

Rada Doskonałości Naukowej
00-901 Warszawa, pl. Defilad 1
Dział Kancelaryjny
WPLYNĘŁO (RPW)

05.04.2024

Znak sprawy:

Podpis: [signature] Zał. [signature]

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Ul. Nowoursynowska 166

02-787 Warszawa

(nazwa i dane adresowe podmiotu habilitującego,
wybranego do przeprowadzenia postępowania)

za pośrednictwem:

Rady Doskonałości Naukowej

pl. Defilad 1

00-901 Warszawa

(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)



Sławomir Orzechowski

(imię i nazwisko wnioskodawcy)

Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

(miejsce pracy/jednostka naukowa)



Wniosek

z dnia **05.04.2024**

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

w dziedzinie **nauk rolniczych** w dyscyplinie¹

rolnictwo i ogrodnictwo

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Wybrane aspekty regulacji rozkładu skrobi w liściach ziemniaka.

Wniosuję – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym***²

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu.

Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

[signature]

(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

² * Niepotrzebne skreślić.

1. Dane wnioskodawcy
2. Kopia dyplomu doktorskiego
3. Autoreferat
4. Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny.
5. Kopie dokumentów

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

dr inż. Sławomir Orzechowski

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

Tytuł zawodowy: **magister inżynier rolnictwa, specjalizacja biotechnologia**

Tytuł pracy: „Wpływ jonów metali ciężkich na aktywność systemu asymilacyjnego amoniak w siewkach pszenżyta odmiany Malno”

Data obrony: **15.05.1996**

Miejsce: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego; Wydział Rolniczy, w latach 1991-1996

Nazwisko promotora: prof. dr hab. Wiesław Bielawski

Stopień naukowy: **doktor nauk biologicznych, dyscyplina: nauki biologiczne, specjalność: biochemia roślin**

Tytuł rozprawy: „Niektóre właściwości aminotransferazy alaninowej i glicynowej z liści kukurydzy (*Zea mays* L.)”

Data obrony: **08.03.2000**

Data zatwierdzenia: 08.03.2000

Miejsce przeprowadzenia przewodu: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie; Wydział Rolniczy, w latach 1996-2000

Nazwisko promotora: dr hab. Andrzej Paszkowski

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.07.1996 – 08.03.2000 – **Studia Doktoranckie** przy Wydziale Rolniczym SGGW w Warszawie

01.05. 2000 – 30.09.2018 **adiunkt** w Katedrze Biochemii Wydziału Rolniczego (Wydział Rolniczy został przekształcony z dn. 01.01.2004 w Wydział Rolnictwa i Biologii), w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

05.01.2002-31.12.2004 – **Post-Dock**, Faculty of Science, Plant Physiology, University of Potsdam, Niemcy (urlop naukowy w SGGW)

01.10.2018- **obecnie adiunkt** w Katedrze Biochemii i Mikrobiologii, Instytutu Biologii (KBiM powstała w 2018 roku z Katedry Biochemii i Samodzielnego Zakładu

Mikroorganizmów, Wydziału Rolnictwa i Biologii), Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Tytuł osiągnięcia naukowego wraz z wykazem prac stanowiących cykl:

Wybrane aspekty regulacji rozkładu skrobi w liściach ziemniaka.

Wykaz publikacji naukowych wchodzących w skład pierwszego osiągnięcia naukowego:

P1. Dudkiewicz M., Simińska J., Pawłowski K., **Orzechowski S.** (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharide phosphorylation effect on the stabilization of the β -amylase-ligand complex. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 27: 479-495, IF₂₀₀₈ = 1,029, MNiSW₂₀₀₈ = 20 pkt; IF₂₀₂₂ = 1,0; MNiSW₂₀₂₃ = 40 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 5)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, utworzeniu i koordynowaniu prac zespołu badawczego w ramach projektu KBN o numerze N302061134, w którym byłem kierownikiem. Do współpracy włączyłem specjalistów z obszaru bioinformatyki. Z projektu została sfinansowana kilkumiesięczna licencja specjalistycznego oprogramowania wykorzystanego do analiz. Moim zadaniem było zaprojektowanie odpowiednich ufosforylowanych ligandów o różnej długości łańcucha poliglukoz (od 2 do 8 glukozy), które następnie były wykorzystywane w dokowaniu *in silico* do centrum aktywnego beta- amylazy. Po wspólnym opracowaniu wyników napisałem dyskusję oraz wnioski końcowe. Brałem także udział we wprowadzaniu poprawek i udzielaniu odpowiedzi recenzentom przed opublikowaniem artykułu

P2. **Orzechowski S.**, Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 483–500, IF₂₀₁₃ = 1,305, MNiSW₂₀₁₃ = 25pkt; IF₂₀₂₂ = 2,6; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 12)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań utworzeniu i kierowaniu zespołem badawczym w ramach projektu KBN o numerze N302061134, zaplanowaniu

i współwykonaniu eksperymentów (hodowla roślin, zebranie materiału, oczyszczanie StGWD3, testowaniu otrzymanych przeciwciał poliklonalnych anty StGWD3 przed immunolokalizacją, SDS-PAGE i western blot, przygotowaniu prób do MALDI-TOF MS), zebraniu wszystkich wyników i ich opracowaniu graficznym, przygotowaniu manuskryptu – wersji wstępnej i ostatecznej, naniesieniu uwag współautorów, korespondencji z redakcją oraz wprowadzeniu poprawek przed opublikowaniem artykułu.

P3. Sitnicka D., **Orzechowski S.** (2014) Cold-induced starch degradation in potato leaves – intercultivar differences in the gene expression profile and activity of key enzymes. *Biologia Plantarum* 58(4): 659-666, IF₂₀₁₄ = 1,849, MNiSW₂₀₁₄ = 25pkt; IF₂₀₂₂ = 1,5; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 16)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i współwykonaniu eksperymentów (hodowla roślin, zebranie materiału, pomiar zawartości węglowodanów i aktywności enzymów), zebraniu wszystkich wyników i ich opracowaniu graficznym, przygotowaniu manuskryptu – wersji wstępnej i ostatecznej, naniesieniu uwag współautorki.

P4. Mahlow S., **Orzechowski S.**, Fettke J. (2016) Starch phosphorylation: insights and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 2753–2764, IF₂₀₁₆ = 5,788, MNiSW₂₀₁₆ = 140pkt; IF₂₀₂₂ = 8,0; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 49)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji manuskryptu. W trakcie mojego pobytu w Poczdamie w 2015 roku wybrałem tematykę i czasopismo, przygotowałem wersję wstępną i ostateczną większości rozdziałów, nanosiłem uwagi współautorów.

P5. **Orzechowski S.**, Sitnicka D., Grabowska A., Compant J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7203, IF₂₀₂₁ = 5,923, MNiSW₂₀₂₁ = 140 pkt; IF₂₀₂₂ = 5,6; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 11)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, współwykonaniu eksperymentów (hodowla roślin, zebranie materiału, oznaczenie WSD, oraz pomiar zawartości węglowodanów i aktywności enzymów), zebraniu wszystkich wyników i ich opracowaniu graficznym, przygotowaniu manuskryptu – wersji wstępnej i ostatecznej, naniesieniu uwag współautorów, korespondencji z redakcją oraz wprowadzeniu poprawek przed opublikowaniem artykułu. Pozyskałem też niezbędne środki na badania realizowane w ramach projektu SGGW o numerze 504-02-710300-S00125-99.

P6. Orzechowski S., Compart J., Zdunek-Zastocka E., Fettke J. (2023) Starch parameters and short-term temperature fluctuations – Important but not yet in focus? *Journal of Plant Physiology* 280 153902, IF₂₀₂₃ = 3,686, MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji manuskryptu, doborze współautorów oraz na napisaniu manuskryptu. Potrzeba napisania takiego artykułu zrodziła się po naszych wspólnych eksperymentach z grupą badawczą z Uniwersytetu w Poczdamie oraz we współpracy z dr hab. E Zdunek-Zastocką. Przygotowałem wersję wstępną i ostateczną, nanosiłem uwagi współautorów, wprowadzałem poprawki przed opublikowaniem artykułu.

Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników.

Wstęp.

Biosynteza skrobi asymilacyjnej.

Skrobia jest głównym węglowodanem zapasowym w roślinach wyższych. Odgrywa ważną rolę zarówno jako główny składnik diety wielu ludzi, jak i surowiec w wielu gałęziach przemysłu spożywczego i chemicznego. Metabolizm skrobi jest bardzo ważny dla lepszego zrozumienia regulacji przyrostu masy roślin. W zielonych algach i roślinach lądowych skrobia jest zlokalizowana wyłącznie w plastydach. W roślinach wyższych skrobia znajduje się w chloroplastach tkanek zdolnych do przeprowadzenia procesu fotosyntezy oraz w amyloplastach tkanek nasion i bulw. W zależności od lokalizacji skrobia może pełnić funkcje dobowego magazynu zasymilowanego węgla (skrobia przejściowa) lub rezerwy długoterminowej szkieletów węglowych (skrobia zapasowa) (Lloyd i Kossmann, 2019; Thalmann i Santelia, 2017; Smith i Zeeman, 2020).

W roślinach takich jak zboża, ziemniak, czy też *Arabidopsis thaliana* skrobia jest najważniejszym polisacharydem zapasowym, syntetyzowanym w fazie świetlnej fotosyntezy i następnie ulegającym degradacji w nocy. Warto jednak wspomnieć, że są gatunki roślin jak np. *Pisum sativum* i *Spinacia olearacea*, w których to nieredukujący dwucukier - sacharoza jest głównym stabilnym produktem fotosyntezy i jedynie nadwyżka zasymilowanych w fotosyntezie metabolitów kierowana jest do szlaku biosyntezy skrobi (Stitt i in. 1983). Skrobia obecna w plastydach roślin występuje w formie ziaren o półkrystalicznej strukturze. Nierozpuszczalne w wodzie ziarna skrobi zawierają dwa różne rodzaje homoglukanów zbudowanych z reszt glukozy: amylozę i amylopektynę. Amyloza jest zasadniczo liniowym polimerem reszt glukozy połączonych wiązaniami α -(1,4)-glikozydowymi, podczas gdy amylopektyna jest rozgałęzioną cząsteczką, w której dominują wiązania α -(1,4)-glikozydowe,

łązące poszczególne cząsteczki glukozy. W punktach rozgałęzień znajdujących się w amylopektynie średnio co 25-30 reszt glukozy występują wiązania glikozydowe typu α -(1,6). Regularne rozmieszczenie punktów rozgałęzień w amylopektynie umożliwia tworzenie zorganizowanych układów ściśle upakowanych, lewoskrętnych i podwójnych helis w półkryształicznych strefach ziarna skrobi. Z kolei liniowe cząsteczki amylozy obecne są w tak zwanej amorficznej strefie ziaren skrobi, która zawiera także amylopektynę o mniej uporządkowanej strukturze. Obserwowane różnice w strukturze skrobi pochodzącej z różnych roślin są wynikiem różnic w wielu parametrach, takich jak średnie długości łańcuchów poliglukoz, stopień rozgałęzienia i wielkości ziaren (Orzechowski 2008, Apriyanto i in. 2022).

Biosynteza skrobi jest bardzo skomplikowanym procesem, w którym biorą udział liczne enzymy i białka regulatorowe. Synteza skrobi nie jest możliwa bez utworzenia ADP-glukozy, czyli niskocząsteczkowego substratu dla syntaz skrobi (starch synthases SS, EC 2.4.1.21). AGPaza (adenozyno-5'-difosforan glukopirofosforylaza, EC 2.7.7.27) to główny enzym odpowiedzialny za syntezę ADP-glukozy. Reakcja katalizowana przez AGPazę jest uważana za pierwszy i kluczowy etap biosyntezy skrobi. Enzym ten składa się z dwóch dużych (ApL) i dwóch małych (ApS) podjednostek katalitycznych kodowanych przez różne geny. Mutanty w genie *ApS* wykazują fenotyp bezskrobiowy. Plastydowa izoforma AGPazy jest enzymem allosterycznym aktywowanym przez niski poziom 3-fosfoglicerynianu (3-PGA) i hamowanym wraz ze wzrostem stężenia 3-PGA, a także przez nieorganiczny ortofosforan (Pi) i pirofosforan (PPi). U różnych gatunków roślin aktywność AGPazy jest również kontrolowana poprzez potencjał utlenienia i redukcji w odpowiedzi na światło i poziom węglowodanów. W wyniku nocnego tworzenia wiązań dwusiarczkowych pomiędzy podjednostkami AGP-S powstaje nieaktywny dimer. Aktywacja redoks AGPazy w bulwach ziemniaka jest związana z wysokim poziomem sacharozy lub glukozy. W tym typie aktywacji zaangażowana jest kinaza białkowa związana z sacharozą (SnRK1) oraz szlaki sygnalizacyjne z udziałem heksokinazy (Orzechowski 2008).

Po utworzeniu się ADP-glukozy związek ten wykorzystywany jest jako substrat przez syntazy skrobi (SS). SS katalizują tworzenie nowych wiązań glikozydowych poprzez przeniesienie reszty glukozylowej z rozpuszczalnego prekursora ADP-glukozy na koniec redukujący istniejącego już glukanu (akceptor). W akceptorze reszty glukozy połączone są wiązaniem α -(1,4)-glikozydowym. Z kolei regularny rozkład punktów rozgałęzień amylopektyny, które umożliwiają jej krystalizację w plastydzie, jest efektem skoordynowanego działania enzymów rozgałęziających (starch branching enzymes BE, EC 2.4.1.18) i enzymów

usuwających rozgałęzienia (starch debranching enzymes, DBE, EC 3.2.1.68 lub EC 3.2. 1.41) (Tetlow i Emes, 2017).

Rośliny posiadają wiele izoform syntaz skrobi. Na podstawie sekwencji aminokwasów można wyróżnić pięć klas syntaz skrobi: syntaza skrobi związana z ziarnami (granule bound starch synthase GBSS) – nierozpuszczalna, która sukcesywnie jest „zamykana” w powiększającym się ziarnie skrobi i jest zaangażowana głównie w biosyntezę amylozy. Dwa geny kodują izoformę GBSS (I i II). Ekspresja GBSSI ogranicza się głównie do tkanek zapasowych, a ekspresja genu kodującego GBSSII ma miejsce głównie w chloroplastach. Z tego powodu przypuszcza się, że GBSSII jest odpowiedzialny za syntezę amylozy w chloroplastach. Mutacje prowadzące do utraty aktywności GBSS skutkują powstaniem skrobi pozbawionej amylozy (tzw. skrobi woskowej). Pozostałe cztery podklasy syntaz skrobi (SSI, SSII, SSIII, SSIV) zaangażowane są wyłącznie w syntezę amylopektyny. Wśród tych form syntaz skrobi dość dobrze poznana jest specyficzność substratowa SSI i SSII. SSI preferencyjnie wydłuża najkrótsze łańcuchy poliglukoz o DP (degree of polymerization) wynoszącym 4–10 jednostek glukozyliwych, a SSII — łańcuchy średniej długości (DP wynoszące 12–24 poliglukoz). Funkcje SSIII i SSIV mogą być różne w zależności od gatunków roślin, lokalizacji wewnątrzkomórkowej i lokalizacji tkankowej. Enzymy te uczestniczą w inicjacji procesu tworzenia ziaren skrobi, regulacji liczby tych ziaren, tworzeniu kompleksów z różnymi białkami, a także mają wpływ na tempo biosyntezy skrobi (Tetlow i Emes, 2017).

Enzymy rozgałęziające skrobię (SBE/BE, EC 2.4.1.18) tworzą wiązania α -(1,6)-glikozydowe poprzez rozszczepienie wewnętrznych wiązań α -(1,4) i przeniesienie fragmentu glukanowego (co najmniej sześcioglukozyliwego) do tego samego lub sąsiedniego łańcucha cząsteczki amylopektyny. Enzymy rozgałęziające skrobię występują również w wielu izoformach. Na podstawie podobieństw w sekwencji aminokwasowych wyróżniono dwie podklasy tych enzymów: I (rodzina B) oraz II (rodzina A). Podklasa BEI preferencyjnie przenosi dłuższe łańcuchy niż BEII. Mutacja jednego z genów kodującego BE, która obniża aktywność tego enzymu powoduje powstawanie skrobi o wysokim udziale amylozy. W ziemniaku taka mutacja spowodowała wzrost zawartości amylozy i modyfikację struktury amylopektyny. Ta modyfikacja amylopektyny polegała na wydłużeniu średniej długości łańcuchów poliglukoz, zamiast 25-30 ich długość wynosiła 23–60 reszt glukozy (Tetlow i Emes, 2017).

Najnowsze badania wykazały, że w procesie syntezy skrobi mogą również brać udział enzymy tradycyjnie związane z rozkładem tego polisacharydu. Jednakże ich rola w syntezie skrobi nie została w pełni wyjaśniona. Wśród nich są enzymy zdolne do rozszczepiania wiązań

α -(1,6)-glikozydowych w α -glukanie. W roślinach występują dwa typy enzymów usuwających rozgałęzienia w skrobi (DBE, debranching enzyme): izoamylazy, (ISA, EC 3.2.1.68) i pullulanazy (znane również jako limit-dekstrynazy, LDA, EC 3.2.1.41). Pullulanazy skutecznie hydrolizują wiązania α -(1,6)-glikozydowe nie tylko w amylopektynie, ale także w pullulanie (grzybowym polimerze reszt maltotriozy). Badania nad mutantami jęczmienia i transgenicznym ryżem sugerują, że izoamylazy odgrywają kluczową rolę w inicjacji syntezy ziaren skrobi. Enzymy hydrolizujące wiązania α -(1,6)-glikozydowe biorą udział w biosyntezie skrobi w kompleksach z syntazami skrobi (SS) oraz enzymami wytwarzającymi rozgałęzienia w amylopektynie (SBE), czyli z enzymami syntetyzującymi odpowiednio wiązania α -(1,4)- i α -(1,6)-glikozydowe. Wykazano też, że spadek lub utrata aktywności DBE typu izoamylazy ISA-1 lub ISA-2 są odpowiedzialne za akumulację fitoglikogenu (nieuporządkowanego rozpuszczalnego w wodzie polisacharydu), a nie skrobi o prawidłowej strukturze. Przypuszcza się, że te hydrolazy odgrywają „oczyszczającą” rolę, usuwając z plastydów rozpuszczalne glukany, które nie są związane z ziarnami skrobi. Mogą też powodować „przycinanie” pre-amylopektyny, co później umożliwia jej agregację w półkrystaliczną strukturę ziarna skrobi. Działanie enzymów hydrolizujących wiązania α -(1,6)-glikozydowe powoduje usuwanie rozgałęzień pojawiających się w niewłaściwym miejscu, które mogłyby zakłócić krystalizację ziaren skrobi (Tetlow i Emes, 2017).

Kolejnym enzymem częściej łączonym z procesem degradacji skrobi niż jej biosyntezą jest fosforylaza glukanów (PHO, EC 2.4.1.1). Enzym ten katalizuje odwracalne przeniesienie jednostek glukozylowych z glukozo-1-fosforanu (G1P) na nieredukujący koniec glukanów połączonych wiązaniami α -(1,4)-glikozydowym. Rola fosforylasy glikogenu w metabolizmie ssaków jest dobrze znana, ale funkcja tego enzymu w roślinach pozostaje w znacznym stopniu niejasna. Przypuszcza się, że PHO spełnia podobną rolę jak enzymy hydrolizujące wiązania α -(1,6)-glikozydowe, czyli odpowiada za „oczyszczanie” rozpuszczalnych glukanów niezwiązanych z ziarnami skrobi w drodze fosforolizy (Zeeman i in. 2004).

Synteza ziaren skrobi w plastydach odbywa się także z wykorzystaniem oddziaływań białko-białko. Tworzenie kompleksów przez enzymy zaangażowane w metabolizm skrobi poprzez interakcje białko-białko może zwiększyć efektywność biosyntezy amylopektyny i amylozy o prawidłowej strukturze, dzięki zmianom konformacyjnym enzymów, tunelowaniu substratów, a także zapobieganiu tworzenia się fitoglikogenu. W tworzeniu się takich kompleksów znaczenie ma prawdopodobnie proces fosforylacji tworzących je białek. Wykazano bowiem, że ufosforylowane enzymy rozgałęziające skrobię (SBE) i syntazy skrobi (SS) są zdolne do tworzenia aktywnych kompleksów, podczas gdy niefosforylowane takich

zdolności nie wykazywały. Odwracalna fosforylacja enzymów, to dobrze znany mechanizm potranslacyjnej kontroli aktywności enzymów, głównie pochodzenia zwierzęcego i bakteryjnego. Należy jednak zauważyć, że większość doświadczeń, w których wskazywano na możliwość tworzenia się takich kompleksów przeprowadzono w tkankach heterotroficznych, głównie w bielmie zbóż. Powstanie takich kompleksów mogłoby wyjaśnić zmiany tempa biosyntezy skrobi i liczne efekty plejotropowe obserwowane w trakcie przeprowadzanych eksperymentów (Pfister i in. 2016, Lloyd i Kossmann 2019).

Degradacja skrobi asymilacyjnej.

Proces degradacji skrobi „przejściowej” w chloroplastach znacznie różni się od rozkładu skrobi zapasowej zgromadzonej w amyloplastach. W rytmie dobowym skrobia przejściowa ulega degradacji podczas kolejnych faz ciemnych, zapewniając w nocy stały dopływ węgla i energii dla metabolizmu komórki (Smith i Zeeman 2020). W komórkach heterotroficznych nasion i bulw skrobia zapasowa tworzy się sukcesywnie w ciągu dni a nawet tygodni. Ponadto synteza skrobi i innych substancji zapasowych w tych tkankach i organach jest ściśle uzależniona od transportu zasymilowanych w trakcie fotosyntezy asymilatów. Po okresie spoczynku skrobia ulega mobilizacji w nasionach i bulwach podczas kiełkowania. Zatem tkanka czy też organ rośliny przechowujący skrobię ulega poważnym zmianom fizjologicznym podczas zarówno procesu syntezy jak i degradacji skrobi zapasowej (**P6**).

Obserwowaną okresową degradację skrobi asymilacyjnej w nocy można podzielić na dwie fazy tj.: inicjację degradacji oraz rozkład amylopektyny i amylozy do maltozy, maltotriozy i glukozy. Regulacja degradacji skrobi w liściach przebiega w cyklu dobowym. W standardowych warunkach (dzień nie dłuższy niż 16 h) skrobia jest syntetyzowana w fazie świetlnej, a wszystkie ziarna skrobi przejściowej ulegają rozkładowi w trakcie nocy (Smith i Zeeman 2020). Przez pierwsze dwie godziny w ciemności proces degradacji skrobi ulega przyspieszeniu, a następnie przebiega ze stałą szybkością. Dynamika degradacji skrobi zależy od długości dnia i intensywności syntezy skrobi, tj. im mniejsza szybkość syntezy skrobi, tym mniejsza szybkość jej rozkładu (Orzechowski 2008).

Ziarna skrobi natywnej są niezbyt dobrym substratem dla większości enzymów amylolitycznych ze względu na ich zwartą strukturę. Przez wiele lat uważano, że α -amylazy (EC 2.4.1.1) inicjują degradację ziaren skrobi w chloroplastach, ale wyniki badań ostatnich kilkunastu lat kwestionują tę hipotezę (Smith i Zeeman 2020, Vikso-Nielsen i in. 1997). W chloroplastach ziemniaka za rozkład skrobi asymilacyjnej w warunkach optymalnych dla wzrostu roślin odpowiada głównie β -amylaza (EC 2.4.1.2) i enzym usuwający rozgałęzienia (Izoamylaza, EC 3.2.1.68) (Smith i Zeeman 2020). Te dwa enzymy hydrolizują odpowiednio

wiązania α -(1,4)- i α -(1,6)-glikozydowe. Głównym niskocząsteczkowym produktem ich połączonego działania jest β -maltoza, która jest eksportowana z chloroplastu do cytozolu za pośrednictwem transportera MEX1 (Apriyanto i in. 2022).

Aby rozluźnić zwartą strukturę skrobi i przez to ułatwić „atak” enzymom degradującym skrobię, jej rozkład powinien być poprzedzony fosforylacją powierzchni ziaren skrobi. Skrobia przejściowa ulega ciągłej fosforylacji zarówno podczas biosyntezy jak również w trakcie jej rozkładu w ciemności, przy czym stopień fosforylacji skrobi jest wyższy podczas rozkładu skrobi (Ritte i in. 2004). Fosforylacja skrobi jest katalizowana przez dwie dikinazy: α -glukan, woda (GWD, EC 2.7.9.4) i α -fosfoglukan, woda (PWD/GWD3, EC 2.7.9.5). GWD specyficznie fosforyluje głównie grupę hydroksylową w cząsteczce glukozy w pozycji C6 oraz w znacznie mniejszym stopniu grupę hydroksylową w cząsteczce glukozy w pozycji C3. Natomiast PWD fosforyluje grupę hydroksylową w cząsteczce glukozy w pozycji C3 w cząsteczce amylopektyny już wcześniej ufosforylowanej przez GWD (Ritte i in. 2006). Należy jednak zauważyć, że znane są też wyniki badań wykorzystujące nierozgałęzioną maltodekstrynę jako substrat, które wskazują, że wstępna fosforylacja przez GWD nie jest konieczna do działania PWD (Hejazi i in. 2008, Hejazi i in. 2009). Zatem PWD fosforyluje także nieprefosforylowane łańcuchy glukanowe w maltodekstrynie, niemniej jednak nie znajduje to potwierdzenia w wynikach badań z użyciem ziaren skrobi natywnej wyizolowanych z ziemniaka. Być może mamy tu do czynienia z pewnymi ograniczeniami w dostępności metod analitycznych. Te metodyczne ograniczenia mogą polegać na niedostatecznej czułości stosowanych metod analitycznych, w których wykorzystywane są radioaktywne substraty. Może to też mieć związek z trudnościami w przeprowadzeniu odpowiednich reakcji kontrolnych gdyż trudno jest uzyskać ziarna skrobi bez reszt fosforanowych. Nie mniej jednak bezsporny jest fakt, że zarówno GWD jak i PWD preferencyjnie działają na powierzchnię krystaliczną amylopektyny, a fosforylacja za pośrednictwem GWD umożliwia przejście powierzchni granulki ze stanu stałego do stanu bardziej rozpuszczalnego, inicjując amyloлизę lub fosforolizę amylopektyny. Działanie GWD jest powszechnie akceptowane jako proces początkowy w degradacji skrobi (Smith i Zeeman 2020). W skrobi izolowanej z ziemniaka większość estrów fosforanowych jest związana w pozycji C6 (70–80%), i tylko 20–30% w pozycji C3. Podczas przechowywania bulw ziemniaka około 0,5% reszt glukozy w skrobi zapasowej ulega fosforylacji, natomiast poziom fosforylacji w skrobi przejściowej w chloroplastach nie przekracza 0,1%. Wykorzystując izoamylazę do hydrolizy zewnętrznych łańcuchów na powierzchni ziarna skrobi wykazano, że łańcuchy pojedynczo ufosforylowane

miały długość od 7 do 23 reszt glukozy, natomiast podwójnie ufosforylowane miały długość powyżej 16 reszt glukozy w pojedynczym łańcuchu (**P4**).

Fosforylacja skrobi jest etapem przygotowawczym we właściwym procesie jej rozkładu, gdyż powoduje rozluźnienie powierzchni ziaren skrobi, a tym samym wpływa korzystnie na aktywność β -amylazy (Edner i in 2007). β -Amylaza jest specyficzną maltohydrolazą α -1,4-D-glukanu, która katalizuje hydrolizę wiązań α -(1,4)-glikozydowych w polisacharydach w celu odłączenia kolejnych jednostek β -maltozy od nieredukujących końców łańcuchów. Substratami dla β -amylazy są łańcuchy oligosacharydowe, które nie są rozgałęzione i nieufosforylowane. β -amylaza nie jest w stanie ominąć w trakcie hydrolizy wiązań α -(1,6)-glikozydowych, ani estrów fosforanowych w pozycjach C6 lub C3 w łańcuchu α -poliglukanu (Edner i in. 2007). Co więcej, zarówno β -maltoza jak i cyklodekstryna są inhibitorami β -amylazy (Kang i in. 2004, Thoma i Koshland, 1960). Ograniczenie jakie przejawia β -amylaza w stosunku do ufosforylowanych substratów sprawia, że w przypadku prawidłowej degradacji skrobi konieczne jest przed jej rozpoczęciem usunięcie estrów fosforanowych. Zatem ufosforylowanie skrobi jest w znacznym stopniu przejściowe i w trakcie doby następuje cykl fosforylacji-defosforylacji na powierzchni ziaren skrobi (Smith i Zeeman 2020). W genomie *Arabidopsis thaliana* są trzy domniemane geny kodujące fosfatazy, mogące wykorzystywać ufosforylowaną skrobię jako substrat i zlokalizowane są w plastydach. Enzymami tymi są: glukan phosphatase Starch Excess4 (SEX4; EC 3.1.3.48), SEX4-like phosphatase LSF1 i LSF2 (SEX4-like phosphatase 1 and 2). Umożliwiają one ciągłą degradację skrobi asymilacyjnej w cyklu dobowym (Apriyanto i in. 2022).

β -maltoza powstająca w jednoetapowej reakcji katalizowanej przez β -amylazę zostaje przeniesiona do cytoplazmy gdzie ulega dalszej przemianie w reakcji katalizowanej przez cytoplazmatyczną izoformę 4- α -glukanotransferazy (enzym dysproporcjonujący, DPE2, EC 2.4.1.25) (Smith i Zeeman 2020). W wyniku tej reakcji do cytoplazmy uwalniana jest jedna reszta glukozy, a druga cząsteczka glukozy jest wbudowana w rozpuszczalny heteroglukan (SGH). Uwolniona reszta glukozy jest następnie fosforylowana przez heksokinazę, podczas gdy heteroglukan ulega fosforolizie do glukozy-1-fosforanu (G1P) w reakcji katalizowanej przez cytozolową izoformę fosforylasy glukanów (PHO2, EC 2.4.1.1) (Fettke i in. 2006). Glukozy-1-fosforan jest źródłem fosforanów heksoz podczas syntezy sacharozy. Oprócz β -maltozy, w procesie degradacji β -amylolitycznej łańcuchów składających się z nieparzystej liczby reszt glukozyliwych w chloroplastach powstaje również pewna ilość maltotrioz (Chia i in., 2004; Lu i in., 2006, Lütken i in. 2010). Maltotriozy dalej są przekształcane przez chloroplastową izoformę 4- α -glukanotransferazy (DPE1), która różni się od swojej cytozolowej

izoformy DPE2 nie tylko lokalizacją w komórce i sekwencją aminokwasową, ale przede wszystkim specyficnością substratową (Lütken i in. 2010). W przeciwieństwie do DPE2, DPE1 nie wykorzystuje jako substratu wyłącznie β -maltozę, lecz może katalizować odwracalną reakcję również z maltotriozą i dłuższymi maltooligosacharydami. W przypadku, kiedy donorem reszt glukozylowych jest maltotrioza DPE1 w reakcji transglukozytacji może wytworzyć z glukozy jako akceptora maltotetraozę (G4) lub gdy akceptorem jest β -maltoza - maltopentaozę (G5). Oba nowopowstałe z maltotriozy maltooligosacharydy mogą być już hydrolizowane przez β -amylazę, co w efekcie końcowym umożliwia całkowitą hydrolizę skrobi w chloroplastach. Z kolei niewielka ilość uwolnionej glukozy w reakcji katalizowanej przez DPE1 lub przez izoamylazę jest eksportowana z chloroplastu przez transporter glukozy do cytoplazmy (Apriyanto i in. 2022; Samojedny i Orzechowski 2007).

Fosforoliza skrobi z udziałem chloroplastowej izoformy fosforylasy glukanów PHO1 może być alternatywą lub dodatkiem do rozkładu hydrolitycznego skrobi występującej w plastydach. Analiza mutantu *A. thaliana* z wyciszonym genem plastydowej fosforylasy glukanów wykazała, że nawet bez większych zmian w akumulacji skrobi w ciągu dnia i jej degradacji w nocy, roślina ta wykazuje zmniejszoną tolerancję na stresy abiotyczne (Zeeman i in. 2004).

Cel badań

- 1. Charakterystyka nowego białka uczestniczącego w regulacji metabolizmu skrobi w ziemniaku.***
- 2. Bioinformatyczna analiza stabilności kompleksów β -amylazy z ufosforylowanymi maltooligosacharydami.***
- 3. Poznanie przebiegu rozkładu skrobi chloroplastowej w liściach ziemniaka indukowanej niskimi temperaturami.***

Cel 1 Charakterystyka nowego białka uczestniczącego w regulacji metabolizmu skrobi w ziemniaku.

*Identyfikacja i charakterystyka dikinazy α -fosfoglukan, woda PWD/GWD3 (EC 2.7.9.5) z *S. tuberosum*.*

W ziarnach skrobi izolowanych z wielu gatunków roślin obecność ufosforylowanych reszt glukozy jest zjawiskiem dość powszechnym. Częstość występowania ufosforylowanych reszt glukozy w ziarnach skrobi niezmodyfikowanej z ziemniaka waha się od 0,1 do 1%. Ta zmienność wiąże się z typem skrobi. W skrobi zapasowej jest więcej fosforanów niż w skrobi chloroplastowej. Jak również ilość ufosforylowanych reszt glukozy zmniejsza się wraz ze

wzrostem wielkości granulek, zarówno w pozycji C3, jak i C6 (Helle i in. 2019). W trakcie pobytu w Poczdamie w latach 2002-2004, realizując jeden z projektów analizowałem białka uzyskane z liści oraz bulw ziemniaka specyficznie związane z kuleczkami agarozowymi pokrytymi maltoheptaosą. Poddając elektroforezie SDS-PAGE, a następnie identyfikacji z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF, spośród kilkunastu polipeptydów zidentyfikowałem jeden o masie cząsteczkowej ok. 130 kDa, wykazujący wysokie podobieństwo w sekwencji do fosfodikinazy α -glukan, woda (PWD/GWD3; EC 2.7.9.5) z *A. thaliana*. Ten nowy polipeptyd nazwałem StGWD3.

Swoje badania nad nowo zidentyfikowanym białkiem kontynuowałem po powrocie do SGGW, finansując je z projektów Rektora SGGW oraz projektu własnego KBN, w których byłem kierownikiem. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w **P2** oraz były prezentowane podczas konferencji i sympozjów naukowych: **RK2, PK5-PK8, PK12**. W pierwszym etapie badań opracowano metodę oczyszczania StGWD3, stosując chromatografię powinowactwa na kolumnie agarozowej z maltoheptaosą i SDS-PAGE. Otrzymano mieszaninę białek w formie prążków, które uległy rozdziałowi w żelu poliakrylamidowym. Wszystkie te prążki wycięto i po odpowiednim przygotowaniu hydrolizowano trypsyną. Masy cząsteczkowe otrzymanych peptydów analizowano za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF. Wyniki mas cząsteczkowych analizowano *in silico*, z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi bioinformatycznych. Jeden z analizowanych prążków białkowych miał masę cząsteczkową około $125 \pm 3,5$ kDa. Przeszukanie dostępnych baz danych sekwencji umożliwiło identyfikację sekwencji tego polipeptydu na poziomie 31%, a 33 z 68 przeszukanych mas peptydów miało identyczną masę cząsteczkową, jak sekwencje peptydów po hydrolizie trypsyną StGWD3. Całą procedurę oczyszczania StGWD3 powtórzono kilkunastokrotnie, tak aby to białko można było zastosować jako antygen dla produkcji poliklonalnych przeciwciał (anty-StGWD3) przez firmę Eurogentec w Belgii. Po oczyszczeniu surowicy uzyskano królicze przeciwciała poliklonalne, które wykorzystano do analiz western blot i immunolokalizacji StGWD w różnych tkankach ziemniaka. Analizy western blot białek wyizolowanych z bulw ziemniaka w różnym stanie fizjologicznym z przeciwciałem poliklonalnym skierowanym przeciwko StGWD3 wykazały obecność białka StGWD3 we frakcji białek rozpuszczalnych wyizolowanych z bulw przechowywanych 3 tygodnie w temperaturze pokojowej bez światła. W przypadku białek izolowanych z bulw przechowywanych w temperaturze 4°C przez 8 tygodni lub w późnej fazie kiełkowania (długość pędów przekraczała 10–15 cm) nie uzyskano wyraźnego sygnału immunochemicznego odpowiadającego masie cząsteczkowej StGWD3. Wśród białek wyizolowanych z bulw w początkowej fazie kiełkowania (długość pędów około 2 cm)

stwierdzono obecność StGWD3 we frakcji białek rozpuszczalnych. Nie stwierdzono sygnału immunocytochemicznego dla białek o masie cząsteczkowej odpowiadającej masie cząsteczkowej StGWD3 we frakcjach białkowych izolowanych z bulw w trakcie ich powstawania, gdy dominuje synteza ziaren skrobi nad jej rozkładem. W białkach wyizolowanych z liści w cyklu dobowym w trakcie dnia, nie stwierdzono żadnych zmian w poziomie StGWD3. Przy użyciu poliklonalnego przeciwciała anti-StGWD3 zlokalizowano białko StGWD3 w bulwach i liściach. Analizy z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego wykazały, że StGWD3 była obecna w ziarnach skrobi powstałych w amyloplastach bulw. W liściach StGWD3 była obecna w chloroplastach komórek palisadowych i miękiszu gąbczastego. StGWD3 najwyraźniej akumulowała się na ziarnach skrobi, o czym świadczy wzrost liczby chloroplastów znakowanych poliklonalnymi przeciwciałami anti-StGWD3. Nie zaobserwowano oznakowania fluorescencyjnego ani ziaren złota koloidalnego w ziarnach skrobi i ścianach komórkowych, gdy w procedurze pominięto przeciwciało pierwszorzędowe (próba kontrolna) (**P2**).

Równoległe z pracami mającymi na celu umożliwienie analizy obecności i zmian poziomu białka StGWD3, podjęto udaną próbę sklonowania pełnej długości genu kodującego StGWD w *S. tuberosum*. Pełna sekwencja cDNA *StGWD3* zawiera otwartą ramkę odczytu (ORF) o długości 3609 bp, (GenBank: GU045560.1; GI:270269269). *StGWD3* koduje białko składające się z 1202 aminokwasów, a obliczona masa cząsteczkowa tego polipeptydu wynosi 132,27 kDa. Z kolei punkt izoelektryczny StGWD wynosi 5,8. Analiza BLAST sekwencji aminokwasów StGWD3 ujawniła obecność dwóch konserwatywnych domen: C-końcowa domena wiążąca nukleotyd PPKK_N (domena wiążąca PEP/pirogronian; Pfam: PF01326) i N-końcowy moduł wiążący skrobię CBM20 (Pfam: PF00686). Pomędzy tymi dwiema domenami znajduje się region łączący, złożony z 450 aminokwasów, w którym zidentyfikowano domenę [TL]-S-H fosfohistydyny (COG: COG 00391). Sekwencja StGWD3 ma 58,6% identyczności i 75,3% podobieństwa do AtGWD3 i wykazuje podobny poziom homologii do domniemanego GWD3 z *Oryza sativa* (59,8% identyczności i 75,9% podobieństwa). Sekwencja StGWD3 ma jedynie 29,7% identyczności i 48,2% podobieństwa do białka StGWD1 (**P2**).

Obecność transkryptów *StGWD3* (GenBank:GU0455600) potwierdzono w całkowitym RNA wyizolowanym zarówno z liści, jak i bulw. W dalszych eksperymentach analizowano ekspresję StGWD3 zarówno w tkankach hetero-, jak i autotroficznych, czyli w bulwach w różnych stanach fizjologicznych oraz w liściach w trakcie cyklu dobowego. Zmiany poziomu mRNA kodującego obie dikinazy: StGWD1 i StGWD3 w liściach, w zależności od cyklu

dziennego analizowano metodą RT-PCR. Użyta Technika pozwoliła na względną ocenę poziomów transkryptów *StGWD1* i *StGWD3* w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego (housekeeping gene) kodującego czynnik elongacyjny - EF1-a. Wyniki RT-PCR wyraźnie wskazują na zmianę ilości transkryptów *StGWD1* i *StGWD3* w cyklu dobowym. Ekspresja *StGWD3* w trakcie dnia wzrastała aż do 13 godziny naświetlania, kiedy to osiągnęła maksymalny poziom. Z kolei ekspresja *StGWD1* osiągnęła maksimum po 10 godzinach naświetlania, poprzedzając maksymalną wartość ekspresji *StGWD3*. Te zmiany w ekspresji genów kodujących obie dikinazy glukanów, woda potwierdzają teorię o następczym działaniu *StGWD3* w stosunku do *StGWD1*, czyli na już ufosforylowaną wcześniej przez *StGWD1* skrobię. Wahania ekspresji *StGWD3* w ciągu cyklu dobowego nie były tak wyraźne jak w przypadku *StGWD1*. Najniższy poziom ekspresji *StGWD3* zmierzono 4 godziny po wyłączeniu światła i był on ponad 2,5 razy niższy od maksymalnego poziomu ekspresji tego genu. Z kolei najniższa ekspresja *StGWD1* wystąpiła również 4 godziny po włączeniu światła i była około siedmiokrotnie niższa niż jej maksymalna wartość w cyklu dobowym (**P2**).

Biorąc pod uwagę fakt, że gen *StGWD3* ulega ekspresji zarówno w liściach, jak i bulwach ziemniaka, badano techniką RT-PCR *in situ* lokalizację jego ekspresji w liściach autotroficznych oraz w bulwach zbieranych we wczesnej fazie wytwarzania się bulw, czyli w fazie kwitnienia roślin lub w bulwach przechowywanych przez 8 tygodni w 4°C. Wyraźne sygnały ekspresji *StGWD3* uzyskano zarówno na skrawkach bulw zebranych w fazie tuberyzacji jak i tych przechowywanych w niskiej temperaturze. Sygnał immunocytochemiczny był rozprawdany w cytoplazmie wszystkich komórek miąższu. W próbkach liści nie stwierdzono sygnału potwierdzającego obecność genu *StGWD3* w młodych liściach, a jedynie słaby sygnał zaobserwowano w pełni rozwiniętych liściach autotroficznych (**P2**).

Posiadając już wstępne wyniki badań nad dikinazą fosfoglukan, woda (*StGWD3/StPWD*) z *S. tuberosum* oraz korzystając z kilkumiesięcznego pobytu w Uniwersytecie w Poznaniu w 2015 roku w grupie badawczej prof. J. Fettke zaproponowałem napisanie artykułu przeglądowego (**P4**) na temat fosforylacji skrobi. W tym artykule którego jestem pomysłodawcą została opisana budowa skrobi, jej naturalnie występujące modyfikacje oraz wpływ tych modyfikacji na strukturę ziaren skrobi w kontekście możliwości degradacji natywnych ziaren skrobi. Krótko omówiono proces biosyntezy i degradacji skrobi w roślinach wyższych, zarówno chloroplastowej jak i zapasowej w tkankach niefotosyntetyzujących roślin. Niemniej jednak najważniejszym celem tego artykułu było zebrane dotychczasowej wiedzy na temat enzymów fosforylujących skrobię w roślinie modelowej *A. thaliana* i w *S. tuberosum*

oraz określenie znaczenia fizjologicznego poszczególnych izoenzymów dikinaz glukan, woda i wskazanie dalszych kierunków badań.

Podsumowując wiedzę dotyczącą enzymów fosforylujących skrobię w plastydach roślin wyższych wiadomo, że są to enzymy monomeryczne, czyli funkcję katalityczną spełniają jako pojedyncze polipeptydy (**P4**). Wykazują liczne podobieństwa w sekwencjach aminokwasowych, a także w mechanizmie katalizowanych reakcji. Największą homologię pomiędzy tymi enzymami stwierdzono w regionie C-końcowym, który bardzo przypomina domenę wiążącą ATP w innych poznanych enzymach (**P2**). Kolejną domeną charakterystyczną w budowie tych enzymów jest drugi region nazywany domeną fosfohistydyny. Konserwatywna reszta histydyny w tej domenie jest zdolna do przyjęcia grupy β -fosforanowej z ATP, co wykazano w eksperymentach ze znakowaniem radioaktywnym przy użyciu rekombinowanego GWD (Hejazi i in. 2012). Z kolei grupa γ -fosforanowa z ATP jest przenoszona na cząsteczkę wody. Największe różnice w sekwencjach aminokwasowych GWD i PWD dotyczą ich niekatalitycznego regionu N-końcowego, odpowiedzialnego za związanie skrobi (**P2**). W przypadku PWD N-koniec zawiera pojedynczą domenę wiążącą skrobię (SBD) należącą do dobrze scharakteryzowanej rodziny modułów wiążących węglowodany (Carbohydrate Binding Module) CBM20. W przeciwieństwie do PWD, sekwencja N-końcowa domeny wiążącej skrobię w GWD jest mniej powtarzalna, ale można ją przypisać do rodziny domen wiążących węglowodany CBM45 (**P4**).

Obniżona ekspresja genu kodującego GWD lub PWD w *A. thaliana* spowodowała opóźnienie wzrostu roślin, pięciokrotne zwiększenie zawartości skrobi przejściowej w chloroplastach, w porównaniu do roślin typu dzikiego (WT) (Yu i in. 2001, Kottling i in. 2005). Analizy mikroskopowe wykazały że jest to spowodowane większą ilością chloroplastów, większymi ziarnami skrobi w porównaniu do roślin typu dzikiego. A powierzchnia ziaren skrobi z roślin transgenicznych była mniej regularna niż w przypadku skrobi roślin WT (Mahlow i in. 2014). W transgenicznych liniach ziemniaków o obniżonej ekspresji StGWD obserwowano powstawanie więcej, ale mniejszych bulw w porównaniu do roślin typu dzikiego. Ponadto mutacja tego genu miała wpływ na zawartość amylozy i lepkość wyizolowanej skrobi (Vikso-Nielsen i in. 2001, Kozlov i in. 2007). Niestety do tej pory nie uzyskano transgenicznych linii ziemniaka z obniżoną ekspresją StPWD/StGWD3. Przeprowadzone przez mnie i mój zespół badawczy badania lokalizacji zarówno mRNA kodującego *StGWD3* jak i samego białka potwierdziły obecność StGWD3 w zarówno w liściach jak i bulwach ziemniaka, w różnych fazach fizjologicznych bulw (**P2**).

Stosunkowo niewiele wiadomo na temat regulacji aktywności dikinazy α -glukan, woda (GWD) i w zasadzie nic nie wiadomo na temat regulacji aktywności dikinazy α -fosfoglukan, woda (PWD). Najczęściej proponowany jest potranslacyjny model kontroli aktywności tych enzymów (P4). Opisano regulację aktywności StGWD za pośrednictwem potencjału oksydoredukcyjnego (Mikkelsen i in. 2005). Miałaby ona polegać na utworzeniu specyficznego wewnątrzcząsteczkowego wiązania disiarczowego pomiędzy dwiema resztami cysteiny, które są obecne w sekwencji StGWD. Taka modyfikacja powodowałaby, że StGWD jest nieaktywna w postaci utlenionej, ale zachowuje jednocześnie zdolność do wiązania skrobi. Zmiana potencjału redoks w chloroplastach i redukcja mostku disiarczowego w StGWD aktywuje ten enzym (Mikkelsen i in. 2005). Ponadto stwierdzono, że rozpuszczalna (a więc nie związana z ziarnami skrobi) postać StGWD zawiera w swoim aminokwasowym składzie reszty cysteiny w stanie całkowicie zredukowanym (Mikkelsen i in. 2005). Pomimo podobieństw w sekwencji AtGWD i StGWD, w tym występowaniu reszt cysteiny, mechanizmy regulacji aktywności tych dwóch enzymów są różne. Analiza odpowiednich mutantów roślin nie potwierdziła bowiem mechanizmu regulacji aktywności zależnego od potencjału oksydoredukcyjnego. Szybkość degradacji skrobi w takich roślinach w porównaniu z roślinami typu dzikiego nie zmieniała się w zależności od potencjału oksydoredukcyjnego (Skeffington i in. 2014).

Ostatnie badania podkreślają biotechnologiczny potencjał zmian w fosforylacji skrobi w głównych roślinach uprawnych i łączenie tej naturalnej modyfikacji skrobi z produkcją biomasy. Podjęto kilka prób zmiany ekspresji homologów GWD w ziemniakach (Lorberth i in. 1998, Vikso-Nielsen i in. 2001, Kozlow i in. 2007), jęczmieniu (Carciofi i in. 2011), kukurydzy (Weise i in. 2012), pszenicy (Ral i in. 2012) i ryżu (Hirose i in. 2013). Uzyskane mutanty analizowano mając na celu określenie cech ważnych ekonomicznie, takich jak właściwości fizykochemiczne skrobi, zawartość skrobi i biomasa roślin. Wyżej wymienione rośliny gromadzą duże ilości skrobi zapasowej w bulwach lub nasionach, tak ważnych dla rolnictwa światowego (Vilpoux i Silveira, Junior 2023). Wcześniej sygnalizowano opóźnienie wzrostu modelowych roślin transgenicznych *A. thaliana* z obniżoną ekspresją AtGWD. Mutanty ryżu z obniżoną aktywnością OsGWD, a także siewki kukurydzy o zredukowanym poziomie ekspresji *ZmGWD* charakteryzują się zwiększoną akumulacją skrobi w liściach, ale bez widocznych różnic we wzroście wegetatywnym (Weise i in. 2012). Jednakże w badaniach polowych ogólny plon ziarna ryżu ze zredukowaną aktywnością OsGWD był o 30% niższy w porównaniu z WT. Synteza skrobi w tkankach heterotroficznych zależy od ilości węglowodanów dostarczanych przez organy fotosyntetyzujące, czyli liście. Zaburzona degradacja skrobi chloroplastowej spowodowana niedoborem aktywności GWD może

prowadzić do zmniejszenia eksportu cukrów do tkanki heterotroficznej i ogólnej redukcji biomasy roślin, a w szczególności nasion i bulw (**P4**).

Chociaż skrobia zapasowa z bulw i nasion zbóż stanowi główne źródło tego polisacharydu w naszej diecie, stosunkowo niewiele wiadomo na temat fosforylacji skrobi, szczególnie w bielmie zbóż. W wyniku heterologicznej nadekspresji *StGWD* w amyloplastach jęczmienia dziesięciokrotnie wzrosła zawartość fosforanów w skrobi zapasowej w porównaniu do roślin typu dzikiego (Carciofi i in. 2011). Wysoka zawartość ufosforylowanej skrobi w tych transgenicznym liniach jęczmienia powoduje zmienioną morfologię granulek i wpływa na właściwości kleikowania takiej skrobi. Wiele zastosowań przemysłowych i spożywczych skrobi wymaga procesu kleikowania skrobi. W tym procesie półkryształiczna struktura skrobi zostaje stopniowo zakłócona przez ogrzewanie w roztworze. Początkowo ogrzewanie nierozpuszczalnych ziaren skrobi w roztworze powoduje ich pęcznienie, następnie zaczyna się kleikowanie, czyli rozlewanie się dobrze uwodnionych ziaren skrobi i w końcu powstaje lekko opalizujący kleik skrobiowy, odznaczający się wysoką lepkością. W zależności od botanicznego pochodzenia skrobi temperatury kleikowania mieszczą się w zakresie ok. 37-70°C, a dla skrobi izolowanej z bulw ziemniaka od ok. 50 do 75°C (Juszczak i in. 2014). Temperatura kleikowania oczyszczonych ziaren skrobi z roślin jęczmienia, z nadekspresją *StGWD*, o podwyższonej zawartości reszt fosforanowych jest niższa w porównaniu do ziaren skrobi z roślin typu dzikiego (Carciofi i in. 2011). Przypuszcza się, że spowodowane to lepszym uwodnieniem tak zmodyfikowanej skrobi. Ma to ogromne znaczenie dla obniżenia kosztów w przetwórstwie żywności. Analogiczne wyniki badań uzyskano przy redukcji aktywności *StGWD* w ziemniaku. Zmniejszona zawartość fosforanów zwiększała temperaturę kleikowania ziarenek skrobi wyizolowanych z takich mutantów. Badania z mutantami pszenicy z obniżoną ekspresją *GWD*, przeprowadzone w warunkach szklarniowych jak i polowych dały zaskakujące wyniki (Ral i in. 2012). Okazało się, że taka modyfikacja metabolizmu skrobi w pszenicy powoduje wzrost biomasy i plonu roślin transgenicznych w porównaniu do roślin typu dzikiego. Niestety nie wiadomo jak połączyć obniżoną ekspresję *GWD* w pszenicy ze zwiększoną wydajnością plonu, niemniej jednak jest to cecha niezwykle pożądana z punktu widzenia produkcji rolniczej (Bowerman i in. 2016, Ral i in. 2012).

Podsumowując, zawartość fosforanów w skrobi można modyfikować poprzez zmianę ekspresji *GWD* w roślinach uprawnych, co może zwiększać zawartość skrobi, jej właściwości fizyko-chemiczne, a nawet plon roślin. W szczególności wysoce pożądana byłaby zmiana w ekspresji *GWD* w liściach lub organach zapasowych, tak aby wpłynąć na akumulację skrobi, w zależności od potrzeb.

Patrząc w przyszłość warto podjąć próbę wyjaśnienia w jaki sposób dikinazy glukan, woda działają na substrat. Nie jest jasne, czy enzym działa na całą powierzchnię ziaren skrobi, jaka jest głębokość penetracji amylopektyny przez enzym i czy ta głębokość penetracji jest również powiązana z reakcją fosforylacji skrobi. Dodatkowo wysoce prawdopodobna jest funkcjonalna interakcja ze znanymi lub nawet dotychczas nie poznanymi białkami/enzymami podczas działania GWD i PWD na ziarna skrobi. Pojawiają się wątpliwości dotyczące sposobu działania GWD i PWD na substrat. Zaskakujące są również informacje dotyczące przeszukania genomów prymitywnych jednokomórkowych alg zielonych. Na ich podstawie przypuszcza się, że aż pięć sekwencji w tych algach może kodować różne enzymy wykorzystujące poliglukany jako substraty w reakcji fosforylacji (Derelle i in. 2006, Rensing i in. 2008). Mimo wielu szeroko zakrojonych badań fizjologiczna rola poszczególnych izoenzymów fosforylujących polisacharydy w roślinach wyższych nadal nie jest pełna. Chociaż wiadomo już sporo o tej grupie enzymów to wciąż wiele pozostaje do odkrycia.

Cel 2: Bioinformatyczna analiza stabilności kompleksów β -amylazy z ufosforylowanymi maltooligosacharydami.

W ramach realizacji projektu finansowanego przez KBN o numerze N302061134 i we współpracy z pracownikami Katedry Biometrii i Bioinformatyki przeprowadzono pionierskie w swoim charakterze eksperymenty *in silico* w celu zbadania znaczenia fosforylacji maltooligosacharydów dla stabilności kompleksu enzym-substrat – dla β -amylazy, czyli kluczowego enzymu w procesie degradacji skrobi w ziemniaku. Badano energię wiązania kilku maltooligosacharydów, w których grupy hydroksylowe w resztach glukozytowych były ufosforylowane jednokrotnie w pozycji C6 lub podwójnie w pozycjach C6 i C3. Do analiz kontrolnych stosowano te same maltooligosacharydy, ale nie ufosforylowane. W obliczeniach wykorzystano strukturalny model enzymu skonstruowanego dla sekwencji aminokwasowej β -amylazy z *Solanum tuberosum*. W efekcie tych badań uzyskano wyniki energii dokowania DOCK6 oraz bardziej zaawansowaną miarę energii dokowania, zwaną Glide Score. Dla dłuższych maltooligosacharydów zaobserwowano wzrost ich powinowactwa do centrum aktywnego β -amylazy. Natomiast dla maltooligosacharydów składających się z tej samej ilości reszt glukozylowych, ale rozgałęzionych stwierdzono spadek powinowactwa do centrum aktywnego β -amylazy. Obliczone energie stabilizacji kompleksów β -amylazy i ufosforylowanych form: maltozy, maltotriozy i maltotetraozy, dla energii dokowania DOCK6, były nawet do 75% wyższe niż dla nieufosforylowanych form tych samych oligosacharydów. Może to wskazywać na ich silny inhibitorowy charakter w reakcji katalizowanej przez

β -amylazę, co jednoznacznie potwierdza wcześniejsze wyniki badań *in vitro* (Vikso-Nielsen i in. 1997). W przypadku maltoheptaozy i maltooktaozy zaobserwowano odwrotną tendencję: fosforylacja grupy hydroksylowej w pozycji C6 lub C3 reszty glukozy nieznacznie zmniejszała energię wiązania liniowych oligosacharydów i znacząco zmniejszała skłonność do wiązania z centrum aktywnym β -amylazy. Uzyskane przez nas wyniki analiz bioinformatycznych potwierdzają zatem, że ufosforylowane, rozgałęzione oligosacharydy niechętnie łączą się z centrum aktywnym β -amylazy, co znacznie ogranicza możliwość ich hydrolizy przez ten enzym. Co więcej, szczegółowa analiza centrum aktywnego β -amylazy z *S. tuberosum* i możliwego ułożenia przestrzennego substratów takich jak np. ufosforylowanej w pozycji C6 maltooktaozy wskazuje, że grupa fosforanowa tego maltooligosacharydu „wystaje” z centrum aktywnego β -amylazy. Odmienne zjawisko zaobserwowano w przypadku 2-krotnie krótszego oligosacharydu - maltotetraozy i jej ufosforylowanego odpowiednika w pozycji C6. W przypadku tego substratu grupa ortofosforanowa tworzy wiązania wodorowe z bocznymi łańcuchami argininy i lizyny w sekwencji β -amylazy, które mogą być odpowiedzialne za widoczne przesunięcie substratu w kierunku reszt tyrozyny i waliny w sekwencji β -amylazy. Umożliwia to nowe interakcje pomiędzy centrum aktywnym enzymu, a substratem. Wprawdzie obliczona energia wiązania substratu jest większa niż w przypadku dłuższego oligosacharydu, ale prawdopodobny wpływ na reakcję katalityczną może polegać na tym, że obecność grupy fosforanowej może blokować interakcję pomiędzy potencjalną resztą kwasu glutaminowego Glu453 z centrum katalitycznego β -amylazy, a atakującą wiązanie glikozydowe cząsteczką wody. Gdyby zmiany konformacyjne w centrum aktywnym β -amylazy nie miały miejsca to woda powinna wejść w szczelinę centrum aktywnego, umożliwiając interakcję z C1 jednostki glukozylowej i zainicjować proces hydrolizy wiązania α -(1,4)-glikozydowego. Zaobserwowano spadek energii wiązania do centrum aktywnego β -amylazy w przypadku rozgałęzionych i ufosforylowanych dłuższych ligandów węglowodanowych. Zjawisko to można wyjaśnić tym, że β -amylaza hydrolizuje co drugie wiązanie α -(1,4)-glikozydowe, zaczynając od nieredukującego końca α -glukanów, ale enzym ten nie jest w stanie ominąć wiązań α -(1,6)-glikozydowych, które musi rozerwać izoamylaza. Grupa fosforanowa na końcu redukującym maltooligosacharydów może działać jak „kotwica”, która nie pozwala na wiązanie dłuższych ligandów w centrum aktywnym β -amylazy. Fosforylacja grup hydroksylowych w resztach glukozylowych krótkich ligandów oligowęglowodanowych zarówno w pozycjach C3, jak i C6 wpływa na ich zdolność do wiązania się z β -amylazą z *S. tuberosum*. Fosforylacja w pozycji C3 w liniowych maltooligosacharydach powoduje

zwiększenie energii dokowania takich substratów do centrum aktywnego β -amylazy, w porównaniu z niefosforylowanymi substratami. Fosforylacja skrobi w ziemniaku powoduje rozluźnienie powierzchni ziaren skrobi co zarazem rozpoczyna jej enzymatyczny rozkład. Wyniki tych badań opublikowano w **P1** oraz prezentowano w trakcie konferencji: **PK9-PK10**.

Cel 3 Poznanie przebiegu rozkładu skrobi chloroplastowej w liściach ziemniaka indukowanej niskimi temperaturami.

W toku ewolucji rośliny rozwinęły szereg mechanizmów umożliwiających im przetrwanie w nieoptymalnych warunkach. Zdolność roślin do aklimatyzacji w niskich temperaturach wynika z licznych zmian w ich metabolizmie, które obejmują m. in. zmiany w ekspresji genów, aktywności enzymów, stabilizacji fosfolipidów tworzących błony komórkowe oraz akumulacji rozpuszczalnych węglowodanów i białek (Kosová i in. 2007, Ruellandet i in. 2009, Krasensky i Jonak 2012). Ujemne temperatury po wschodach roślin mogą powodować uszkodzenia części nadziemnej roślin ziemniaka, opóźniając rozwój i potencjalnie zmniejszając plony. Rosnące zapotrzebowanie na żywność w związku ze wzrostem liczby ludności na świecie powoduje ciągłe poszerzanie zasięgu uprawy ziemniaków, głównie w krajach rozwijających się. Jedną z modyfikacji metabolicznych, która zwiększa tolerancję roślin na stres jest akumulacja cukrów rozpuszczalnych. Rozpuszczalne węglowodany odgrywają ważną rolę w ochronie komórek roślinnych przed uszkodzeniami powodowanymi przez chłód. Ochrona ta polega na dostarczaniu osmoprotektantów, składników energetycznych do komórek lub interakcji z dwuwarstwową błoną białkowo-lipidową otaczającą komórki (Yuanyuan i in. 2009). W liściach *A. thaliana* zaobserwowano, że chłód już po kilkudziesięciu minutach powoduje zwiększenie zawartości maltozy i maltotiozy do połowy ich maksymalnego zmierzonego stężenia (Kaplan i in. 2007). Rosnąca zawartość mono- i disacharydów w liściach stanowi dobrą ochronę dla roślin, zapewniając komórkom dodatkowy czas na produkcję odpowiednich białek stresowych i metabolitów w celu dostosowania metabolizmu i fizjologii rośliny do stresu niskiej temperatury (Patrick i un. 2013). Szybko rosnąca zawartość maltozy w liściach *A. thaliana*, spowodowana ekspozycją na niską temperaturę, wskazuje na znaczną rolę degradacji skrobi podczas początkowej reakcji tych roślin na chłód. Kluczową rolę w degradacji skrobi w liściach przypisuje się działaniu β -amylazy. W przypadku rośliny modelowej *A. thaliana* wykazano, że stres spowodowany niską temperaturą indukuje ekspresję jednego z izoenzymów β -amylazy – BMY8 (Kaplan i Guy 2004). Z kolei analiza mutantu *A. thaliana* z wyciszonym genem kodującym plastydową fosforylaze glukanów (PHO1) wykazała, że nawet bez większych

zmian w akumulacji skrobi w ciągu dnia i jej degradacji w nocy, rośliny transgeniczne wykazują zmniejszoną tolerancję na stresy abiotyczne (Weise i in. 2006).

Plastydowa fosforylaza glukanów (PHO1) jako aktywny enzym składa się z dwóch polipeptydów i może występować w liściach ziemniaka jako homodimer, który się składa się z dwóch podjednostek nazwanych PHO1a. W liściach wykryto także PHO1 w formie heterodimeru, który zbudowany jest z jednej podjednostki PHO1a oraz jednej nazwanej PHO1b (Sonnewald i in., 1995, Nakano i in., 1986). Z kolei w bulwach ziemniaka, PHO1 nie wykazuje struktury heterodimerycznej. Występuje wyłącznie jako homodimer złożony z 2 podjednostek PHO1a (Albrecht i in., 1998). Oba polipeptydy: PHO1a i PHO1b mają bardzo podobne sekwencje – wykazują ponad 80% identyczności aminokwasowej. Z tego wynika że polipeptyd PHO1a występuje zarówno w liściach jak i w bulwach ziemniaka, natomiast polipeptyd PHO1b tylko w liściach.

Vikso-Nielsen i in. (1997) w swojej publikacji zwrócili uwagę na niejednoznaczności i zbyt kontrowersyjne różnice w wynikach wcześniejszych badań dotyczących akumulacji węglowodanów w bulwach ziemniaka pod wpływem zimna. Badacze ci uważali, że te różnice mogą wynikać z niedoskonałości technik analitycznych, które czasami nie pozwalają na rozróżnienie aktywności różnych typów enzymów degradujących skrobię. Autorzy ci jednak podejrzewali, że takie rozbieżności mogą również wynikać z różnic odmianowych. Dlatego celem eksperymentów opisanych w **P4** była weryfikacja hipotezy, czy w liściach ziemniaków dwóch różnych odmian: Desiree i Russet Burbank poddanych działaniu temperatury 2°C przez 12 godzin wystąpią różne mechanizmy degradacji skrobi chloroplastowej. Analizowano dwie odmiany ziemniaka różniące się znacznie plonem i zawartością skrobi w bulwach. Russet Burbank to odmiana o dużym plonie bulw (Stark i in. 2007) i dużej zawartości skrobi w bulwach. Desiree to odmiana modelowa, która charakteryzuje się dość niskim plonem bulw i niską zawartością skrobi w bulwach (Kaminski i in. 2012). W ramach tych eksperymentów wykonano analizę ekspresji dwóch genów kodujących izoenzymy α -amylazy (*AMY21*, *AMY23*), 2 genów kodujących podjednostki wchodzące w skład plastydowej fosforylasy glukanów (*PHO1a* i *PHO1b*), genu kodującego β -amylazę (BAM), genu kodującego cytoplazmatyczny izoenzym fosforylasy glukanów (*PHO2/PHOH*) oraz genu referencyjnego *18SrRNA*. Ponadto analizowano zmiany aktywności α -amylazy, β -amylazy, fosforylasy glukanów i całkowitej ilości cukrów redukujących – głównie mono- i oligosacharydów. Nie zaobserwowano żadnych zmian w ekspresji obu genów kodujących α -amylazę w liściach. Z kolei zmierzona aktywność α -amylazy w liściach Desiree wahała się nieznacznie.

Początkowo nie ulegała zmianie pod wpływem niskiej temperatury, dopiero pod koniec trwania eksperymentu wzrosła. Analogiczne zmiany aktywności α -amylazy obserwowano w liściach odmiany Russet Burbank, przy czym względne wzrosty aktywności po 9 godzinach trwania stresu chłodu były wyższe niż w odmianie Desiree. Rola α -amylaz w degradacji skrobi w chloroplastach ziemniaków jest prawdopodobnie mniej istotna niż β -amylazy. Analiza ekspresji genu *BAM* w liściach odmiany Desiree wykazała znaczną indukcję syntezy mRNA kodującego β -amylazę. Tej zwiększonej ekspresji genu *BAM* jako efektu działania niskiej temperatury na rośliny, odpowiadała zwiększona aktywność β -amylazy przez cały czas trwania doświadczenia. Stwierdzono także 3-krotny wzrost zawartości cukrów redukujących w porównaniu do kontroli, co zaobserwowano już po 3 godzinach ekspozycji roślin na niską temperaturę. Analogiczna analiza przeprowadzona na liściach ziemniaka odmiany Russet Burbank wykazała brak zmian w ekspresji genu kodującego β -amylazę, co znalazło także odzwierciedlenie w braku zmian aktywności tego enzymu. W przeciwieństwie do odmiany Desiree, aktywność β -amylazy w liściach odmiany Russet Burbank nie wzrosła w niskiej temperaturze w porównaniu z roślinami kontrolnymi. W liściach odmiany Russet Burbank stwierdzono natomiast zwiększoną transkrypcję jednego z genów kodujących polipeptyd (PHO1b), wchodzący w skład aktywnego dimeru plastydowej izoformy fosforylasy glukanów (PHO1). Mimo to całkowita aktywność fosforylasy glukanów nie wzrastała od początku ekspozycji roślin na stres chłodu. W liściach odmiany Desiree, w początkowej fazie trwania eksperymentu nie obserwowano zmiany poziomu transkryptu genu kodującego polipeptyd PHO1b, po czym poziom transkrypcji tego genu spadł w 9 i 12 godzinie trwania stresu niskiej temperatury. Aktywność fosforylasy glukanów w liściach odmiany Desiree znacząco wzrosła po 3 godzinach trwania stresu, czyli bardzo podobnie do zaobserwowanego wzrostu aktywności β -amylazy. Podobne zjawisko obserwowano także w liściach odmiany Russet Burbank. W obu odmianach aktywność PHO wzrosła w statystycznie istotny sposób dopiero po 12 godzinach ekspozycji roślin na chłód. Uzyskane przez nas wyniki analiz zawartości cukrów redukujących wykazały, że w liściach kontrolnych odmiany Russet Burbank było o ok. 60% więcej cukrów redukujących niż w takich samych liściach odmiany Desiree. Dostępność dużej ilości cukrów redukujących w liściach odmiany Russet Burbank może opóźniać reakcję na chłód skutkującą degradacją skrobi chloroplastowej. Znaczna ilość cukrów redukujących w komórkach może służyć jako osmoprotektant w krótkotrwałym okresie stresu spowodowanego niską temperaturą. Niska temperatura spowodowała, że w liściach odmiany Desiree zawartość cukrów redukujących była trzykrotnie wyższa niż w roślinach kontrolnych już po 3 godzinach

ekspozycji na chłód. Następnie zawartość cukrów redukujących w roślinach poddanych stresowi spadła, ale ciągle pozostawała o ok. 30% wyższa niż w roślinach kontrolnych. W przypadku odmiany Russet Burbank przez 9 godzin ekspozycji roślin na chłód nie obserwowano istotnych zmian w zawartości cukrów redukujących, dopiero po 12 godzinach nastąpił ich niewielki wzrost w porównaniu do kontroli.

Podsumowując wyniki przedstawione w artykule **P3** należy stwierdzić istnienie znaczących różnic we wzorcach ekspresji genów i aktywności enzymów hydrolitycznych i fosforolitycznych skrobi. Uzyskane wyniki otworzyły też nowe perspektywy dla przyszłych badań, które uzupełnią wiedzę na temat tolerancji roślin na niekorzystne warunki środowiskowe, w tym stres niskiej temperatury.

Kontynuując tematykę badawczą dotyczącą wpływu niskiej temperatury na degradację skrobi w chloroplastach liści ziemniaka wykonano serię eksperymentów, a ich wyniki opisano w artykule **P5**. Analizowano różne parametry fizjologiczne takie jak: zawartość chlorofilu, współczynnik deficytu wody, stężenie aldehydu malonowego, poziom ekspresji genów kodujących StGWD (EC 2.7.9.4) i StPWD (EC 2.7.9.5) oraz genu kodującego dehydrogenazę NADH (EC 7.1.1.2). Dodatkowo oznaczano aktywności enzymów w żelach poliakrylamidowych dwóch transferaz zaangażowanych w proces rozkładu skrobi: fosforylasy glukanów PHO (EC 2.4.1.1) i enzymu dysproporcjonującego, DPE (EC 2.4.1.25). Dodatkowo z wykorzystaniem zymogramów analizowano aktywności enzymów amylolytycznych – bez rozróżnienia na specyficzną aktywność: α -amylazy (EC 3.2.1.1) i β -amylazy (EC 3.2.1.2). Do oznaczenia aktywności inwertazy kwaśnej (EC 3.2.1.26), enzymu hydrolizującego sacharozę zastosowano metodę spektrofotometryczną. W zebranych w trakcie doświadczenia próbkach liści oznaczono także poziom skrobi, glukozy, fruktozy oraz sacharozy. Sadzonki ziemniaka odmiany Russet Burbank po 5 tygodniach od wschodów poddano 12 godzinnemu działaniu niskiej temperatury w komorze fitotronowej - 2°C. Próby liści zbierano co 3 godziny z grupy roślin poddanych stresowi i rosnących w warunkach optymalnych, przy tym samym natężeniu światła i cyklu dobowym. Warto nadmienić, że większość wcześniejszych badań innych autorów dotyczących fizjologicznych i biochemicznych reakcji roślin ziemniaka na stres chłodu obejmowały eksperymenty, które trwały przez kilka tygodni lub kilka dni (Orawetz i in. 2016, Evers i in. 2012, Oufir i in. 2008). Rośliny przechodziły wówczas fazy adaptacji i aklimatyzacji do stresu niskiej temperatury. W naszych badaniach dotyczących zmian w degradacji skrobi po raz pierwszy w świecie skoncentrowaliśmy się na pierwszej fazie stresu nazywanej fazą alarmową, trwającej zwykle kilka godzin, kiedy to procesy kataboliczne przeważają nad procesami anabolicznymi w roślinach (Kosova i in. 2015).

W zebranych liściach zarówno z roślin kontrolnych jak i tych poddanych działaniu niskiej temperatury nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian we współczynniku deficytu wody RWC (relative water content). Świadczy to o tym, że krótkotrwałe działanie chłodem na rośliny ziemniaka nie powodowało odwodnienia liści, jak to ma miejsce w przypadku stresu suszy. Podobnie nie stwierdzono zmian w zawartości chlorofilu. Natomiast zawartość dialdehydu malonowego znacznie wzrosła po 6 godzinach ekspozycji na chłód. Dialdehyd malonowy jest markerem peroksydacji lipidów i jest powiązany ze stresem oksydacyjnym (Morales i in. 2019). Analizując metodą Real-Time RT-PCR zmiany poziomu transkryptów wybranych genów stwierdzono spadek ilości wskaźnikowego dla stresu chłodu genu kodującego jedną z podjednostek dehydrogenazy NADH już po 9 godzinach traktowania roślin niską temperaturą. Chłód spowodował zwiększoną ekspresję genów *StGWD* oraz *StPWD*, odpowiednio po 6 i 9 godzinach od rozpoczęcia ekspozycji roślin na chłód. Obserwowano też spadek zawartości skrobi w liściach ziemniaka poddanych stresowi ale dopiero po 9 godzinach działania chłodu. Wyniki te potwierdzają podstawową fizjologiczną rolę obu dikinaz w przygotowaniu powierzchni ziaren skrobi do jej degradacji. Zaobserwowano także po 12 godzinach działaniach niskich temperatur statystycznie istotny wzrost zawartości glukozy i fruktozy w liściach ale nie sacharozy. Aktywność inwertazy kwaśnej była statystycznie istotnie wyższa we wszystkich zebranych próbach liści w porównaniu do kontroli. Kluczowe wydają się być zmiany aktywności enzymów degradujących skrobię. Po izolacji chloroplastów zmierzono aktywność amylaz w żelu poliakrylamidowym, dzięki temu można było jednoznacznie przypisać pasma aktywności w żelu amylazom zlokalizowanym w chloroplastach, czyli zlokalizowanym w komórce w bezpośrednim sąsiedztwie skrobi asymilacyjnej. Wyniki pomiarów densytometrycznych pasm aktywności w żelu poliakrylamidowym nie wskazują na istotny udział enzymów amylolitycznych w procesie rozkładu skrobi spowodowanym krótkotrwałym stresem niskiej temperatury. Zupełnie inna jest dynamika zmian aktywności fosforylasy glukanów pod wpływem działania chłodu na rośliny ziemniaka. Uzyskane przez nas wyniki wskazują na bardzo szybki przyrost całkowitej aktywności fosforylasy glukanów, już po 3 godzinach działania niskiej temperatury na rośliny. Zwiększoną aktywność odnotowano zarówno dla fosforylasy glukanów zlokalizowanej w chloroplastach (PHO1) jak i w cytozolu (PHO2), przy czym w miarę trwania stresu niskiej temperatury w całkowitej aktywności PHO rósł udział aktywności PHO1. Ta zwiększona aktywność fosforylasy glukanów może mieć związek z syntezą ziaren skrobi. W przeszłości wykazano, że niska temperatura wpływa na aktywność fosforylasy glukanów, która, jak się uważa, odgrywa szczególnie ważną rolę w metabolizmie skrobi w warunkach stresu

abiotycznego (Zeeman i in. 2004). Z kolei aktywność DPE2, innego enzymu biorącego udział w metabolizmie rozpuszczalnych węglowodanów była silnie zmniejszona pod wpływem stresu chłodu. Być może spowodowane jest to niedoborem β -amylazy, czyli głównego produktu hydrolizy skrobi asymilacyjnej w warunkach optymalnych do wzrostu roślin. Podwyższona aktywność inwertazy kwaśnej zaobserwowana już po pierwszych 3 godzinach działania chodu na rośliny może wskazywać na to, że w liściach odmiany ziemniaka Russet Burbank w fazie początkowej działania stresu chłodu na rośliny, degradowana jest głównie sacharoza.

Uzyskane przez nas wyniki badań wskazują raczej na fosforolityczny rozkład skrobi, który przebiega w stresie, niż na typową dla optymalnych warunków wzrostu roślin hydrolizę ziaren skrobi. Hydroliza ziaren skrobi w warunkach optymalnych dla wzrostu roślin, po wcześniejszym ufosforylowaniu ich powierzchni przez GWD i PWD, odbywa się głównie z udziałem β -amylazy. W wyniku działania PHO na skrobię powstaje ufosforylowana glukoza, czyli (glukoza-1-fosforan, G1P). Taka zdestabilizowana fosforanowa pochodna glukozy jest bardziej reaktywna niż β -maltoza – typowy produkt beta-amylolitycznego rozkładu skrobi. Proces fosforolizy może być istotny dla oszczędzania energii w trakcie działania niskich temperatur na rośliny, które w takich warunkach z pewnością ograniczają intensywność procesu fotosyntezy.

Aktualnie niewiele wiadomo na temat mechanizmów adaptacyjnych roślin do niskich temperatur w procesie degradacji skrobi chloroplastowej. Rośliny uprawne stale poddawane są zmianom temperatury spowodowanym gwałtownymi zmianami pogody, pór roku i zmianami klimatycznymi. Z tego powodu konieczne są dalsze badania i wysiłki, aby uzyskać dokładniejszy obraz procesów towarzyszących tym zmianom, mających istotny wpływ na kondycje i plonowanie roślin uprawnych. Na konieczność takich badań zwrócono uwagę w artykule **P6**. Wiele ważnych roślin uprawnych, takich jak: kukurydza, ziemniaki, pszenica, pszenżyto, ryż czy maniok, musi być uprawiana w różnych strefach klimatycznych, w których dochodzi do znacznych wahań temperatury w ciągu doby. Większość roślin skrobiodajnych dostarcza ten cenny polisacharyd nie tylko do produkcji żywności dla ludzi i zwierząt, ale także do produkcji skrobi w zastosowaniach przemysłowych. Wykorzystanie skrobi w przemyśle jest powszechne i wymaga specyficznych właściwości skrobi, takich jak wielkość i kształt ziaren skrobi lub pewnych cech skrobi, takich jak długość łańcuchów budujących amylopektynę, krystaliczność. Wszystkie te cechy wpływają między innymi na temperaturę kleikowania skrobi, lepkość kleiku oraz procent retrogradacji. (Gu i in. 2022; Zhang i in. 2021).

W roślinach skrobia zapasowa jest syntetyzowana w znacznie większych ilościach niż skrobia przejściowa i dlatego skrobia zapasowa jest szczególnie ważna do zastosowań przemysłowych. W ostatnich latach opublikowano sporo wyników badań na temat biosyntezy i degradacji skrobi w różnych roślinach uprawnych (Li i in. 2021, Compart i in. 2023). Wiadomo, że w biosyntezie skrobi bierze udział ponad trzydzieści białek i enzymów/izoenzymów. Jednak w większości ich dokładne funkcje i właściwości nie są jeszcze w pełni poznane (Tetlow i Emes, 2017; Apriyanto i in. 2022). Aktualnie wiedza na temat metabolizmu skrobi opiera się głównie na wzroście roślin w kontrolowanych warunkach, zarówno roślin typu dzikiego jak i różnych mutantów. Często nie jest jasne, w jaki sposób na metabolizm skrobi wpływają niekorzystne krótkotrwałe zmiany temperatury, które mogą wielokrotnie powtarzać się w trakcie wegetacji roślin. Nadal brakuje nam również szczegółowej wiedzy dotyczącej kontroli inicjacji biosyntezy, tworzenia wewnętrznej struktury skrobi, morfologii i właściwości powierzchni ziaren skrobi (Compart i in. 2021). Wszystkie te cechy ziaren skrobi w ogromnym stopniu wpływają na komercyjne zastosowanie skrobi w przemyśle.

Nawet krótkie okresy trwania niskich temperatur prowadzą do hydrolizy skrobi asymilacyjnej i akumulacji cukrów rozpuszczalnych (Nagao i in. 2005; Sicher, 2011; Nezhdanova i in. 2022), powodując zmiany we właściwościach skrobi, a także w ogólnym metabolizmie rośliny. Te rozpuszczalne cukry mogą regulować ekspresję genów biorących udział w fotosyntezie, metabolizmie węglowodanów i w syntezie osmolitów (Li i in., 2022a; Rosa i in. 2009), a zatem mogą pośrednio wpływać na budowę i właściwości ziaren skrobi.

Rośliny zebrane z pól uprawnych, które dostarczają skrobię na cele przemysłowe, są poddawane dalszym technologicznym procesom w celu uzyskania surowca o jak najkorzystniejszych parametrach do ściśle określonych zastosowań. Poszerzona wiedza na temat wpływu określonych czynników stresowych na parametry skrobi może pomóc w zmniejszeniu wysiłków i kosztów jej izolacji oraz przetwarzania. Wreszcie lepsze zrozumienie jak warunki wzrostu roślin uprawnych mogą wpływać na wielkość, ilość oraz strukturę ziaren skrobi pozwoli na ukierunkowaną hodowlę nowych odmian. Takie nowe odmiany roślin powinny pozostać odporne na powtarzające się stresy abiotyczne. Z tych powodów jestem przekonany, że badania nad krótkotrwałym wpływem stresu niskiej temperatury na parametry ziaren z zastosowaniem najnowocześniejszych metod analitycznych umożliwiających analizy nawet pojedynczych ziaren skrobi (Cisek i in. 2018; Pruvost i in. 2021) są ważne, konieczne i aktualne.

Podsumowanie.

Jednym z moich najważniejszych osiągnięć badawczych jest identyfikacja i częściowa charakterystyka fosfodikinazy α -glukan, woda (StPWD/StGWD3; EC 2.7.9.5) z *S. tuberosum*. Po roślinie modelowej jaką jest *A. thaliana*, była to pierwsza w świecie charakterystyka homologa tego enzymu w roślinie uprawnej. W badaniach, których wyniki przedstawiono w artykule **P2**, ustalono pełną sekwencję genu kodującego ten enzym oraz poznano jego pełną sekwencję aminokwasową. Uzyskane sekwencje posłużyły do różnorodnych analiz bioinformatycznych i modelowania struktury StGWD3. Oczyszczono StGWD3 z bulw ziemniaka w ilości wystarczającej do uzyskania poliklonalnych przeciwciał, które wykorzystano do specyficznej lokalizacji enzymu w tkankach ziemniaka, w różnych warunkach fizjologicznych. Podstawowe znaczenie dikinaz GWD i PWD w metabolizmie roślin wyższych polega na katalizie reakcji ufosforylowania skrobi. Reakcja ta w cyklu dobowym przebiega zarówno w ciągu dnia jak i nocą, ale jej intensywność jest większa nocą i skutkuje rozluźnieniem powierzchni ziaren skrobi. Ta zmiana powierzchni ziaren skrobi ułatwia jej degradację.

Aktualną wiedzę na temat procesu fosforylacji skrobi oraz perspektywę badań tej naturalnej modyfikacji skrobi zaprezentowano w artykule **P4**. Mając to na uwadze przeprowadziłem szereg eksperymentów, w których analizowano stabilność kompleksów maltooligosacharydów i ich fosforanowych pochodnych w kompleksach z β -amylazą.

Uzyskane przez nas wyniki analiz bioinformatycznych, przedstawione w **P1** potwierdziły, że ufosforylowane i rozgałęzione oligosacharydy nie są dobrymi substratami dla β -amylazy, co znacznie ogranicza możliwość ich hydrolizy przez ten enzym. W przypadku liniowych oligosacharydów i ich ufosforylowanych form stwierdzono wyższe wartości energii dokowania dla fosforanowych pochodnych maltoligosacharydów. Może to świadczyć o ich silnym inhibitorowym charakterze w reakcji katalizowanej przez β -amylazę. Te pionierskie w skali światowej wyniki uzyskane przez nas w analizach *in silico* potwierdzają wcześniejsze wyniki badań uzyskane *in vitro*.

Badano również wpływ niskiej temperatury na przebieg degradacji skrobi w liściach ziemniaka. Wykazano, że wpływ niskich temperatur na rozkład skrobi w chloroplastach dwóch odmian ziemniaka, różniących się znacznie plonem i zawartością skrobi w bulwach nie jest jednakowy. Wyniki przedstawione w artykule **P3** umożliwiły stwierdzenie istnienia znaczących różnic we wzorcach ekspresji genów i aktywności enzymów hydrolitycznych i fosforolitycznych skrobi w tych odmianach. Z kolei zaprezentowane w **P5** i **P3** wyniki badań

wskazują, że w stresie krótkotrwałego chłodu rozkład skrobi w chloroplastach ma charakter fosforolityczny. Są to pierwsze takie informacje w literaturze światowej dotyczące rośliny uprawnej, czyli ziemniaka, a nie rośliny modelowej jaką jest *A. thaliana* (Thalmann i Santiella 2017). Ten typ degradacji skrobi przeważa nad typową dla optymalnych warunków wzrostu roślin hydrolizą ziaren skrobi. Hydroliza ziaren skrobi w warunkach optymalnych dla wzrostu roślin, po wcześniejszym ufosforylowaniu ich powierzchni przez GWD i PWD, odbywa się głównie z udziałem β -amylazy. W wyniku działania fosforylasy glukanów na skrobię powstaje ufosforylowana glukoza, czyli glukoza-1-fosforan. Taka zdestabilizowana fosforanowa pochodna glukozy jest bardziej reaktywna niż β -maltoza – końcowy produkt beta-amylolitycznego rozkładu skrobi. Proces fosforolizy może być istotny dla oszczędzania energii w trakcie działania niskich temperatur na rośliny, które w takich warunkach z pewnością ograniczają intensywność procesu fotosyntezy.

Rośliny skrobiodajne, do których należy ziemniak, dostarczają skrobię również na cele przemysłowe. Są one uprawiane w celu uzyskania surowca o jak najkorzystniejszych parametrach do ściśle określonych zastosowań. Prawidłowa i regularna struktura ziaren skrobi zapasowej jest uzależniona od ciągłego dopływu wcześniej zasymilowanych szkieletów węglowych i niczym nie zakłóconej biosyntezy takich ziaren, która trwa czasem przez kilka tygodni. W trakcie fotosyntezy zasymilowany CO₂ „przechowywany” jest przez kilka lub kilkanaście godzin jako skrobia przejściowa w chloroplastach. Odbywa się to jeszcze przed transportem szkieletów węglowych do nieautotroficznych tkanek, w których powstaje skrobia zapasowa. Stąd też, jak opisano w **P6**, tak istotne jest poznanie modelu biosyntezy ziaren skrobi asymilacyjnej, jak też sposobów jej degradacji w drodze hydrolizy lub fosforolizy. Swój artykułem w formie „Opinii” chciałem zwrócić uwagę wszystkich naukowców zajmujących się problematyką metabolizmu skrobi zapasowej w roślinach na konieczność podjęcia badań w warunkach krótkotrwałego działania stresu chłodu na rośliny uprawne. Artykuł ten opublikowany w uznanym czasopiśmie, zajmującym się problematyką fizjologii i biochemii roślin kładzie nacisk na to, aby te zmiany w metabolizmie skrobi poznawać w warunkach niekorzystnych dla wzrostu roślin. Przykładem takiego stresu może być krótkotrwałe działanie niskiej temperatury, tak często występujące w dzisiejszych, zmieniających się ciągle warunkach klimatycznych.

Spis literatury:

Albrecht, T., Greve, B., Pusch, K., Kossmann, J., Buchner, P., Wobus, U., & Steup, M. (1998). Homodimers and heterodimers of Pho1-type phosphorylase isoforms in *Solanum tuberosum* L. as revealed by sequence-specific antibodies. *Eur J Biochem*, 251(1–2), 343–352.

- Apriyanto, A., Compart, J., Fettke, J., 2022. A review of starch, a unique biopolymer – structure, metabolism and in planta modifications. *Plant Sci.* 318, 111223
- Bowerman, AF, Newberry, M, Dielen, AS, Whan, A, Larroque, O, Pritchard, J, Gubler, F, Howitt, CA, Pogson, BJ, Morell, MK, Ral, JP (2016) Suppression of glucan, water dikinase in the endosperm alters wheat grain properties, germination and coleoptile growth. *Plant Biotechnol J* 14(1):398–408
- Carciofi, M, Shaif, SS, Jensen, SL, Blennow, A, Svensson, JT, Vincze, E, Hebelstrup, KH (2011) Hyperphosphorylation of cereal starch. *J Cereal Sci* 54(3):339–346
- Chia, T, Thorneycroft, D, Chapple, A, Messerli, G, Chen, J, Zeeman, SC, Smith, SM, Smith, AM (2004). A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J.* 37:853–63
- Cisek, R., Tokarz, D., Kontenis, L., Barzda, V., Steup, M., (2018) Polarimetric second harmonic generation microscopy: an analytical tool for starch bioengineering. *Starch/Staerke* 70, 1700031.
- Compart, J, Singh, A, Fettke, J, Apriyanto, A. (2023) Customizing Starch Properties: A Review of Starch Modifications and Their Applications. *Polymers (Basel)*. 15(16): 3491.
- Compart, J., Li, X., Fettke, J., (2021) Starch-A complex and undeciphered biopolymer. *J. Plant Physiol.* 258–259, 153389
- Derelle, E, Ferraz, C, Rombauts, S, Rouze, P, Worden, AZ, Robbens, S, Partensky, F, Degroeve, S, Echeynie, S, Cooke, R, Saeys, Y, Wuyts, J, Jabbari, K, Bowler, C, Panaud, O, Piegue, B, Ball, SG, Ral, JP, Bouget, FY, Piganeau, G, De Baets, B, Picard, A, Delseny, M, Demaille, J, Van de Peer, Y, Moreau, H (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(31):11647–11652.
- Edner, Ch.; Li, J.; Albrecht, T.; Mahlow, S.; Hejazi, M.; Hussain, H.; Kaplan, F.; Guy, Ch.; Smith, S.M.; Steup, M.; Ritte, G. (2007) Water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial β -amylases. *Plant Physiol.* 145, 17–28.
- Evers, D.; Legay, S.; Lamoureux, D.; Hausman, J.F.; Hoffmann, L.; Renaut, J. (2012) Towards a synthetic view of potato cold and salt stress response by transcriptomic and proteomic analyses. *Plant Mol. Biol.* 78, 503–514.
- Fettke, J, Chia, T, Eckermann, N, Smith, A, Steup, M. (2006) A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J.* 46: 668–84
- Gu, X., Yang, S., Li, G., Lu, W., Lu, D., (2022). Starch morphological, structural, pasting, and thermal properties of waxy maize under different heat stress durations at grain formation stage. *Food and Energy Security* 11, e378.
- Hejazi, M, Fettke, J, Haebel, S, Edner, C, Paris, O, Froberg, C, Steup, M, Ritte, G (2008) Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *Plant J* 55(2):323–334
- Hejazi, M, Fettke, J, Paris, O, Steup, M (2009) The two plastidial starch-related dikinases sequentially phosphorylate glucosyl residues at the surface of both the a- and b-type allomorphs of crystallized maltodextrins but the mode of action differs. *Plant Physiol* 150(2):962–976
- Hejazi, M., Steup, M., and Fettke, J. (2012). The plastidial glucan, water dikinase (GWD) catalyses multiple phosphotransfer reactions. *FEBS J.* 279: 1953-66.
- Helle, S.; Bray, F.; Putaux, J.-L.; Verbeke, J.; Flament, S.; Rolando, C.; D'Hulst, C.; Szydlowski, N. (2019) Intra-Sample Heterogeneity of Potato Starch Reveals Fluctuation of Starch-Binding Proteins According to Granule Morphology. *Plants* 8, 324.
- Hirose, T, Aoki, N, Harada, Y, Okamura, M, Hashida, Y, Ohsugi, R, Akio, M, Hirochika, H, Terao, T (2013) Disruption of a rice gene for alpha-glucan water dikinase, OsGWD1, leads to hyperaccumulation of starch in leaves but exhibits limited effects on growth. *Front Plant Sci* 4:147
- Juszczak, L., Pietrzyk, S., Fortuna, T., Gałkowska, D., & Witczak, T. (2014). Wybrane właściwości fizykochemiczne skrobi ziemniaczanej o różnym stopniu utlenienia. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (272), 39–48.
- Kaminski, K.P., Petersen, A.H., Sønderkær, M., Pedersen, L.H., Pedersen, H., Feder, C., Nielsen, K.L. (2012) Transcriptome analysis suggests that starch synthesis may proceed via multiple metabolic routes in high yielding potato cultivars. - *PLoS ONE* 7: e51248,
- Kang, Y.N; Adachi, M.; Utsumi, S.; Mikami, B. (2004) The roles of Glu186 and Glu380 in the catalytic reaction of soybean β -amylase. *J. Mol. Biol.*, 339, 1129–1140.
- Kaplan, F., Guy, C. (2004) β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. - *Plant Physiol.* 135: 1674-1684,
- Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D.Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R., Guy, C.L. (2007) Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. - *Plant J.* 50: 967-981.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T. (2007). The role of dehydrins in plant response to cold. - *Biol. Plant.* 51: 601-617
- Kosová, K.; Vítámvás, P.; Urban, M.O.; Klíma, M.; Roy, A.; Prášil, I.T. (2015) Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops—A proteomic perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 20913–20942.

- Kotting, O, Pusch, K, Tiessen, A, Geigenberger, P, Steup, M, Ritte, G (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol* 137(1):242–252.
- Kozlov, SS, Blennow, A, Krivandin, AV, Yuryev, VP (2007) Structural and thermodynamic properties of starches extracted from GBSS and GWD suppressed potato lines. *Int J Biol Macromol* 40(5):449–460.
- Krasensky, J., Jonak, C. (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. - *J. Exp. Bot.* 63: 1593-1608
- Li R, Zheng W, Jiang M, Zhang H. (2021) A review of starch biosynthesis in cereal crops and its potential breeding applications in rice (*Oryza Sativa* L.). *PeerJ.*; 9:e12678.
- Li, M., Duan, X., Liu, T., Qi, H., (2022). Short-term suboptimal low temperature has short and long-term effects on melon seedlings. *Sci. Hortic.* 297, 110967
- Lloyd, J.R., Kossmann, J., (2019) Transitory and storage starch metabolism: two sides of the same coin? *Starch Trek: the search for Yield.* *Curr. Opin. Biotechnol. Front. Plant Sci.* 329, 143–148 article 1930.
- Lorberth, R, Ritte, G, Willmitzer, L, Kossmann, J (1998) Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat Biotechnol* 16(5):473–477
- Lu, Y., Steichen, J.M., Yao, J., Sharkey, T.D. (2006) The role of cytosolic alpha-glucan phosphorylase in maltose metabolism and the comparison of amyloamylase in *Arabidopsis* and *Escherichia coli*. - *Plant Physiol.* 142: 878-889
- Lütken, H., Lloyd, J.R., Glaring, M.A., Baunsgaard, L., Laursen, K.H., Haldrup, A., Kossmann, J., Blennow, A. (2010) Repression of both isoforms of disproportionating enzyme leads to higher malto-oligosaccharide content and reduced growth in potato. - *Planta* 232: 1127-1139
- Mahlow, S, Hejazi, M, Kuhnert, F, Garz, A, Brust, H, Baumann, O, Fettke, J (2014) Phosphorylation of transitory starch by alpha-glucan, water dikinase during starch turnover affects the surface properties and morphology of starch granules. *New Phytol* 203(2):495–507.
- Mikkelsen, R, Mutenda, KE, Mant, A, Schurmann, P, Blennow, A (2005) Alpha-glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(5):1785–1790
- Morales, M.; Munné-Bosch, S. (2019) Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiol.*, 180, 1246–1250
- Nagao, M., Minami, A., Arakawa, K., Fujikawa, S., Takezawa, D., (2005) Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *J. Plant Physiol.* 162, 169–180.
- Nakano, K., Tashiro, Y., Kikumoto, Y., Tagaya, M., & Fukui, T. (1986). Amino acid sequence of cyanogen bromide fragments of potato phosphorylase. *J Biol Chem*, 261(18), 8224–8229.
- Nezhdanova, A.V., Efremov, G.I., Slugina, M.A., Kamionskaya, A.M., Kochieva, E.Z., Shchennikova, A.V., (2022) Effect of a radical mutation in plastidic starch phosphorylase PHO1a on potato growth and cold stress response. *Horticulturae* 8, 730.
- Orawetz, T., Malinova, I., Orzechowski, S., Fettke, J., (2016) Reduction of the plastidial phosphorylase in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) reveals impact on storage starch structure during growth at low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* 100: 141-149
- Orzechowski, S., 2008. Starch metabolism in leaves. *Acta Biochim. Pol* 55, 435–445. Tetlow, I.J.; Emes, M.J. *Starch Biosynthesis in the Developing Endosperms of Grasses and Cereals.* *Agronomy* 2017, 7, 81.
- Oufir, M.; Legay, S.; Nicot, N.; Van Moer, K.; Hoffmann, L.; Renaut, J.; Hausman, J.-F.; Evers, D. (2008) Gene expression in potato during cold exposure: Changes in carbohydrate and polyamine metabolisms. *Plant Sci.*, 175, 839–852.
- Patrick, J.W., Botha, F.C., Birch, R.G. (2013) Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. – *Plant Biotechnol. J.* 11: 142-156
- Pfister, B.; Zeeman, S.C. (2016) Formation of starch in plant cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73, 2781–2807.
- Pruvost, A., Helle, S., Szydłowski, N., Rolando, C., (2021). Miniaturized Analysis of Amylopectin Chain Length Distribution by Fluorescence-Assisted Capillary Electrophoresis (FACE) down to Single Starch Granules. *ChemRxiv*.
- Ral, JP, Bowerman, AF, Li, Z, Sirault, X, Furbank, R, Pritchard, JR, Bloemsma, M, Cavanagh, CR, Howitt, CA, Morell, MK (2012) Downregulation of glucan, water-dikinase activity in wheat endosperm increases vegetative biomass and yield. *Plant Biotechnol J* 10(7):871–882
- Rensing, SA, Lang, D, Zimmer, AD, Terry, A, Salamov, A, Shapiro, H, Nishiyama, T, Perroud, PF, Lindquist, EA, Kamisugi, Y, Tanahashi, T, Sakakibara, K, Fujita, T, Oishi, K, Shin, IT, Kuroki, Y, Toyoda, A, Suzuki, Y, Hashimoto, S, Yamaguchi, K, Sugano, S, Kohara, Y, Fujiyama, A, Anterola, A, Aoki, S, Ashton, N, Barbazuk, WB, Barker, E, Bennetzen, JL, Blankenship, R, Cho, SH, Dutcher, SK, Estelle, M, Fawcett, JA, Gundlach, H, Hanada, K, Heyl, A, Hicks, KA, Hughes, J, Lohr, M, Mayer, K, Melkozernov, A, Murata, T, Nelson, DR, Pils, B, Prigge, M, Reiss, B, Renner, T, Rombauts, S, Rushton, PJ, Sanderfoot, A, Schween, G, Shiu, SH, Stueber, K, Theodoulou, FL, Tu, H, Van de Peer, Y, Verrier, PJ, Waters, E, Wood, A, Yang, L, Cove, D, Cuming, AC, Hasebe, M, Lucas, S, Mishler, BD, Reski, R,

- Grigoriev, IV, Quatrano, RS, Boore, JL (2008) The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319(5859):64–69.
- Ritte, G, Heydenreich, M, Mahlow, S, Haebel, S, Kottling, O, Steup, M (2006) Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Lett* 580(20): 4872–4876
- Ritte, G, Scharf, A, Eckermann, N, Haebel, S, Steup, M (2004) Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. *Plant Physiol* 135(4): 2068–2077
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., Gonzalez, J.A., Hilal, M., Prado, F.E., (2009) Soluble sugars—metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 388–393.
- Ruelland, E., Vaultier, M.N., Zachowski, A., Hurry, V. (2009) Cold signalling and cold acclimation in plant. - *Adv. bot. Res.* 49: 35-150,
- Samojedny, D., Orzechowski, S. (2007) Nowe spojrzenie na proces degradacji ziaren skrobi w chloroplastach *Arabidopsis thaliana* L. *Postępy Biochemii* 53/1: 74-83
- Sicher, R., (2011) Carbon partitioning and the impact of starch deficiency on the initial response of *Arabidopsis* to chilling temperatures. *Plant. Sci.* 181, 167–176.
- Skeffington, AW, Graf, A, Duxbury, Z, Gruissem, W, Smith, AM (2014) Glucan, water dikinase exerts little control over starch degradation in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant Physiol* 165(2):866–879
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., (2020) Starch: a flexible, adaptable carbon store coupled to plant growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 217–245.
- Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B., & Steup, M. (1995). A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: Cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol Biol*, 27(3), 567–576.
- Stark, J.C., Novy, R.G., Love, S.L., Whitworth, J.L., Corsini, D.L., Pavek, J.J., Mosley, A.R., Pavek, M.J., Knowles, N.R., Thornton, R.E., James, S.R., Hane, D.C., Olsen, N., Vales, M.I. and Brown, C.R. (2007) Blazer Russet: an early to mid-season potato cultivar with high U.S. no. 1 yields and good processing and culinary qualities. - *Amer. J. Potato Res.* 84: 467-477,.
- Stitt, M, Gerhardt, R, Kurzel, B, Heldt, HW (1983) A role for fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of sucrose synthesis in spinach leaves. *Plant Physiol* 72: 1139-1141
- Thalmann, M., Santelia, D., (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytol.* 214, 943–951.
- Thoma, J.A.; Koshland, D.E. (1960) Competitive inhibition by substrate during enzyme action. Evidence for induced-fit theory. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 3329–3333.
- Vikso-Nielsen, A, Blennow, A, Jorgensen, K, Kristensen, KH, Jensen, A, Moller, BL (2001) Structural, physicochemical, and pasting properties of starches from potato plants with repressed R1-gene. *Biomacromolecules* 2(3):836–843
- Vikso-Nielsen, A., Christensen, T.M.I.E., Bojko, M., Marcussen, J. (1997) Purification and characterization of β -amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). - *Physiol. Plant.* 99: 190-196,
- Vilpoux, OF, Silveira, Junior, JFS, (2023) Chapter 3 - Global production and use of starch, Editor(s): Marney Pascoli Cereda, Olivier François Vilpoux, *Starchy Crops Morphology, Extraction, Properties and Applications*, Academic Press, pp: 43-66,
- Weise, S.E., Schrader, S.M., Kleinbeck, K.R., Sharkey, T.D. (2006) Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phospholytic breakdown of transitory starch. - *Plant. Physiol.* 141: 879-886
- Weise, SE, Aung, K, Jarou, ZJ, Mehrshahi, P, Li Z, Hardy, AC, Carr, DJ, Sharkey, TD (2012) Engineering starch accumulation by manipulation of phosphate metabolism of starch. *Plant Biotechnol J* 10(5):545–554.
- Yu, TS, Kofler, H, Hausler, RE, Hille, D, Flugge, UI, Zeeman, SC, Smith, AM, Kossmann, J, Lloyd, J, Ritte, G, Steup, M, Lue, WL, Chen, J, Weber, A (2001) The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* 13(8):1907–1918
- Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L., Hongbo, S. (2009) Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. - *Afr. J. Biotechnol.* 8: 2004-2010
- Zeeman, S.C.; Thorneycroft, D.; Schupp, N.; Chapple, A.; Weck, M.; Dunstan, H.; Haldimann, P.; Bechtold, N.; Smith, A.M.; Smith, S.M. (2004) Plastidial α -glucan phosphorylase is not required for starch degradation in *Arabidopsis* leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiol.*, 135, 849–858.
- Zhang, R., Ma, S., Li, L., Zhang, M., Tian, S., Wang, D., Liu, K., Liu, H., Zhu, W., Wang, X., (2021) Comprehensive utilization of corn starch processing by-products: a review. *Grain & Oil Science and Technology* 4 (3), 89–107.

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 latach 1999-2023 odbyłem 5 różnych pobytów naukowych od kilku dni (ostatni, finansowany przez program Erasmus), po 36 miesięczny (2002-2004, staż po uzyskaniu stopnia doktora). W tej części autoreferatu opiszę dwa staże w Uniwersytecie w Poczdamie w Niemczech, które w największym stopniu przyczyniły się do mojego rozwoju naukowego.

36-miesięczny staż realizowany w latach 2002-2004 w Instytucie Biochemii i Biologii Uniwersytetu w Poczdamie (Niemcy), finansowany przez różne projekty UP

Praktycznie cała działalność naukowa w trakcie tego pobytu związana była z realizacją projektu pt.: Identification and functional analysis of carbohydrate-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* L. Projekt ten był realizowany we współpracy pomiędzy naukowcami z Francji oraz firmą Jerini AG z Berlina i miał na celu identyfikację białek oddziałujących w sposób katalityczny i niekatalityczny z unieruchomionymi oligosacharydami, w zależności od ich struktury. Materiałem do badań stanowiły zagęszczone homogenaty z liści *Arabidopsis thaliana* L.. Jako fazę stałą zastosowano w tym projekcie unieruchomione, przy użyciu różnych odstępników (linkerów) na powierzchni membrany celulozowej bądź też na „kuleczkach” z agarozy oligosacharydy. W pierwszej części badań testowano różne odstępniki używane w trakcie immobilizacji, różniące się m.in. długością oraz sposobem związania się z oligosacharydem.

Białka wybiórczo wiążące się z poszczególnymi sacharydami były następnie identyfikowane z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF. W tym celu odmywano je z fazy stałej, rozdzielano elektroforetycznie w warunkach denaturujących, podawano proteolizie z udziałem modyfikowanej na użytek spektrometrii mas trypsyny (MS Grade). Uzyskane peptydy były poddawane analizie MALDI-TOF. Na tej podstawie można było z dużym prawdopodobieństwem określić rodzaj analizowanego białka, które związało się z fazą stałą w takich warunkach.

W celu zwiększenia selektywności wiązania się ściśle określonych grup białek zsyntetyzowane chemicznie ligandy węglowodanowe poddawano modyfikacjom enzymatycznym m.in. z wykorzystaniem fosforylasy glikogenowej. Niestety sam projekt, a zwłaszcza jego wyniki nie były zbyt zadawalające aby bez zmian dalej realizować ten projekt. Musiałem zapoznać się z metodyką min. analizy białek, po ich wcześniejszej proteolizie z wykorzystaniem spektrometrii mas. Z jednej strony umożliwiło to wykorzystanie tej techniki w innych projektach, z drugiej zaś zastosowanie ekstraktów uzyskanych z *S. tuberosum* zamiast z *A. thaliana*, pozwoliło na wstępną selekcję niescharakteryzowanych jeszcze białek, wykazujących powinowactwo do oligosacharydów. Spośród tych białek w dalszych badaniach,

już prowadzonych w SGGW zidentyfikowałem PWD – dikinazę fosfoglukan, woda (EC 2.7.9.5) – enzym istotnie wpływający na strukturę skrobi w liściach i bulwach ziemniaka oraz mający potencjalne znaczenie biosyntezy i degradacji ziaren skrobi.

Ponadto w trakcie pobytu w Katedrze Fizjologii Roślin Instytutu Biochemii i Biologii, poza oznaczeniami ściśle związanymi z badaniami w ramach realizowanego projektu uczestniczyłem w bieżących projektach realizowanych w tej pracowni. Analizowałem zawartość skrobi, cukrów rozpuszczalnych (glukozy, fruktozy, sacharozy) i heksozofosforanów (G1P - glukozo-1-fosforanu, G6P -glukozo-6-fosforanu, F6P - fruktozo-6-fosforanu) z wykorzystaniem testów fotometrycznych w liściach *A. thaliana* oraz *S. tuberosum* w roślinach typu dzikiego i w różnych mutantach. W ten sposób poznałem wiele nowoczesnych metod biochemicznych, które z powodzeniem wykorzystywałem w dalszych badaniach prowadzonych w macierzystym uniwersytecie.

3-miesięczny staż w 2015 roku realizowany w Pracowni Biopolimerów Uniwersytetu w Poczdamie (Niemcy), finansowany w ramach stypendium SGGW

Głównym celem tego stażu naukowego (01.03-31.05.2015) było ilościowe oznaczenie mono-, di- i oligosacharydów obecnych w ekstraktach z liści 2 odmian ziemniaka poddanych działaniu niskiej temperatury. Dodatkowo podjąłem próbę wyjaśnienia wpływu GWD (dikinazy α -glikan: woda) na strukturę powierzchni ziaren skrobi. Do tych analiz wykorzystałem spektrometrię mas (MALDI-TOF-TOF) oraz HPLC-PAD i elektroforezę kapilarną z detekcją fluorescencji indukowanej laserem (CE-LIF).

Podczas pobytu w Laboratorium Biopolimerów wykonywałem też analizy zawartości oligosacharydów w 110 próbkach z liści 2 odmian ziemniaka Russet Burbank i Desiree, które wzrastały w warunkach obniżonej temperatury. Uzyskane wcześniej wyniki badań prowadzonych w SGGW wskazywały na różnice w ekspresji wybranych genów metabolizmu sacharydów, w zależności od temperatury i odmiany. Obserwowano również zmieniający się poziom cukrów redukujących w obu odmianach, w zależności od temperatury (**P3**).

Wykonane analizy z wykorzystaniem HPLC-PAD wskazywały na występowanie różnic w składzie oligosacharydów w liściach odmian Russet Burbank i Desiree poddanych przez 3 godziny działaniu niskiej temperatury. Stwierdzono, że w liściach roślin poddanych działaniu niskiej temperatury zwiększało się stężenie oligosacharydu o stopniu polimeryzacji DP10 oraz zmniejszała się zawartość maltozy w porównaniu do kontroli. Wyniki te zostały potwierdzone również po analizie z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej i fluorescencyjnie wyznakowanych sacharydów (CE-LIF).

Poza oznaczeniem cukrów rozpuszczalnych w próbkach z liści ziemniaka wykonałem eksperymenty mające na celu ustalenie zmiany struktury powierzchni skrobi pod wpływem działania GWD. W tym celu najpierw uzyskano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym białko rekombinowane StGWD. Tak uzyskany enzym inkubowano w obecności ATP z różnymi rodzajami natywnej skrobi wyizolowanej z mutantów *A. thaliana*, różniącymi się procentową zawartością fosforanów w skrobi. Po inkubacji, ziarna skrobi trawione były izoamylazą, a uwolnione oligosacharydy analizowano z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF. Uzyskane wyniki sugerują, że GWD tylko do pewnego stopnia jest w stanie ufosforylować powierzchnię skrobi, a przedłużona inkubacja z tym enzymem nie powoduje liniowego wzrostu ufosforylowanych oligosacharydów.

W trakcie pobytu w Laboratorium Biopolimerów, poza oznaczeniami ściśle związanymi z głównym tematem moich zainteresowań badawczych uczestniczyłem w zidentyfikowaniu ok. 50 białek przywiezionych z Polski, z grup badawczych prof. B. Zagdańskiej i prof. R. Bogatek (SGGW). Identyfikację wykonano z wykorzystaniem spektrometrii masowej (MALDI-TOF).

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

1. Od 2009 roku pełnię funkcję **Kierownika Katedry**, początkowo Katedry Biochemii, a od 2018 roku Katedry Biochemii i Mikrobiologii. W czasie pełnienia przeze mnie tej funkcji nastąpił dynamiczny rozwój kadry. Liczba pracowników - nauczycieli akademickich w 2009 roku wzrosła z 15 do 25 obecnie. W 2009 roku zatrudnialiśmy w KB także 6 pracowników niebędących nauczycielami akademickimi. W trakcie moich kolejnych kadencji jako kierownika katedry 1 osoba uzyska tytuł profesora, 2 osoby uzyskały awans na stanowisko prof SGGW, 4 habilitacje, a 13 doktorat – 8-ro z nich pracuje aktualnie w KBiM. W trakcie tych kilkunastu lat zmienił się wyraźnie profil badawczy katedry. Pracownicy naukowci stosują powszechnie metody biologii molekularnej. Katedra chętnie wybierana jest przez studentów SGGW jako miejsce do realizacji prac dyplomowych na I i II stopniu studiów. Sporym wysiłkiem organizacyjno-finansowym zostały unowocześnione sale dydaktyczne, wyposażone w rzutniki multimedialne i nowe wyposażenie laboratoryjne. Aktualnie do dyspozycji pracowników i studentów w KBiM znajduje się 5 sal ćwiczeniowych do zajęć z biochemii, 2 sale ćwiczeniowe do zajęć z mikrobiologii, 1 pracownia komputerowa do zajęć z bioinformatyki i 1 sala seminaryjna. W KBiM realizowano od ok 5000 do 6500 godzin dydaktycznych w ramach kilkudziesięciu różnych przedmiotów dla kilkunastu kierunków studiów w SGGW. W tym czasie zrealizowano liczne projekty badawcze finansowane przez NCN, NCBiR, UE

lub Rektora SGGW. Nigdy nie było żadnych problemów z ich rozliczeniem zarówno finansowym, jak i merytorycznym. Z kolei liczba publikacji naukowych indeksowanych w bazie JCR zwiększyła się z ok. kilku - kilkunastu w latach 2009-2011 do ponad 30 rocznie w ostatnich kilku latach.

2. Byłem **współautorem pełnego programu studiów stacjonarnych II stopnia**, specjalności Bioinżynieria Rolnicza dla kierunku Rolnictwo – 2007 rok.

3. Brałem udział w **3rd Erasmus Workshop** na Universidad Politecnica de Valencia – ETSIA 6-7.11.2008, Hiszpania, reprezentując SGGW w dyskusjach panelowych dt. sposobów intensyfikacji wymiany studentów.

4. Od 1.09.2008 do 31.08.2016 pełniłem funkcję **Koordynatora Programu Erasmus** na Wydziale Rolnictwa i Biologii, SGGW w Warszawie. Moja rola polegała na konsultacjach ze studentami ubiegającymi się o wyjazd finansowany przez ten program, przyjmowaniu formularzy zgłoszeniowych, sporządzaniu list rankingowych na poszczególnych etapach rekrutacji.

5. Byłem **współautorem programu kursu „Biochemia” dla kierunku studiów E-Rolnictwo** – projekt finansowany był w części przez UE w latach 2009-2012, w ramach projektu: „Program unowocześnienia kształcenia w SGGW dla zapewnienia konkurencyjności oraz wysokiej kompetencji absolwentów” w ramach Poddziałania 4.1.1 „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni” w Priorytecie IV PO KL”. Kwota dofinansowania: 10312007,90 PLN

6. W 2019 roku byłem **koordynatorem zespołu ds. opracowania programu kształcenia** dla Zadania 14 - Zmodernizowany program kształcenia studiów **I stopnia na kierunku Biologia** na Wydziale Rolnictwa i Biologii – moduł 1 – Tytuł projektu: Sukces z natury - kompleksowy program podniesienia jakości zarządzania procesem kształcenia i jakości nauczania Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie nr: PO WER.03.05.00-00-Z033/17 (luty-kwiecień, wrzesień-październik 2019). Kwota dofinansowania: 28060405,81 PLN

7. **Przedstawiciel adiunktów w Senacie SGGW** od 01.09.2012 do 31.08.2016 roku,

8. **Przedstawiciel adiunktów z Wydziału Rolnictwa i Biologii w gronie elektorów wybierających Rektora SGGW w latach 2012-2016**

9. **Członek Komisji przy Senacie SGGW** od 01.09.2012 do 31.08.2016 roku Uczelnianej Komisji ds. Oceny Pracowników Jednostek Międzywydziałowych,

10. **Członek Komisji przy Senacie SGGW** od 01.09.2012 do 31.08.2016 roku Uczelnianej odwoławczej komisji dyscyplinarnej ds. doktorantów,

11. **Przedstawiciel adiunktów w Radzie Wydziału Rolnictwa i Biologii** od 01.09.2008 roku do 2019,

12. **Przedstawiciel adiunktów w Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne** od 01.09.2019 roku do chwili obecnej,

13. **Członek Komisji Finansowej** przy Radzie WRiB od 01.09.2008 do 2019,

14. **Członek Komisji Finansowej** przy Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne od 01.01.2020 do chwili obecnej,

15. **Członek Komisji Dydaktycznej** przy Radzie WRiB od 01.09.2008 do 31.08.2012,

16. **Członek Komisji ds. Rozwoju** przy Radzie WRiB od 01.09.2012, **Przewodniczący** tej Komisji od 01.09.2016.

17. ***Prowadzenie zajęć dydaktycznych***

Prowadzenie **wykładów od 2005 roku** (w wymiarze od 5 do 40 godzin semestralnie):

Wykłady zostały przeze mnie sprofilowane w zależności od kierunku studiów, czasu ich trwania. Dla niektórych kierunków studiów, nowoutworzonych w SGGW wykłady przygotowywałem po raz pierwszy np. E-rolnictwo, dietetyka. Każdorazowo samodzielnie opracowałem tematy poszczególnych wykładów, ich kolejność, materiały dydaktyczne. Dodatkowo opracowałem niezbędną dokumentację wymaganą w SGGW w ramach Jakości

Kształcenia (sylabusy, ankiety, weryfikacja efektów uczenia) pytania egzaminacyjne i pytania na cząstkowe kolokwia w trakcie trwania poszczególnych kursów.

Biochemia dla kierunków Rolnictwo, E-Rolnictwo (w roku 2009/2010 – zdalnie i stacjonarnie – 18 godzin) i Ochrona Środowiska w latach: 2005-2009, 2017 – 15 godzin

Biochemia ogólna i żywności dla kierunków: Żywnienie Człowieka i Technologia Żywności i Dietetyka w latach 2010-2021 – 30 godzin

Biochemia Roślin dla kierunku Ochrona Zdrowia Roślin w latach: 2019-2021 – 15 godzin

Podstawy Biochemii dla kierunku Gastronomia i Hotelarstwo w latach: 2017-2019 – 8 godzin

Biochemia na studiach podyplomowych „Biologia z higieną człowieka i ochroną środowiska” w latach: 2011-2018 – 5 godzin

Biochemia dla kierunku Bezpieczeństwo w Żywności w latach: 2019 – obecnie – 40 godzin

Biochemia Zwierząt dla kierunku Zootechnika – niestacjonarne w latach: 2021- obecnie – 14 godzin

Podstawy biochemii i fizjologii roślin dla kierunku Ekologiczne Rolnictwo i Produkcja Żywności w latach 2024-obecnie – 7 godzin

Ćwiczenia laboratoryjne z biochemii, enzymologii (w wymiarze od 5 do 60 godzin semestralnie) od 1996 roku jako doktorant, potem jako pracownik SGGW:

Prowadzenie ćwiczeń, dla wymienionych poniżej przedmiotów, dodatkowo przygotowywano niezbędną dokumentację wymaganą w SGGW w ramach Jakości Kształcenia (kolokwia, sprawozdania z ćwiczeń, karty oceny studenta).

Biochemia dla kierunków: Rolnictwo 18-30 godzin, Ogrodnictwo 21-30 godzin, Bezpieczeństwo Żywności 36 godzin, Technologia Żywności 21-30 godzin, Biologia – 60 godzin, Biotechnologia – 30 godzin, Ochrona Środowiska – 15 godzin, E-Rolnictwo – 18 godzin

Biochemia ogólna i żywności dla kierunków: Dietetyka – 14-30 godzin, Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka – 18-30 godzin, Żywnienie Człowieka i Ocena Żywności – 21-30 godzin,

Biochemia Roślin dla kierunku Ochrona Zdrowia Roślin – 15 godzin

Biochemia dla studentów Studiów Podyplomowych „Biologia z higieną człowieka i ochroną środowiska”- 5 godzin

Biochemia zwierząt dla kierunku Zootechnika – 21-30 godzin

Enzymologia dla kierunku Biologia – 30 godzin

Enzymologia i techniki biochemiczne dla kierunku Biotechnologia – 30 godzin

Techniki analizy białek dla kierunku Technologia Biomedyczna – 5 godzin

Podstawy Fizjologii Roślin dla kierunku Biologia w Uniwersytecie w Poczdamie w Niemczech (zajęcia prowadzone w języku niemieckim podczas mojego pobytu na stażu podoktorskim), w wymiarze 11 tygodni x 8 godzin w latach 2002-2004,

Opieka nad realizacją **prac magisterskich** (opiekun) - 4

Opieka nad realizacją **prac licencjackich lub inżynierskich** (promotor) - 19

Recenzje prac dyplomowych: magisterskich lub licencjackich/inżynierskich: mgr – 8, lic/inż. – 9

Opieka nad profesorem wizytującym SGGW

W latach: 2012/2013, 2014/2015, 2015/2016 opiekowałem się formalnie profesorem wizytującym SGGW, który realizował 60 godzin dydaktycznych w Katedrze Biochemii, WRiB. Moja rola polegała na załatwieniu wszystkich formalności w porozumieniu z administracją SGGW i profesorem wizytującym SGGW. Zaplanowałem zajęcia dydaktyczne dla wizytującego profesora, udzieliłem mu pomocy w znalezieniu zakwaterowania w Warszawie.

Opieka nad stażystami.

Stypendystka z programu DAAD RISE z Niemiec (2011) – 6 tygodni

Moja rola polegała na zgłoszeniu się do programu DAAD RISE z propozycją tematyki badań. Po wybraniu przez studentkę mojego tematu uzgodniliśmy termin przyjazdu i harmonogram badań. Ponadto pomogłem jej w otrzymaniu zakwaterowania w domu studenckim. Formalnie i merytorycznie byłem jej opiekunem podczas pobytu w Polsce. W czasie 6 tygodni zostały zrealizowane zaplanowane badania i osiągnięte zamierzone efekty. Studentka biologii z Niemiec była dobrze przygotowana do pracy w laboratorium.

Stypendystka w ramach Praktyk Erasmus z Turcji (2021) – 3 miesiące

Moja rola polegała na wyrażeniu zgody na odbycie praktyki w KBiM przez studentkę oraz na przygotowaniu planu badawczego. Studentka w Turcji otrzymała finansowanie z programu Erasmus, następnie uzgodniliśmy termin przyjazdu. Pomogłem jej w otrzymaniu

zakwaterowania w domu studenckim. Formalnie i merytorycznie byłem jej opiekunem podczas pobytu w Polsce. W czasie 3 miesięcy zostały zrealizowane zaplanowane badanie i osiągnięte zamierzone efekty. Studentka z racji okresu pandemicznego miała niewielkie doświadczeni w pracy w laboratorium i musiała intensywnie pracować, aby uzyskać zamierzone efekty.

Doktorant z Uniwersytetu w Poczdamie (Niemcy, 2022) – 3 miesiące

Moja rola polegała na przygotowaniu planu badawczego w SGGW. Doktorant z Pakistanu realizuje swój doktorat w Pracowni Biopolimerów Uniwersytetu w Poczdamie w grupie badawczej prof. J. Fettke. Wcześniej doktorant przebywał w Poczdamie zaledwie kilka miesięcy, stąd wymagał dość intensywnego szkolenia z metod, które rutynowo wykorzystujemy w analizie różnych aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm skrobi w ziemniaku. W czasie stażu założyliśmy doświadczenie szklarniowe, zebraliśmy próby i wykonaliśmy ekstrakty enzymatyczne i pomiary stężenia białka, zymogramy wykrywające aktywności fosforylasy glukanów (PHO) i enzymu dysproporcjonującego (DPE). Część materiału biologicznego została wysłana w suchym lodzie do Poczdamu w celu dalszych analiz. W późniejszym okresie doktorant przyjeżdżał jeszcze 2-krotnie w celu zebrania kolejnych prób z roślin z wcześniej założonych przez mnie eksperymentach. Spodziewanym efektem stażu będą wspólne publikacje i wniosek o finansowanie badań we współpracy z Pracownią Biopolimerów Uniwersytetu w Poczdamie.

Autorstwo rozdziałów skryptach SGGW dla studentów kilkunastu kierunków studiów:

- a) Orzechowski S: Fotometryczne oznaczanie zawartości białka. str.: 55-62, w skrypcie pt „Przewodnik do ćwiczeń z biochemii” pod redakcją W. Bielawskiego i B. Zagdańskiej (2018)
- b) Orzechowski S, Sitnicka D: Oznaczanie aktywności enzymów amylolitycznych. str.: 115-124, w skrypcie pt „Przewodnik do ćwiczeń z biochemii” pod redakcją W. Bielawskiego i B. Zagdańskiej (2018)
- c) Orzechowski S, Paszkowski A: Oznaczanie aktywności aminotransferazy alaninowej. str.: 131-137, w skrypcie pt „Przewodnik do ćwiczeń z biochemii” pod redakcją W. Bielawskiego i B. Zagdańskiej (2018)
- d) Orzechowski S: Elektroforetyczna identyfikacja enzymów amylolitycznych i fosforolitycznych w tkankach roślinnych, str.: 55-62 w skrypcie pt. „Praktikum z enzymologii” pod redakcją J.M Dzik (2017).

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

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

Wpływ metali ciężkich na aktywność enzymów zaangażowanych w asymilację jonów amonowych w siewkach pszenżyta.

Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH, EC 1.4.1.2) i syntetaza glutaminy (GS, EC 6.3.1.2) to dwa główne enzymy roślin wyższych odpowiedzialne za bezpośrednie włączanie azotu nieorganicznego (NH_4^+) do szkieletów węglowych. Celem badań realizowanych w ramach mojej pracy magisterskiej było określenie wpływu rodzaju i stężenia wybranych jonów metali ciężkich (Cd^{2+} , Pb^{2+} i Zn^{2+}) na aktywności tych enzymów w korzeniach i w liściach siewek pszenżyta. Stwierdzono znaczący wzrost aktywności zarówno GS jak i GDH w korzeniach siewek pod wpływem rosnących stężeń wszystkich analizowanych metali. Z kolei w częściach nadziemnych roślin stwierdzono niższą aktywność GS, a wyższą GDH w porównaniu z próbami kontrolnymi. Szczególnie wyraźne zmiany zaobserwowano w obecności Cd^{2+} i Zn^{2+} , co może świadczyć o różnej fizjologicznej roli obu enzymów zaangażowanych w asymilację jonu amonowego. Wykazanie, że aktywność GDH znacznie rośnie w warunkach niekorzystnych dla wzrostu roślin posłużyło do wykorzystania tego enzymu jako bioindykatora zanieczyszczenia podłoża metalami ciężkimi. Dodatkowo w badaniach tych wykazano, że metale ciężkie powodowały redukcję biomasy całych siewek oraz redukcję stężenia formy zredukowanej glutationu (GSH). Wysokie stężenia Cd^{2+} i Zn^{2+} spowodowały także spadek stężenia jonów NO_3^- oraz Mg^{2+} w siewkach pszenżyta. Wyniki opublikowano w 2 artykułach **A1-A2** oraz prezentowano podczas konferencji **PK1**.

Oczyszczanie, badanie właściwości molekularnych oraz zmian aktywności różnych aminotransferaz.

Aminotransferaza alaninowa (AlaAT, EC 2.6.1.2) i aminotransferaza glicynowa (GlyAT, EC 2.6.1.4), to dwa różne enzymy katalizujące reakcje transaminacji z L-alaniną jako substratem aminokwasowym, które badano w kukurydzy. Stosując elektroforezę preparatywną (PAGE) częściowo oczyszczonego preparatu aminotransferaz z liści kukurydzy otrzymano 6 frakcji różniących się ruchliwością elektroforetyczną (I-VI). Aktywność we frakcjach II i III

była niska, nie pozwalało to na dalsze analizy. Najszybciej migrująca frakcja I reprezentowała AlaAT, specyficzną dla L-alaniny i stanowiła blisko 90% całkowitej aktywności zmierzonej we wszystkich frakcjach (I-VI). Pozostałe frakcje wykazywały aktywność trzech aminotransferaz: L-alanina: 2-oksoglutaran, L-alanina: glioksylan i L-glutaminian: glioksylan. Za pomocą sita molekularnego Zorbax SE-250 podłączonego do HPLC uzyskano dwie grupy enzymów o masach cząsteczkowych około 100 kDa i 50 kDa. Masę cząsteczkową 104 kDa przypisano AlaAT we frakcji I. Natomiast masa cząsteczkowa trzech aktywności enzymatycznych w 3 frakcjach o niskiej ruchliwości elektroforetycznej (IV-VI) wynosiła około 50 kDa. Badając specyficzność substratową tych frakcji po sączeniu molekularnym z: aminooksyoctanem, 3-chloro-L-alaniną i wykorzystując dodatkowo inhibicję L-aminokwasami stwierdzono, że trzy z sześciu frakcji uzyskanych po preparatywnej PAGE (IV-VI) reprezentowało izoformy GlyAT, różniące się od siebie stosunkiem aktywności L-glutaminianu: glioksylan i L-alanina: glioksylan do aktywności L-alanina: 2-oksoglutaran. W innych eksperymentach aminotransferazę alaninową z liści 14-dniowych siewek kukurydzy oczyszczono ponad 1600-krotnie do jednorodności elektroforetycznej, wykorzystując HPLC i podłączoną do niej kolumnę z anionitem. Aktywność specyficzna oczyszczonego enzymu mierzona z L-alaniną i 2-oksoglutaranem jako substratami wynosiła 2125 nkatali/ mg białka. Masy cząsteczkowe natywnego i zdenaturowanego (w obecności SDS) białka AlaAT wynosiły odpowiednio 95 kDa i 50 kDa, co wskazuje, że natywny enzym jest prawdopodobnie homodimerem. AlaAT prawie wyłącznie katalizowała transfer grup aminowych z L-alaniny na 2-oksoglutaranu i reakcję odwrotną. Eksperymenty z inhibitorami wykazały, że fosforan pirydoksalu jest bezpośrednio zaangażowany w katalizę enzymatyczną, a cząsteczka enzymu zawiera grupy -SH, niezbędne do prawidłowego przebiegu reakcji. Z kolei zastosowanie fenyloglioksalanu wykazało resztę argininy jako anionowego miejsca wiązania substratu w centrum aktywnym AlaAT. Poza tym badano wewnątrzkomórkową lokalizację aminotransferazy alaninowej wyizolowanej zarówno z całych liści kukurydzy jak i komórek pochwy okołowiązkowej. Po wyizolowaniu frakcji mitochondrialnej i peroksysomalnej komórek, przez odwirowanie w gradiencie liniowym sacharozy 40-52% (w/o), aktywność aminotransferazy L-alanina: 2-oksoglutaran z całych liści wykazała dwa szczyty: pierwszy wyraźnie wyższy związany z mitochondriami, a drugi niższy we frakcji peroksysomów. W komórkach pochwy okołowiązkowej stwierdzono tylko jeden szczyt tej aktywności. Odpowiadał on mitochondrialnemu regionowi gradientu. Uzyskane wyniki wskazują na to, że mitochondrialna aktywność L-alanina: 2-oksoglutaran była efektem aktywności AlaAT. Z kolei aminotransferaza glicynowa może być odpowiedzialna za tę samą aktywność

w peroksysomach. Wyniki były częścią doktoratu, który wykonywałem pod opieką dr hab. A. Paszkowskiego i opublikowałem w 3 artykułach: **A3-A5**. Były też prezentowane podczas konferencji **RK1** w formie referatu i plakatu **PK2**. Kontynuując badania nad aminotrasferazami, już po uzyskaniu stopnia doktora, opracowano nowy test spektrofotometryczny umożliwiający zmierzenie aktywności aminotransferazy aminokwasów aromatycznych (ArAT). Test opiera się na przeniesieniu grupy aminowej z L-tryptofanu na 2-oksoglutaran, w wyniku czego powstaje indolo-3-pirogronian (IPyA). Ilość utworzonego IPyA oznaczono ilościowo poprzez reakcję z odczynnikiem Salkowskiego. Dla celów porównawczych aktywność ArAT oznaczono także metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Dodatkowo opracowano także metodę oznaczenia aktywności ArAT z wykorzystaniem zymogramów: po rozdziale preparatów enzymatycznych w żelach poliakryloamidowych i po zajściu reakcji transaminacji jej produkt - IPyA barwiono odczynnikiem Salkowskiego. Wyniki opublikowano w artykule: **A13**.

Po uzyskaniu stopnia doktora:

Analiza budowy skrobi, rola enzymów i białek zaangażowanych w metabolizm skrobi.

Skrobia jest podstawowym polisacharydem zapasowym występującym w postaci nierozpuszczalnych ziaren w roślinach. W roślinach uprawnych o dużym znaczeniu gospodarczym, takich jak zboża i ziemniak z łatwością można wyróżnić dwa rodzaje skrobi: przejściową nazywaną również skrobią tranzytoryczną lub chloroplastową i skrobię zapasową, która gromadzi się ziarniakach lub bulwach. Z punktu widzenia wykorzystania skrobi jako surowca w przemyśle większe znaczenie ma skrobia zapasowa. Z kolei skrobia przejściowa jest kluczowa dla wszystkich procesów przebiegających w trakcie wegetacji roślin. Budowę skrobi opisano w publikacjach **A9**, **A24**. Analiza procesu biosyntezy i rozkładu skrobi zapasowej w ziemniaku jest dość czasochłonna i skomplikowana z racji naturalnie występującego spoczynku bulw, dość długiego cyklu życiowego ziemniaka i lokalizacji skrobi zapasowej w bulwach – częściach podziemnych roślin. Z tego powodu wstępne badania enzymów biorących udział w biosyntezie lub degradacji skrobi często wykonuje się wykorzystując metabolizm skrobi chloroplastowej. Charakterystyczne w tym modelu badawczym są dobowe cykle: biosynteza skrobi odbywa się w trakcie trwania fotosyntezy, a jej degradacja przebiega nocą i prowadzi do całkowitego rozkładu wcześniej zsyntetyzowanych ziaren skrobi. W oba procesy: biosyntezy i rozkładu ziaren skrobi zaangażowane są liczne enzymy, które wykorzystują skrobię, polimery glukozy, glukozę i jej pochodne jako substraty, bądź też te

metabolity powstają w wyniku ich aktywności. Więcej szczegółów na ten temat można znaleźć w publikacjach: **A6**, **A8-A9**. Często w analizach poszczególnych procesów związanych z metabolizmem skrobi wykorzystywane są metody funkcjonalnej analizy genów. Postęp w analizie ekspresji genów w komórkach, czy całych tkankach jest bezsporny i przyczynia się do coraz lepszego zrozumienia roli poszczególnych genów. Tradycyjne metody analizy funkcjonalnej genów, takie jak: m.in. metoda przewidywania przez homologię, czy też metoda inaktywacji i zwiększonej ekspresji genów zastępowane są przez silnie wspomagane narzędziami bioinformatycznymi analizy mikromacierzy i chipów DNA. W ostatnich latach często stosowana jest niezwykle precyzyjna i wydajna technologia edycji genomu CRISPR/Cas9. W praktyczny sposób wiedza na temat funkcji i zmian ekspresji genów wykorzystywana jest w diagnostyce medycznej, przemyśle farmaceutycznym oraz biotechnologii roślin i zwierząt. Metody te opisano w artykułach **A9** i **A14**. Aby poznać lub jednoznacznie potwierdzić znaczenie poszczególnych białek i enzymów w różnych procesach przebiegających w roślinach np. w metabolizmie skrobi stosuje się analizę roślin transgenicznych. Zwykle przed analizą np. roślin ziemniaka wykonuje się najpierw badania z rośliną modelową, jaką jest rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*). Efektem takich doświadczeń są wyniki, które uzyskano we współpracy z zespołem prof. J. Fettke z Uniwersytetu w Poczdamie. W badaniach tych analizowano znaczenie syntazy skrobi 4 (AtSS4) jako kluczowego enzymu w procesie inicjacji powstawania ziaren skrobi i regulującego liczbę ziaren skrobi w chloroplastach roślin wyższych. Syntazy skrobi (SS) występują w kilku izoformach w roślinach wyższych i przenoszą resztę glukozylową z ADP-glukozy na nieredukujący koniec istniejącego wcześniej łańcucha glukanowego. Obecność charakterystycznej sekwencji na N-końcu SS4 z *Arabidopsis* umożliwia tworzenie kompleksu białko-białko. W ramach tych eksperymentów wykazano również, że AtSS4 bezpośrednio tworzy kompleks z izoformą plastydową fosforylasy glukanów (AtPHS1). Wiadomo, że fosforylasy glukanów są szeroko rozpowszechnione u zwierząt, mikroorganizmów i roślin. Jednak jak dotąd nie było jasne, czy obserwowana interakcja białko-białko jest specyficzna dla fosforylasy glukanów pochodzenia roślinnego. Dlatego sprawdzono, czy fosforylaza glukanów pochodzenia zwierzęcego, czyli fosforylaza z mięśni królika (PHOa) również będzie oddziaływać z AtSS4. Uzyskane wyniki potwierdzają, że kompleks białko-białko (AtPHS1 i AtSS4) jest specyficzny, gdyż PHOa z królika nie może utworzyć kompleksu z AtSS4. Wyniki opublikowano w artykule **A23**.

Kolejnym eksperymentem wykonanym we współpracy z tą samą grupą badawczą z Uniwersytetu w Poczdamie była charakterystyka transporterów zlokalizowanych w błonie

plazmatycznej, przenoszących glukozy-1-fosforan (G1P) w *A. thaliana*. Ta fosforanowa pochodna glukozy powstaje w wyniku aktywności fosforylasy glukanów (PHO). Enzym ten katalizuje odwracalne przeniesienie reszt glukozyliwych z nieredukującego końca α -glukanów na ortofosforan z uwolnieniem glukozy-1-fosforanu. W przypadku gdy produktem działania PHO jest G1P, wówczas ma miejsce fosforolityczny rozkład skrobi lub glukanów. Inaczej jest gdy G1P jest donorem glukozy w reakcji katalizowanej przez PHO. W tej sytuacji enzym ten jest odpowiedzialny za biosyntezę tego węglowodanu zapasowego. Dla pierwotnego metabolizmu węglowodanów w roślinach duże znaczenie mają procesy transportu węglowodanów przez membrany komórkowe (głównie maltozy i glukozy) oraz ich fosforanowych pochodnych (heksozofosforany, triozofosforany). W ostatnich latach opublikowano liczne publikacje, które wykazały, że poza transportem glukozy-6-fosforanu, maltozy, glukozy i triozofosforanów istotną rolę odgrywa także transport glukozy-1-fosforanu. W ramach badań opisanych w **A25** przedstawiono charakterystykę dwóch bardzo podobnych transporterów: At1g34020 i At4g09810 w *A. thaliana*, które umożliwiają import glukozy-1-fosforanu przez błonę komórkową. Oba transportery ulegały ekspresji w drożdżach i były charakteryzowane biochemicznie w celu ujawnienia antyportu glukozy-1-fosforanu/fosforanu. Ponadto wykazano, że apoplast liści *Arabidopsis* zawierał glukozy-1-fosforan i że odpowiedni mutant tych transporterów miał wyższe ilości glukozy-1-fosforanu w apoplaście w porównaniu do kontroli. Stwierdzono także niewielkie, ale istotne zmniejszenie zawartości skrobi w roślinach transgenicznym z wyciszonymi genami *At1g34020* i *At4g09810*.

W ramach kolejnych badań analizowano wpływ fosforylasy glukanów – a dokładniej jej izoformy plastydowej (PHO1; EC 2.4.1.1) na metabolizm skrobi zapasowej w bulwach w warunkach długotrwałego (kilka tygodni) działania niskiej temperatury. W ramach przeprowadzonych badań przeanalizowano zawartość skrobi, wielkość ziaren, a także strukturę wewnętrzną ziarenek skrobi wyizolowanych z roślin ziemniaka, uprawianych w niskich temperaturach. W tym celu stosowano Kapilarną Elektroforezę z detekcją Fluorescencji Indukowanej Laserem (CE-LIF) oraz Coulter Counter Multisizer 3. Więcej na temat metod stosowanych do analizy struktury i właściwości węglowodanów złożonych można przeczytać w **A24**. Oprócz odmiany dzikiej, analizowano rośliny ziemniaka transgenicznego charakteryzujące się silną redukcją aktywności PHO1. Nie wykryto żadnych znaczących zmian w zawartości skrobi i wielkości jej ziaren. Natomiast gdy rośliny hodowano w niskich temperaturach długości łańcuchów w ziarnach skrobi ulegały zmianie. Takie ziarna zawierały więcej krótkich łańcuchów poliglukozy. Zjawiska tego nie zaobserwowano w roślinach transgenicznym, co wskazuje na to, że PHO1 w roślinach typu dzikiego bierze udział

w tworzeniu krótkich łańcuchów glukanu, czyli w biosyntezie skrobi. Dzieje się tak przynajmniej w niskich temperaturach, w których wzrastają rośliny ziemniaka. Wyniki opublikowano w **A17**.

Charakterystyka i funkcje fizjologiczne wybranych fitocystatyn z pszenżyta ozimego.

Fitocystatyny są to endogenne inhibitory o charakterze białkowym odpowiedzialne głównie za kontrolę aktywności proteinaz cysteinowych w czasie gromadzenia białek zapasowych w nasionach i ich rozkład podczas kiełkowania. W badaniach zespołu, którego byłem członkiem uzyskano pełną sekwencję nukleotydową *TrcC-6* składającą się z 735 pz i kodującą białko o długości 152 reszt aminokwasowych. Analiza informatyczna wykazała, że białko posiada trzy motywy aminokwasowe charakterystyczne dla nadrodziny cystatyn: motyw G w części N-końcowej łańcucha polipeptydowego, QxVxG w części środkowej i W/PW w części C-końcowej. Zidentyfikowano także motyw LGRYSVEEHN charakterystyczny dla fitocystatyn. Wykazano, że sekwencje aminokwasowe *TrcC-6* są w ok. 30% identyczne z sekwencjami innych fitocystatyn pszenżyta, wcześniej badanych przez w/w zespół. Badanie dynamiki ekspresji *TrcC-6* przemawia za jej udziałem w regulacji procesów gromadzenia białek zapasowych i kiełkowaniu. W bakteryjnym systemie ekspresyjnym uzyskano, a następnie oczyszczono białko rekombinowane 6xHis-*TrcC-6*, którego obliczona masa cząsteczkowa wynosiła 16,3 kDa. Białko to hamowało *in vitro* aktywności proteaz cysteinowych: papainy i ficyny, zaś nie miało wpływu na aktywność bromelainy. Wyznaczono IC_{50} dla 6xHis-*TrcC-6*, które wobec papainy wynosiło 42,79 nM, a wobec ficyny 45,28 nM. Białko rekombinowane 6xHis-*TrcC-6* hamowało aktywności proteinaz cysteinowych wyizolowanych z kiełkujących ziarniaków pszenżyta. Wynik ten dowodzi, że *TrcC-6* może brać udział w rozkładzie białek zapasowych pszenżyta. Wyniki tych badań opisano w artykule **A15**. W dalszych badaniach podjęto próbę zidentyfikowania, scharakteryzowania i określenia roli fitocystatyn w warunkach deficytu wodnego u pszenżyta ozimego. W organach wegetatywnych tego gatunku zbóż zidentyfikowano cDNA fitocystatyny *TrcC-8* i wykazano, że ta sekwencja nukleotydowa koduje białko zbudowane z 243 reszt aminokwasowych. W wyniku nadekspresji w *E. coli* otrzymano aktywne białko rekombinowane o m. cz. 25,39 kDa. Reakcja sieciowania otrzymanego białka z aldehydem glutarowym wykazała, że *TrcC-8* może występować w postaci monomeru, dimeru i heksameru, przy czym tylko jego monomeryczna forma wykazuje najwyższą aktywność inhibitorową. Dowodem na udział tej fitocystatyny pszenżyta w odpowiedzi rośliny na deficyt wody, z jednej strony był wzrost poziomu mRNA genu kodującego *TrcC-8* w warunkach suszy, z drugiej zaś obniżenie poziomu transkryptu tego genu

po ustąpieniu warunków stresowych. Wykazano też, że rekombinowane białko His6-TrcC-8 powodowało całkowite wygaszenie pasm aktywności proteinaz cysteinowych, których aktywność wzrastała w odpowiedzi na deficyt wody w liściach pszenżyta i pszenicy. Wyniki tych badań opublikowano w artykułach: **A16** i **A19**.

Wpływ szkodników na metabolizm roślin żywicielskich.

W ramach współpracy z Katedrą Entomologii SGGW prowadziłem badania nad wpływem taumatyny II (słodkie białko) w uzyskaniu odporności roślin transgenicznych ogórka, pokolenia T6 na przędziorka chmielowca (*Tetranychus urticae* Koch, Acari: *Tetranychidae*). W doświadczeniach szklarniowych oznaczane było: a) zachowanie roztoczy wobec kilku linii ogórka (T22409, T21201, T21006) różniących się poziomem ekspresji taumatyny II, b) ich zdolność rozrodcza, c) zdolność do kolonizacji roztoczy oraz d) stopień uszkodzenia liści. Dodatkowo stosując metodę western blot analizowano obecność taumatyny II w liściach transgranicznych roślin ogórka przed i po poddaniu ich działaniu przędziorka chmielowca. Uzyskano wyniki, które wskazują, że nawet przy stosunkowo wysokim poziomie taumatyny II w liściach T22409 i T21201 stopień uszkodzenia był znaczący. W badaniach tych wykazano również brak wyraźnego związku pomiędzy poziomem taumatyny II, a odpowiedzią roślin na przędziorka chmielowca. W liściach porażonych roztoczami zawartość taumatyny II zmniejszała się, zwiększała się lub pozostawała bez zmian. Dane te wykluczają taumatynę II jako związek bezpośrednio zaangażowany w indukowaną obronę przez działaniem roztoczy. Z drugiej strony zmniejszona płodność samic roztoczy i mniejsza niż w kontroli liczba osobników żerujących na roślinach bogatych w taumatynę wskazują na potencjalną rolę taumatyny II w interakcjach roślina-roztocze. Wyżej opisane wyniki zaprezentowano w artykule **A11**.

Kolejne badania przeprowadzone we współpracy z Katedrą Entomologii SGGW dotyczyły określenia zależności między wiekiem liści robinii akacjowej a intensywnością i sposobem rozmieszczenia jaj przez samice *Aculops allotrichus* Nalepa (Acari: Eriophyoidea). Do badań wykorzystano trzy kategorie wiekowe liści: najmłodsze, młode i dojrzałe. Przeprowadzone analizy biochemiczne i morfologiczne wykazały istotne różnice w zawartości składników odżywczych, fenoli, grubości zewnętrznych ścian komórkowych naskórka w liściach o różnym wieku. Liście najmłodsze, o największej zawartości składników odżywczych były najchętniej wybierane przez samice *A. allotrichus*. Wyniki w/w doświadczeń zostały opisane w artykule **A22** oraz były prezentowane podczas konferencji w formie referatu – **PK16**.

Proteomiczna analiza białek warstwy subaleuronowej w ziarniakach jęczmienia.

We współpracy z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR) w Radzikowie oraz Uniwersytetem w Poczdamie analizowano biotypy jęczmienia ze światowej kolekcji różniące się zawartością białka zapasowego. Strukturę ziaren badano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej i wykazano brak różnic w strukturze warstwy aleuronowej ziarniaków odmian wysoko- i niskobiałkowych. Stwierdzono natomiast, że duże ilości białka mogą być magazynowane w komórkach strefy przylegającej do warstwy aleuronowej, określanej mianem komórek subaleuronowych. Interesującym było stwierdzenie, że jednolite ziarna tej samej rośliny, a nawet tego samego kłosa mogą znacznie różnić się liczbą komórek subaleuronowych. Celem tych badań było również wykazanie różnic jakościowych w tej części bielma. Stosując elektroforezę SDS-PAGE oraz spektrometrię mas zidentyfikowano wiele rodzajów białek występujących w warstwie subaleuronowej ziarniaków jęczmienia. We frakcjach białkowych izolowanych z ziarniaków odmian o podwyższonej zawartości białka stwierdzono znacznie silniejszą reprezentację białek o masach cząsteczkowych od 29 do 45 kDa, w porównaniu do ziarniaków odmian niskobiałkowych. Szczegółowa analiza tych białek wykazała, że są to izoformy serpin typu Z oraz B3-hordeiny. Wyniki opublikowano w artykule: **A7**, oraz prezentowano podczas konferencji w formie referatu - **PK4**.

Oddziaływanie stresów abiotycznych na metabolizm roślin.

Jednym z najczęściej występujących czynników ograniczających rozwój i produktywność roślin uprawnych jest niedobór wody. Zachwianie gospodarki wodnej w roślinie wywołuje szereg zmian morfologicznych i fizjologiczno-biochemicznych. W warunkach suszy w roślinach następuje również przebudowa białek komórkowych, w tym m.in. szereg ich modyfikacji potranslacyjnych. Jedną z tych modyfikacji, będącą celem prowadzonych z moim udziałem badań była karbonylacja kilkudziesięciu istotnych z punktu widzenia metabolizmu rośliny białek (**A21**). Materiałem badawczym były 4 i 6-dniowe siewki pszenicy poddane stresowi suszy. Do identyfikacji karbonylowych białek została wykorzystana dwuwymiarowa elektroforeza w żeli poliakryloamidowym (2D-PAGE) oraz spektrometria mas (MALDI-TOF i LC-MS/MS). Spośród 26 karbonylowanych białek w siewkach mniej wrażliwych na deficyt wody (4-dniowych) poziom ich karbonylacji aż w 19 był znacznie wyższy, a w pozostałych istotnie niższy w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Nieco odmienne wyniki uzyskano dla siewek wrażliwych na ten rodzaj stresu (6-dniowych), gdyż tylko w 10 spotach białkowych obserwowano wzrost i aż w 16 spadek poziomu ich karbonylacji. Szczegółowa analiza spotów białkowych wykazała, że białka o możliwej roli w utrzymywaniu tolerancji na odwodnienie

siewek pszenicy są powiązane głównie z gospodarką energetyczną rośliny, działaniu przeciwgrzybicznym i /lub owadobójczym oraz regulacją syntezy i ekspresji białek. Rozszerzeniem powyższej opisanej tematyki badań były doświadczenia mające na celu ustalenie zależności pomiędzy utratą tolerancji na odwodnienie 5-dniowych siewek pszenicy, a zaburzeniem komórkowej homeostazy potencjału oksydoredukcyjnego (**A18**). W ramach tych badań prowadzono pomiary zredukowanego glutationu oraz białek zawierających grupy SH. Badano poziom ekspresji białek w siewkach pszenicy w pełni uwodnionych (kontrola), tolerancyjnych na odwodnienie (4 dniowe) i wrażliwych (6 dniowe). Identyfikację białek prowadzono zgodnie w wyżej opisaną metodą spektrometrii mas i sklasyfikowano według ich funkcji. Zaobserwowane zmiany w proteomie S-nitrozylowanych i S-glutationylowanych białek były wysoce specyficzne w przypadku siewek zarówno odpornych jak i wrażliwych na odwodnienie. Funkcje metaboliczne tych białek wskazują, że tolerancja na odwodnienie jest związana głównie z kwasami nukleinowymi, metabolizmem białek i gospodarką energetyczną rośliny. Otrzymane wyniki wskazują na istnienie wzajemnego oddziaływania pomiędzy S-nitrozylacją i S-glutationylacją – dwiema modyfikacjami potranslacyjnymi białek regulowanymi przez potencjał oksydoredukcyjny komórki. Modyfikacje te mogą wzmacniać mechanizmy obronne roślin lub ułatwić aklimatyzację roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych. Wyniki opublikowano w artykule **A18** oraz w materiałach konferencyjnych **PK15**.

W ramach tematyki dotyczących stresów abiotycznych realizowałem też badania nad wpływem kadmu na różne parametry molekularno-biochemiczne w roślinach bobowatych: *Phaseolus vulgaris* i *Pisum sativum*. W doświadczeniach tych analizowano zawartość i metabolizm ureidów w *P. vulgaris* i *P. sativum* rosnących w warunkach kontrolnych i traktowanych 50 μM CdCl_2 przez 48 godzin. Następnie badano wpływ egzogennej alantoiny i jej prekursora - kwasu moczowego na zmiany oksydacyjne związane z obecnością kadmu w obu tych roślinach. Kadm zwiększał zawartość obu ureidów jedynie w liściach *P. vulgaris*, co było zgodne ze wzrostem poziomu transkryptów i aktywnością enzymów szlaków metabolicznych tych ureidów. Zjawisku temu towarzyszył wzrost zawartości kwasu moczowego. W liściach *P. sativum* kadm nie tylko zwiększał aktywność enzymów szlaków biosyntezy ureidów, ale też zmniejszał aktywność enzymów je rozkładających. Egzogenne kwas moczowy i alantoina hamowały indukowaną przez kadm akumulację H_2O_2 oraz łagodziły skutki uszkodzeń oksydacyjnych mierzonych na podstawie degradacji RNA, zawartości chlorofilu i dialdehydu malonowego w obu roślinach bobowatych. Z otrzymanych wyników można wywnioskować, że *P. sativum* wykorzystuje alantoinę i kwas moczowy jako związki

przeciwuutleniające w celu łagodzenia uszkodzeń oksydacyjnych tkanek związanych z pobraniem kadmu. W *P. vulgaris* priorytetem wydaje się być udział szlaku ureidowego w indukowanym przez kadm odzyskiwaniu i recyklingu azotu. Wyniki opublikowano w artykule: **A28**. W kolejnym eksperymencie określono rolę proliny w różnych fazach odpowiedzi roślin na traktowanie kadmem. Badano akumulację proliny i zmiany poziomu transkryptów *PsP5CS2*, genu kodującego syntetazę D1-pirolino-5-karboksyłanu zaangażowaną w syntezę proliny oraz *PsPDH1*, genu kodującego dehydrogenazę proliny zaangażowaną w degradację proliny. Zmiany w akumulacji proliny ściśle odpowiadały zmianom w poziomach transkryptów *PsP5CS2* oraz *PsPDH1*. Dodanie do pożywki $CdCl_2$ indukowało również ekspresję *PsProT1* i *PsProT2* oraz genów kodujących transportery proliny. Szczególnie duży wzrost ekspresji obserwowano podczas pierwszych 12 godzin i w najmłodszych liściach. Pomiar akumulacji kwasu absycynowego (ABA) i proliny wykazał, że wzrosty stężenia proliny w liściach grochu traktowanych kadmem były bardziej związane ze spadkiem stężenia chlorofilu oraz wzrostem poziomu dialdehydu malonowego niż ze samym wzrostem stężenia ABA. Uzyskane wyniki sugerują, że w warunkach stresu wywołanego kadmem akumulacja proliny w liściach grochu może zachodzić niezależnie od obecności ABA. Wyniki opublikowano w artykule: **A26**.

Wpływ endogennego NO na spoczynek zarodków jabłoni.

W ramach współpracy z Katedrą Fizjologii Roślin SGGW badałem wpływ metabolitów i wtórnych cząstek sygnałowych na przerywanie stanu spoczynku nasion jabłoni. Badania te wykazały ścisły związek między aktywnością syntazy tlenku azotu (NOS, EC 1.14.13.39) oraz poziomem produktu reakcji katalizowanej przez ten enzym – NO, a przerywaniu stanu spoczynku i przejściem zarodków jabłoni w fazę kiełkowania. Wzrosty stężenia NO w nasionach jabłoni wywołane fumigacją NO i dodaniem donorów NO znacznie przyspieszały przerwanie stanu spoczynku zarodków, a dodatek argininy i zmiataczy tlenków azotu wzmacniały ten stan. Zjawisku temu towarzyszyło obniżenie poziomu aktywności syntazy NO i spadek poziomu reaktywnych form azotu. Na tej podstawie można wnioskować, że zarówno sam NO jak i jego donory oraz arginina pełnią kluczową rolę w usuwaniu spoczynku nasion i są niezbędnym sygnałem do przejścia nasion ze stanu spoczynku w fazę kiełkowania. W badaniach tych wykazano również, że kiełkowanie zarodków nasion jabłoni wiąże się ze zmniejszonym poziomem białek nitrowanych oraz białek zawierających biotynę. Wyniki opublikowano w artykule **A19** oraz w materiałach konferencyjnych **PK14**.

Najważniejsze nagrody i wyróżnienia:

- Nagroda Zespołowa III stopnia Rektora SGGW za osiągnięcia badawcze 2022**
Nagroda Zespołowa III stopnia Rektora SGGW za osiągnięcia organizacyjne 2022
Srebrny Medal za Długoletnią Służbę - 2022
Nagroda Indywidualna III stopnia Rektora SGGW za osiągnięcia organizacyjne 2019
Nagroda Indywidualna III stopnia Rektora SGGW za osiągnięcia naukowe 2017
Nagroda Zespołowa II stopnia Rektora SGGW za osiągnięcia dydaktyczne 2015
Nagroda Zespołowa II stopnia Rektora SGGW za osiągnięcia dydaktyczne 2012
Nagroda Indywidualna II stopnia Rektora SGGW za osiągnięcia organizacyjne 2011
Nagroda Indywidualna II stopnia Rektora SGGW za osiągnięcia naukowe 2007
Wyróżnienie za realizację projektu (Grant SGGW 50401130011) 2006.



(podpis wnioskodawcy)

Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny

Informacje zawarte w poszczególnych punktach tego dokumentu powinny uwzględniać podział na okres przed uzyskaniem stopnia doktora oraz pomiędzy uzyskaniem stopnia doktora a uzyskaniem stopnia doktora habilitowanego.

I. WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

1. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy.

P1. Dudkiewicz M., Simińska J., Pawłowski K., **Orzechowski S.** (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharide phosphorylation effect on the stabilization of the α -amylase-ligand complex. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 27: 479-495, IF₂₀₀₈ = 1,029, MNiSW₂₀₀₈ = 20 pkt; IF₂₀₂₂ = 1,0; MNiSW₂₀₂₃ = 40 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 5)

P2. **Orzechowski S.**, Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 483–500, IF₂₀₁₃ = 1,305, MNiSW₂₀₁₃ = 25pkt; IF₂₀₂₂ = 2,6; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 12)

P3. Sitnicka D., **Orzechowski S.** (2014) Cold-induced starch degradation in potato leaves – intercultur differences in the gene expression profile and activity of key enzymes. *Biologia Plantarum* 58(4): 659-666, IF₂₀₁₄ = 1,849, MNiSW₂₀₁₄ = 25pkt; IF₂₀₂₂ = 1,5; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 16)

P4. Mahlow S., **Orzechowski S.**, Fettke J. (2016) Starch phosphorylation: insights and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 2753–2764, IF₂₀₁₆ = 5,788, MNiSW₂₀₁₆ = 140pkt; IF₂₀₂₂ = 8,0; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 50)

P5. **Orzechowski S.**, Sitnicka D., Grabowska A., Compant J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7203, IF₂₀₂₁ = 5,923, MNiSW₂₀₂₁ = 140 pkt; IF₂₀₂₂ = 5,6; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 13)

P6. Orzechowski S., Compart J., Zdunek-Zastocka E., Fettke J. (2023) Starch parameters and short-term temperature fluctuations – Important but not yet in focus? *Journal of Plant Physiology* 280, 153902, IF₂₀₂₃ = 3,686, MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

W przypadku prac dwu- lub wieloautorских zaleca się złożenie oświadczenia przez habilitanta oraz współautorów wskazujące na ich merytoryczny (a NIE procentowy) wkład w powstanie każdej pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet, itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego autora, w tym habilitanta, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenia – P1.

Oświadczenie autora

Data: 20 marca 2024

Dr Sławomir Orzechowski

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Dudkiewicz M., Simińska J., Pawłowski K., Orzechowski S. (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharide phosphorylation effect on the stabilization of the α -amylase-ligand complex. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 27: 479-495

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, utworzeniu i koordynowaniu prac zespołu badawczego w ramach projektu KBN o numerze N302061134, w którym byłem kierownikiem. Do współpracy włączyłem specjalistów z obszaru bioinformatyki. Z projektu została sfinansowana kilkumiesięczna licencja specjalistycznego oprogramowania wykorzystanego do analiz. Moim zadaniem było zaprojektowanie odpowiednich ufosforylowanych ligandów o różnej długości łańcucha poliglukoz (od 2 do 8 glukozy), które następnie były wykorzystywane w dokowaniu in silico do centrum aktywnego beta- amylazy. Po wspólnym opracowaniu wyników napisałem dyskusję oraz wnioski końcowe. Brałem także udział we wprowadzaniu poprawek i udzielaniu odpowiedzi recenzentom przed opublikowaniem artykułu



Oświadczenie współautora

Data 26.03.2024

Dr hab. Małgorzata Dudkiewicz

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Dudkiewicz M., Simińska J., Pawłowski K., Orzechowski S. (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharide phosphorylation effect on the stabilization of the α -amylase-ligand complex. Journal of Carbohydrate Chemistry 27: 479-495

byłam autorem korespondującym, przeprowadziłam i opisałam metodykę oraz wyniki analiz bioinformatycznych, brałam udział w przygotowaniu ostatecznej wersji artykułu.



Oświadczenie współautora

Data: 22.03.2024r.

Dr Joanna Jasnos (nazwisko rodowe - Simińska)

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Dudkiewicz M., Simińska J., Pawłowski K., Orzechowski S. (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharide phosphorylation effect on the stabilization of the α -amylase-ligand complex. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 27: 479-495

brałam udział w przygotowaniu tabel.

Joanna Jasnos

Oświadczenie współautora

Data: 20.05.2024

Dr hab. Krzysztof Pawłowski

Tagliabracci Lab,

Howard Hughes Medical Institute

And Department of Molecular Biology,

University of Texas Southwestern Medical Center

Dallas, TX USA

Oświadczam, że w pracy:

Dudkiewicz M., Simińska J., Pawłowski K., Orzechowski S. (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharide phosphorylation effect on the stabilization of the α -amylase-ligand complex. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 27: 479-495

brałem udział w przygotowaniu ostatecznej wersji wyników analiz bioinformatycznych prezentowanych w artykule, byłem też finansowany z projektu KBN o numerze N302061134, w którym kierownikiem był S. Orzechowski.



Oświadczenia – P2.

Oświadczenie autora

Data: 20 marca 2024

Dr Sławomir Orzechowski

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:483–500

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań utworzeniu i kierowaniu zespołem badawczym w ramach projektu KBN o numerze N302061134, zaplanowaniu i współwykonaniu eksperymentów (hodowla roślin, zebranie materiału, oczyszczanie stGWD3, testowaniu otrzymanych przeciwciał poliklonalnych anty stGWD3 przed immunolokalizacją, SDS-PAGE i western blot, przygotowaniu prób do MALDI-TOF MS), zebraniu wszystkich wyników i ich opracowaniu graficznym, przygotowaniu manuskryptu – wersji wstępnej i ostatecznej, naniesieniu uwag współautorów, korespondencji z redakcją oraz wprowadzeniu poprawek przed opublikowaniem artykułu.



Oświadczenie współautora

Data: 21.03.2024

Dr inż. Agnieszka Grabowska

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:483–500

Brałam udział w uzyskaniu pełnej długości genu *StGWD3* oraz w opisie odpowiedniej metodyki.

Agnieszka Grabowska

Oświadczenie współautora

Data: 24.03.2024r.....

Mgr Dorota Sitnicka

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:483–500

Brałam udział w izolacji RNA.

D. Sitnicka

Oświadczenie współautora

Data: 22 03. 2024 r.

Dr Joanna Jasnos (nazwisko rodowe – Simińska)

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:483–500

Brałam udział w immunolokalizacji StGWD3.

Joanna Jasnos

Oświadczenie współautora

Data: 26.03.2004

Mgr Marta Feluś

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:483–500

Brałam udział w oczyszczaniu StGWD3.

Mgr Marta Feluś była moją dyplomatką – niestety po skończeniu studiów nie mam z nią kontaktu, ale jako promotor jej pracy magisterskiej, pragnę potwierdzić jej udział w powstawaniu tego artykułu.



Oświadczenie współautora

Data: 26.03.2024

Dr hab. Małgorzata Dudkiewicz

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M.
(2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3)
in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan,
water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:483–500

Brałam udział w wykonaniu i opisie analiz bioinformatycznych.



Oświadczenie współautora

Data: 20-03-2024

Dr Sylwia Fudali

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:483–500

Brałam udział w wykonaniu eksperymentu *in situ* RT-PCR.



Oświadczenie współautora

Data: 2024.03.20

Dr inż. Mirosław Sobczak

Katedra Botaniki

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M.
(2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of glucan, water dikinase (GWD3)
in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan,
water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35:483–500

Brałem udział w opisanu metodyki i wyników analiz mikroskopowych.



Oświadczenia – P3.

Oświadczenie autora

Data: 20 marca 2024

Dr Sławomir Orzechowski

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Sitnicka D., Orzechowski S. (2014) Cold-induced starch degradation in potato leaves – intercultural differences in the gene expression profile and activity of key enzymes. *Biologia Plantarum* 58(4):659-666

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i współwykonaniu eksperymentów (hodowla roślin, zebranie materiału, pomiar zawartości węglowodanów i aktywności enzymów), zebraniu wszystkich wyników i ich opracowaniu graficznym, przygotowanie manuskryptu – wersji wstępnej i ostatecznej, naniesieniu uwag współautorki.



Oświadczenie współautora

Data: 24.03.2024r.

Mgr Dorota Sitnicka

Oświadczam, że w pracy:

Sitnicka D., Orzechowski S. (2014) Cold-induced starch degradation in potato leaves – intercultural differences in the gene expression profile and activity of key enzymes. *Biologia Plantarum* 58(4):659-666

Byłam autorem korespondującym, wykonałam analizę ekspresji genów, opisałam tą część metodyki i wyników. Razem z dr S Orzechowskim hodowaliśmy rośliny, zbieraliśmy próby, brałam udział w przygotowaniu wersji wstępnej i ostatecznej manuskryptu.



Oświadczenia – P4.

Oświadczenie autora

Data: 20 marca 2024

Dr Sławomir Orzechowski

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Mahlow S., Orzechowski S., Fettke J. (2016) Starch phosphorylation: insights and perspectives. Cellular and Molecular Life Sciences 73: 2753–2764

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji manuskryptu. W trakcie mojego pobytu w Poczdamie w 2015 roku wybrałem tematykę i czasopismo, przygotowałem wersję wstępną i ostateczną większości rozdziałów, nanosiłem uwagi współautorów.





Mathematisch-Naturwissenschaftliche
Fakultät

Institut für Biochemie und Biologie

- Biopolymer Analytics-

apl. Prof. Dr. habil Joerg Fettke

Karl-Liebknecht-Str. 24-25
Haus 20
14476 Potsdam-Golm
Tel.: 0331/977-2653
Fax: 0331/977-/2512
E-mail: fettke@uni-potsdam.de

25.03.2024

Co-author's statement

I declare that in the article/ Oświadczam, że w artykule:

Mahlow S., **Orzechowski S.**, Fettke J. (2016) Starch phosphorylation: insights and perspectives. Cellular and Molecular Life Sciences 73: 2753–2764

I was involved in the preparation of figures in the article and contributed to two chapters: „Phenotypical consequences of lacking the starch-related dikinases” and „Regulation of dikinase enzyme activity.

Brałem udział w przygotowaniu rysunków do artykułu i wspólnie z pozostałymi autorami napisałem dwa rozdziały: „Phenotypical consequences of lacking the starch-related dikinases” and „Regulation of dikinase enzyme activity.

As there is no contact any more to my former PhD student Sebastian Mahlow and I was also involved in this publication, I declare this instead of him!

Sincerely yours,



Joerg Fettke

UNIVERSITÄT POTSDAM
Institut für Biochemie und Biologie
AG Biopolymer-Analytik
Karl-Liebknecht-Str. 24-25 / Haus 20
14476 Potsdam/Golm
GERMANY



Co-author's statement

I declare that in the article/ Oświadczam, że w artykule:

Mahlow S., **Orzechowski S.**, Fettke J. (2016) Starch phosphorylation: insights and perspectives. Cellular and Molecular Life Sciences 73: 2753–2764

I was a corresponding author, this work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Grant FE 1030/1-1). I wrote one chapter: „ Action of starch-related dikinases on glucan substrates” And together with Dr. S Orzechowski, we edited the final version of the manuscript.

Byłem autorem korespondencyjnym, praca ta była wspierana przez Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Grant FE 1030/1-1). Napisałem jeden rozdział: „ Action of starch-related dikinases on glucan substrates”. I razem z dr S Orzechowskim zredagowaliśmy ostateczną wersję manuskryptu.

Sincerely yours,

Joerg Fettke

UNIVERSITÄT POTSDAM
Institut für Biochemie und Biologie
AG Biopolymer-Analytik
Karl-Liebknecht-Str. 24-25 / Haus 20
14476 Potsdam/Golm
GERMANY

Oświadczenia – P5.

Oświadczenie autora

Data: 20 marca 2024

Dr Sławomir Orzechowski

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A., Compart J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7203

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań, współwykonaniu eksperymentów (hodowla roślin, zebranie materiału, oznaczenie WSD, oraz pomiar zawartości węglowodanów i aktywności enzymów), zebraniu wszystkich wyników i ich opracowaniu graficznym, przygotowaniu manuskryptu – wersji wstępnej i ostatecznej, naniesieniu uwag współautorów, korespondencji z redakcją oraz wprowadzeniu poprawek przed opublikowaniem artykułu. Pozyskałem też niezbędne środki na badania realizowane w ramach projektu SGGW o numerze 504-02-710300-S00125-99.



Oświadczenie współautora

Data: 24.03.2024 r.

Mgr Dorota Sitnicka

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A., Compart J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7203

Brałam udział w hodowli roślin i zbieraniu materiału, wykonałam analizę ekspresji genów i izolację chloroplastów. Razem z dr S Orzechowskim oznaczałam WSD, zawartości sacharydów i aktywności inwertazy kwaśnej. Opisałam metody dt. analizy ekspresji genów. Częściowo badania zostały sfinansowane z projektu SGGW, w którym byłam kierownikiem nr.: 505-10-011300-N00223-99.



Oświadczenie współautora

Data: 21.03.2021

Dr inż. Agnieszka Grabowska

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A., Compart J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7203

Mierzyłam zawartość chlorofilu i dialdehydu malonowego w próbach.

Agnieszka Grabowska

Oświadczenie współautora

Co-author's statement

Data:25.3.24.....

Julia Compart (PhD student)

Biopolymer Analytics, University of Potsdam,

Karl-Liebknecht 24-25,

14476 Potsdam-Golm, Germany

I declare that in the article/ Oświadczam, że w artykule:

Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A., Compart J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. International Journal of Molecular Sciences 22, 7203

I was involved in the design of method for measurements of disproportioning enzyme activity and describing obtained results.

Brałem udział w opracowaniu metody pomiaru aktywności enzymów dysproporcjonujących i opisanii uzyskanych wyników.



Universität Potsdam · Postfach 601553 · 14415 Potsdam



Mathematisch-Naturwissenschaftliche
Fakultät

Institut für Biochemie und Biologie

- Biopolymer Analytics-

apl. Prof. Dr. habil Joerg Fettke

Karl-Liebknecht-Str. 24-25

Haus 20

14476 Potsdam-Golm

Tel.: 0331/977-2653

Fax: 0331/977-2512

E-mail: fettke@uni-potsdam.de

25.03.2024

Co-author's statement

I declare that in the article/ Oświadczam, że w artykule:

Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A., Compart J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. International Journal of Molecular Sciences 22, 7203

I was involved in the design of method for measurements of glucan phosphorylase activity and describing obtained results and introduction.

Brałem udział w opracowaniu metody pomiaru aktywności fosforylasy glukanów i opisanii uzyskanych wyników oraz wstępu.

Sincerely yours,

Joerg Fettke

UNIVERSITÄT POTSDAM
Institut für Biochemie und Biologie
AG Biopolymer Analytics
Karl-Liebknecht-Str. 24-25 / Haus 20
14476 Potsdam-Golm
GERMANY

Oświadczenie współautora

Data: 21.03.2024

Dr hab. Edyta Zdunek-Zastocka

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A., Compart J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7203

Brałam udział w przygotowaniu wstępu w tym artykule.

Zdunek-Zastocka

Oświadczenia – P6.

Oświadczenie autora

Data: 20 marca 2024

Dr Sławomir Orzechowski

Katedra Biochemii i Mikrobiologii

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Oświadczam, że w pracy:

Orzechowski S., Compart J., Zdunek-Zastocka E., Fettke J. (2023) Starch parameters and short-term temperature fluctuations – Important but not yet in focus? *Journal of Plant Physiology* 280 153902

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji manuskryptu, doborze współautorów oraz na napisaniu manuskryptu. Potrzeba napisania takiego artykułu zrodziła się po naszych wspólnych eksperymentach z grupą badawczą z Uniwersytetu w Poczdamie oraz we współpracy z dr hab. E. Zdunek-Zastocką. Przygotowałem wersję wstępną i ostateczną, nanosiłem uwagi współautorów, wprowadzałem poprawki przed opublikowaniem artykułu.



Universität Potsdam · Postfach 601553 · 14415 Potsdam



Mathematisch-Naturwissenschaftliche
Fakultät

Institut für Biochemie und Biologie

- Biopolymer Analytics-

apl. Prof. Dr. habil Joerg Fettke

Karl-Liebknecht-Str. 24-25

Haus 20

14476 Potsdam-Golm

Tel.: 0331/977-2653

Fax: 0331/977-2512

E-mail: fettke@uni-potsdam.de

25.03.2024

Co-author's statement

I declare that in the article/ Oświadczam, że w artykule:

Orzechowski S., Compart J., Zdunek-Zastocka E., Fettke J. (2023) Starch parameters and short-term temperature fluctuations – Important but not yet in focus? *Journal of Plant Physiology* 280 153902

I was a corresponding author, this work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-FE 1030/5–1 and 6–1). Together with Dr. S Orzechowski, we edited the final version of the manuscript.

Byłem autorem korespondencyjnym, praca ta była wspierana przez Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-FE 1030/5–1 and 6–1). Razem z dr S Orzechowskim zredagowaliśmy ostateczną wersję manuskryptu.

Sincerely yours,

Joerg Fettke

UNIVERSITÄT POTSDAM
Institut für Biochemie und Biologie
AG Biopolymer-Analytik
Karl-Liebknecht-Str. 24-25 / Haus 20
14476 Potsdam/Golm
GERMANY

II. WYKAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1). – *nie dotyczy*
2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych. – *nie dotyczy*
3. Wykaz członkostwa w redakcjach naukowych monografii. – *nie dotyczy*
4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

Publikacje niewymienione w pkt I.1 obejmują pozycje A1-A28

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

A1. Orzechowski S., Kwinta J., Gworek B., Bielawski W. (1997), Biochemical indicators of environmental contamination with heavy metals., *Polish Journal of Environmental Studies* 6: 47-50, IF₁₉₉₇ = 0,639, MNiSW₁₉₉₇ = 10 pkt; IF₂₀₂₂ = 1,8; MNiSW₂₀₂₃ = 40 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

A2. Orzechowski S., Bielawski W. (1997) Heavy metals and ammonium assimilation in triticale. *Journal of Applied Genetics* 38B: 265-270, IF₁₉₉₇ = 0,967, MNiSW₁₉₉₇ = 10 pkt; IF₂₀₂₂ = 2,4; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

A3. Orzechowski S., Socha-Hanc J., Paszkowski A. (1999), Alanine aminotransferase and glycine aminotransferase from maize (*Zea mays* L.) leaves., *Acta Biochimica Polonica*, 46: 447-457, IF₁₉₉₉ = 0,569, MNiSW₁₉₉₉ = 10 pkt; IF₂₀₂₂ = 1,7; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 21)

A4. Orzechowski S., Socha-Hanc J., Paszkowski A. (1999) Purification and properties of alanine aminotransferase from maize (*Zea mays* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21: 323-330, IF₁₉₉₉ = 0,560, MNiSW₁₉₉₉ = 10 pkt; IF₂₀₂₂ = 2,6; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 5)

A5. Orzechowski S., Socha-Hanc J., Paszkowski A. (1999) Subcellular distribution of alanine aminotransferase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21: 331-334, IF₁₉₉₉ = 0,560, MNiSW₁₉₉₉ = 10 pkt; IF₂₀₂₂ = 2,6; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 3)

Po uzyskaniu stopnia doktora:

A6. Dobrzyńska U., **Orzechowski S.** (2004) Enzymy biorące udział w biosyntezie i rozkładzie skrobi w roślinach. *Postępy Nauk Rolniczych* 5: 57-70, IF₂₀₀₄ = 0, MNiSW₂₀₀₄ = 6 pkt; IF₂₀₂₂ = 0; MNiSW₂₀₂₃ = 0 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

A7. Macewicz J., **Orzechowski S.**, Dobrzyńska U., Haebel S. (2006) Is quantity of protein in barley forms determined by proteins localized in the subaleurone layer? *Acta Physiologiae Plantarum* 28/6: 409-416, IF₂₀₀₆ = 0,528, MNiSW₂₀₀₆ = 10 pkt; IF₂₀₂₂ = 2,6; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 4)

A8. Samojedny D., **Orzechowski S.** (2007) Nowe spojrzenie na proces degradacji ziaren skrobi w chloroplastach *Arabidopsis thaliana* L. *Postępy Biochemii* 53/1: 74-83, IF₂₀₀₇ = 0, MNiSW₂₀₀₇ = 6 pkt; IF₂₀₂₂ = 0; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

A9. **Orzechowski S.** (2008) Starch metabolism in leaves. *Acta Biochimica Polonica* 55: 435-445, IF₂₀₀₈ = 1,448, MNiSW₂₀₀₈ = 20 pkt; IF₂₀₂₂ = 1,7; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 51)

P1. Dudkiewicz M., Simińska J., Pawłowski K., **Orzechowski S.** (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharide phosphorylation effect on the stabilization of the α -amylase-ligand complex. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 27: 479-495, IF₂₀₀₈ = 1,029, MNiSW₂₀₀₈ = 20 pkt; IF₂₀₂₂ = 1,0; MNiSW₂₀₂₃ = 40 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 5)

A10. Sitnicka D., Figurska K., **Orzechowski S.** (2009) Analiza funkcjonalna genów. *Postępy Biologii Komórki* 36: 503-516, IF₂₀₀₉ = 0, MNiSW₂₀₀₉ = 6 pkt; IF₂₀₂₂ = 0; MNiSW₂₀₂₃ = 20 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

A11. Kielkiewicz M., Czarnecka M., **Orzechowski S.**, Szwacka M. (2009) The role of thaumatin II in cucumber resistance against *Tetranychus urticae* Koch: laboratory and greenhouse evaluation. *Biological Letters* 46: 77-88, IF₂₀₀₉ = 0, MNiSW₂₀₀₉ = 4 pkt; IF₂₀₂₂ = 0; MNiSW₂₀₂₃ = 20 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

A12. Łazicka K., **Orzechowski S.** (2010) The characteristics of the chosen mycotoxins and their toxic influence on the human and animal metabolism. *Natural Science* 2(6): 544-550, IF₂₀₁₀ = 0, MNiSW₂₀₁₀ = 0 pkt; IF₂₀₂₂ = 0; MNiSW₂₀₂₃ = 0 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

A13. Szkop M., Sikora P., **Orzechowski S.** (2012) A novel, simple and sensitive colorimetric method to determine aromatic amino acid aminotransferase activity using the Salkowski reagent. *Folia Microbiologica* 57(1):1-4, IF₂₀₁₂ = 0,791, MNiSW₂₀₁₂ = 15 pkt; IF₂₀₂₂ = 2,6; MNiSW₂₀₂₃ = 40 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 29)

P2. **Orzechowski S.**, Grabowska A., Sitnicka D., Simińska J., Feluś M., Dudkiewicz M., Fudali S., Sobczak M. (2013) Analysis of the expression, subcellular and tissue localisation of

glucan, water dikinase (GWD3) in *Solanum tuberosum* L.: A bioinformatics approach for the comparative analysis of two α -glucan, water dikinases (GWDs) from *Solanum tuberosum* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 483–500, IF₂₀₁₃ = 1,305, MNiSW₂₀₁₃ = 25pkt; IF₂₀₂₂ = 2,6; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 12)

A14. Brust H, **Orzechowski** S, Fettke J., Steup M. (2013) Starch synthesizing reactions and paths: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Applied Glycoscience* 60: 3-20, IF₂₀₁₃ = 0, MNiSW₂₀₁₃ = 0 pkt; IF₂₀₂₂ = 1,1; MNiSW₂₀₂₃ = 20 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

P3. Sitnicka D., **Orzechowski** S. (2014) Cold-induced starch degradation in potato leaves – intercultur differences in the gene expression profile and activity of key enzymes. *Biologia Plantarum* 58(4): 659-666, IF₂₀₁₄ = 1,849, MNiSW₂₀₁₄ = 25pkt; IF₂₀₂₂ = 1,5; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 16)

A15. Simińska J., **Orzechowski** S., Bielawski W. (2015) Analysis of expression and inhibitory activity of a novel phytocystatin TrcC-6 present in developing and germinating seeds of triticale (*×Triticosecale* Wittm.) *Plant Physiology and Biochemistry* 96: 209-216, IF₂₀₁₅ = 2,928, MNiSW₂₀₁₅ = 35 pkt; IF₂₀₂₂ = 6,5; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 4)

A16. Chojnacka M.; Szewińska J.; Mielecki M.; Nykiel M.; Imai R.; Bielawski W.; **Orzechowski** S. (2015) A triticale water-deficit-inducible phytocystatin inhibits endogenous cysteine proteinases *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* 174: 161-165, IF₂₀₁₅ = 2,971, MNiSW₂₀₁₅ = 35 pkt; IF₂₀₂₂ = 4,3; MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 9)

A17. Orawetz T., Malinova I., **Orzechowski** S., Fettke J., (2016) Reduction of the plastidial phosphorylase in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) reveals impact on storage starch structure during growth at low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* 100: 141-149, IF₂₀₁₆ = 2,724, MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt; IF₂₀₂₂ = 6,5; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 27)

A18. Gietler M., Nykiel M., **Orzechowski** S., Fettke J., Zagdańska B. (2016) Proteomic analysis of S-nitrosylated and S-glutathionylated proteins in wheat seedlings with different dehydration tolerances. *Plant Physiology and Biochemistry* 108: 507-518, IF₂₀₁₆ = 2,724, MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt; IF₂₀₂₂ = 6,5; MNiSW₂₀₂₃ = 70 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 17)

A19. Krasuska U., Ciacka K., **Orzechowski** S., Bogatek R., Fettke J., Gniazdowska A. (2016) Modification of the endogenous NO level influences apple embryos dormancy by alterations of nitrated and biotinylated protein patterns *Planta* 244: 877-891, IF₂₀₁₆ = 3,361, MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt; IF₂₀₂₂ = 4,3; MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 22)

P4. Mahlow S., **Orzechowski S.**, Fettke J. (2016) Starch phosphorylation: insights and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 2753–2764, IF₂₀₁₆ = 5,788, MNiSW₂₀₁₆ = 140pkt; IF₂₀₂₂ = 8,0; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 50)

A20. Prabucka B., Mielecki M., Chojnacka M., Bielawski W., Czarnocki-Cieciura M., **Orzechowski S.** (2017) Structural and functional characterization of the triticale phytocystatin TrcC-8 and its dimerization-dependent inhibitory activity. *Phytochemistry* 142: 1-10, IF₂₀₁₇ = 3,186, MNiSW₂₀₁₇ = 35 pkt; IF₂₀₂₂ = 3,8; MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 4)

A21. Gietler M., Nykiel M., **Orzechowski S.**, Fettke J., Zagdańska B. (2017) Protein carbonylation linked to the wheat seedlings tolerance to the water deficiency. *Environmental and Experimental Botany* 137: 84–95, IF₂₀₁₇ = 3,666, MNiSW₂₀₁₇ = 40 pkt; IF₂₀₂₂ = 5,7; MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 10)

A22. Michalska K., Tomczyk A., Łotocka B., **Orzechowski S.**, Studnicki M. (2019) Oviposition by the vagrant eriophyoid mite *Aculops allotrichus* on leaves of black locust tree, *Robinia pseudoacacia*. *Experimental and Applied Acarology* 79: 1-19, IF₂₀₁₉ = 1,532, MNiSW₂₀₁₉ = 100 pkt; IF₂₀₂₂ = 2,2; MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 5)

A23. Qasim HM, **Orzechowski S.**, Fettke J., AL-Rawi SA. (2019) Identify the specificity of interaction between the *Arabidopsis* starch synthase 4 and the plastidial starch phosphorylase using a homologous protein-animal rabbit muscle phosphorylase a. *Scholars International Journal of Biochemistry* 283-289, IF₂₀₁₉ = 0, MNiSW₂₀₁₉ = 0 pkt; IF₂₀₂₂ = 0; MNiSW₂₀₂₃ = 0 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

A24. Brust H., **Orzechowski S.**, Fettke J. (2020) Starch and glycogen analyses: Methods and techniques. *Biomolecules*, 10(7), 1020, IF₂₀₂₀ = 4,878, MNiSW₂₀₂₀ = 100 pkt; IF₂₀₂₂ = 5,5; MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 25)

A25. Malinova I., Kössler S., Orawetz T., Matthes U., **Orzechowski S.**, Koch A., Fettke J. (2020) Identification of two *Arabidopsis thaliana* plasma membrane transporters able to transport Glucose 1-phosphate. *Plant and Cell Physiology*, 61(2):381-392, IF₂₀₂₀ = 4,927, MNiSW₂₀₂₀ = 140 pkt; IF₂₀₂₂ = 4,9; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 7)

A26. Zdunek-Zastocka E.; Grabowska A.; Michniewska B.; **Orzechowski S.** (2021) Proline concentration and its metabolism are regulated in a leaf age dependent manner but not by abscisic acid in Pea plants exposed to cadmium stress. *Cells* 10(4), 946, IF₂₀₂₁ = 6,600, MNiSW₂₀₂₁ = 140 pkt; IF₂₀₂₂ = 6,0; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 17)

P5. Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A., Compart J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. (2021) Effect of short-term cold treatment on the carbohydrate metabolism in potato leaves. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7203, IF₂₀₂₁ = 5,923, MNiSW₂₀₂₁ = 140 pkt; IF₂₀₂₂ = 5,6; MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 13)

A27. Majdura J.; Jankiewicz U.; Gałazka A.; **Orzechowski S.** The role of quorum sensing molecules in bacterial–plant interactions. *Metabolites* (2023), 13, 114, IF₂₀₂₂ = 4,1, MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 9)

A28. Zdunek-Zastocka E., Grabowska A., Michniewska B., **Orzechowski S.,** Compart J., Fettke J., Sagi M. (2023) *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*, representing ureide and amide legumes, respectively, exploit ureides differentially to mitigate the deleterious effects of cadmium toxicity. *Plant and Soil* 492: 439–456, IF₂₀₂₂ = 4,9, MNiSW₂₀₂₃ = 140 pkt (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

P6. Orzechowski S., Compart J., Zdunek-Zastocka E., Fettke J. (2023) Starch parameters and short-term temperature fluctuations – Important but not yet in focus? *Journal of Plant Physiology* 280, 153902, IF₂₀₂₃ = 3,686, MNiSW₂₀₂₃ = 100 pkt; (liczba cytowań wg. Bazy WoS - 0)

5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3). – *nie dotyczy*

6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3). – *nie dotyczy*

7. Wykaz wystąpień na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

RK1. Orzechowski S., Socha-Hanc J., Paszkowski A. (1998) Aminotransferazy alaninowe z liści kukurydzy (*Zea mays* L.) XXXIV Zjazd PTBioch, Białystok wrzesień

Po uzyskaniu stopnia doktora:

RK2. Orzechowski S. (2007) Co nowego w metabolizmie skrobi? Symposium "Słodkie nowości ostatniej dekady - transport, metabolizm i regulacyjna rola cukrów." Białystok Polska, kwiecień - wykład na zaproszenie organizatorów

RK3. Orzechowski S., Dudkiewicz M. (2010) Complex of starch related proteins in potato tuber. XLV Zjazd PTBioch Wisła 20-23 wrzesień *Acta Biochm. Pol, Suppl* 57/4: 99

Pozostałe formy udziału w konferencjach naukowych

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

PK1. Orzechowski S., Bielawski W. (1997) Heavy metals and ammonium assimilation in triticale. 5th International Symposium on Cereals-pathogens and stress factors interaction. September 15-17, 1997, Poznań – plakat

PK2. Orzechowski S., Socha-Hanc J., Paszkowski A. (1998) Alanine: 2-oksoglutarate aminotransferase from maize (*Zea Mays* L.) seedlings. 5th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation 3rd Fohs Biostress Symposium July 13-17 Luso, Portugal – plakat

Po uzyskaniu stopnia doktora:

PK3. Orzechowski S. Goliszewski W., Samborski S., (2001) Wstępna analiza białek związanych ze skrobią. XXXVII Zjazd PTBioch Toruń wrzesień – plakat

PK4. Macewicz J.B., Orzechowski S.R., Dobrzyńska U., Haebel S. (2003) Is quantity and quality of barley grain protein determined by the proportion of kernels with subaleurone tissue? 1st Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology Olsztyn, Poland September - Polish Journal of Natural Sciences. Suppl. 1: 179 - plakat

PK5. Feluś M., Orzechowski S. (2006) Identification and partly purification a novel homologue of glucan, water dikinase (GWD) from *Solanum tuberosum* L. 41st Meeting of the Polish Biochemical Society Białystok September Acta Biochem. Pol. Suppl. 53/1: 61 – plakat

PK6. Grabowska A., Samojedny D., Simińska J., Dudkiewicz M. Orzechowski S. (2007) Cloning and sequence analysis of phosphoglucan water dikinase gene (PWD) from *Solanum tuberosum* L. 3rd Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology Warsaw, Poland August – plakat

PK7. Orzechowski S., Sobczak M., Feluś M., Simińska J., Grabowska A. (2007) Analysis of expression and subcellular localization of phosphoglucan water dikinase (PWD) from *Solanum tuberosum* L. 3rd Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology Warsaw, Poland August – plakat

PK8. Orzechowski S., Simińska J., Grabowska A., Sobczak M. (2008) Analysis of expression and tissue localization of phosphoglucan water dikinase (PWD) gene from *Solanum tuberosum* L. XLIII Zjazd PTBioch Olsztyn 7-11 wrzesień Acta Biochem. Pol. Suppl. 55/3/2008: 213 - plakat

PK9. Dudkiewicz M., **Orzechowski S.**, Pawłowski K. (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharide phosphorylation effect on the stabilization of the beta-amylase-ligand complex. Bioinformatics 2008, 24 - 27 of April Warsaw University, Faculty of Biology – plakat

PK10. **Orzechowski S.**, Dudkiewicz M. (2008) Bioinformatics analysis of oligosaccharides phosphorylation influence on the stabilization of the beta-amylase-ligand complex 33rd FEBS & 11rd IUBMB Congress, 28 of June- 4 of July Athens, Greece FEBS J 275 Suppl 1: 216 – plakat

PK11. Dudkiewicz M., **Orzechowski S.**, Pawłowski K. (2010) Protein-protein interactions between starch related enzymes in potato. Conference “Experimental approaches to protein: protein interactions” 11—12 Styczeń, University of Sheffield, UK – plakat

PK12. Sitnicka D, Simińska J, **Orzechowski S.** (2012) Alteration of GWD genes expression during low temperature exposure in potato leaves. The First Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting Poznań wrzesień Acta Biochm. Pol, Suppl 59/3/2012: 171 – plakat

PK13. **Orzechowski S.**, Marecka D. Jóźwiak A., Sitnicka D. (2016) Changes in sugar content in leaves of two potato cultivars Desiree and Russet Burbank in response to cold Bio 2016 – 2nd Congress of Polish Biochemistry, Cell biology, Biotechnology and Bioinformatics. Wrocław 13-16 wrzesień Acta Biochm. Pol, Suppl 2/2016: pp: 20 – plakat

PK14. Ciąćka K., Krasuska U., **Orzechowski S.**, Gniazdowska A. (2016) Nitracja białek markerem spoczynku zarodków jabłoni. Streszczenia referatów i plakatów 57. Zjazdu PTB, Botanika- tradycja i nowoczesność, Lublin 27.06-3.07. 2016. str. 61. - referat

PK15. Gietler M., Nykiel M., **Orzechowski S.**, Fettke J., Zagdańska B. (2017) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in wheat seedlings with different dehydration tolerances. 8th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology - Communication in plants: from cell to environment Tom 1 (OP6.3) str. 72 - plakat

PK16. Michalska K., Łotocka B., Tomczyk A., **Orzechowski S.**, Studnicki M. (2017) Składanie jaj przez szpeciela *Aculops allotrichus* *Nalepa* na liściach robinii akacjowej. Streszczenia referatów i plakatów 35. Sympozjum Akarologiczne - Osieck 24-27.05.2017 – referat

PK17. **Orzechowski S.**, Cisowska I., Cania J., Chądzyńska M., Marecka D., Rybarczyk-Płońska A., Jasnos J., Sitnicka D. (2018) The effect of drought on the content and degradation of soluble sugars and starch in *Solanum tuberosum* L. leaves. Congress BIO 2018 Gdańsk, Poland September 18th-21th 2018 Acta Biochm. Pol, Suppl 2/2018: pp: 117 – plakat

PK18. Frontiers Forum Live: Frontiers' community summit 27-29.04.2023 – on-line

PK19. Konferencja promująca wyniki projektu Pasza Pro – 05.06.2023, Nysa, Polska

8. Wykaz udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji. – *nie dotyczy*

9. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Jako uczestnik studiów doktoranckich byłem wykonawcą w projekcie własnym KBN Nr. 5PO6A00510 pt. „Funkcje aminotransferaz glicynowych w siewkach kukurydzy”. w latach 1996-1998, którego kierownikiem był dr hab. Andrzej Paszkowski – mój promotor pracy doktorskiej. Wymiernym efektem projektu były wspólne publikacje (**A3-A5**), w części rozprawa doktorska i udział w 2 konferencjach (**RK1, PK2**).

Po uzyskaniu stopnia doktora:

2. **Podczas pobytu w Instytucie Biochemii i Biologii Uniwersytetu w Poczdamie (Niemcy)** byłem wykonawcą w projektach realizowanych przez różnych pracowników Instytutu w latach 2002-2004. Ten najważniejszy – którego realizacja trwała 2 lata to „Identification and functional analysis of carbohydrate-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* L.” Projekt ten obejmował współpracę pomiędzy naukowcami z Francji oraz firmą Jerini AG z Berlina. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w artykułach **A7, P2** jak również prezentowano podczas konferencji w formie posterów **PK4**.

3. **Projekt SGGW nr.: 50401130015 Projekt badawczy w konkursie ogłaszającym przez Rektora SGGW**

Tytuł projektu: Analiza ekspresji homologa wodnej dikinazy α -glikanów (GWD) z *Solanum tuberosum* L

Okres trwania projektu: 2005-2006 – 1 rok

Kwota dofinansowania: 25 000 PLN

Skład zespołu – Sławomir Orzechowski – kierownik projektu i wykonawca,

Cel projektu: Celem realizowanych w ramach niniejszego projektu badań była izolacja homologa enzymu wodnej dikinazy α -glikanów (GWD) (EC 2.7.9.4) z *Solanum tuberosum* L. Uzyskane białko posłużyło do wytworzenia poliklonalnych przeciwciał, które użyte zostały do analizy ekspresji homologa GWD w różnych organach ziemniaka. Wyniki planowanych badań przyczyniły się do pełniejszego poznania procesu rozkładu skrobi w plastydach, co ma

znaczenie poznawcze i praktycznie. Wyniki opublikowano w artykule **P2** jak również prezentowano podczas konferencji w formie posteru **PK5**.

4. Projekt SGGW nr.: 50401130011 Projekt badawczy w konkursie ogłaszanym przez Rektora SGGW

Tytuł projektu: Klonowanie genu kodującego dikinazę: fosfoglikan, woda z *Solanum tuberosum* L."

Okres trwania projektu: 2006-2007 – 1 rok

Kwota dofinansowania: 9 999,60 PLN

Skład zespołu – Sławomir Orzechowski – kierownik projektu i współwykonawca, wykonawcy: Agnieszka Grabowska, Dorota Samojedny, Joanna Simińska,

Cel projektu: W oparciu o poznaną sekwencję genu (1380 pz) zaprojektowane zostały startery do syntezy jednoniciowych sond cDNA w celu *in situ* hybrydyzacji lub RT-PCR. Metody te zostały wykorzystane do opisanie wzoru ekspresji genu kodującego dikinazę: fosfoglikan, woda na poziomie mRNA w różnych organach ziemniaka. Następnie wykonane zostały analizy transkrypcji tego genu. Wyniki opublikowano w artykule **P2**, jak również prezentowano podczas konferencji w formie posterów **PK6-7**.

5. Projekt KBN nr.: N N302061134 Projekt badawczy własny

Tytuł projektu: Rola fosforylacji skrobi w procesie jej degradacji w plastydach ziemniaka.

Okres trwania projektu: 2008- 2010,

Kwota dofinansowania: 198 500 PLN

Skład zespołu – Sławomir Orzechowski – kierownik projektu i współwykonawca, wykonawcy: Marcin Filipecki, Agnieszka Grabowska, Krzysztof Pawłowski, Mirosław Sobczak,

Cel projektu: Celem badań realizowanych w ramach niniejszego projektu była wstępna charakterystyka PWD - dikinazy: α -fosfoglikan, woda (EC 2.7.9.5) z *Solanum tuberosum* L.. W tym celu wykonano lokalizację transkryptu sklonowanego wcześniej genu i białka PWD w różnych tkankach ziemniaka, a w przypadku bulw w różnej fazie fizjologicznej. Stosowano metody RT-PCR *in situ* i immunolokalizację, w których wykorzystano startery i poliklonalne przeciwciała uzyskane we wcześniejszych projektach. Dodatkowo stosując ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) przeanalizowano wzory ekspresji zarówno PWD jak i GWD w cyklu dobowym w liściu. Po sklonowaniu pełnej długości genu PWD kolejnym zadaniem było przewidywanie struktury trójwymiarowej poszczególnych domen białka PWD i jego homologa GWD, budowę modeli struktur oraz dokowanie potencjalnych substratów.

Wyniki opublikowano w artykułach: **P1-2, A8**, jak również prezentowano podczas konferencji w formie referatu **RK3** i posterów: **PK8-11**.

6. Projekt SGGW nr.: 504-02-710300-S00125-99 System Wsparcia dla Naukowców i Zespołów Badawczych przez Rektora SGGW

Tytuł projektu: Metabolizm skrobi w ziemniaku w warunkach stresu chłodu i niedoboru wody.

Okres trwania projektu: 2020-2021 – 1 rok

Kwota dofinansowania: 85 000 PLN

Skład zespołu – Sławomir Orzechowski – kierownik projektu i wykonawca,

Cel projektu: Dofinansowanie uzyskano w związku z wcześniejszym złożeniem wniosku o finasowanie badań w konkursie BEETHOVEN LIFE 1 pt. „Metabolizm skrobi w ziemniaku w warunkach stresu chłodu i niedoboru wody.” Projekt był dobrze oceniony przez recenzentów NCN oraz DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) i dlatego został zakwalifikowany do Systemu Wsparcia dla Naukowców i Zespołów Badawczych przez Rektora SGGW.

Realizacja projektu została znacznie zmodyfikowana w związku z wybuchem pandemii na wiosnę 2020 roku. Pierwotnie środki miały służyć głównie na zwiększenie intensywności kontaktów międzynarodowych i promocję wyników badań na konferencjach międzynarodowych. Ostatecznie przyznane środki wykorzystano na kontynuację badań wpływu stresów abiotycznych na metabolizm roślin, które od lat prowadzimy w KBiM oraz na dofinansowanie publikacji w formule otwartego dostępu. Uzyskane wyniki badań opublikowano w artykułach: **P5-6, A25, A27**.

7. Projekt NCBiR nr 510-60-710300-S00025 Konkurs: Poddziałanie 1.1.1 PO IR „Badania przemysłowe i prace rozwojowe realizowane przez przedsiębiorstwa” (konkurs 2/1.1.1/2019-Szybka Ścieżka).

Tytuł projektu: PASZA PRO: w Technologię wykorzystania ubocznych produktów przetwórstwa płodów rolnych.

Okres trwania: 2019-2023, projekt w trakcie realizacji

W tym projekcie byłem **Kierownikiem Zadania** – kwota dofinansowania 200 000 PLN netto, Całkowita wartość projektu: 14 771 125 PLN dofinansowanie projektu z UE: 9 297 450 PLN, w tym SGGW w Warszawie 5 440 000 PLN.

Skład Konsorcjum: Bioagra S.A. Z SGGW: Instytut Nauk Drzewnych i Meblarstwa, Instytut Nauk o Zwierzętach, Instytut Biologii – KBiM – skład: Sławomir Orzechowski kierownik zadania i współwykonawca oraz wykonawcy: Beata Michniewska, Dorota Marecka Agnieszka Gałązka.

Cel projektu: Lepsze niż dotychczas wykorzystanie ziarna kukurydzy po fermentacji w biogazowni, a także wydłużenie trwałości „mokrego placka” (po fermentacji) poprzez uzyskanie nowego produktu na rynku komponentów paszowych. W skali pilotażowej została opracowana technologia wzbogacania w białko m.in. mokrego placka i otrąb zbożowych, związana z ekstrakcją części polisacharydów. Prowadzone były także prace nad technologią przerobu frakcji wyekstrahowanej w kierunku otrzymywania wartościowych produktów przeznaczonych dla przemysłu spożywczego i tworzyw sztucznych. W skali laboratoryjnej prowadzone były badania związane z rozkładem i ekstrakcją monosacharydów (C5) oraz dalszym ich wykorzystaniem. Wyniki przedstawiano na konferencji **PK19**. W planach jest, po zakończeniu projektu, przygotowanie wspólnych publikacji.

10. Wykaz członkostwa w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

Jestem członkiem Warszawskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego od 2008 roku.

11. Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. 3 miesięczne stypendium realizowane w Instytucie Biochemii i Biologii Uniwersytetu

w Poczdamie (Niemcy, 1999), finansowane przez Land Brandenburg

W trakcie pobytu w Katedrze Fizjologii Roślin Instytutu Biochemii i Biologii, w Uniwersytecie w Poczdamie uczestniczyłem w bieżących projektach realizowanych w tej pracowni. Analizowałem różne przeciwciała stosując technikę western blot w ekstraktach z liści *A. thaliana* oraz *S. tuberosum* w roślinach typu dzikiego i w różnych mutantach, które analizowano w tej Katedrze. Wykonywałem także różne elektroforogramy w warunkach natywnych badając aktywności izoenzymów fosforylasy glukanów (PHO, EC 2.4.1.1).

Po uzyskaniu stopnia doktora:

Łącznie w latach 2000-2023 odbyłem 4 zagraniczne pobyty naukowe.

2. 3-miesięczny staż realizowany w 2000 roku w Instytucie Biochemii i Biologii, Uniwersytetu w Poczdamie (Niemcy), finansowany przez Land Brandenburg

W trakcie pobytu w Katedrze Fizjologii Roślin Instytutu Biochemii i Biologii Uniwersytetu w Poczdamie uczestniczyłem w bieżących projektach realizowanych w tej pracowni. Stosowałem HPLC w celu rozdziału i dalszej analizy peptydów z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF oraz techniki dot-blot, w hydrolizatach enzymatycznych i nieenzymatycznych, co umożliwiło dokonanie lepszej charakterystyki epitopów, dla wybranych rozdzielonych wcześniej w elektroforezie SDS-PAGE białek.

3. 36-miesięczny staż realizowany w latach 2002-2004 w Instytucie Biochemii i Biologii Uniwersytetu w Poczdamie (Niemcy), finansowany przez różne projekty UP

Praktycznie cała działalność naukowa w trakcie tego pobytu związana była z realizacją projektu pt.: Identification and functional analysis of carbohydrate-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* L. Projekt ten był realizowany we współpracy pomiędzy naukowcami z Francji oraz firmą Jerini AG z Berlina i miał na celu identyfikację białek oddziałujących w sposób katalityczny i niekatalityczny z unieruchomionymi oligosacharydami, w zależności od ich struktury. Materiałem do badań stanowiły zagęszczone homogenaty z liści *Arabidopsis thaliana* L.. Jako fazę stałą zastosowano w tym projekcie unieruchomione, przy użyciu różnych odstępników (linkerów) na powierzchni membrany celulozowej bądź też na „kuleczkach” z agarozy oligosacharydy. W pierwszej części badań testowano różne odstępniki używane w trakcie immobilizacji, różniące się m.in. długością oraz sposobem związania się z oligosacharydem.

Białka wybiórczo wiążące się z poszczególnymi sacharydami były następnie identyfikowane z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF. W tym celu odmywano je z fazy stałej, rozdzielano elektroforetycznie w warunkach denaturujących, poddawano proteolizie z udziałem modyfikowanej na użytek spektrometrii mas trypsyny (MS Grade). Uzyskane peptydy były poddawane analizie MALDI-TOF. Na tej podstawie można było z dużym prawdopodobieństwem określić rodzaj analizowanego białka, które związało się z fazą stałą w takich warunkach.

W celu zwiększenia selektywności wiązania się ściśle określonych grup białek zsyntetyzowane chemicznie ligandy węglowodanowe poddawano modyfikacjom enzymatycznym m.in. z wykorzystaniem fosforylasy glikogenowej. Niestety sam projekt, a zwłaszcza jego wyniki nie były zbyt zadawalające aby bez zmian dalej realizować ten projekt. Musiałem zapoznać się z metodyką min. analizy białek, po ich wcześniejszej proteolizie z wykorzystaniem spektrometrii mas. Z jednej strony umożliwiło to wykorzystanie tej techniki

w innych projektach, z drugiej zaś zastosowanie ekstraktów uzyskanych z *S. tuberosum* zamiast z *A. thaliana*, pozwoliło na wstępną selekcję niescharakteryzowanych jeszcze białek, wykazujących powinowactwo do oligosacharydów. Spośród tych białek w dalszych badaniach, już prowadzonych w SGGW zidentyfikowałem PWD – dikinazę fosfoglukan, woda (EC 2.7.9.5) – enzym istotnie wpływający na strukturę skrobi w liściach i bulwach ziemniaka oraz mający potencjalne znaczenie biosyntezy i degradacji ziaren skrobi.

Ponadto w trakcie pobytu w Katedrze Fizjologii Roślin Instytutu Biochemii i Biologii, poza oznaczeniami ściśle związanymi z badaniami w ramach realizowanego projektu uczestniczyłem w bieżących projektach realizowanych w tej pracowni. Analizowałem zawartość skrobi, cukrów rozpuszczalnych (glukozy, fruktozy, sacharozy) i heksozofosforanów (G1P - glukozo-1-fosforanu, G6P -glukozo-6-fosforanu, F6P - fruktozo-6-fosforanu) z wykorzystaniem testów fotometrycznych w liściach *A. thaliana* oraz *S. tuberosum* w roślinach typu dzikiego i w różnych mutantach. W ten sposób poznałem wiele nowoczesnych metod biochemicznych, które z powodzeniem wykorzystywałem w dalszych badaniach prowadzonych w macierzystym uniwersytecie.

4. 3-miesięczny staż w 2015 roku realizowany w Pracowni Biopolimerów Uniwersytetu w Poczdamie (Niemcy), finansowany w ramach stypendium SGGW

Głównym celem tego stażu naukowego (01.03-31.05.2015) było ilościowe oznaczenie mono-, di- i oligosacharydów obecnych w ekstraktach z liści 2 odmian ziemniaka poddanych działaniu niskiej temperatury. Dodatkowo podjąłem próbę wyjaśnienia wpływu GWD (dikinaza glikan: woda) na strukturę powierzchni ziaren skrobi. Do tych analiz wykorzystałem spektrometrię mas (MALDI-TOF-TOF) oraz HPLC-PAD i elektroforezę kapilarną z detekcją fluorescencji indukowanej laserem (CE-LIF).

Podczas pobytu w Laboratorium Biopolimerów wykonywałem też analizy zawartości oligosacharydów w 110 próbkach z liści 2 odmian ziemniaka Russet Burbank i Desiree, które wzrastały w warunkach obniżonej temperatury. Dotychczas uzyskane wyniki badań prowadzonych w SGGW wskazywały na różnice w ekspresji wybranych genów metabolizmu sacharydów, w zależności od temperatury i odmiany. Obserwowano również zmieniający się poziom cukrów redukujących w obu odmianach, w zależności od temperatury (P3).

Wykonane analizy z wykorzystaniem HPLC-PAD wskazują na występowanie różnic w składzie oligosacharydów w liściach odmiany Russet Burbank i Desiree poddanych przez 3 godziny działaniu niskiej temperatury. Stwierdzono, że w liściach roślin poddanych działaniu niskiej temperatury zwiększało się stężenie oligosacharydu o stopniu polimeryzacji DP10 oraz zmniejszała się zawartość maltozy w porównaniu do kontroli. Wyniki te zostały potwierdzone

również po analizie z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej i fluorescencyjnie wyznakowanych sacharydów (CE-LIF).

Poza oznaczeniem cukrów rozpuszczalnych w próbkach z liści ziemniaka wykonałem eksperymenty mające na celu ustalenie zmiany struktury powierzchni skrobi pod wpływem działania GWD (dikinaza glukan: woda). W tym celu najpierw uzyskano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym białko rekombinowane StGWD. Tak uzyskany enzym inkubowano w obecności ATP z różnymi rodzajami natywnej skrobi wyizolowanej z mutantów *A. thaliana*, różniącymi się % zawartością fosforanów w skrobi. Po inkubacji ziarna skrobi trawione były izoamylazą, a uwolnione oligosacharydy analizowano z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF. Uzyskane wyniki sugerują, że GWD tylko do pewnego stopnia jest w stanie ufosforylować powierzchnię skrobi, a przedłużona inkubacja z tym enzymem nie powoduje liniowego wzrostu ufosforylowanych oligosacharydów.

W trakcie pobytu w Laboratorium Biopolimerów, poza oznaczeniami ściśle związanymi z głównym tematem moich zainteresowań badawczych uczestniczyłem w zidentyfikowaniu ok. 50 białek przywiezionych z Polski, z grup badawczych prof. B. Zagdańskiej i prof. R. Bogatek (SGGW). Identyfikację wykonano z wykorzystaniem spektrometrii masowej (MALDI-TOF).

5. 5-dniowy staż w 2023 roku realizowany w Pracowni Biopolimerów Uniwersytetu w Poczdamie, (Niemcy) finansowany ze stypendium Erasmus

W dniach **22-26.05.2023** odbyłem wyjazd szkoleniowy w celu realizacji **Specjalistycznego szkolenia z technik spektrometrii mas do analizy biomolekuł**. Celem szkolenia było pogłębienie mojej dotychczasowej wiedzy z zakresu praktycznego zastosowania spektrometrii mas. Dodatkowo zainicjowane zostały wspólne eksperymenty oraz rozmowy dotyczące możliwość wymiany studentów, doktorantów i stażystów pomiędzy Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie i Uniwersytetem w Poczdamie.

12. Wykaz członkostwa w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.). – *nie dotyczy*

13. Wykaz recenzowanych prac naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

Łącznie wykonałem kilkadziesiąt recenzji artykułów naukowych dla następujących czasopism:

3 Biotech, SPRINGER, IF = 2,8, JCI = 0,56

Acta Physiologiae Plantarum, SPRINGER, IF = 2,6, JCI = 0,69

Agronomy-Basel, MDPI, IF = 3,7, JCI = 1,04
Biomolecules, MDPI, IF = 5,5, JCI = 0,81
BMC Biology, BMC, IF = 5,4, JCI = 1,52
BMC Plant Biology, BMC, IF = 5,3, JCI = 1,36
Foods, MDPI, IF = 5,2, JCI = 0,97
Frontiers in Plant Sciences, FRONTIERS MEDIA SA, IF = 5,6, JCI = 1,24
In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant, SPRINGER, IF = 2,6, JCI = 0,54
International Journal of Molecular Sciences, MDPI, IF = 5,6, JCI = 0,71
Journal of Plant Physiology, ELSEVIER, IF = 4,3, JCI = 1,00
Plant Growth Regulation, SPRINGER, IF = 4,2, JCI = 0,79
PLoS One, PUBLIC LIBRARY SCIENCE, IF = 3,7, JCI = 0,91
Starch-Starke, WILEY, IF = 2,3, JCI = 0,48

14. Wykaz uczestnictwa w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.

Po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Projekt NCBiR nr 510-60-710300-S00025 Konkurs: Poddziałanie 1.1.1 PO IR „Badania przemysłowe i prace rozwojowe realizowane przez przedsiębiorstwa” (konkurs 2/1.1.1/2019-Szybka Ścieżka). Tytuł projektu: PASZA PRO: w Technologię wykorzystania ubocznych produktów przetwórstwa płodów rolnych. Okres trwania: 2019-2023. W tym projekcie byłem Kierownikiem Zadania. Całkowita wartość projektu: 14 771 125 PLN dofinansowanie projektu z UE: 9 297 450 PLN.

2. Projekt „Program unowocześnienia kształcenia w SGGW dla zapewnienia konkurencyjności oraz wysokiej kompetencji absolwentów” w ramach Poddziałania 4.1.1 „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni” w Priorytecie IV PO KL”. Byłem współautorem programu kursu „Biochemia” dla kierunku studiów E-Rolnictwo Okres trwania: 2009-2012 Kwota dofinansowania: 10 312 007,90 PLN

15. Wykaz udziału w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9. – *nie dotyczy*

16. Wykaz uczestnictwa w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny. – *nie dotyczy*

III. WSPÓŁPRA Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego. – *nie dotyczy*

2. Współpraca z sektorem gospodarczym.

Moje doświadczenie we współpracy z sektorem gospodarczym sprowadza się do realizacji Projektu NCBiR nr 510-60-710300-S00025 Konkurs: Poddziałanie 1.1.1 PO IR „Badania przemysłowe i prace rozwojowe realizowane przez przedsiębiorstwa” (konkurs 2/1.1.1/2019-Szybka Ścieżka). Tytuł projektu: PASZA PRO: w Technologii wykorzystania ubocznych produktów przetwórstwa płodów rolnych. W skład konsorcjum wchodziła Bioagra S.A.

3. Wykaz uzyskanych praw własności przemysłowej, w tym uzyskanych patentów krajowych lub międzynarodowych. – *nie dotyczy*

4. Wykaz wdrożonych technologii. – *nie dotyczy*

5. wykaz wykonanych ekspertyz lub innych opracowań wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.

W 2022 roku wykonałem wraz z zespołem z KBiM ekspertyzę próbek majonezu dla firmy GBA POLSKA Sp. z o.o. W dostarczonych próbkach, zgodnie ze zleceniem, za pośrednictwem Innitech4Life sp. z o.o. oznaczono aktywności lipolityczne i amylolityczne.

6. Wykaz udziału w zespołach eksperckich lub konkursowych. – *nie dotyczy*

7. Wykaz projektów artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi. – *nie dotyczy*

IV. DANE NAUKOMETRYCZNE

1. Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny).

Tabela 1. Czasopisma naukowe, w których opublikowano artykuły wymienione w pkt II

Czasopismo naukowe	Liczba artykułów	Dane naukometryczne (zgodnie z rokiem opublikowania)	
		Sumaryczny IF ^a	Suma punktów MNiSW/MEiN ^b
Plant Physiology and Biochemistry	3	8,376	105
Journal of Plant Physiology	2	6,657	135
Cells	1	6,6	140
International Journal of Molecular Sciences	1	5,923	140
Cellular and Molecular Life Sciences	1	5,788	140
Metabolites	1	5,581	100
Plant and Cell Physiology	1	4,927	140
Plant and Soil	1	4,9	140
Biomolecules	1	4,878	100
Environmental and Experimental Botany	1	3,666	40
Planta	1	3,361	35
Phytochemistry	1	3,186	35
Acta Physiologiae Plantarum	4	2,953	55
Acta Biochimica Polonica	2	2,017	30
Biologia Plantarum	1	1,849	25
Experimental and Applied Acarology	1	1,532	100
Journal of Carbohydrate Chemistry	1	1,029	20
Journal of Applied Genetics	1	0,967	10
Folia Microbiologica	1	0,791	15
Polish Journal of Environmental Studies	1	0,639	10
Postępy Nauk Rolniczych	1	0	6
Postępy Biochemii	1	0	6
Postępy Biologii Komórki	1	0	6
Biological Letters	1	0	4
Natural Science	1	0	0
Journal of Applied Glycoscience	1	0	0
Scholars International Journal of Biochemistry	1	0	0
RAZEM	34	75,62	1537

2. Liczba cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytaowań.

3. Indeks Hirscha.

Tabela 2 Szczegółowe dane naukometryczne publikacji z całego okresu pracy naukowej.

Dorobek		Przed uzyskaniem stopnia doktora		Po uzyskaniu stopnia doktora		Ogółem	
		liczba	IF ^a	liczba	IF ^a	liczba	IF ^a
artykuły naukowe w czasopismach z IF umieszczonych w JCR	wchodzące w skład cyklu artykułów			6	19,58	6	19,58
	pozostałe	5	3,295	16	52,745	21	56,04
Artykuły naukowe w pozostałych czasopismach naukowych		0	0	4	0	4	0
Ogółem liczba publikacji w czasopismach		5	3,295	29	72,325	34	75,62
Rozdziały w monografii		0	0	0	0	0	0
Sumaryczny IF zgodnie z rokiem opublikowania ^a / IF ₂₀₂₂		3,295 / 11,1		72,325 / 95,586		75,62 / 106,686	
Sumaryczna liczba punktów MNiSW, MEiN ^b / 2023		50 / 390		1487 / 2200		1537 / 2590	
Sumaryczna liczba cytowań według bazy	Web of Science	28		337		365	
	Scopus	32		366		402	
Sumaryczna liczba cytowań bez autocytowań według bazy	Web of Science	26		315		341	
	Scopus	30		347		377	
Indeks Hirscha według bazy	Web of Science	12					
	Scopus	12					

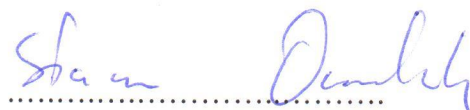
4. ^a Współczynnik wpływu (IF) według bazy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania

5. ^b punktacja według list czasopism ministra właściwego ds. szkolnictwa wyższego z rokiem opublikowania

Informacje zawarte w pkt. IV powinny wskazywać również na bazę danych, na podstawie której zostały podane.

Przy wyborze tej bazy należy zwracać uwagę na specyfikę dziedziny i dyscypliny naukowej, w której kandydat ubiega się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Rada Doskonałości Naukowej informuje, że podawanie danych naukometrycznych – w opinii Rady Doskonałości Naukowej – jest wskazane i zalecane, wynika to także ze stosowanej powszechnie praktyki przez samych kandydatów ubiegających się o awans naukowy. Należy jednak podkreślić, że podane we wnioskach o wszczęcie postępowania awansowego dane naukometryczne nie mogą stanowić kryterium oceny dorobku naukowego Kandydata dla podmiotów doktoryzujących, habilitujących oraz samej Rady Doskonałości Naukowej, organów prowadzących postępowania w sprawie nadania stopnia lub tytułu. Zadaniem tych organów jest przede wszystkim ocena ekspercka dorobku naukowego Kandydata ubiegającego się o awans naukowy, zaś decyzja o nadaniu stopnia lub tytułu nie powinna być uzależniona od podania tych danych.

A handwritten signature in blue ink, consisting of two parts: a name on the left and a surname on the right, both written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal dotted line.

(podpis wnioskodawcy)