

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: Małgorzata Janicka-Russak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

1996 – Magister Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, kierunek biologia

2001– Doktor Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, kierunek biologia, specjalność fizjologia roślin

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu:

2001- obecnie adiunkt, Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biologii Eksperymentalnej (aktualna nazwa), Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin (aktualna nazwa)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.): (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

Tytuł osiągnięcia naukowego: **Modyfikacje aktywności plazmolemowej H⁺-ATPazy w warunkach wybranych stresów abiotycznych.**

a) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Janicka-Russak M., Kłobus G. 2007. Modification of plasma membrane and vacuolar H⁺-ATPases in response to NaCl and ABA. *Journal of Plant Physiology* 164 (3) 295-302. [IF₂₀₀₇ 2.239, MNiSW: 35p] udział własny 80%
2. Janicka-Russak M., Kabała K., Burzyński M., Kłobus G. 2008. Response of plasma membrane H⁺-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots. *Journal of Experimental Botany* 59: 3721-372. [IF₂₀₀₈ 4.001, MNiSW: 45p] udział własny 70%
3. Janicka-Russak M., Kabała K., Wdowikowska A., Kłobus G. 2012. Response of plasma membrane H⁺-ATPase to low temperature in cucumber roots. *Journal of Plant Research* 125: 291-300. [IF 1.764, MNiSW: 25p] udział własny 70%

4. Janicka-Russak M., Kabala K., Burzyński M. 2012. Different effect of cadmium and copper on H⁺-ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots. *Journal of Experimental Botany* 63(11): 4133-4142. [IF 5.364, MNiSW: 45p] udział własny 85%
5. Janicka-Russak M., Kabala K. 2012. Abscisic acid and hydrogen peroxide induce modification of plasma membrane H⁺-ATPase from *Cucumis sativus* L. roots under heat shock. *Journal of Plant Physiology* 169 (16): 1607-1014. [IF 2.791, MNiSW: 35p] udział własny 90%
6. Janicka-Russak M., Kabala K., Wdowikowska A., Kłobus G. 2013. Modification of plasma membrane proton pumps in cucumber roots as an adaptation mechanism to salt stress. *Journal of Plant Physiology*. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.02.002> [IF 2.791, MNiSW: 35p] udział własny 85%

Sumaryczny Impact Factor wyżej wymienionych publikacji wynosi: **18.950**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dn. 20 grudnia 2012 oraz rozporządzenia MNiSW z 13 lipca 2012 za publikacje w części A) wynosi **220**

b) Omówienie osiągnięcia naukowego

Studia biologiczne na Uniwersytecie Wrocławskim rozpoczęłam w 1991 roku. Był to 5-cio letni okres, w którym skrupulatnie zgłębiałam wiedzę o organizmach żywych, a jednocześnie zafascynowałam się funkcjonowaniem organizmów roślinnych. Chciałam poznać poszczególne zjawiska zachodzące w żywej roślinie, procesy odpowiedzialne za te zjawiska i mechanizmy uczestniczące w regulacji tych procesów. A co ważniejsze poznać zależność między organizmem roślinnym i otaczającym go środowiskiem. Ta chęć poznania spowodowała, że na czwartym roku studiów zdecydowałam się na wykonanie pracy magisterskiej w Zakładzie Fizjologii Roślin, kierowanym wówczas przez ś.p. Profesora Józefa Buczka. Zagadnienie mojej pracy magisterskiej było związane z określeniem wpływu stresu solnego na aktywność pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu w korzeniach siewek ogórków. Wykonałam to zadanie pod kierunkiem prof. Grażyny Kłobus, która była opiekunem mojej pracy magisterskiej. Z opieki tej mogę czerpać korzyści do tej pory gdyż Pani Profesor Grażyna Kłobus jest nadal moim bezpośrednim przełożonym, mentorem i opiekunem naukowym dyskutującym, podpowiadającym i wskazującym wybór właściwej ścieżki w nauce. W kierowanym przez nią Zakładzie Fizjologii Roślin, mam możliwość do tej pory realizacji moich naukowych zamierzeń. Wówczas, w pracy magisterskiej określiłam wpływ różnych stężeń NaCl na aktywność plazmolemowej i tonoplastowej H^+ -ATPazy. Moja fascynacja nauką podczas wykonywania tych zadań i uzyskane pilotażowe wyniki stały się podwaliną do wykonania pracy doktorskiej, pod dalszym kierunkiem Prof. dr hab. Grażyny Kłobus. W kwietniu 2001 roku uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Modyfikacje aktywności pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu w warunkach stresu solnego”. Wykazałam w tej pracy, sposób modyfikacji plazmolemowej i tonoplastowej H^+ -ATPazy w korzeniach siewek ogórków poddanych przez 24 godziny działaniu 200 mM NaCl. W pracy doktorskiej, stosując odpowiednie inhibitory kinaz i fosfataz, chelatory oraz antagonistów kanałów wapniowych, pokazałam, że plazmolemowa H^+ -ATPaza jest enzymem który w warunkach krótkotrwałego, ostrego stresu solnego może podlegać posttranslacyjnej modyfikacji polegającej na fosforylacji tego białka przy udziale kinazy zależnej od wapnia i kalmoduliny. Po uzupełnieniu tych badań, opublikowałam wyniki, razem z profesorem Grażyną Kłobus, w artykule: „Modulation by cytosolic components of proton pump activities in *Cucumis sativus*, roots during salt stress” (Kłobus G, Janicka-Russak M. *Physiologia Plantarum* (2004) 121: 84-92). Publikacja ta

została przyjęta z uznaniem przez międzynarodowe gremium naukowe, czego dowodem było przyznanie jej nagrody „Faculty of 1000” w maju 2004 roku. Rekomendacje do tej nagrody złożył hiszpański profesor Ramon Serrano - niekwestionowany, znakomity naukowiec zajmujących się tematyką plazmolemowej H^+ -ATPazy. ([Ramon Serrano](#), Universidad Politecnica de Valencia-CSIC, Spain. [F1000 Microbiology](#) “This article is interesting as a reminder of the power of biochemistry in tackling regulatory problems. Plant vacuolar and plasma membrane H^+ -ATPases are activated by salt stress. Working with cucumber roots, this Polish group demonstrates that these activations are mediated by soluble calcium-calmodulin dependent protein kinases (CDPKs). The salt regulation of these proton pumps can now be understood in physiological terms because salt stress induces an increase in cytosolic calcium and in expression of CDPKs. This is an important confirmation of previous work by other laboratories. Serrano R: F1000 Prime Recommendation of [Kłobus G and Janicka-Russak M, *Physiol Plant* 2004, 121(1):84-92]. Faculty of 1000, 06 May 2004; DOI: 10.3410/f.1006665.213416. [f1000.com/prime/1006665#eval213416](#)). Nasze badania szły równolegle z najnowszymi, światowymi doniesieniami na temat regulacji tego kluczowego białka enzymatycznego jakim jest plazmolemowa H^+ -ATPaza. To osiągnięcie stało się dla mnie bazą i punktem wyjścia do dalszych badań na temat regulacji aktywności plazmolemowej H^+ -ATPazy w warunkach różnych stresów abiotycznych.

Plazmolemowa H^+ -ATPaza jest podstawowym enzymem odpowiedzialnym za utrzymanie gradientu elektrochemicznego błony, wytwarzanego wskutek jednokierunkowego transportu protonów z cytoplazmy do apoplastu, przy udziale energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Gradient elektrochemiczny generowany przez H^+ -ATPazę jest wykorzystywany w komórce roślinnej w wielu podstawowych procesach fizjologicznych, takich jak: regulacja wewnątrzkomórkowego pH, regulacja potencjału osmotycznego i związanych z tym procesów, „kwaśny” wzrost ściany komórkowej i elongacja komórek oraz transport rozmaitych substancji, w tym także składników odżywczych na drodze symportu i antyportu. Badania ostatnich lat, w których mam swój znaczący udział, pokazały istotną rolę H^+ -ATPazy w generowaniu reakcji odpornościowych w warunkach stresowych, pojawiających się podczas całego życia rośliny. Wiadomo, że modyfikacja aktywności może obejmować transkrypcyjny jak i posttranskrypcyjny poziom. Doniesienia literaturowe wskazywały zmiany ekspresji genu kodującego plazmolemową H^+ -ATPazę w odpowiedzi na różne czynniki środowiskowe. Oprócz genetycznej regulacji pompy protonowej możliwa jest jej

modyfikacja przez szybkie zmiany posttranslacyjne na poziomie białka, na skutek odwracalnej fosforylacji. Niezwykle ważną rolę w takiej regulacji plazmolemowej H^+ -ATPazy odgrywa jej autoinhibitorowy region znajdujący się na C-końcu białka enzymatycznego. Domena C-końcowa H^+ -ATPazy, w stanie niskiej aktywności białka, wchodzi w interakcje z regionem katalitycznym, ograniczając w ten sposób aktywność enzymu. Wiele danych sugeruje, że w aktywacji plazmolemowej ATPazy istotną rolę pełni fosforylacja reszty treoninowej w pozycji 948 (Thr-948), pozwalająca na przyłączenie białka 14-3-3. Przyłączenie białka 14-3-3 powoduje przesunięcie C-końcowej domeny autoinhibitorowej i aktywację plazmolemowej pompy protonowej. Przegląd informacji na temat budowy, funkcjonowania i regulacji plazmolemowej H^+ -ATPazy, szczególnie w stresach abiotycznych przedstawiłam w rozdziale książki wydawnictwa In-Tech z 2011 roku (ABIOTIC STRESS RESPONSE IN PLANTS –PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND GENETIC PERSPECTIVES Edited by Arun Kumar Shanker and B. Venkateswarlu, ISBN 979-953-307-195-3, rozdział 8: Plant Plasma Membrane H^+ -ATPase in Adaptation of Plants to Abiotic Stresses).

Rośliny stale narażone są na zmienne, często niekorzystne warunki środowiska, muszą więc być przystosowane i odpowiednio na nie reagować. Stresy abiotyczne często prowadzą u roślin do uszkodzeń i wzrostu przepuszczalności błon. Utrzymanie równowagi jonowej i uzupełnienie utraconych substancji jest niezwykle ważne w procesach naprawczych. Transport substancji przez plazmolewę wymaga wzrostu gradientu protonów generowanego przez H^+ -ATPazę. Ponadto w warunkach stresowych takich jak zasolenie, czy metale ciężkie następuje nadmierna akumulacja toksycznych jonów w cytoplazmie. W celu przetrwania niekorzystnych warunków rośliny muszą usuwać z cytoplazmy toksyczny nadmiar jonów. Podczas zasolenia usuwanie tych jonów jest możliwe dzięki funkcjonowaniu w plazmolemie i tonoplaście antyportera sodowo/protonowego, dla którego źródłem siły jest gradient protonów wytwarzany przez plazmolemową i tonoplastową H^+ -ATPazę. Udział takiego antyportera zarówno w plazmolemie jak i tonoplaście wykazałam, w roślinach traktowanych 24 godziny 200 mM NaCl i opublikowałam w artykule: „ Na^+/H^+ antiport activity in plasma membrane and tonoplast vesicles isolated from NaCl-treated cucumber roots” (Kabała K., Janicka-Russak M. (2012) *Biologia Plantarum* 56: 377-382). Generowanie gradientu protonów przez plazmolemową H^+ -ATPazę, prowadzące do wytworzenia siły protonomotorycznej, może być wykorzystany przez wtórne transportery zarówno do eksportu toksycznych substancji poza

obszar komórki roślinnej jak i do importu utraconych substancji odżywczych. Tak więc, modyfikacja aktywności plazmolemowej H^+ -ATPazy może być spójnym elementem obrony roślin w odpowiedzi na stresy abiotyczne. Z tego względu poznanie mechanizmów i szlaków reakcji prowadzących do zmiany aktywności plazmolemowej H^+ -ATPazy w warunkach różnych krótko i długo działających stresów abiotycznych stało się celem przewodnim moich badań, którego efektem finalnym jest cykl publikacji składających się na rozprawę habilitacyjną: Modyfikacje aktywności plazmolemowej H^+ -ATPazy w warunkach wybranych stresów abiotycznych.

W pierwszej pracy z tego cyklu: "Modification of plasma membrane and vacuolar H^+ -ATPases in response to NaCl and ABA" (Janicka-Russak M., Kłobus G. (2007) *Journal of Plant Physiology* 164: 295-302) pokazałam, że zmiany aktywności pompy w warunkach stresu solnego angażują oprócz wykazanych wcześniej modyfikacji posttranslacyjnych białka (Kłobus G., Janicka-Russak M. 2004), także modyfikacje na poziomie genetycznym. Wykazałam w tych badaniach także, że w warunkach 24 godzinnego działania 200 mM NaCl wzrost aktywności plazmolemowej H^+ -ATPazy był skorelowany ze wzrostem poziomu kwasu abscysynowego. Ponadto okazało się, że traktowanie siewek ogórków 50 μ M ABA powodowało wzrost aktywności badanego białka. Kwas abscysynowy wykazywał stymulujące działanie na aktywność H^+ -ATPazy tylko w reakcjach *in vivo*, natomiast wprowadzenie go do mieszaniny reakcyjnej nie zwiększało aktywności badanego białka. Co sugerowało, że ABA nie ma bezpośredniego wpływu na białko, a przyczynia się do innych zmian prowadzących do zwiększenia aktywności plazmolemowej pompy protonowej. Okazało się, że traktowanie roślin kwasem abscysynowym powodowało wzrost poziomu transkryptu plazmolemowej H^+ -ATPazy. Uzyskane wówczas wyniki dowodziły, że w warunkach zasolenia działanie ABA, polegające na stymulacji plazmolemowej H^+ -ATPazy może odbywać się na poziomie ekspresji genów. Opublikowana praca miała charakter nowatorski, ponieważ była pierwszą publikacją pokazującą w jaki sposób ABA może przyczyniać się do stymulacji plazmolemowej H^+ -ATPazy w warunkach zasolenia. Do tej pory jest chętnie cytowana przez osoby zajmujące się problematyką zasolenia i roli plazmolemowej H^+ -ATPazy w tym procesie.

Kolejna praca wchodząca w wyżej wymieniony cykl, to: „Response of plasma membrane H^+ -ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots” (Janicka-Russak M., Kabała K., Burzyński M., Kłobus G. (2008) *Journal of Experimental Botany* 59: 3721-372).

Wyniki do tej publikacji uzyskałam dzięki uczestnictwie, jako wykonawca, w projekcie badawczym własnym, KBN nr 3P04C03424, 2003-2005, „Molekularne podstawy zaburzeń gospodarki azotowej roślin wywoływane obecnością metali ciężkich w środowisku”, którego kierownikiem była Prof. dr hab. Grażyna Klobus. Mój udział w tym grantie skupiał się na określeniu roli plazmolemowej H^+ -ATPazy w komórkach siewek ogórka narażonych na działanie stresu wywołanego obecnością metali ciężkich w środowisku zewnętrznym. Metale ciężkie prowadzą do zaburzenia struktury i funkcjonowania plazmolemy oraz do akumulacji toksycznych jonów metali ciężkich w cytoplazmie. Utrzymanie wtórnego transportu jonów przez plazmolemę wymaga wzmożonego generowania gradientu protonów przez PM- H^+ -ATPazę. Ponadto gradient ten może być wykorzystany do usuwania toksycznych jonów z cytoplazmy poza komórkę. Nadmiar toksycznych metali może być usunięty z cytozolu przez wtórne transportery na zasadzie antyportu z protonami (np. CDF). Dodatkowo metale ciężkie prowadzą do dehydratacji co, oprócz gromadzenia nadmiernej (toksycznej) ilości zbędnych jonów (metali ciężkich) jest elementem wspólnym badanego przeze mnie wcześniej stresu wywołanego zasoleniem i metalami ciężkimi. Stąd uczestnictwo w tym grantie i wykonanie powierzonych mi badań było dla mnie szczególnie interesujące. Okazało się jednak, że w roślinach traktowanych 2 godziny 10 lub 100 μ M kadmem, miedzią lub niklem następowało hamowanie aktywności plazmolemowej H^+ -ATPazy, mierzonej zarówno jako aktywność hydrolityczna (hydroliza ATP przez pompę protonową) jak i transport protonów. Nie zmieniał się poziom transkryptyu plazmolemowej H^+ -ATPazy. Ciekawym stało się wyjaśnienie, co jest przyczyną hamowania aktywności badanego białka. Okazało się, że hamowanie przez metale ciężkie H^+ -ATPazy było częściowo niwelowane obecnością kantarydyny. Jest to specyficzny inhibitor białkowych fosfataz. Sugerowało to, że hamowanie aktywności H^+ -ATPazy może wynikać ze zmian potranslacyjnych polegających na fosforylacji i defosforylacji białka. Analizy Western blot z użyciem przeciwciał przeciwko fosfotreoninie potwierdziły, że obniżenie aktywności plazmolemowej H^+ -ATPazy w obecności metali ciężkich wynika z zmian polegających na defosforylacji białka enzymatycznego. Wynik był nieco zaskakujący, bo odbiegał od oczekiwanego. Wydawało się, że wzmożona aktywność plazmolemowej H^+ -ATPazy w warunkach obecności metali ciężkich w środowisku przyczyniłaby się do wytworzenia gradientu protonów w poprzek plazmolemy, który mógłby być wykorzystany przez komórki roślinne do detoksykacji cytozolu i usuwania toksycznych jonów metali ciężkich oraz do uzupełnienia ubytku substancji odżywczych. Z drugiej jednak strony,

badalam tylko krótko trwający stres (2 godziny). Być może moja koncepcja sprawdziłaby się, gdyby założyć inne warunki doświadczenia - długoterminowe badania. Ponadto wiemy, że jedną ze strategii obronnych rozwijanych przez rośliny w warunkach stresów związanych z obecnością metali jest efektywne hamowanie ich pobierania z roztworów glebowych. Znaczący udział w tym procesie odgrywają białka o charakterze aktywnych, wtórnych transporterów (Nramp, YSL, COP), wykorzystujące gradient protonów generowany przez plazmolemową H^+ -ATPazę. Wydaje się więc, że hamowanie aktywności PM- H^+ -ATPazy w krótko trującym stresie metali ciężkich jest korzystne dla funkcjonowania roślin, ogranicza bowiem w pewnym stopniu napływ toksycznych jonów do komórki.

W dalszej kolejności, w ramach już własnego grantu (projekt badawczy habilitacyjny MNiSW nr N N303 027237 „Analiza szlaków reakcji prowadzących do modyfikacji aktywności plazmolemowej pompy protonowej w warunkach wybranych stresów abiotycznych”, kierownik projektu, 2009-2011) sprawdziłam wobec tego jaki wpływ na plazmolemową H^+ -ATPazę będzie miało dłuższe działanie metali ciężkich. Okazało się, że dłuższe traktowanie siewek ogórka metalami ciężkimi (6 dni $10\mu M$ Cd lub Cu) prowadzi do stymulacji aktywności plazmolemowej pompy protonowej. Określiłam poziom transkryptu genów kodujących PM H^+ -ATPazę, z którego wynikało, że w przypadku kadmu stymulacja pompy protonowej mogła nastąpić na drodze stymulacji ekspresji genów H^+ -ATPazy. Miedź nie zmieniała poziomu ekspresji genów kodujących badane białko. Ponadto dzięki analizie Western blot z przeciwciałami przeciwko fosfotreoninie i białku 14-3-3 wykazałam, że w warunkach długotrwałego działania metali ciężkich (Cd i Cu) stymulacja aktywności pompy protonowej wynika z fosforylacji białka H^+ -ATPazy. Dodatkowo wykazałam, że miedź wyraźnie zwiększała aktywność katalazy i peroksydazy askorbinianowej oraz redukowała poziom nadtlenu wodoru w korzeniach siewek ogórków. Z drugiej strony, kadm w ogóle nie zmieniał tych parametrów. Uzyskane wyniki sugerują, że kadm i miedź w inny sposób mogą prowadzić do modyfikacji aktywności PM H^+ -ATPazy. Otrzymane wyniki złożyły się na kolejną publikację: “Different effect of cadmium and copper on modification of H^+ -ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots”. (Janicka-Russak M., Kabała K., Burzyński M. (2012) *Journal of Experimental Botany* 63(11): 4133-4142), która wchodzi w skład opisywanego przeze mnie cyklu publikacji składających się na rozprawę habilitacyjną. Wyniki tej pracy wyraźnie pokazują ważną rolę plazmolemowej H^+ -ATPazy w adaptacji roślin do stresu wynikającego z obecności metali ciężkich w środowisku. W

długoterminowym działaniu metali, kiedy dochodzi do nagromadzenia toksycznych jonów w cytoplazmie i uszkodzenia błon, a co za tym idzie ubytku substancji odżywczych, wygenerowanie gradientu protonów aby niwelować te negatywne skutki jest bardzo ważne dla roślin do przetrwania warunków stresowych wywołanych metalami ciężkimi. Oryginalny wkład obu powyższych prac w wyjaśnienie roli plazmolemowej pompy protonowej w adaptacji roślin do stresów wywołanych metalami ciężkimi w środowisku jest bardzo duży. Do tej pory w literaturze nie było takich kompleksowych prac pokazujących sposób modyfikacji plazmolemowej pompy protonowej w roślinach narażonych na działanie metali ciężkich. Doniesienia literaturowe wskazywały jedynie na bezpośredni wpływ, stymulujący lub hamujący, metali na aktywność plazmolemowej H^+ -ATPazy, bez wyjaśniania przyczyn tej stymulacji czy hamowania aktywności białka. Moje dwie prace były zatem pierwszymi publikacjami, przejrzyste pokazującymi, przy użyciu odpowiednich inhibitorów kinaz i fosfataz oraz przeciwciał skierowanych przeciwko fosfotreoninie i białku 14-3-3, udział procesów fosforylacji i defosforylacji białka w stresie wywołanym metalami ciężkimi. Ponadto pokazałam różny mechanizm, prowadzący do aktywacji plazmolemowej pompy protonowej, uruchamiany przez różne metale. W przypadku kadmu stymulacja pompy protonowej mogła nastąpić na drodze stymulacji ekspresji genów H^+ -ATPazy i zmian potranslacyjnych. W przypadku miedzi stymulacja badanego białka następowała tylko na skutek zmian potranslacyjnych, Cu nie zmieniało poziomu ekspresji genów kodujących H^+ -ATPazę. Pierwsza z tych prac jest chętnie cytowana przez osoby z innych ośrodków badawczych na świecie, zajmujące się podobną tematyką.

Wzrost przepuszczalności błony w wyniku jej uszkodzenia występuje też podczas stresu chłodu. Stąd (w ramach wspomnianego grantu habilitacyjnego 2009-2011) zbadalam wpływ obniżonej temperatury ($10^{\circ}C$) na modyfikację plazmolemowej pompy protonowej. Rośliny były narażone na działanie chłodu przez 3 lub 6 dni. Część roślin po trzech dniach chłodu była przenoszona do temperatury optymalnej na kolejne trzy dni (rośliny post-cold, PC). Aktywność plazmolemowej H^+ -ATPazy zmniejszała się w roślinach traktowanych 3 dni chłodem. Natomiast w roślinach dłużej traktowanych chłodem i w roślinach PC obserwowałam stymulację aktywności tego enzymu. Największą aktywność białka oznaczyłam w roślinach PC, tzn. po wycofaniu czynnika stresogennego, kiedy to w roślinach następowały procesy naprawcze. Poziom mRNA plazmolemowej pompy protonowej był skorelowany z aktywnością H^+ -ATPazy. Transkrypty *CsHAs* malały po trzech dniach chłodu

a rosły po sześciu i w roślinach PC. Modyfikacja poziomu transkryptów genów kodujących PM H^+ -ATPazę mogła wynikać z działania H_2O_2 . Doniesienia literaturowe wskazywały, na istotną rolę H_2O_2 w podnoszeniu tolerancji roślin na stresy abiotyczne. W wyniku zwiększonej ilości nadtlenu wodoru w tkankach następuje bowiem wzmożona ekspresja niektórych genów. Uważa się, że H_2O_2 funkcjonuje jako cząsteczka sygnałowa w pierwszych etapach obecności czynnika stresowego. Reaktywne formy tlenu, do których należy nadtlenek wodoru, są jednak toksycznymi cząsteczkami dla żywych organizmów. Ich nadmiar prowadzi do uszkodzeń błon komórkowych i białek. W optymalnych dla życia warunkach synteza RFT utrzymywana jest na niskich poziomach. Jednak podczas stresów ich produkcja w tkankach roślinnych drastycznie wzrasta. Istnieje więc delikatna granica pomiędzy destrukcyjnym a sygnałowym działaniem nadtlenu wodoru. Dwa zupełnie różne oblicza H_2O_2 wymagają niezmiernie precyzyjnej kontroli jego poziomu w tkankach. Niewątpliwie więc, mechanizm kontrolujący szlak sygnałowy RFT w komórkach podczas stresów abiotycznych może być skuteczną strategią podnoszącą tolerancję roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe. Na podstawie powyższych danych ciekawym wydało się zbadać czy w modyfikacji plazmolemowej H^+ -ATPazy, której udział w adaptacji do stresów abiotycznych jest bardzo istotny, tzw. RFT signaling, a w szczególności H_2O_2 bierze też udział. W roślinach PC bardzo wyraźnie podnosił się poziom nadtlenu wodoru. Wykazałam, że nadtlenek stymuluje ekspresję genów plazmolemowej pompy protonowej. Oprócz tego, pokazałam, że zmiana aktywności PM- H^+ -ATPazy w warunkach chłodu nie wynikała ze zmian potranslacyjnych polegających na fosforylacji/defosforylacji białka. Reasumując, oryginalny i nowatorski charakter powyższej pracy polegał przede wszystkim na pokazaniu udziału H_2O_2 w stymulacji plazmolemowej H^+ -ATPazy w roślinach narażonych na działanie niskich temperatur. Ponadto czas poświęcony na te badania szczęśliwie zbiegł się z bardzo istotnym wydarzeniem naukowym, dla osób które swoje prace wykonują na roślinie badawczej jaką jest ogórek-*Cucumis sativus*. W 2009 roku został bowiem zsekwencjonowany genom ogórka i opublikowany w banku genów przez Huang i współpracowników (Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas WJ, Wang X i inni (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nat Genet 41:1275-1281). Bazując na tym genomie mgr Anna Wdowikowska z mojego Zakładu, w ramach wykonywanego przez nią doktoratu wykazała, że genom ogórka koduje potencjalnie 10 izoform plazmolemowej H^+ -ATPazy, z czego 6 ekspresjonowanych jest w korzeniu. Korzystając z przygotowanych przez mgr Wdowikowską (która jest

współautorem opisywanej pracy) starterów mogłam wykonać precyzyjne badania genetyczne dokładnie pokazujące które izoformy plazmolemowej H^+ -ATPazy w korzeniach siewek ogórków są zaangażowane w adaptację do stresu wywołanego niską temperaturą. Do tej pory w literaturze nie było tak kompleksowych badań pokazujących sposób modyfikacji plazmolemowej H^+ -ATPazy w roślinach w warunkach chłodu. Opisane wyniki są zawarte w artykule: „Response of plasma membrane H^+ -ATPase to low temperature in cucumber roots” (Janicka-Russak M., Kabała K., Wdowikowska A., Kłobus G. (2012) Journal of Plant Research. 125: 291-300), który wchodzi, jako czwarty, w skład opisywanego cyklu publikacji.

W ramach grantu habilitacyjnego określiłam też modyfikacje PM H^+ -ATPazy w warunkach szoku cieplnego (z ang. heat shock, HS). HS jest czynnikiem stresowym, który w sposób szczególny powoduje uszkodzenia błon, a przez to wpływ substancji odżywczych i zaburzone pobieranie jonów. Rośliny (tygodniowe siewki ogórków) były poddane działaniu temperatury $48^{\circ}C$ przez 2 godziny. Część roślin po 2-godzinnym HS była przenoszona do warunków optymalnych na kolejne 24 godziny (post stress, PS). Obserwowałam wyraźny wzrost aktywności badanego białka w plazmolemie pochodzącej z korzeni roślin PS. Stosując przeciwciała na fosfotreoninę i białka 14-3-3 pokazałam, że krótkie działanie wysokiej temperatury powodowało wzrost fosforylacji badanego białka, przyczyniając się do stymulacji jego aktywności. Natomiast określając poziom transkryptów wykazałam, że w roślinach PS ekspresja genów *CsHA4* i *CsHA8* była istotnie stymulowana. Ponadto stwierdziłam, że poziom ABA i H_2O_2 wyraźnie rósł w wyniku traktowania roślin wysoką temperaturą. We wcześniejszych pracach wykazałam, że zarówno ABA jak i H_2O_2 mogą stymulować ekspresje genów kodujących plazmolemową H^+ -ATPazę w korzeniach siewek ogórków. Ciekawym było wyjaśnienie czy ścieżki transdukcji sygnału prowadzące do stymulacji aktywności PM H^+ -ATPazy z udziałem ABA i H_2O_2 działają niezależnie, czy występuje krzyżowanie się tych dróg sygnałowych i czy dwa wspomniane elementy tych kaskad reakcji są od siebie zależne czy nie. Aby to zbadać zastosowałam inhibitory syntezy obu tych związków, tzn. wolframian (inhibitor ABA-aldehydowej oksydazy) lub difenyleneiodonium, DPI (inhibitor oksydazy NADPH, hamujący syntezę H_2O_2) zanim rośliny poddałam działaniu wysokiej temperatury. Istniały dane literaturowe wskazujące, że ABA może przyczyniać się do zwiększone ilości poziomu nadtlenu w roślinach narażonych na działanie różnych stresów abiotycznych poprzez stymulację aktywności oksydazy NADPH

- produkującej anionorodnik ponadtlenkowy, który bardzo szybko jest przekształcany przez dysmutazę ponadtlenkową do nadtlenu wodoru. Wydawało się więc, że podwyższony poziom nadtlenu obserwowany w pracy mógł wynikać ze zwiększonej ilości ABA w siewkach narażonych na działanie wysokiej temperatury. Ponadto pokazałam, że traktowanie roślin kwasem abscysynowym powodowało stymulację ekspresji genów kodujących te same izoformy H⁺-ATPazy, których ekspresja była stymulowana wysoką temperaturą (*CsHA4* i *8*). Mogłam więc spekulować, że wzrost aktywności PM H⁺-ATPazy w korzeniach siewek ogórków narażonych na działanie wysokiej temperatury, mógł wynikać ze zwiększonej ilości ABA w tkankach, który wpływałby na produkcję H₂O₂ i oba te związki, albo tylko H₂O₂ zwiększałyby ekspresję genów plazmolemowej pompy protonowej. Jednak wykonane doświadczenia ze wspomnianymi inhibitorami pokazały zupełnie inną kaskadę reakcji w siewkach ogórka narażonych na wysoka temperaturę. Wyniki przeprowadzonych analiz pokazały, że podczas działania HS, w pierwszej kolejności podwyższa się poziom H₂O₂ i dopiero ta zmiana może pociągać za sobą wzrost syntezy ABA, ponieważ aplikacja DPI, hamująca syntezę H₂O₂ blokowała także syntezę ABA. Z drugiej strony hamowanie syntezy ABA nie zmieniało poziomu H₂O₂ w tkankach. Wyniki badań własnych są sprzeczne z doniesieniami literaturowymi i pokazują, że w roślinach być może funkcjonuje ścieżka sygnałowa, gdzie to nie ABA zwiększa syntezę nadtlenu ale właśnie nadtlenek może promować powstanie ABA. Zanim nastąpi złożona synteza ABA, w tkankach zachodzi najprawdopodobniej szybka synteza nadtlenu, po której to dopiero następuje wzmożona synteza ABA i odpowiedź na czynnik stresowy. Niezależnie od powyższych rozważań, pokazałam, że obie wspomniane cząsteczki sygnałowe: ABA i H₂O₂ wydają się odgrywać istotną rolę indukcji aktywności plazmolemowej H⁺-ATPazy, w warunkach wysokiej temperatury, a w szczególności w roślinach gdzie czynnik stresogenny został wycofany i następują już procesy naprawcze. Nowatorski charakter prezentowanych badań dotyczących wysokiej temperatury polegał przede wszystkim na kompleksowym przedstawieniu wpływu HS na plazmolemową pompę protonową. Do tej pory w literaturze nie było żadnych prac wyjaśniających ścieżki transdukcji sygnału prowadzące do modyfikacji plazmolemowej H⁺-ATPazy i mówiących o roli tego białka w adaptacji roślin do wysokiej temperatury. Ponadto kaskada reakcji, w których to transdukcja sygnału przebiega w kolejności H₂O₂ i dopiero ABA nie była nigdy dotąd prezentowana. Przedstawione wyniki zamieściłam w publikacji (piąta w cyklu): "Abscisic acid and hydrogen peroxide induce modification of plasma

membrane H⁺-ATPase from *Cucumis sativus* L. roots under heat shock". Janicka-Russak M., Kabała K. (2012), *Journal of Plant Physiology*. 169 (16): 1607-1014.

W ramach wymienionego grantu wróciłam także do badań plazmolemowej H⁺-ATPazy w kontekście stresu solnego. Poznanie mechanizmów regulacji aktywności tego białka, w kontekście innych stresów - chłód, metale ciężkie czy wysoka temperatura - zmuszało mnie do zadania sobie pytania, czy w stresie solnym ścieżki transdukcji sygnału prowadzące do wzrostu aktywności pompy protonowej są takie same jak w stresach spowodowanych zmianami temperatury czy metalami ciężkimi w środowisku. Na początku mojego kontaktu z nauką (praca magisterska, doktorat) badałam plazmolemową H⁺-ATPazę tylko w kontekście krótkotrwałego (24 godziny) ostrego stresu solnego (200mM NaCl). Ciekawym było określenie mechanizmów modyfikacji H⁺-ATPazy w roślinach narażonych na długotrwały, łagodny stres solny. Chcąc odpowiedzieć na nurtujące mnie pytanie określiłam wpływ 50 mM chlorku sodu na aktywność plazmolemowej pompy protonowej. Rośliny były narażone na działanie soli przez 1, 3 i 6 dni. W stresowanych roślinach stwierdziłam słabą stymulację aktywności hydrolitycznej, natomiast bardzo duży wzrost transportu protonów przez plazmolemę. Współczynnik sprzężenia H⁺/ATP wyraźnie rósł w wyniku zasolenia i był największy w roślinach poddanych 6-cio dniowemu zasoleniu. Obserwowałam też podwyższony poziom nadtlenu wodoru, przy czym największy jego poziom określiłam w roślinach traktowanych 6 dni NaCl. Dodatkowo, po 6-ciu dniach stresu solnego w korzeniach siewek ogórków pojawiły się białka HSP17,7 i HSP101, sugerujące, że w roślinach rozpoczynają się procesy naprawcze i adaptacyjne do stresu. Dodatkowo, przy udziale przeciwciał skierowanych przeciwko fosfotreoninie i białku 14-3-3, wykazałam, że w warunkach łagodnego, długotrwałego zasolenia zmiana aktywności pompy protonowej wynika ze zmian na poziomie posttranslacyjnym. Oprócz modyfikacji potranslacyjnych stymulacja aktywności białka mogła również wynikać ze zmian na poziomie genetycznym. Okazało się bowiem, że w warunkach zasolenia pojawia się w siewkach ogórka dodatkowa izoforma PM H⁺-ATPazy (*CsHA1*), która nie ulega ekspresji w roślinach nie poddanych działaniu soli. Pojawienie się nowej izoformy, oprócz wzrostu aktywności H⁺-ATPazy, świadczy o ważnej roli białka *CsHA1* w utrzymaniu homeostazy jonowej w roślinach podczas stresu solnego. Wyniki zamieściłam w publikacji: "Modification of plasma membrane proton pumps in cucumber roots as an adaptation mechanism to salt stress". Małgorzata Janicka-Russak, Katarzyna Kabała, Anna Wdowikowska, Grażyna Kłobus, *Journal of Plant*

Physiology (2013) (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.02.002>), która stanowi ostatnią, szóstą pracę cyklu.

Najważniejsze, oryginalne osiągnięcia badań opublikowanych w cyklu prac habilitacyjnych to:

1. Wykazanie potencjalnej roli plazmolemowej H⁺ATPazy w adaptacji ogórka do stresu solnego, metali ciężkich, zbyt niskiej lub zbyt wysokiej temperatury.
2. Udowodnienie, że zmiany aktywności pompy indukowane stresogennymi czynnikami abiotycznymi (NaCl, metale ciężkie, niska i wysoka temperatura) obejmują genetyczny i posttranslacyjny poziom regulacji.
3. Pokazanie, że posttranslacyjna modyfikacja pompy polega na odwracalnej fosforylacji białka enzymatycznego i odpowiada za wzrost jego aktywności.
4. Prześledzenie zmian na poziomie genetycznym i wskazanie izoform plazmolemowej H⁺-ATPazę, których ekspresja zmienia się istotnie w poszczególnych stresach.
5. Wskazanie na specyficzne funkcje izoformy *CsHAI* w generowaniu odporności na stres solny.
6. Wykazanie niezmiernie ważnej roli ABA i H₂O₂ w adaptacji plazmolemowej pompy protonowej w korzeniach siewek ogórka do stresów abiotycznych oraz ścieżki reakcji w których te dwie ważne molekuly biorą udział.

Obecnie mam możliwość kontynuowania prac związanych z poznawaniem ścieżek transdukcji sygnału prowadzących do zmiany aktywności plazmolemowej H⁺-ATPazy w warunkach różnych stresów abiotycznych, ponieważ uzyskałam finansowanie badań, w postaci grantu na badania własne (OPUS, nr rejestracyjny 2012/05/B/NZ3/00422), zatytułowanego: Udział cząsteczek sygnałowych, H₂O₂, NO i H₂S, w adaptacji siewek *Cucumis sativus* L. do stresów abiotycznych. Jestem kierownikiem tego grantu, przewidzianego na lata 2013-2016.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poniżej przedstawiam wykaz innych opublikowanych prac naukowych nie wchodzących w skład wcześniej opisanego osiągnięcia naukowego.

1. Janicka-Russak M., Kłobus G. 2002. Modyfikacje pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu w warunkach stresu solnego. *Zeszyty Problemowe Nauk Rolniczych*. vol 481: 417- 422. Udział własny to 80%
2. Kabała K., Kłobus G., Janicka-Russak M. 2003. Nitrate transport across the tonoplast of *Cucumis sativus* L. root cells. *Journal of Plant Physiology* 160 : 523-530. [IF₂₀₀₃ 1.149, MNiSW: 35p] Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udział własny 5%
3. Janicka-Russak M., Kabała K., Pacholicki P., Kłobus G. 2004. Wpływ wybranych kwasów fenolowych na wzrost i aktywność plazmolemowej H⁺-ATPazy w siewkach ogórków. *Zeszyty Problemowe Nauk Rolniczych*. vol. 496. : 325-330. Udział własny 50%
4. Kłobus G., Janicka-Russak M. 2004 Modulation by cytosolic components of proton pump activities in *Cucumis sativus*, roots during salt stress. *Physiologia Plantarum* 121: 84-92. [IF₂₀₀₄ 2.167, MNiSW: 35p] udział własny 50%
5. Kabała K., Janicka-Russak M., Burzyński M., Kłobus G. 2008. Comparison of heavy metal effect on the proton pumps of plasma membrane and tonoplast in cucumber root cells. *Journal of Plant Physiology* 165: 278-288. [IF₂₀₀₈ 2.437, MNiSW: 35p] udział własny 10%
6. Janicka-Russak M., Kabała K., Młodzińska E., Kłobus G. 2010. The role of polyamines in the regulation of the plasma membrane and tonoplast proton pumps under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 167: 261-269. [IF₂₀₁₀ 2.677, MNiSW: 35p] udział własny 70%
7. Kabała K., Janicka-Russak M. , Kłobus G., 2010. Different responses of tonoplast pumps in cucumber roots to cadmium and copper. *Journal of Plant Physiology* 167: 1328-1335. [IF₂₀₁₀ 2.677, MNiSW: 35p] udział własny 10%
8. Kabała K., Janicka-Russak M. 2011. Differential regulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-Ppase in *Cucumis sativus* roots by zinc and nickel. *Plant Science*, 180 (3): 531-539. [IF 2.945, MNiSW: 35p] udział własny 10%

9. Janicka-Russak M. (2011). Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase in Adaptation of Plants to Abiotic Stresses, Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives, Arun Shanker, Co-editor: B. Venkateswarlu (Ed.), ISBN: 978-953-307-672-0, InTech, udział własny 100%
10. Kabała K., Janicka-Russak M. 2012. Na⁺/H⁺ antiport activity in plasma membrane and tonoplast vesicles isolated from NaCl treated cucumber roots. *Biologia Plantarum* 56 (2): 377-382. [IF 1.974, MNiSW: 25p] Udział własny 50%
11. Kabała K., Janicka-Russak M., Anklewicz A. 2013. The mechanism of Cd and Cu action on the tonoplast proton pumps in cucumber roots. *Physiologia Plantarum*, 147:2017-211. [IF 3.112, MNiSW: 35p] udział własny 10%

Sumaryczny Impact Factor wyżej wymienionych (11) publikacji wynosi: **19.138**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie aktualną punktacją wg wykazu MNiSW (lista A) z dn. 20 grudnia 2012 oraz rozporządzenia MNiSW z 13 lipca 2012) wynosi **270**

Swoją pracę naukową (praca magisterska i później praca doktorska) rozpoczynałam od badania aktywności dwóch pomp protonowych: plazmolemowej i tonoplastowej H⁺-ATPazy. Enzymy te mają zupełnie inną budowę i różną lokalizację subkomórkową. Jednak w swoich badaniach jednoznacznie wykazałam, że białka te współuczestniczą w adaptacji siewek ogórków do stresu solnego. Przyczyniają się one do wytworzenia gradientu protonów w poprzek plazmolemy i tonoplastu, który to gradient zostaje następnie wykorzystany przez wtórne transportery do usunięcia nadmiaru toksycznych jonów sodu z cytoplazmy do apoplastu i wakuoli. Rolę pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu oraz udział plazmolemowego i tonoplastowego antyportera sodowo-protonowego w detoksyfikacji komórek siewek ogórka dokładnie opisałam w pracy: Kabała K., Janicka-Russak M. 2012. Na⁺/H⁺ antiport activity in plasma membrane and tonoplast vesicles isolated from NaCl treated cucumber roots. *Biologia Plantarum* 56 (2): 377-382. Pani doktor Katarzyna Kabała z mojego Zakładu jest współautorem kilku moich prac. Jest autorem prac skupiających się wokół zagadnienia tonoplastu i związanych z nim enzymów zaangażowanych w transport protonów: V-ATPaza i pirofosfataza. Pomogła mi opanować warsztat metodyczny związany z izolacją tonoplastu i oznaczaniem aktywności obu wspomnianych enzymów. Dzięki temu mogliśmy się później wspomagać w pracy laboratoryjnej i dyskutować wspólnie wyniki dotyczące zarówno plazmolemowej jak i tonoplastowej pompy protonowej w kontekście

stresu solnego i metali ciężkich Mój udział w pracach kierowanych przez Panią Kabałę, dotyczący tonoplastowej H^+ -ATPazy i pirofosfatazy w stresie metali ciężkich, w których jest pierwszym autorem (4 publikacje), był w granicach 10%.

Bardzo ciekawe okazały się wyniki prac związanych z określeniem wpływu poliamin na aktywność plazmolemowej i tonoplastowej H^+ -ATPazy. Informacje dotyczące roli poliamin (putrescyny, spermidyny i sperminy) w warunkach stresu solnego nie były w pełni wyjaśnione. Często w literaturze pojawiały się sprzeczne i niejasne dane na temat poziomu poliamin i ich roli w adaptacji roślin do stresu solnego. Jednak w pracach tych podkreślano, że podwyższony poziom poliamin przyczynia się do ochrony roślin przed toksycznym działaniem NaCl. Wyniki uzyskane przeze mnie były sprzeczne z doniesieniami literaturowymi. Okazało się, że ostry stres solny (24 godziny 200mM NaCl) wcale nie podnosił endogennego poziomu poliamin, ale powodował wyraźne obniżenie ilości zarówno putrescyny, sperminy jak i spermidyny w korzeniach siewek ogórków. Sprawdziłam wobec tego wpływ poliamin na aktywność plazmolemowej i tonoplastowej pompy protonowej. Okazało się, że poliaminy (w stężeniu 50 μ M) wprowadzone do mieszaniny reakcyjnej lub też do pożywki zdecydowanie powodowały zahamowanie aktywności obu badanych pomp protonowych. W przypadku plazmolemowej pompy protonowej hamowanie aktywności enzymu było skorelowane z obniżeniem transkryptu *CsHA3* (jedna z izoform plazmolemowej H^+ -ATPazy, której ekspresja zachodzi tylko w korzeniach siewek ogórków). W pracy przeprowadzając szereg analiz dowiodłam, że obniżony poziom poliamin w przypadku ostrego krótkotrwałego stresu solnego był korzystny dla roślin do przetrwania niekorzystnych warunków bowiem po pierwsze obniżała się ilość czynnika hamującego pompy protonowe (a wzrost aktywności pomp jest niezbędny do detoksyfikacji w warunkach ostrego zasolenia). Po drugie w wyniku nadmiernego zasolenia rośnie w cytozolu poziom kationów (Na^+). Utrzymanie równowagi kationowo/anionowej jest bardzo ważne. Poliaminy występują w cytozolu jako poliaktiony. W warunkach ostrego stresu solnego, kiedy napływa nadmierna ilość kationów sodowych, obniżony poziom poliamin będzie wspomagał komórkę w utrzymaniu równowagi kationowo anionowej poprzez obniżenie poziomu endogennych polikationów (poliamin). W pracy pokazałam, że rośliny modyfikując biosyntezę poliamin mogą zwiększać tolerancje na zasolenie. Wyniki opublikowałam w publikacji: Janicka-Russak M., Kabała K., Młodzińska E., Kłobus G. 2010. The role of polyamines in the regulation of the plasma membrane and tonoplast proton pumps under salt stress. J. Plant Physiol. 167: 261-269. Praca ta cieszy się dużym zainteresowaniem, być może z powodu

odbiegających od dotychczas znanych wyników. Po jej opublikowaniu otrzymywałam zaproszenia do pisania prac przeglądowych, bądź też rozdziałów w książkach poświęconych stresom abiotycznym. Z jednego z takich zaproszeń skorzystałam i napisałam rozdział: "Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase in Adaptation of Plants to Abiotic Stresses" w książce: Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives, Arun Shanker, Co-editor: B. Venkateswarlu (Ed.), ISBN: 978-953-307-672-0, InTech. W rozdziale tym dokonałam szczegółowego przeglądu literatury na temat roli plazmolekowej H⁺-ATPazy w adaptacji roślin do stresów abiotycznych. Wydawnictwo przesłało notę informującą, że napisany przeze mnie rozdział osiągnął imponującą liczbę pobrań ze stron internetowych InTech (ponad 6 000). Najwięcej pobrań powyższego rozdziału było w USA, Japoni, Chinach, Polsce i Indiach.



Małgorzata Janicka-Russak