet Helsiński w celu uzyskania dodatkowych mutantów w genach *CIA2* i *CIL* za pomocą techniki CRISPR-Cas9. W wyniku współpracy z doktorem Waszczakiem ukazała się praca (P1) wchodząca w skład opisywanego osiągnięcia naukowego.

Współpracę z doktorem Peterem Sarinem rozpocząłem w 2021 r. Wyniki wspólnie przeprowadzonych eksperymentów nad modyfikacjami potranskrypcyjnymi tRNA w trakcie stresu wysokiego natężenia światła z wykorzystaniem LC-MS były podstawą do aplikacji o projekt NCN

SONATA-BIS. Dr Peter Sarin współuczestniczy w eksperymentach mających na celu charakterystykę modyfikacji tRNA i zmian poziomu tych modyfikacji podczas stresów abiotycznych.

5.5 Mendel University in Brno, Czechy

Współpraca z doktorem Pavelem Kerchevem, którą rozpocząłem w 2021 r., jest istotna dla realizacji projektu SONATA-BIS. Dr Pavel Kerchev jest odpowiedzialny za charakterystykę zmian w proteomie w roślinach *A. thaliana* w reakcji na stresy abiotyczne i w mutantach z zaburzonym wprowadzaniem modyfikacji w tRNA. Dotychczas opublikowaliśmy wspólnie jedną pracę przeglądową wchodzącą w skład opisywanego osiągnięcia (P5).

6 Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1 Aktywność organizacyjna

Członek komisji jury podczas XLVI Przeglądu Dorobku Kół Naukowych (6 grudnia 2019)

Członek zespołu przygotowującego raport samooceny na Wydziale Ogrodnictwa i Biotechnologii (2019) – byłem zaangażowany w przygotowanie raportu do akredytacji (PKA) kierunku ogrodnictwo w roku akademickim 2019/20.

Koordinator ds. Współpracy Międzynarodowej w Instytucie Biologii (1 listopada 2019 – 21 września 2021)

Opiekun roku na kierunku Biotechnologia (1 października 2020 – obecnie)

Organizator seminariów naukowych w Katedrze Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin (1 września 2020 – obecnie) – od 2020 roku organizuję seminaria zapraszając gości z innych jednostek naukowych z Polski z zagranicy. W każdym semestrze średnio jest zorganizowanych 10 seminariów.

Członek komitetu organizacyjnego konferencji „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku” (1 października 2020 – 24 września 2021) – byłem odpowiedzialny za pozyskanie sponsorów oraz za kontakty z firmami i instytucjami wystawiającymi się podczas konferencji.

Członek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne (14 grudnia 2020 – obecnie) – od 2020 r. jestem członkiem Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne w grupie niesamodzielnych pracowników naukowych.

Koordinator ds. Współpracy z Otoczeniem Gospodarczym Wydziału Ogrodnictwa i Biotechnologii na kierunku Biotechnologia (1 października 2020 – 31 sierpnia 2021) – do zakresu mojej działalności można zaliczyć współpracę z podmiotami gospodarczymi i interesariuszami zewnętrznymi, i koordynowanie oferty dydaktycznej współpracy z podmiotami otoczenia gospodarczego.

Koordinator ds. Współpracy z Otoczeniem Gospodarczym Wydziału Biologii i Biotechnologii (1 września 2021 – obecnie) – do zakresu mojej działalności można zaliczyć współpracę w podmiotami gospodarczymi i interesariuszami zewnętrznymi, i koordynowanie oferty dydaktycznej współpracy z podmiotami otoczenia gospodarczego.

Oficer łącznikowy SGGW w centrum badawczym dotyczącym obszaru biochemii i biotechnologii w ramach inicjatywy „UNIGreen – the green European University” (kwiecień 2023 – obecnie)

6.2 Zajęcia dydaktyczne

Zajęcia dydaktyczne prowadzę od 2017 r. na 3 kierunkach studiów dziennych (Biotechnologii, Biologii i Bezpieczeństwie żywności). Łącznie prowadziłem zajęcia w ramach 11 przedmiotów

w większości realizowanych na kierunku Biotechnologia. Moim **autorskim przedmiotem** na Biotechnologii I-go stopnia jest **Biologia chloroplastów**. Współtworzyłem przedmiot **Język programowania R** i jestem koordynatorem ćwiczeń z **Inżynierii genetycznej**. Moje zaangażowanie w realizację zajęć dydaktycznych w ostatnim roku akademickim (2022/23) jest znacząco mniejsze niż w poprzednich latach ze względu na redukcję pensum z powodu kierowania projektem NCN SONATA-BIS.

Lista prowadzonych przeze mnie zajęć na 3 kierunkach:

Biotechnologia studia stacjonarne:

1. Biologia chloroplastów (wykłady i ćwiczenia, opracowałem i realizuję całość przedmiotu),
2. Inżynieria genetyczna I i II (ćwiczenia, opracowałem całość ćwiczeń i jestem ich koordynatorem),
3. Podstawy bioinformatyki (prowadziłem wybrane ćwiczenia),
4. Projektowanie molekularne (prowadziłem wybrane ćwiczenia),
5. Genetyka ogólna (opracowałem i prowadziłem wybrane ćwiczenia),
6. Genomika strukturalna i funkcjonalna (opracowałem i realizuję wybrane wykłady i ćwiczenia),
7. Metodologia publikacji naukowych w naukach biologicznych (opracowałem i prowadziłem wybrane ćwiczenia),
8. Język programowania R (opracowałem i prowadzę 50% przedmiotu),
9. Molekularne aspekty biologii komórki roślinnej (opracowałem i prowadziłem część wykładów).

Bezpieczeństwo żywności studia stacjonarne:

1. Podstawy biologii molekularnej i inżynierii genetycznej (koordynowałem i prowadziłem większość ćwiczeń).

Biologia studia stacjonarne:

1. Genetyka (prowadziłem część ćwiczeń).

6.3 Promotorstwo prac dyplomowych

Pełnię rolę **promotora pomocniczego w trzech rozprawach doktorskich**. Obrony dwóch doktoratów przewidziane są na koniec 2023 r. Obrona ostatniego z doktoratów, który jest realizowany w ramach otrzymanego przeze mnie projektu SONATA-BIS, przewidziana jest na koniec 2026 r. **Byłem promotorem dwóch prac magisterskich, 11 inżynierskich** (w tym jednej w języku angielskim) oraz **dwóch prac licencjackich**.

6.3.1 Rozprawy doktorskie

1. Mielecki Jakub: Analiza funkcjonalna genów kodujących potencjalne czynniki zaangażowane w transdukcję retroaktywnych sygnałów z chloroplastów do jądra komórkowego podczas odpowiedzi obronnych i aklimatyzacyjnych u *Arabidopsis thaliana*, Instytut Biologii, SGGW, pełnię funkcję **promotora pomocniczego** (w trakcie, przewidywany termin obrony: grudzień 2023)
2. Barczak-Brzyżek Anna: Chloroplast retrograde control of miRNA expression in response to high light stress, Instytut Biologii, SGGW, pełnię funkcję **promotora pomocniczego** (w trakcie, przewidywany termin obrony: wrzesień 2023)
3. Gołębiewska Kinga: The role of chloroplast non-coding RNAs and RNA-modifying proteins in translation, Instytut Biologii, Szkoła Doktorska SGGW, pełnię funkcję **promotora pomocniczego** (w trakcie, przewidywany termin obrony: koniec 2026)

6.3.2 *Prace magisterskie*

1. Gołębiewska Kinga: Molekularna i fizjologiczna analiza *Arabidopsis thaliana* pod wpływem stresu wysokiego natężenia światła w obecności nigerycyny, 2022, Biotechnologia, SGGW
2. Tyszkiewicz Magda: Modelowanie struktury II i III-rzędowej wybranych cząsteczek RNA *Arabidopsis thaliana*, 2020, Biotechnologia, SGGW

6.3.3 *Prace inżynierskie i licencjackie*

1. Czeremużyńska Zofia: Białko HCF173 jako czynnik inicjacji translacji *psbA* w chloroplastach - klonowanie molekularne i otrzymanie roślin transgeniczných *Arabidopsis thaliana* wyrażających białko fuzyjne HCF173-EYFP, 2022, Biotechnologia, SGGW
2. Zaremba Julia: Uzyskanie i charakterystyka linii transgeniczných z nadekspresją genów *CIA2* i *HvCMF7* w tle genetycznym mutantu *cia2-2 cil-1* u *Arabidopsis thaliana*, 2022, Biotechnologia, SGGW
3. Dwojak Paulina: Optymalizacja metody klonowania genów z wykorzystaniem egzonukleazy T5, 2021, Biologia, SGGW
4. Gołębiewska Kinga: Analiza wpływu nigerycyny na translację w chloroplastach wybranych mRNA u *Arabidopsis thaliana*, 2021, Biotechnologia, SGGW
5. Wawrzyniak Kamila: Analiza ekspresji wybranych tRNA w odpowiedzi na stres świetlny u *Arabidopsis thaliana*, 2021, Biotechnologia, SGGW
6. Biernacik Bartosz: Analiza tRNA w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana* w czasie stresu wysokiego natężenia światła, 2020, Biotechnologia, SGGW
7. Łosiński Konrad: Tworzenie mutantów knockout *Arabidopsis thaliana* w genach *CIA2* i *CIL* z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9, 2020, Biotechnologia, SGGW (praca w języku Angielskim)
8. Warchałowska Natalia: Analiza możliwości wykorzystania YAMAT-seq do detekcji modyfikacji tRNA, 2020, Biotechnologia, SGGW
9. Świąder Krzysztof: Identyfikacja modyfikacji chemicznych tRNA występujących w chloroplastach *Arabidopsis thaliana* na podstawie wyników YAMAT-seq oraz analizy porównawczej z tRNA z innych organizmów, 2020, Biotechnologia, SGGW
10. Najehalski Maciej: Charakterystyka fizjologiczna i molekularna czterech linii mutantów insercyjnych *Arabidopsis thaliana* genów *KEA3* i *TPK3*, 2019, Biotechnologia, SGGW
11. Piwnicki Rafał: Porównanie programów do mapowania odczytów uzyskanych w wyniku profilowania rybosomów, 2019, Biotechnologia, SGGW
12. Michalak Agata: Analiza mutantu *prors1-5* w genie *PRORS1* u *Arabidopsis thaliana* oraz optymalizacja metody Toeprinting, 2019, Biotechnologia, SGGW
13. Pałac Aleksandra: Analiza wpływu nigerycyny i związków zmieniających status redoks na fotosyntetyczny transport elektronów u *Arabidopsis thaliana*, 2019, Biologia, SGGW

6.4 *Opieka nad studentami zagranicznymi realizującymi praktyki w SGGW*

Pablo Lopez Saiz (wrzesień 2021 – czerwiec 2022) – opieka nad studentem w ramach programu Erasmus+

6.5 *Opieka nad studentami realizującymi projekty w ramach koła naukowego*

Kinga Gołębiewska, Krzysztof Wardak, 2021 – prezentacja ustna, pani Kinga Gołębiewska zdobyła pierwsze miejsce w sekcji nauk biologicznych

Bartosz Biernacik, 2019 – poster pt. „Analiza tRNA w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana* w czasie stresu wysokiego natężenia światła”.

7 Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

7.1 Nagrody

2012 – Dyplom dla laureata konkursu popularyzatorskiego przyznany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej

2014 – Dyplom uznania przyznany przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia naukowe

2015 – Dyplom uznania przyznany przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia naukowe

2016 – Dyplom uznania przyznany przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia naukowe

2017 – Dyplom uznania przyznany przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia naukowe

2018 – Nagroda zespołowa stopnia II przyznana przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia naukowe

2018 - Nagroda dla wybitnego młodego naukowca przyznana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Nr 0803/E-385/STYP/13/2018)

2019 – Nagroda zespołowa stopnia II przyznana przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia naukowe

2020 – Nagroda zespołowa stopnia I przyznana przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia badawcze

2021 – Nagroda indywidualna stopnia III przyznana przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia badawcze

2022 – Nagroda zespołowa stopnia III przyznana przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia organizacyjne

2022 – Nagroda zespołowa stopnia III przyznana przez Rektora SGGW w Warszawie za osiągnięcia badawcze

7.2 Szkolenia

Kurs praktyczny pt. „Izolacja i oczyszczanie sztucznych chromosomów bakteryjnych z wykorzystaniem zestawu PhasePrep™ BAC DNA Kit firmy Sigma” organizowany przez KGHIBR i firmę Sigma-Aldrich; Warszawa, 2009

Kurs z obsługi zestawu do PCR w czasie rzeczywistym, Applied Biosystems 7500Fast Real-Time PCR; Warszawa, 2009

Szkolenie pt. „Perl Programming – szkolenie dedykowane”; Warszawa, 2009

Szkolenie pt. „Administracja systemów Linux”; Warszawa, 2009

Szkolenie pt. „Microsoft Office Excel 2007 Profesjonalista”; Warszawa, 2009

Szkolenie pt. „Obsługa oprogramowania bioinformatycznego CLC Genomics Workbench 4.5”; Warszawa, 2011

Szkolenie z zakresu prezentacji zagadnień naukowych dla różnych grup odbiorców, organizowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej; Warszawa, 2012

Szkolenie z zakresu autoprezentacji i sztuki wystąpień publicznych, organizowane przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej; Warszawa, 2012

Warsztaty pt. „Mechanisms of plant pest interaction – discovery and characterization”; Warszawa, 2012

8 Sumaryczne wskaźniki dorobku naukowo-badawczego

Wskaźniki wg bazy danych Web of Science (8.05.2023) lub wg punktacji czasopism, zgodnie z komunikatem Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN).

Liczba publikacji w czasopismach posiadających Impact Factor – 25, w tym 23 prace oryginalne i 2 prace przeglądowe.

Liczba rozdziałów w monografiach – 1

Indeks Hirscha – **13**

Sumaryczny Impact Factor – **169,152** (w tym **36,654** przypadających na niniejsze osiągnięcie naukowe)

Suma punktów MEiN – **3120** (w tym **630** przypadających na niniejsze osiągnięcie naukowe)

Sumaryczna liczba cytowań – **600** (w tym **58** przypadające na niniejsze osiągnięcie naukowe)

Publikacje	Liczba publikacji	Pkt MNiSW/ MEiN w roku publikacji	Pkt MEiN w roku 2021	IF w roku publikacji	IF w roku 2021
Osiągnięcie naukowe	5	535	630	34,231	36,654
Publikacje z IF przed doktoratem (nie wchodzi w skład osiągnięcia)	6	165	720	29,312	50,492
Publikacje z IF po doktoracie (nie wchodzi w skład osiągnięcia)	14	1250	1770	68,895	82,006
Suma wszystkich publikacji z IF z osiągnięciem naukowym	25	2010	3120	132,438	169,152