

Załącznik nr 2

## **Autoreferat**

**1. Imię i Nazwisko:** Katarzyna Kabała

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

1993 - magister biologii, specjalność biologia środowiskowa; Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski; tytuł pracy magisterskiej: *„Udział reduktazy azotanowej związanej z plazmalemmą w pobieraniu azotanów”*

1999 - doktor nauk biologicznych w zakresie biologii; Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski; tytuł rozprawy doktorskiej: *„Charakterystyka tonoplastowych pomp protonowych i ich udział w aktywnym transporcie azotanów do wakuoli”*

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.**

1993-1998 - studia doktoranckie biologii na Wydziale Nauk Przyrodniczych; Uniwersytet Wrocławski

od 01.10.1999 - adiunkt w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Botaniki (obecnie Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej); Uniwersytet Wrocławski

**4. Opis 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.).**

**a) Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl pięciu publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 6, objęty tytułem:**

**„Udział tonoplastowych pomp protonowych, V-ATPazy i V-PPazy, w adaptacji roślin do stresu związanego z obecnością metali ciężkich w środowisku”**

1. **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

IF<sub>2008</sub> **2.437**; MNiSW - **35 pkt**

2. **Kabała K.**, Janicka-Russak M., Kłobus G. **2010**. Different responses of tonoplast proton pumps in cucumber roots to cadmium and copper. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1328-1335

IF<sub>2010</sub> **2.677**; MNiSW - **35 pkt**

3. **Kabała K.**, Janicka-Russak M. **2011**. Differential regulation of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase in *Cucumis sativus* roots by zinc and nickel. *Plant Science*, 180: 531-539

IF<sub>2011</sub> **2.945**; MNiSW - **30 pkt**

4. **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: 207-217

IF<sub>2012</sub> **3.656**; MNiSW - **35 pkt**

5. **Kabała K.**, Janicka-Russak M., Reda M., Migocka M. **2013**. Transcriptional regulation of the V-ATPase subunit c and V-PPase isoforms in *Cucumis sativus* under heavy metal stress. *Physiologia Plantarum*, doi:10.1111/ppl.12064

IF<sub>2012</sub> **3.656**; MNiSW - **35 pkt**

Sumaryczny Impact Factor wyżej wymienionych publikacji wynosi **15.371**. Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dnia 20 grudnia 2012 oraz rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012) wynosi **170**.

#### **b) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Proponowana rozprawa habilitacyjna stanowi jednotematyczny cykl pięciu prac oryginalnych poświęconych badaniom regulacji aktywności dwóch tonoplastowych pomp protonowych w warunkach stresu wywołanego obecnością metali ciężkich w środowisku.

Pompy protonowe to wyspecjalizowana grupa enzymatycznych białek błonowych, które przy użyciu energii pochodzącej z hydrolizy wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych katalizują wektorowy transport protonów, przyczyniając się do wytworzenia gradientu potencjału elektrochemicznego H<sup>+</sup> przez błony. Do roślinnych pomp protonowych zaliczane są plazmolemowe H<sup>+</sup>-ATPazy oraz wakuolarne H<sup>+</sup>-ATPazy (V-ATPazy) i H<sup>+</sup>-pirofosfatazy (V-PPazy).

Wakuolarne pompy protonowe transportują H<sup>+</sup> z cytozolu do lumenu wakuolarnego, generując gradient protonów w poprzek tonoplastu. Dzięki temu możliwe jest napędzanie procesów akumulacji wielu jonów (np. K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,

$\text{PO}_4^{3-}$ ) i metabolitów (np. cukry) wewnątrz wakuoli, za pośrednictwem aktywnych antyporterów. Oba białka zaangażowane są więc nie tylko w regulację wewnątrzkomórkowego pH, ale również w procesy generowania turgoru, osmoregulacji czy zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  transdukcji sygnału. Biorą udział w magazynowaniu puli zapasowej jonów, która uwalniana jest do cytoplazmy w warunkach ich niedoboru w środowisku. Uczestniczą w deponowaniu w wakuoli związków toksycznych, przez co zaangażowane są w mechanizmy detoksykacyjne i adaptacyjne, uruchamiane w komórkach roślinnych w odpowiedzi na działanie stresów abiotycznych.

Wakuolarne pompy protonowe istotnie różnią się strukturą. Roślinna V-ATPaza jest kompleksem złożonym z 13 podjednostek, zgrupowanych w dwa sektory: peryferyjny, katalityczny  $V_1$ , odpowiedzialny za hydrolizę ATP i integralnie związany z błoną  $V_0$ , bezpośrednio uczestniczący w transporcie protonów. Sektor  $V_1$  zbudowany jest z 8 podjednostek (A, B, C, D, E, F, G, H), natomiast w budowie sektora  $V_0$  wyróżnia się 5 podjednostek (a, c, c', d, e). Część katalityczną enzymu stanowi heksamer składający się z ułożonych na przemian trzech podjednostek A i trzech podjednostek B, tworzących 3 miejsca, w których zachodzi hydroliza ATP. Region odpowiedzialny za połączenie domen katalitycznych z sektorem błonowym ma ogromne znaczenie dla sprzężenia transportu protonów z hydrolizą ATP i regulacji aktywności enzymu. Najnowsze trójwymiarowe analizy V-ATPazy potwierdziły, że oprócz podjednostki D i F, które formują centralne połączenie, istnieją trzy dodatkowe połączenia peryferyjne między podjednostkami B a domeną błonową. Tworzą je głównie podjednostki E i G, z których każda obecna jest w trzech kopiach w jednej cząsteczce enzymu oraz podjednostka C i H. Można zatem przyjąć, że struktura sektora  $V_1$  zgodna jest ze stechiometrią  $A_3B_3CDE_3FG_3H$ . Centralnym elementem sektora błonowego  $V_0$  są podjednostki c i c', wysoce hydrofobowe, homologiczne względem siebie, które bezpośrednio uczestniczą w przenoszeniu protonów przez błonę. Podjednostki te tworzą w błonie pierścień proteolipidowy. Każda z nich zawiera pojedynczą resztę kwasu glutaminowego z grupą karboksylową, która ulega protonacji podczas cyklu katalitycznego. Podjednostka a, będąca transbłonowym białkiem zbudowanym z długiej cytoplazmatycznej domeny N-końcowej oraz hydrofobowej domeny C-końcowej, współuczestniczy w transporcie protonów. Zaskakujące okazały się wyniki badań proteomicznych błony wakuolarnej przeprowadzone w ostatnich latach. Wykazały bowiem, że w tonoplaście komórek

roślinnych brak podjednostek c" i e. Oba polipeptydy zidentyfikowano natomiast w retikulum endoplazmatycznym i/lub w aparacie Golgiego. Sugeruje to, że podjednostki c" i e nie są elementami strukturalnymi funkcjonalnego kompleksu V-ATPazy, a ich funkcja związana jest raczej z procesem łączenia poszczególnych podjednostek w ostateczny kompleks enzymatyczny lub kierowania go do miejsca przeznaczenia.

W przeciwieństwie do wielopodjednostkowej V-ATPazy, V-PPaza zbudowana jest z pojedynczego polipeptydu, który tworzy 14-17 hydrofobowych transbłonowych domen i wykazuje trzy wysoce konserwatywne fragmenty: CS1 w obrębie domeny katalitycznej odpowiedzialnej za hydrolizę nieorganicznego pirofosforanu ( $PP_i$ ), CS2 i CS3 w części C-końcowej. Rośliny posiadają dwa filogenetycznie odrębne typy  $H^+$ -PPaz. Enzymy typu I wymagają obecności jonów potasu do aktywności i są mało wrażliwe na jony wapnia. Natomiast aktywność  $H^+$ -PPaz typu II nie zależy od  $K^+$ , ale wykazuje wysoką wrażliwość na hamowanie przez  $Ca^{2+}$ . Najnowsze badania potwierdziły, że enzymy typu II nie są związane z tonoplastem, lecz funkcjonują jako pompy protonowe w aparacie Golgiego i związanych z nim pęcherzykach.

Ze względu na obecność i funkcjonowanie dwóch pomp protonowych, wykorzystujących odmienne źródła energii chemicznej, wakuola stanowi unikalny kompartment komórek roślinnych. Generalnie uważa się, że współdziałanie obu enzymów umożliwia roślinom utrzymanie procesów transportu przez tonoplast nie tylko w warunkach optymalnych dla rozwoju, ale także w warunkach stresowych, jednak powiązania funkcjonalne między nimi nie zostały dotąd poznane. V-PPaza uważana jest za dominującą pompę protonową w młodych, intensywnie dzielących się komórkach, gdzie  $PP_i$  powstaje jako produkt uboczny wielu reakcji biosyntezy (DNA i RNA, wielocukrów, lipidów). W trakcie rozwoju i różnicowania się komórek obserwuje się spadek ilości białka V-PPazy, w porównaniu do V-ATPazy, której poziom wydaje się być stały. W konsekwencji V-ATPaza staje się główną pompą protonową błony wakuolarnej w komórkach dojrzałych tkanek rośliny. Wakuolarna pirofosfataza może jednak stanowić alternatywną pompę protonową błony wakuolarnej w warunkach stresowych, kiedy dochodzi do zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej. Wówczas znacznie obniżają się komórkowe poziomy ATP, natomiast ilość pirofosforanu się nie zmienia. Z sytuacją taką mamy do czynienia podczas niedotlenienia, działania niskiej temperatury czy niedoboru fosforu. Dowiedziono, że

to głównie  $H^+$ -PPaza jest w tych warunkach odpowiedzialna za generowanie i utrzymanie gradientu protonów przez tonoplast.

Liczne badania potwierdziły, że wiele spośród czynników środowiskowych wpływa na funkcjonowanie V-ATPazy w komórkach roślinnych. W odpowiedzi na działanie tych czynników enzym może modyfikować aktywność zarówno na poziomie ekspresji podjednostek jak i zmian w strukturze. Z tego powodu V-ATPazę roślin wyższych określa się często mianem „eko-enzymu”. Najlepiej poznanym przykładem udziału tonoplastowych pomp protonowych w adaptacji roślin do warunków stresowych jest modyfikacja V-ATPazy pod wpływem zasolenia. Rośliny poddane działaniu stresu solnego akumulują znaczne ilości jonów sodu w lumenie wakuolarnym, w wyniku aktywacji napędzanego przez gradient protonów i pompy protonowe antyportera  $Na^+/H^+$ . W przypadku dobrze tolerujących zasolone środowisko halofitów stwierdzono wyraźny wzrost aktywności wakuolarnej ATPazy, skorelowany ze zwiększeniem ilości transkryptów genów kodujących poszczególne podjednostki enzymu.

Pomimo, że rola tonoplastowych pomp protonowych w przystosowaniu roślin do stresów środowiskowych jest dobrze udokumentowana w przypadku zasolenia, niedotlenienia czy stresu niskiej temperatury, funkcjonalna i molekularna charakterystyka obu enzymów w roślinach poddanych działaniu metali ciężkich była do niedawna mało poznana. Porównanie gatunków roślin wrażliwych z tolerującymi obecność metali ciężkich wskazuje, że odporność na metale związana jest zazwyczaj z aktywnością białek transportowych w błonach. W sekwestracji metali ciężkich w wakuoli mogą uczestniczyć zarówno pierwotne jak i wtórne aktywne systemy transportowe. Do tonoplastowych transporterów pierwotnych, wykorzystujących ATP jako źródło energii, należą białka typu ABC, transportujące kompleksy metali z glutationem, np. AtMRP3, oraz ATPazy typu  $P_{1B}$ , reprezentowane przez AtHMA3. Natomiast wśród tonoplastowych transporterów wtórnych, wykorzystujących gradient elektrochemiczny  $H^+$ , wyróżnia się białka CDF, wśród nich MTP1, i transportery CAX, przenoszące jony metali do wakuoli na zasadzie antyportu z protonami. Aktywność tych białek zależy w dużej mierze od aktywności wakuolarnych pomp protonowych. Można było zatem przypuszczać, że ekspozycja roślin na metale ciężkie, podobnie jak zasolenie, będzie stymulować V-ATPazę i/lub V-PPazę w celu generowania wyższego gradientu protonów, wykorzystywanego następnie przez wtórne transportery do odkładania szkodliwego nadmiaru jonów metali wewnątrz wakuoli i

detoksykacji cytoplazmy. Co więcej, wzrost aktywności V-PPazy w warunkach, kiedy jony metali spowodują zaburzenia oddychania i spadek poziom ATP w komórkach, może kompensować obniżoną aktywność V-ATPazy. Z drugiej strony jednak, pompy protonowe jak inne białka błonowe narażone są na szkodliwe działanie metali ciężkich. Metale mogą zaburzać drugorzędową strukturę białek poprzez reakcję z grupami sulfhydrylowymi. Generując wolne rodniki i reaktywne formy tlenu zwiększają stopień peroksydacji lipidów w błonach i wywołują stres oksydacyjny. Zdolne są także modyfikować skład lipidowy błon, powodując ilościowe i jakościowe zmiany w błonach, a przez to wpływać na ich strukturę i przepuszczalność.

W związku z powyższym zaplanowano badania, których celem było poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację aktywności V-ATPazy i V-PPazy w korzeniach ogórka w warunkach stresowych wywołanych obecnością Cd, Cu, Zn i Ni. Założono, że w wyniku zaplanowanych analiz uda się określić, czy badane pompy protonowe podlegają negatywnemu oddziaływaniu ze strony jonów metali ciężkich, czy też przeciwnie – ich modyfikacje mogą być związane z odpowiedzią roślin na zaistniałe warunki stresowe. Na podstawie badań planowano ocenić udział każdego z enzymów w reakcjach obronnych uruchamianych w korzeniach roślin poddanych działaniu różnych metali ciężkich. Prezentowane badania stanowią uzupełnienie i poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat roli tonoplastowych pomp protonowych w adaptacji roślin do stresów abiotycznych.

Pierwsza z przedstawionego do oceny cyklu prac (**Kabała et al., 2008, J Plant Physiol 165:278-288**) zawiera wyniki wstępnych badań nad wpływem metali ciężkich na V-ATPazę. Powstała w ramach projektu badawczego KBN nr 3P04C 034 24 (2003-2006). Celem pracy była analiza porównawcza aktywności dwóch typów roślinnych  $H^+$ -ATPaz, charakteryzujących się odmienną strukturą i lokalizacją na terenie komórki, wakuolarnej ATPazy (typu V) i plazmolemowej ATPazy (typu P), w warunkach stresu wywołanego obecnością Cd, Cu i Ni. Były to pierwsze w literaturze dane na temat funkcjonowania roślinnej V-ATPazy w warunkach stresu związanego z obecnością metali ciężkich w środowisku. Dotychczasowe, nieliczne raporty koncentrowały się na plazmolemowej pompie protonowej komórek roślinnych i V-ATPazie komórek zwierzęcych. Siewki ogórka poddano łagodnym warunkom stresowym, tzn. rośliny traktowano  $10 \mu M$  stężeniem metali przez 2 godziny. Analizowano zarówno aktywności hydrolityczne obu enzymów, jak i katalizowany przez nie transport protonów. Wykazano, że obie pompy protonowe istotnie różnią

się wrażliwością na badane metale ciężkie. Aktywności plazmolemowej H<sup>+</sup>-ATPazy były wyraźnie hamowane przez kadm i miedź, podczas gdy aktywności wakuolarnej H<sup>+</sup>-ATPazy nie podlegały wpływowi tych metali. Uzyskane wyniki sugerowały, że w warunkach łagodnego stresu metali ciężkich enzym wakuolarny zdolny jest generować gradient elektrochemiczny protonów przez tonoplast na takim samym poziomie, jak w warunkach optymalnych dla roślin. Obie pompy protonowe eksponują miejsca katalityczne, odpowiedzialne za hydrolizę ATP, od cytoplazmatycznej strony błony. Zatem tylko pula jonów metalu, które dostały się do wnętrza komórki, może działać jako czynnik inhibitorowy. Plazmolema jednak jest pierwszą strukturą komórki roślinnej, która narażona jest na działanie metali ciężkich i efekt ich działania może być obserwowany szybciej niż w przypadku błony wakuolarnej.

W związku z tym kolejne analizy przeprowadzono na siewkach ogórka, które poddane zostały z jednej strony dłuższemu działaniu stresu, tzn. rośliny traktowano metalami przez 24 godziny, a z drugiej strony silniejszemu działaniu czynnika stresowego, tzn. rośliny hodowano w obecności zarówno 10 μM jak i 100 μM stężenia metali. Badania zostały poszerzone o analizę drugiej wakuolarnej pompy protonowej, V-PPazy. Do tej pory brak było w literaturze informacji na temat funkcjonowania V-PPazy w takich warunkach stresowych. Badania realizowano w ramach projektu MNiSW nr N303 112 32/3841 (2007-2009). Efektem prowadzonych badań są dwie publikacje. Pierwsza z nich (**Kabała et al., 2010, J Plant Physiol 167:1328-1335**) dotyczy regulacji aktywności tonoplastowych pomp protonowych w odpowiedzi na obecność kadmu i miedzi. Celem pracy było wyjaśnienie mechanizmu działania dwóch metali, o różnym znaczeniu dla roślin, na V-ATPazę i V-PPazę. Miedź jako mikroelement wymagana jest do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin, natomiast kadm nie pełni istotnych funkcji w roślinach wyższych i stanowi potencjalny inhibitor ich wzrostu. Wykazano odmienny wpływ obu metali na funkcjonowanie tonoplastowych pomp protonowych. Aktywności V-ATPazy zwiększały się wyraźnie pod wpływem ekspozycji roślin na miedź, natomiast były hamowane w obecności kadmu. Aktywności V-PPazy były modyfikowane w znacznie mniejszym stopniu: aktywność hydrolityczna enzymu nie zmieniała się istotnie pod wpływem metali ciężkich, natomiast katalizowany przez enzym transport protonów zmniejszał się w wyniku traktowania roślin jonami Cd. W ramach prowadzonych badań zidentyfikowano konserwatywne fragmenty genów podjednostek A i c V-ATPazy oraz

genu V-PPazy (bez rozróżniania izoform tych podjednostek). Analiza ekspresji wybranych genów metodą ilościowego RT-PCR oraz analiza western blot z użyciem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko holoenzymowi V-ATPazy (otrzymanymi dzięki uprzejmości dr Elke Fischer-Schliebs z Uniwersytetu w Darmstadt) pokazały, że traktowanie siewek ogórka kadmem i miedzią nie wpływało istotnie na poziom transkryptu podjednostki A i c V-ATPazy oraz V-PPazy jak również na poziom białka podjednostek A, B i C V-ATPazy we frakcjach tonoplastowych izolowanych z korzeni. Sugerowało to, że obserwowane pod wpływem metali ciężkich modyfikacje aktywności obu enzymów nie wynikały ze zmian na poziomie genetycznym i na poziomie białka. Nie można jednak było wykluczyć możliwości, że inne, nieanalizowane podjednostki lub izoformy obu enzymów będą w tych warunkach modyfikowane. Jednym z potencjalnych potranslacyjnych mechanizmów regulujących działanie V-ATPazy jest odwracalna fosforylacja podjednostek. Wykorzystując przeciwciała przeciwko fosfoserynie i fosfotreoninie wykazano z dużym prawdopodobieństwem, że fosforylacji ulega regulatorowa podjednostka B enzymu. Stopień jej fosforylacji jednak nie zmieniał się w stresowanych roślinach, wskazując, że mechanizm regulacji aktywności V-ATPazy w warunkach stresu wywołanego obecnością Cd i Cu nie jest związany ze zmianą stanu ufosforylowania podjednostek. Przypuszczano, że różnice w oddziaływaniu kadmu i miedzi na błonowe białka mogą wynikać z odmiennych właściwości chemicznych obu jonów. Cu, w przeciwieństwie do Cd, uczestniczy w przemianach oksydacyjno-redukcyjnych. Stwierdzono wyraźny wzrost peroksydacji lipidów w tonoplaście izolowanym z korzeni siewek traktowanych miedzią. Ponieważ otoczenie lipidowe, a w szczególności stosunek fosfolipidów do glikolipidów, ma istotne znaczenie dla funkcjonowania wakuolarnej ATPazy, można przypuszczać, że zmiany aktywności enzymu obserwowane pod wpływem miedzi są przynajmniej częściowo związane ze zmianami składu lipidowego błony wakuolarnej. Uzyskane wyniki jasno wskazywały, że w wyniku stymulacji V-ATPazy wyższy gradient protonów (a zatem siła napędzająca wtórne transportery) generowany jest przez tonoplast w warunkach stresu związanego z obecnością miedzi w środowisku, sugerując istotną rolę tej pompy protonowej w reakcjach obronnych uruchamianych przez siewki ogórka w odpowiedzi na nadmiar jonów  $\text{Cu}^{2+}$  napływających do komórek. Nie wyjaśniono mechanizmu regulacji kompleksu V-ATPazy pod wpływem jonów miedzi, wykluczono jednak możliwość jego modyfikacji poprzez proces odwracalnej fosforylacji.



Następna praca (**Kabała i Janicka-Russak, 2011, Plant Sci 180:531-539**) podsumowuje część badań poświęconą funkcjonowaniu wakuolarnych pomp protonowych w warunkach stresowych wywołanych obecnością cynku i niklu. Oba jony należą do mikroelementów i praktycznie nie różnią się właściwościami chemicznymi i fizycznymi. Według ówczesnej wiedzy była to pierwsza publikacja poruszająca temat regulacji roślinnych pomp protonowych przez nadmiar cynku w środowisku. Stwierdzono po raz kolejny, że V-ATPaza i V-PPaza w odmienny sposób reagują na obecność czynnika stresowego. Zarówno zależny od ATP transport protonów jak i hydroliza ATP, katalizowane przez V-ATPazę, były hamowane w korzeniach roślin eksponowanych na Zn i Ni. Natomiast aktywności V-PPazy były stymulowane w wyniku traktowania siewek niskimi stężeniami obu metali. Wyższe stężenia Zn i Ni nie wpływały istotnie na aktywność hydrolityczną enzymu, lecz obniżały zależny od PPI transport H<sup>+</sup>, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż transport napędzany przez ATP. Dodatkowo przeanalizowano kinetykę reakcji hydrolitycznych katalizowanych przez oba enzymy w korzeniach roślin kontrolnych i stresowanych. Wykazano, że powinowactwo V-ATPazy do substratu (ATP) było podobne w siewkach nietraktowanych i traktowanych metalami, z wyjątkiem roślin poddanych działaniu wysokiego stężenia cynku, które wyraźnie obniżało wartość K<sub>m</sub>. Nie stwierdzono natomiast wpływu metali ciężkich na szybkość reakcji katalizowanej przez V-PPazę. Poziom ATP w korzeniach nie zmieniał się istotnie pod wpływem Zn i Ni, co pozwalało przypuszczać, że badane metale nie generowały stresu energetycznego w komórkach, a V-ATPaza miała nieograniczony dostęp do substratu w warunkach *in vivo*. Zawartość pirofosforanu natomiast była wyraźnie obniżana w tkankach poddanych silnemu działaniu obu metali. Kiedy jony Zn<sup>2+</sup> i Ni<sup>2+</sup> wprowadzano bezpośrednio do mieszaniny reakcyjnej obu enzymów, zaobserwowano ich podobny efekt. Niskie stężenia metali nie wpływały istotnie, a wyższe stężenia wyraźnie obniżały aktywności zarówno V-ATPazy jak i V-PPazy. Uzyskane wyniki sugerowały, że cynk i nikiel mogą bezpośrednio w podobny sposób negatywnie oddziaływać na białka błonowe i/lub błonę wakuolarną, oraz że różne mechanizmy odpowiedzialne są za działanie metali w warunkach podawania ich roślinom *in vivo* i *in vitro*. Analiza ekspresji wybranych genów oraz analiza z użyciem przeciwciał specyficznych dla V-ATPazy oraz V-PPazy nie wykazały wpływu badanych metali na poziom mRNA podjednostki A i c V-ATPazy oraz V-PPazy ani na poziom białka obu enzymów. Wyniki badań wskazywały, że w warunkach stresu

związanego z obecnością cynku i niklu w środowisku V-PPaza jest pompą protonową odpowiedzialną za utrzymanie gradientu protonów przez tonoplast i napędzanie procesów akumulacji jonów wewnątrz wakuoli.

Dotychczasowe badania koncentrowały się na analizie funkcjonowania tonoplastowych pomp protonowych w warunkach krótkotrwałego stresu, związanego z wczesnymi etapami odpowiedzi roślin na stres. Celem kolejnych doświadczeń było sprawdzenie, czy zmiany aktywności tonoplastowych pomp protonowych, obserwowane po 24-godzinnej ekspozycji roślin na metale, utrzymują się na podobnym poziomie w siewkach traktowanych metalami przez dłuższy okres czasu, kiedy uruchamiane są w roślinach mechanizmy adaptacyjne. Zbadano zatem efekt kadmu i miedzi na V-ATPazę i V-PPazę w korzeniach roślin hodowanych na pożywkach z dodatkiem 10  $\mu\text{M}$  metali przez 6 dni oraz roślin, które po 3 dniach wzrostu w warunkach stresowych przenoszono do warunków kontrolnych na kolejne 3 dni. Wyniki zostały zawarte w czwartej publikacji prezentowanego cyklu prac (**Kabała et al., 2013, *Physiol Plant* 147:207-217**). Wykazano, podobnie jak w przypadku 24-godzinnej ekspozycji, że obecność kadmu w środowisku korzeni hamowała aktywność obu tonoplastowych pomp protonowych, jednak hamowanie to było znacznie wyraźniejsze, zwłaszcza w przypadku katalizowanego przez V-ATPazę transportu protonów. W konsekwencji, w warunkach stresu wywołanego przez jony Cd niższy gradient protonów generowany jest przez tonoplast. Dłuższa ekspozycja roślin na miedź powodowała, oprócz stymulacji V-ATPazy, wzrost aktywności V-PPazy, co w efekcie prowadziło do wytworzenia znacznie wyższego gradientu protonów przez błonę wakuolarną. Stymulujący wpływ miedzi na pompy protonowe, wywołany obecnością jonów Cu w pożywce, był niwelowany, gdy stresowane rośliny przenoszono do warunków kontrolnych. Natomiast inhibitorowy efekt jonów Cd utrzymywał się także po usunięciu metalu ze środowiska. Wyniki potwierdziły jednoznacznie odmienny sposób działania obu metali na enzymy tonoplastowe. Jednym z mechanizmów regulujących aktywność tonoplastowych pomp protonowych, szczególnie V-ATPazy, jest zmiana współczynnika sprzężenia transportu  $\text{H}^+$  z hydrolizą substratu. W przypadku V-ATPazy wykazano, że w obecności kadmu dochodzi do rozprężenia transportu protonów z hydrolizą ATP, a w obecności miedzi efektywność sprzężenia przepływu protonów z hydrolizą ATP rośnie i wartość współczynnika zwiększa się. Badane metale nie wpływały natomiast na poziom współczynnika  $\text{H}^+/\text{PP}_i$  wyznaczonego dla V-PPazy. Ponieważ efekt jonów

metali mógł wynikać z ich bezpośredniego oddziaływania na białka błonowe, przeprowadzono dwa typy eksperymentów, w których jony Cu i Cd podawano *in vitro*. 30-minutowa preinkubacja frakcji tonoplastowej z jonami miedzi powodowała wyraźny wzrost aktywności zarówno V-ATPazy jak i V-PPazy, natomiast pretraktowanie jonami kadmu nie wpływało na aktywności obu enzymów. W wyniku dodania jonów metali do mieszaniny reakcyjnej zaobserwowano hamowanie V-ATPazy i V-PPazy zarówno pod wpływem Cu jak i Cd, podobnie jak wcześniej wykazano dla Zn i Ni. Otrzymane wyniki wskazywały, że jony miedzi mogą stymulować tonoplastowe pompy protonowe bezpośrednio w przeciwieństwie do jonów kadmu, których efekt inhibitorowy nie jest wynikiem bezpośredniego oddziaływania z białkami enzymatycznymi. Oba metale mogą jednak hamować aktywności V-ATPazy i V-PPazy pośrednio, prawdopodobnie poprzez tworzenie kompleksów z ATP i PP<sub>i</sub>, a przez to zmniejszanie dostępności substratów do reakcji hydrolizy. Pompy tonoplastowe posiadają reszty cysteiny z grupami -SH wrażliwymi na reagenty sulfhydrylowe, a aktywność ich może być modyfikowana w wyniku odwracalnej oksydacji/redukcji poprzez tworzenie mostków dwusiarczkowych (inaktywacja/reaktywacja). Na przykładzie korzeni ogórka wykazano większą wrażliwość V-ATPazy w porównaniu z V-PPazą na warunki utleniające. Pomimo że metale ciężkie mogą wiązać się do grup -SH białek, jak również wpływać na stan redoks puli glutationu w komórkach roślinnych, w pracy stwierdzono, że indukowane obecnością Cu i Cd zmiany aktywności wakuolarnych enzymów nie były wynikiem odwracalnych oksydacyjno-redukcyjnych modulacji tych białek. Na podstawie uzyskanych wyników można było stwierdzić, że w warunkach długotrwałego stresu wynikającego z obecności jonów miedzi w środowisku obie wakuolarne pompy protonowe zaangażowane są w generowanie wysokiego gradientu protonów przez tonoplast, a w związku z tym w detoksykację cytoplazmy. Potwierdzono, że obserwowana stymulacja aktywności obu enzymów wynikała, przynajmniej częściowo, z bezpośredniego korzystnego oddziaływania jonów Cu<sup>2+</sup> na badane białka błonowe.

Opublikowanie pełnej sekwencji genomowego DNA *Cucumis sativus* i udostępnienie jej on-line w formie kontigów przez zespoły naukowców chińskich (Huang et al. 2009) i polskich (Wóycicki et al. 2011) stworzyło możliwość zidentyfikowania *in silico* wszystkich izoform genów kodujących tonoplastowe pompy protonowe u tego gatunku. Genom ogórka został przeszukany wykorzystując

dostępne w bazie NCBI sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe 3 genów kodujących V-PPazę i 28 genów kodujących podjednostki V-ATPazy u *Arabidopsis*. Stwierdzono, że 13 podjednostek V-ATPazy kodowanych jest przez 20 genów w genomie *Cucumis sativus*. Niemal wszystkie podjednostki sektora peryferyjnego  $V_1$  (A, B, C, D, E, F, H) kodowane są przez pojedyncze geny, z wyjątkiem podjednostki G (2 izogeny). W obrębie podjednostek sektora  $V_0$  stwierdzono 3 izogeny dla podjednostki a, 3 dla podjednostki c (które nazwano *CsVHA-c1*, *CsVHA-c2*, *CsVHA-c3*), 2 dla c", 2 dla podjednostki e i jeden dla podjednostki d. Ponadto w genomie ogórka zidentyfikowano 3 geny dla V-PPazy, dwa kodujące PPazę typu I (które nazwano *CsVHP1;1* i *CsVHP1;2*) i jeden kodujący PPazę typu II. Szczegółowa analiza sekwencji zidentyfikowanych genów *VHA-c* i *VHP1* sugeruje z dużym prawdopodobieństwem, że *CsVHA-c3* oraz *CsVHP1;2* są izoformami, których poziom ekspresji oznaczano we wcześniejszych pracach. Istnienie izoform podjednostek V-ATPazy oraz PPazy u ogórka pozwalało przypuszczać, iż geny kodujące poszczególne izoenzymy mogą podlegać odmiennej regulacji, a kodowane przez nie białka pełnić specyficzne funkcje u tego gatunku. Wyniki analizy otrzymanych sekwencji zostały zamieszczone w piątej publikacji (**Kabała et al., 2013, *Physiol Plant*, doi:10.1111/ppl.12064**), której nadrzędnym celem było wyjaśnienie roli poszczególnych izoform podjednostki c V-ATPazy i izoform V-PPazy typu I podczas rozwoju roślin i w odpowiedzi na obecność metali ciężkich w środowisku. Stwierdzono, że wszystkie spośród analizowanych genów *CsVHA-c* i *CsVHP1* ulegają transkrypcji zarówno w organach wegetatywnych jak i generatywnych ogórka. Wśród nich *CsVHA-c1* i *CsVHA-c2* wykazały podobny profil ekspresji organowej, a najwyższy ich poziom odnotowano w pręcikach i w starszych liściach, co sugeruje rolę w procesach związanych z rozwojem pyłku i magazynującą funkcją wakuoli. *CsVHP1;1* ulegał ekspresji głównie w korzeniach, zarówno młodych jak i starszych roślin, oraz w kwiatach żeńskich, szczególnie w okwiecie. Można zatem przypuszczać, że izoforma ta pełni istotną rolę w rozwoju korzeni, a także podczas kwitnienia. Natomiast transkrypcja *CsVHA-c3* i *CsVHP1;2* utrzymywała się na stałym poziomie we wszystkich badanych organach zarówno w młodych siewkach jak i dorosłych roślinach. W nawiązaniu do wcześniejszych prac, ekspresję zidentyfikowanych genów analizowano techniką real time PCR w korzeniach roślin poddanych działaniu kadmu, miedzi, cynku i niklu. Stwierdzono, że poszczególne izoformy są w odmienny sposób regulowane przez metale ciężkie na poziomie

transkrypcji. Najistotniejsze zmiany w poziomie transkryptów zaobserwowano w wyniku 24-godzinnej ekspozycji roślin na metale. Geny *CsVHA-c1* i *CsVHP1;1* ulegały wzmożonej ekspresji pod wpływem miedzi i niklu. Poziom mRNA genu *CsVHA-c3* zwiększał się wyraźnie tylko w obecności niklu, natomiast ekspresja *CsVHA-c2* była indukowana przez wszystkie metale, jednak najwyraźniej przez miedź. Ilość *CsVHP1;2* utrzymywała się na względnie stałym poziomie we wszystkich analizowanych warunkach, ale wykazała tendencję do zwiększania się pod wpływem miedzi i cynku. Otrzymane wyniki skłoniły do weryfikacji wniosków sformułowanych we wcześniejszych pracach odnośnie transkrypcyjnej regulacji aktywności tonoplastowych pomp protonowych w warunkach stresu wynikającego z obecności metali ciężkich. Stwierdzono bowiem skoordynowaną indukcję ekspresji genów *CsVHA-c1* i *CsVHA-c2* kodujących podjednostkę c V-ATPazy oraz genu *CsVHP1;1* kodującego V-PPazę w korzeniach ogórka poddanych działaniu miedzi, co może przynajmniej częściowo odpowiadać za obserwowaną wcześniej stymulację aktywności obu enzymów przez Cu. W przypadku pozostałych metali ciężkich zmiany ekspresji badanych genów nie były skorelowane ze zmianami aktywności V-ATPazy i V-PPazy, na przykład wzrost poziomu *CsVHA-c3* pod wpływem niklu. Wydaje się zatem, że niektóre izoformy mogą pełnić dodatkowe funkcje w roślinach, niezależne od pompowania protonów. Powyższe wyniki wskazują, że geny *CsVHA-c1*, *CsVHA-c2* and *CsVHP1;1* stanowią istotny element mechanizmów zaangażowanych w adaptację siewek ogórka do stresu związanego z obecnością jonów miedzi w środowisku. Mogą one w przyszłości znaleźć zastosowanie w tworzeniu odmian ogórka odpornych na obecność metali ciężkich w środowisku.

Za najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań uważam:

1. Stwierdzenie, że V-ATPaza i V-PPaza w odmienny sposób reagują na obecność miedzi, kadmu, cynku i niklu w środowisku.
2. Zidentyfikowanie wszystkich izoform genów kodujących obie tonoplastowe pompy protonowe w genomie ogórka.
3. Wykazanie, po raz pierwszy w literaturze, że poszczególne geny kodujące tonoplastowe pompy protonowe podlegają odmiennej regulacji na poziomie transkrypcyjnym w roślinach traktowanych metalami ciężkimi.

4. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za stymulację aktywności V-ATPazy i V-PPazy w korzeniach ogórka w warunkach stresowych wywołanych obecnością jonów miedzi. Należą do nich:

- bezpośrednie oddziaływanie  $\text{Cu}^{2+}$  z enzymami błonowymi
- wzmożona peroksydacja lipidów w tonoplaście i prawdopodobnie zmiany składu lipidowego błony
- zwiększenie wartości współczynnika  $\text{H}^+/\text{ATP}$  dla V-ATPazy, a w konsekwencji polepszenie efektywności sprzężenia przepływu protonów z hydrolizą ATP
- skoordynowana indukcja ekspresji genów *CsVHA-c1* i *CsVHA-c2* kodujących podjednostkę c V-ATPazy oraz genu *CsVHP1;1* kodującego V-PPazę typu I.

5. Potwierdzenie, że inhibitorowy efekt kadmu, cynku i niklu na tonoplastowe pompy protonowe nie jest związany z hamowaniem ekspresji genów kodujących podjednostki A i c V-ATPazy oraz genów kodujących izoformy V-PPazy typu I.

6. Wykazanie, że za regulację aktywności badanych enzymów w warunkach stresu związanego z obecnością metali ciężkich nie są odpowiedzialne procesy odwracalnej fosforylacji ani odwracalne oksydacyjno-redukcyjne modyfikacje.

Reasumując, skorelowany ze wzmożoną ekspresją genów wzrost aktywności V-ATPazy, i w mniejszym stopniu V-PPazy, w korzeniach poddanych działaniu miedzi świadczy o wytwarzaniu wysokiej siły protonomotorycznej, która może być wykorzystywana przez wtórne transportery biorące udział w usuwaniu nadmiaru jonów  $\text{Cu}^{2+}$  z cytoplazmy do wakuoli. Wakuolarne pompy protonowe zatem, a szczególnie V-ATPaza, poprzez udział w procesach detoksykacji komórek uczestniczą w mechanizmach adaptacyjnych uruchamianych w siewkach ogórka w odpowiedzi na obecność jonów Cu w środowisku. Pod wpływem pozostałych metali ciężkich zaobserwowano hamowanie aktywności V-ATPazy i generowanego przez nią gradientu protonów. W tych samych warunkach funkcjonowanie V-PPazy było ograniczane w znacznie mniejszym stopniu. Wydaje się w związku z tym, że w warunkach silnego stresu wywołanego przez Cd, Ni, a zwłaszcza Zn, generowanie siły protonomotorycznej w tonoplaście przy udziale V-PPazy ma istotne znaczenie dla podtrzymania procesów transportu wtórnego przez błonę wakuolarną i zachowania funkcji pełnionych przez wakuolę.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Tematyka pozostałych prac pozostaje w zgodzie z głównym nurtem moich zainteresowań i dotyczy aktywnych transporterów, zarówno pierwotnych jak i wtórnych, funkcjonujących w błonach komórek roślinnych. Oprócz wakuolarnych pomp protonowych obejmuje plazmolemową  $H^+$ -ATPazę,  $Ca^{2+}$ -ATPazy, a także białka funkcjonujące jako antyportery, wykorzystujące elektrochemiczny gradient protonów, które uczestniczą w gromadzeniu jonów wewnątrz wakuoli. Większość prac poświęcona jest roli aktywnych transporterów w adaptacji roślin do stresów abiotycznych, głównie zasolenia i metali ciężkich. Sumaryczny Impact Factor pozostałych publikacji wynosi **25.339**. Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dnia 20 grudnia 2012 oraz rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012) wynosi **380**.

Charakterystyka procesów transportu przez błony wymaga uzyskania frakcji błonowej o wysokim stopniu czystości, dlatego pierwszy etap pracy naukowej związany był z wyborem i dopracowaniem efektywnej metody izolacji frakcji tonoplastowej z korzeni ogórka. Zmodyfikowana metoda wirowania w skokowym gradiencie gęstości sacharozy umożliwiła otrzymanie frakcji pęcherzyków tonoplastowych o prawidłowej orientacji, pozbawionej w znacznym stopniu zanieczyszczenia przez plazmolemę i inne endomembrany. Wykorzystując liczne specyficzne i niespecyficzne inhibitory dokonano kinetycznej charakterystyki obu wakuolarnych pomp protonowych, V-ATPazy i V-PPazy, w tonoplaście komórek korzeni ogórka. Praca ta była fundamentem dla kolejnych badań dotyczących funkcjonowania tonoplastowych białek transportowych (*Kabała i Kłobus, 2001, Acta Physiol Plant 23:55-63*).

Wakuolarne pompy protonowe, generując gradient protonów w poprzek tonoplastu, uczestniczą w gromadzeniu zapasowej puli jonów wewnątrz wakuoli, która może być uruchamiana w warunkach ich deficytu w środowisku. Do jonów takich należą azotany. Potwierdzono, że w komórkach korzeni ogórka funkcjonuje tonoplastowy wtórny antyporter  $NO_3^-/H^+$ , a jego aktywność napędzana jest przez gradient protonów generowany głównie przez V-ATPazę, a nie przez V-PPazę. Przeprowadzono szczegółową charakterystykę antyportera, który wykazał cechy typowe dla wtórnych transporterów (specyficzność substratową, elektroneutralność, kinetyki wysycenia). Wykorzystując reagenty modyfikujące reszty aminokwasowe

białek wykazano istotną rolę reszt lizyny dla aktywności tego systemu, jednocześnie wykluczając znaczenie reszt cysteiny i argininy. Zastosowane inhibitory kanałów jonowych nie miały bezpośredniego wpływu na funkcjonowanie antyportu  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ , potwierdzając, że badany system nie jest biernym nośnikiem (Kabała *et al.*, 2003, *J Plant Physiol* 160:523-530).

Magazynująca funkcja wakuoli nie ogranicza się do gromadzenia jonów istotnych dla metabolizmu komórek roślinnych, lecz związana jest także z usuwaniem z cytosolu elementów szkodliwych dla komórki, co ma znaczenie w adaptacji roślin do warunków stresowych. Oprócz metali ciężkich, do czynników toksycznych dla roślin należą jony sodu. Porównanie korzeni siewek ogórka rosnących w warunkach kontrolnych oraz poddanych krótkiemu (24-godzinnemu) działaniu silnego stresu solnego (250 mM NaCl) wykazało, że zasolenie indukuje aktywność specyficznego antyportera  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  w tonoplaście. Białko tego transportera obecne jest w błonie wakuolarnej roślin kontrolnych, jednak jego poziom zwiększa się istotnie w wyniku traktowania roślin NaCl. Podobny antyporter funkcjonuje w plazmolemie komórek korzeni ogórka, lecz wykazuje niższe powinowactwo do jonów sodu. To sugeruje, że nadmiar jonów  $\text{Na}^+$ , napływających do cytosolu w warunkach krótkotrwałego stresu solnego, jest w pierwszej kolejności wyrzucany do wnętrza wakuoli (Kabała i Janicka-Russak, 2012, *Biol Plant* 56:377-382).

Modyfikacje aktywności wakuolarnych pomp protonowych pod wpływem zasolenia analizowano w siewkach ogórka poddanych działaniu łagodnego stresu solnego (50 mM NaCl) przez 1-8 dni. Wykazano, że obecność jonów sodu w środowisku stanowi czynnik inhibitorowy dla funkcjonowania V-PPazy niezależnie od czasu ekspozycji. Natomiast aktywność hydrolityczna V-ATPazy oraz katalizowany przez nią transport protonów były stymulowane po 24 godzinach traktowania roślin NaCl. Dłuższy stres jednak powodował spadek aktywności enzymu. Obserwowane modyfikacje aktywności obu białek nie wynikały ze zmian ekspresji genów kodujących podjednostkę A i c V-ATPazy oraz V-PPazę. Uzyskane wyniki skłoniły do wniosku, że wakuolarne pompy protonowe nie odgrywają istotnej roli w adaptacji siewek ogórka, który należy do glikofitów, do długotrwałego stresu solnego. Wydaje się zatem, że jednym z mechanizmów warunkujących tolerancję tego gatunku na zasolenie może być aktywacja plazmolemowej pompy protonowej i usuwanie toksycznego poziomu jonów  $\text{Na}^+$  z komórki do apoplastu (Kabała i Kłobus, 2008, *J Plant Physiol* 165:1830-1837).



Intensywna współpraca z dr Małgorzatą Janicką-Russak zaowocowała kolejnymi wspólnymi publikacjami, w których centralnym punktem była plazmolemowa pompa protonowa i jej regulacja w warunkach stresów abiotycznych. Kontynuacją badań nad funkcjonowaniem plazmolemowych i tonoplastowych H<sup>+</sup>-ATPaz w warunkach zasolenia było określenie roli poliamin, związków organicznych uczestniczących w wielu procesach biochemicznych komórek eukariotycznych, w regulacji aktywności obu enzymów. Wykazano, że poliaminy (spermina, spermidyna, putrescyna) stanowią czynnik hamujący aktywności pomp protonowych. Pod wpływem zasolenia poziom poliamin w korzeniach siewek ogórka maleje, natomiast aktywności H<sup>+</sup>-ATPaz są stymulowane. Otrzymane wyniki sugerowały, że rośliny mogą zwiększać tolerancję na sól poprzez modyfikowanie biosyntezy poliamin (Janicka-Russak, Kabała et al., 2010, *J Plant Physiol* 167:261-269). Stymulacja plazmolemowej pompy protonowej, obserwowana w warunkach zasolenia, wynikała zarówno ze wzmożonej ekspresji genów *CsHA*, kodujących enzym, jak i potranslacyjnych modyfikacji białka enzymatycznego, związanych z jego fosforylacją i wiązaniem białka 14-3-3. Wykazano z dużym prawdopodobieństwem, że znaczącą rolę w aktywacji plazmolemowej H<sup>+</sup>-ATPazy w tych warunkach odgrywa zwiększony poziom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach (Janicka-Russak, Kabała et al., 2013, *J Plant Physiol*, 170: 915- 922). Potwierdzono także istotną rolę plazmolemowej pompy protonowej w adaptacji siewek ogórka do stresu wynikającego z obecności jonów metali ciężkich w środowisku. Kadm i miedź, podobnie jak zasolenie, powodowały wzrost aktywności enzymu, co związane było ze wzrostem stopnia fosforylacji ATPazy, a także w przypadku jonów Cd ze zwiększoną ekspresją genów *CsVHA*. Sugeruje się, że funkcją enzymu w tych warunkach jest udział w procesach naprawczych uruchamianych w komórkach zarówno wkrótce po zadziałaniu czynnika stresowego jak i podczas długotrwałego stresu (Janicka-Russak, Kabała et al., 2008, *J Exp Bot* 59:3721-3728; Janicka-Russak, Kabała, Burzyński, 2012, *J Exp Bot* 63:4133-4142). Jak wykazały badania prowadzone na siewkach ogórka, podobną rolę pełni plazmolemowa H<sup>+</sup>-ATPaza również w korzeniach roślin poddanych działaniu niskiej i wysokiej temperatury, wskazując, że enzym ten jest kluczowym białkiem warunkującym tolerancję roślin na rozmaite stresowe czynniki abiotyczne (Janicka-Russak, Kabała et al., 2012, *J Plant Res* 125:291-300; Janicka-Russak i Kabała, 2012, *J Plant Physiol* 169:1607-1614).

Dorobek naukowy obejmuje ponadto dwie prace przeglądowe. Pierwsza z nich poświęcona jest roślinnym pompom wapniowym, czyli  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazom należącym do ATPaz typu  $\text{P}_{2\text{A}}$  i  $\text{P}_{2\text{B}}$  (Kabała i Kłobus, 2005, *Acta Physiol Plant* 27:559-574). Systematyzuje wiedzę dotyczącą regulacji i funkcji pomp wapniowych u roślin. Wyniki intensywnie prowadzonych przez naukowców badań wskazują, że pomimo podobieństwa sekwencji roślinne  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy istotnie różnią się od enzymów zwierzęcych pod względem lokalizacji subkomórkowej, struktury, a także wrażliwości na inhibitory. Białka te obecne są nie tylko w plazmolemie i ER, co ma miejsce w komórkach zwierzęcych, ale występują w błonach wielu kompartmentów, jak wakuole, plastydy, aparat Golgiego czy jądro. Roślinne pompy wapniowe są istotnym elementem ścieżek transdukcji sygnału, dzięki czemu uczestniczą w adaptacji roślin do stresów abiotycznych (zasolenia, niskiej temperatury, anoksji). Co ciekawe, oprócz jonów  $\text{Ca}^{2+}$  mogą transportować inne dwuwartościowe kationy, np.  $\text{Mn}^{2+}$ .

Druga praca przeglądowa podsumowuje aktualny stan wiedzy na temat struktury i regulacji wakuolarnej  $\text{H}^{+}$ -ATPazy w komórkach roślinnych, czyli enzymu, którego funkcjonowanie analizowano w pacach badawczych (Kabała, 2011, *Post Biol Kom* 38:517-532). Została napisana w języku polskim, ponieważ brak polskojęzycznego piśmiennictwa dotyczącego błonowych pomp protonowych. Z uwagi na swoją skomplikowaną budowę, V-ATPaza stanowi białko niezwykle interesujące, w którym każda z podjednostek pełni odrębną, istotną rolę w obrębie kompleksu enzymatycznego (holoenzymu) i może podlegać innym mechanizmom regulacyjnym. Przez długi czas wiedza dotycząca funkcjonowania V-ATPaz w komórkach roślinnych koncentrowała się na ich roli w generowaniu gradientu protonów i napędzaniu procesów wtórnego transportu przez tonoplast. Badania ostatnich lat pokazują, że białka te stanowią istotny element transportu pęcherzykowego w systemie sekrecyjnym i w endocytozie. Wykorzystanie metod proteomiki ilościowej pozwoliło wykazać asocjację tonoplastowej V-ATPazy z enzymem glikolitycznym aldolazą, wskazując na związek pompy protonowej nie tylko z różnymi procesami komórkowymi, ale także ze szlakami metabolicznymi. Niezwykle interesującym odkryciem ostatnich lat była identyfikacja podjednostki B w kompleksie jądrowym heksokinazy u *A. thaliana*, co sugeruje rolę tego polipeptydu w przekazywaniu sygnału cukrowego. Istnieje zatem możliwość, że inne podjednostki wakuolarnej ATPazy także pełnią w komórkach roślinnych dodatkowe funkcje, nie związane z kompleksem  $\text{V}_1\text{V}_0$ .

Katarzyna Kłobus