



**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

**Wydział Biologii**

**Instytut Biologii Eksperymentalnej**

**Zakład Fizjologii Roślin**

**Rozprawa doktorska**

**Ewelina Stolarska**

**Identyfikacja i charakterystyka genów warunkujących komórkową  
homeostazę poliamin w starzeniu liści jęczmienia**

**Promotor: prof. UAM dr hab. Ewa Sobieszczuk-Nowicka**

**Promotor pomocniczy: dr Umesh Kumar Tanwar**

**Poznań 2024**



**Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland**

**Faculty of Biology**

**Institute of Experimental Biology**

**Department of Plant Physiology**

**Ph. D. Thesis**

**Ewelina Stolarska**

**Genome-wide identification and characterization of genes determining  
cellular polyamine homeostasis in senescing barley leaves**

**Supervisor: prof. UAM dr hab. Ewa Sobieszczuk-Nowicka**

**Assistant supervisor: dr Umesh Kumar Tanwar**

**Poznań 2024**

Serdecznie dziękuję

**prof. dr hab. Ewie Sobieszczuk-Nowickiej** za przyjęcie pod swoje skrzydła, okazaną życzliwość oraz przekazanie mi ogromu wiedzy w trakcie całych studiów doktoranckich, a przede wszystkim dziękuję za zrozumienie w najtrudniejszym dla mnie czasie;

मैं अपने सहायक पर्यवेक्षक **डॉ. उमेश कुमार तंवर** को उनके धैर्य, एक अद्भुत शिक्षक होने और मुझे प्रयोगशाला तकनीकों के बारे में बहुत कुछ सिखाने के लिए धन्यवाद देना चाहता हूँ।  
mojemu promotorowi pomocniczemu **doktorowi Umeshowi Kumarowi Tanwarowi**, za cierpliwość, za bycie rewelacyjnym nauczycielem i za przekazanie ogromu wiedzy o technikach laboratoryjnych;

wszystkim **pracownikom Zakładu Fizjologii Roślin**, za wspaniałą atmosferę w pracy;

całemu **zespółowi Golden Promise** za wsparcie, okazaną pomoc w trakcie całego doktoratu, cieszę się, że to właśnie z Wami „dojłynęłam” do celu;

**Magdzie Grabsztunowicz** – najlepszej współlokatorce pokoju 2.68 Wydziału Biologii, za Twoją troskę i wsparcie zarówno w badaniach naukowych jak i w życiu;

**doktorantom Zakładu Fizjologii Roślin i Zakładu Ekofizjologii Roślin**, którzy zawsze i bez wahania służyli mi radą oraz pomocą;

我要感谢植物生理生态研究所的博士生，他们一直毫不犹豫地为我提供了建议和帮助；

**Szymonowi Chowańskiemu** za dzielenie się spokojem, zwłaszcza w tych najtrudniejszych sytuacjach;

**Wiktorowi** za wyrozumiałość, wsparcie, cierpliwość, cierpliwość i... cierpliwość;

**Rodzicom** za zainteresowanie mnie biologią i umożliwienie mi studiowania. Dziękuję za wiarę we mnie i nigdy niekończące się wsparcie;

**to dzięki Wam powstała ta praca.**

Badania finansowano z projektu OPUS Narodowego Centrum Nauki nr UMO-2018/29/B/NZ9/00734, tytuł projektu: „**Poliaminy – nowy przełącznik metaboliczny starzenia liścia jęczmienia. Opracowanie molekularnej podstawy sieciowej regulacji procesu jako cel strategii uprawy zbóż**”



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Autorka otrzymywała stypendium motywacyjne w ramach programu Paszport do przyszłości – Interdyscyplinarne studia doktoranckie na Wydziale Biologii UAM (POWR.03.02.00-00-I006/17) współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój (POWER)



Fundusze Europejskie  
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita  
Polska

Unia Europejska  
Europejski Fundusz Społeczny



## Spis treści

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej.....	6
Streszczenie.....	7
Abstract.....	8
Wykaz stosowanych skrótów .....	9
Autoreferat.....	10
1. WPROWADZENIE.....	10
1.1 Starzenie się roślin.....	11
1.2 Poliaminy .....	13
1.3 Cykl poliaminowy .....	15
1.4 Poliaminy a starzenie liści.....	17
2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY DOKTORSKIEJ.....	19
3. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE .....	21
3.1 Identyfikacja i analiza genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych zaangażowanych w metabolizm i transport poliamin na podstawie badań homologii i filogenetycznych.....	21
3.2 Charakterystyka funkcjonalna zidentyfikowanych genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych na podstawie analiz <i>in silico</i> .....	24
3.3 Ocena ekspresji badanych genów w przemianach metabolicznych towarzyszących starzeniu się liści jęczmienia.....	31
3.4 Omówienie wyników.....	35
4. PODSUMOWANIE.....	39
5. PERSPEKTYWY .....	41
6. LITERATURA.....	42
Prace naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej.....	47
Oświadczenia autorki .....	51
Oświadczenia współautorów .....	53
Sylwetka kandydatki.....	72
Wykaz pozostałych osiągnięć naukowych .....	73

## Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej

### Publikacja 1

Tanwar, U.K.\* , **Stolarska, E.\***, Paluch-Lubawa, E., Mattoo, A.K., Arasimowicz-Jelonek, M., Sobieszczuk-Nowicka, E. (2022). Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 585-603. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006

IF = 8,025; 100 pkt MNiSW

\* pierwsze autorstwo współdzielone

### Publikacja 2

**Stolarska, E.**, Tanwar, U.K., Guan, Y., Grabsztunowicz, M., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O. IV, Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023a). Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. doi:10.3389/fpls.2023.1194737

IF = 5,600; 100 pkt MNiSW

### Publikacja 3

**Stolarska, E.**, Paluch-Lubawa, E., Grabsztunowicz, M., Kumar Tanwar, U., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O. IV, Mattoo, A.K., Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023b). Polyamines as universal bioregulators across kingdoms and their role in cellular longevity and death. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886

Praca na zaproszenie prof. Roberta N. Trigiano – redaktora naczelnego *Critical Reviews in Plant Sciences*

IF = 6,900; 140 pkt MNiSW

## Streszczenie

Starzenie rozwojowe jest procesem nieodwracalnym, po którym następuje bezwarunkowo śmierć komórki. Indukowane ciemnością starzenie liści (ang. *dark-induced leaf senescence*, DILS) jest do pewnego stadium procesem odwracalnym. W roślinach indukowane starzenie jest wysoce kontrolowanym i aktywnym procesem wymagającym globalnego przeprogramowania metabolicznego, mającego na celu zorganizowaną dezintegrację i ponowną remobilizację cennych zasobów. Sprawność regulacji indukowanego procesu starzenia jest oznaką żywotności starzejących się komórek, które na każdym etapie muszą zachować zdolność do utrzymania homeostazy, przejawiającej się m.in. kontrolowaniem homeostazy cyklu poliamin (PA). Homeostaza PA w komórce jest utrzymywana przez mechanizmy sprzężenia zwrotnego z poziomu biosyntezy, katabolizmu, importu i eksportu. **Poliaminy są niskcząsteczkowymi organicznymi kationami należącymi do grupy biogennych amin, kluczowymi w wielu fizjologicznych i rozwojowych procesach u bakterii, zwierząt i roślin. Metabolizm PA może odgrywać istotną rolę w procesie starzenia się liścia.**

Zespół prof. Ewy Sobieszczuk-Nowickiej za cel postawił sobie poznanie wielokierunkowych powiązań metabolizmu poliamin z siecią metaboliczną organizującą proces starzenia liści jęczmienia oraz ocenę, czy zmiana kierunku starzeniowo-zależnego metabolizmu PA wpłynie na ten proces. Kierunek metabolizmu PA i transport może kontrolować efektywność zależnej od starzenia remobilizacji azotu. Do realizacji celu wybrano podejście oparte na genomice funkcjonalnej.

Brak w literaturze informacji na temat sekwencji genów metabolizmu PA w jęczmieniu był dużym ograniczeniem tego podejścia. **Stąd też potrzebna była identyfikacja genów metabolizmu PA w jęczmieniu, która stała się celem mojej rozprawy doktorskiej. Do badań włączyłam również analizę transporterów PA.** Transportery PA są rozpoznane u roślin w niewielkim stopniu. Importery PA zostały opisane u rzodkiewnika, ryżu i pomarańczy. Eksporterzy PA zostały zasugerowane jako potencjalne eksporterzy PA u rzodkiewnika i ryżu.

**W wyniku badań w skali całego genomu jęczmienia wyodrębniłam rodziny genów warunkujące homeostazę PA w komórce, które obejmowały 23 geny metabolizmu PA i 13 genów transporterów. Przeprowadziłam również szczegółową charakterystykę zidentyfikowanych genów oraz ich białkowych produktów.** Modelowanie homologiczne badanych transporterów pozwoliło z dużą dokładnością przewidzieć struktury trójwymiarowe białek, a analizy dokowania molekularnego potwierdziły możliwość interakcji pomiędzy białkami transportującymi a PA. **Obecność w genomie zidentyfikowanych *in silico* genów potwierdziłam eksperymentalnie i zbadałam ich organospecyficzną ekspresję.**

**Następnie w modelu starzenia liści jęczmienia indukowanego ciemnością zbadałam profile ekspresji genów homeostazy PA. Na podstawie tej analizy wytypowałam geny kandydujące do badań funkcjonalnych.**

**Niniejsza rozprawa doktorska przedstawia wyniki pierwszej identyfikacji, izolacji i kompleksową charakterystykę genów jęczmienia warunkujących komórkową homeostazę PA oraz ocenę ich organospecyficzną i starzeniowo-zależną ekspresji w metabolizmie liścia ekspresji.** Wyniki moich badań stanowią punkt odniesienia badań funkcjonalnych wielu zespołów naukowców wyjaśniających mechanizmy molekularnej kontroli i regulacji przez PA procesów rozwojowych zbóż i ich reakcji na (a)biotyczne czynniki środowiska. Szczególnie badań funkcjonalnych nad mechanizmem działania PA w starzeniu liści.

**Słowa kluczowe:** genomika, jęczmień, metabolizm poliamin, starzenie liści, transportery poliamin

## Abstract

Developmental senescence is an irreversible process that is inevitably followed by cell death. Dark-induced leaf senescence (DILS) is a reversible process to a certain stage. In plants, induced senescence is a highly controlled and active process requiring global metabolic reprogramming aimed at the organized disintegration and remobilization of valuable resources. The efficiency of the regulation of the induced senescence process is a sign of the viability of senescent cells, which at each stage must maintain the ability to maintain homeostasis, manifested, among others, by controlling polyamine (PA) cycle homeostasis. PA homeostasis in the cell is maintained by feedback mechanisms from the levels of biosynthesis, catabolism, import and export. **Polyamines are low molecular weight organic cations belonging to the group of biogenic amines, crucial in many physiological and developmental processes in bacteria, animals and plants. PA metabolism may play an important role in the leaf senescence process.**

Professor Ewa Sobieszczuk-Nowicka's team set themselves the goal to understand the multidirectional connections of polyamine metabolism with the metabolic network organizing the senescence process of barley leaves and to assess whether a change in the direction of senescence-dependent PA metabolism will affect this process. The direction of PA metabolism and transport may control the efficiency of senescence-dependent nitrogen remobilization. An approach based on functional genomics was chosen to achieve the goal.

The lack of information in the literature on the sequence of PA metabolism genes in barley was a major limitation of this approach. **Hence, there was a need to identify PA metabolism genes in barley, which became the goal of my doctoral thesis. I also included the analysis of PA transporters in my research.** PA transporters are little known in plants. PA importers have been described in Arabidopsis, rice and orange. PA exporters have been suggested as potential PA exporters in Arabidopsis and rice.

**As a result of research on the entire barley genome, I identified gene families determining PA homeostasis in the cell, which included 23 PA metabolism genes and 13 transporter genes. I also carried out a detailed characterization of the identified genes and their protein products.** Homology modeling of the studied transporters allowed to predict the three-dimensional structures of proteins with high accuracy, and molecular docking analyzes confirmed the possibility of interactions between transport proteins and PA. **I experimentally confirmed the presence of the genes identified in silico in the genome and examined their organospecific expression.**

**Then, in a dark-induced barley leaf senescence model, expression profiles of PA homeostasis genes. Based on this analysis, I selected candidate genes for functional research.**

**This doctoral dissertation presents the results of the first identification, isolation and comprehensive characterization of barley genes determining cellular PA homeostasis, as well as the assessment of their organospecific and senescence-dependent expression in leaf metabolism.** The results of my research constitute a reference point for functional studies of many teams of scientists explaining the mechanisms of molecular control and regulation by PA of crop development processes and their response to (a)biotic environmental factors. Especially functional studies on the mechanism of action of PA in leaf senescence.

Keywords: genomics, barley, polyamine metabolism, leaf senescence, polyamine transporters



## Wykaz stosowanych skrótów

ADC	dekarboksylaza argininy
AIH	iminohydrolaza agmatyny
ALDH	dehydrogenaza aldehydowa
ARGAH	arginaza/agmatynaza
BAT	eksportery poliamin
CDS	rejon kodujący
CPA	aminohydrolaza <i>N</i> -karbamoiloputrescyny
CRE	elementy regulacyjne działające w pozycji <i>cis</i>
CuAO	oksydaza aminowa zawierające miedź
dcSAM	dekarboksylowana S-adenozyl-L-metionina
DILS	starzenie liści indukowane ciemnością
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	maksymalna wydajność kwantowa fotosystemu drugiego
miRNA	mikro RNA
NCPut	<i>N</i> -karbamoiloputrescyna
ODC	dekarboksylaza ornityny
PA	poliaminy
PAO	oksydaza poliaminowa zawierające flawinę
PAObc	oksydaza poliaminowa biorąca udział w konwersji wstecznej
PAT	transportery PA
PCA	analiza głównych składowych
PCD	programowana śmierć komórki
pI	punkt izoelektryczny
PMG	geny metabolizmu PA
PUT	importery PA
Put	putrescyna
SAM	S-adenozyl-L-metionina
SAMDC	dekarboksylaza S-adenozyl-L-metioniny
SAMS	syntetaza S-adenozyl-L-metioniny
Spd	spermidyna
SPDS	syntaza spermidyny
Spm	spermina
SPMS	syntaza sperminy
T-Spm	termospermina
TSPMS	syntaza termosperminy
UTR	rejon niepodlegający translacji

# Autoreferat

## 1. WPROWADZENIE

Świat znajduje się w środku kryzysu ekonomicznego i ekologicznego. Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa prognozuje, że zapotrzebowanie na produkty agrokultury zwiększy się o 35–50% pomiędzy 2012 a 2050 rokiem (FAO, 2019). Spowodowane jest to m.in. wzrostem światowej populacji ludności. Dodatkowo straty w plonach spowodowane zmianą klimatu wpływają na produkcję roślinną, a tym samym na zrównoważoną produkcję żywności. Wymusza to na nas potrzebę poznania i zrozumienia najefektywniejszych metod hodowli. Aby to osiągnąć, należy lepiej poznać biologię roślin użytkowych oraz uzyskać nowe odmiany, efektywniejsze pod względem produkcji. W wyniku stałego narażenia na działanie niekorzystnych warunków rośliny wykształciły mechanizmy, które umożliwiają im przetrwanie. Jednym z nich jest przekierowanie metabolizmu na drogę starzenia. U roślin starzenie jest wysoce kontrolowanym i aktywnym procesem wymagającym globalnego przeprogramowania metabolicznego mającego na celu zorganizowaną dezintegrację i ponowną mobilizację cennych zasobów. Roślina dąży do optymalizacji alokacji zasobów w celu przystosowania się do zmieniających się warunków środowiska.

Jednym z najważniejszych zbóż uprawnych na świecie jest jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) należący do rodziny wiechlinowatych (*Poaceae*) (Monat i wsp., 2019). Jest szeroko wykorzystywaną, jednoliścienną rośliną uprawną o długiej historii w agrokulturze.

Produkcja jęczmienia zwyczajnego w latach 2022–2023 szacowana jest na 151,62 miliona ton, co pod względem wielkości upraw na świecie plasuje go na czwartym miejscu wśród zbóż po kukurydzy, pszenicy i ryżu (<https://www.statista.com/statistics/271973/world-barley-production-since-2008/>). Jęczmień jest rośliną samopylną o diploidalnym genomie składającym się z siedmiu chromosomów ( $2n = 2x = 14$ ) (Monat i wsp., 2019). Szacowana wielkość genomu jęczmienia wynosi 5,1 Gpz, przy czym ponad 80% genomu składa się z elementów powtarzalnych (Wicker i wsp., 2017). W związku z tym, że genom jęczmienia jest diploidalny, roślina ta jest traktowana jako dobry model genomowy dla powszechniej uprawianej, ale heksaploidalnej pszenicy, której genom zbudowany jest z ok. 17 Gpz (Hussain i wsp., 2022). Wszystkie opisane wyżej cechy sprawiają, że jęczmień jest odpowiednim modelem do badań zbóż, dlatego jest ważny nie tylko dla rolnictwa, ale też dla nauki (Muñoz-Amatriaín i wsp., 2014).

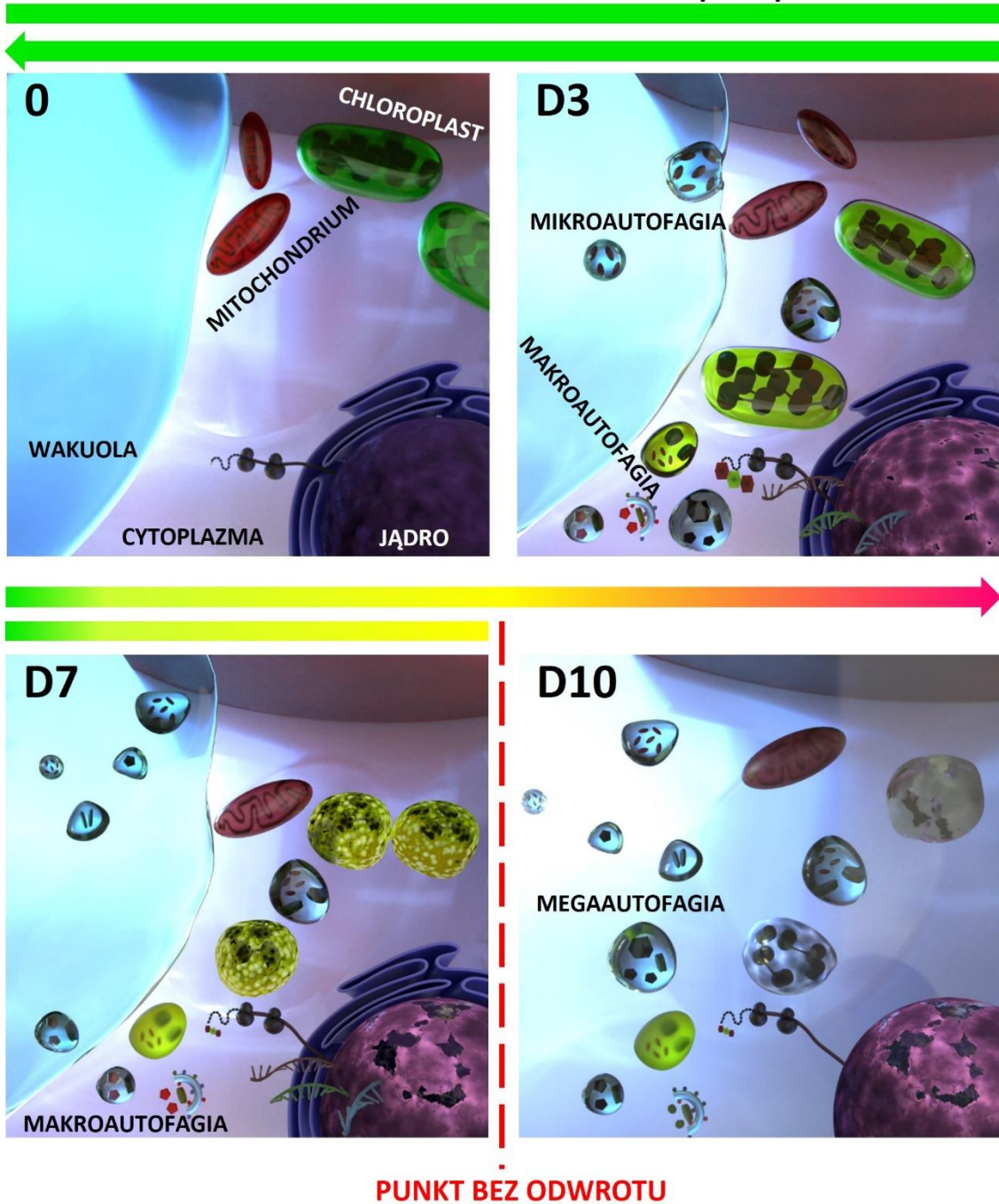
## 1.1 Starzenie się roślin

W wielu badaniach mających na celu identyfikację i analizę funkcjonalną genów roślinnych zaangażowanych w starzenie wykorzystywana jest roślina modelowa, jaką jest rzodkiewnik (Law i wsp., 2018; Guo i wsp., 2021; Buelbuel i wsp., 2023). Stwierdzono jednak wyraźne różnice w programie starzenia rzodkiewnika w porównaniu z innymi roślinami, w tym jednoliściennymi (Buchanan-Wollaston i wsp., 2003; Sobieszczuk-Nowicka i wsp., 2018). Badania nad starzeniem wielu roślin, w tym jęczmienia, wykazały, że usunięcie rozwijających się kwiatów powoduje znaczne wydłużenie żywotności liści. Natomiast u męskosterylnych mutantów rzodkiewnika oraz roślin typu dzikiego, z których usunięto rozwijające się pędy, żywotność liści nie ulega przedłużeniu (Buchanan-Wollaston i wsp., 2003).

W zbożach składniki odżywcze ze starszych liści są remobilizowane do liści młodszych, a ostatecznie do liścia flagowego, co umożliwia rozwój ziarna. Dodatkowo starzenie zbóż jest regulowane na poziomie pojedynczego liścia (Gregersen, Holm i Krupinska, 2008). Liście zbóż mają podstawę merystemową, wierzchołek liścia składa się ze starszych komórek, a młodsze skupione są u nasady liścia. Taka organizacja komórek ułatwia różnicowanie postępu starzenia.

Starzenie rozwojowe jest procesem nieodwracalnym, po którym następuje bezwarunkowo śmierć komórki. Indukowane ciemnością starzenie liści (ang. *dark-induced leaf senescence*, DILS) jest do pewnego stadium procesem odwracalnym. Sobieszczuk-Nowicka i wsp. (2018) zdefiniowali w modelu DILS moment krytyczny, który wyznacza punkt czasowy bez powrotu (Ryc. 1), ale mechanizm jego kontroli nie jest znany. Zmiany obserwowane w DILS obejmują: hamowanie fotosyntezy, dezintegrację chloroplastów, rozpad białek liścia i utratę chlorofilu. Na zaawansowanym etapie dochodzi do dezintegracji jądra i mitochondriów, a kondensacja chromatyny ma miejsce razem z nasileniem fragmentacji nDNA (marker programowanej śmierci komórki, ang. *programmed cell death*, PCD). Na tym etapie dochodzi też do ekspresji genów proteaz cysteinowych i białek makroautofagii (Sobieszczuk-Nowicka i wsp., 2018). W regulacji DILS charakterystyczne jest współdziałanie mikro-, makro- i megaautofagii. Proces ten nawet przy zaawansowanej makroautofagii jest wciąż odwracalny. W roślinach indukowane starzenie jest wysoce kontrolowanym i aktywnym procesem. Sprawność regulacji indukowanego procesu starzenia jest oznaką żywotności starzejących się komórek, które na każdym etapie muszą zachować zdolność do utrzymania homeostazy, która przejawia się m.in. kontrolowaniem homeostazy cyklu PA (za Thomas, 2013; Sequera-Mutiozabal i wsp., 2016; Sobieszczuk-Nowicka i wsp., 2016; Sobieszczuk-Nowicka, 2017; Law i wsp., 2018; Sobieszczuk-Nowicka i wsp., 2018; za Paluch-Lubawa, Stolarska i Sobieszczuk-Nowicka, 2021).

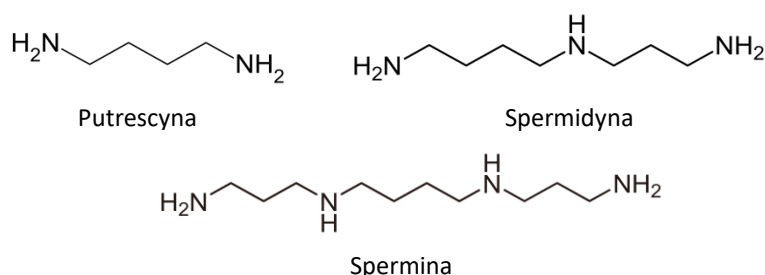
## Indukowany ciemnością procesu starzenia liści jęczmienia Dark-Induced Leaf Senescence (DILS)



**Rycina 1. Model indukowanego ciemnością starzenia liści (DILS).** Na każdym etapie DILS towarzyszą różne typy autofagii: mikro-, makro- i megaaufagii. Określono krytyczny punkt czasowy D7, w którym możliwe jest odwrócenie starzenia liści, pomimo postępu makroautofagii objawy degradacji można odwrócić i zapobiec śmierci komórek. 0 oznacza kontrolę, którą są 7-dniowe siewki jęczmienia, D3 do D10 oznaczają dni starzenia (Sobieszczyk-Nowicka i wsp., 2018, zmienione)

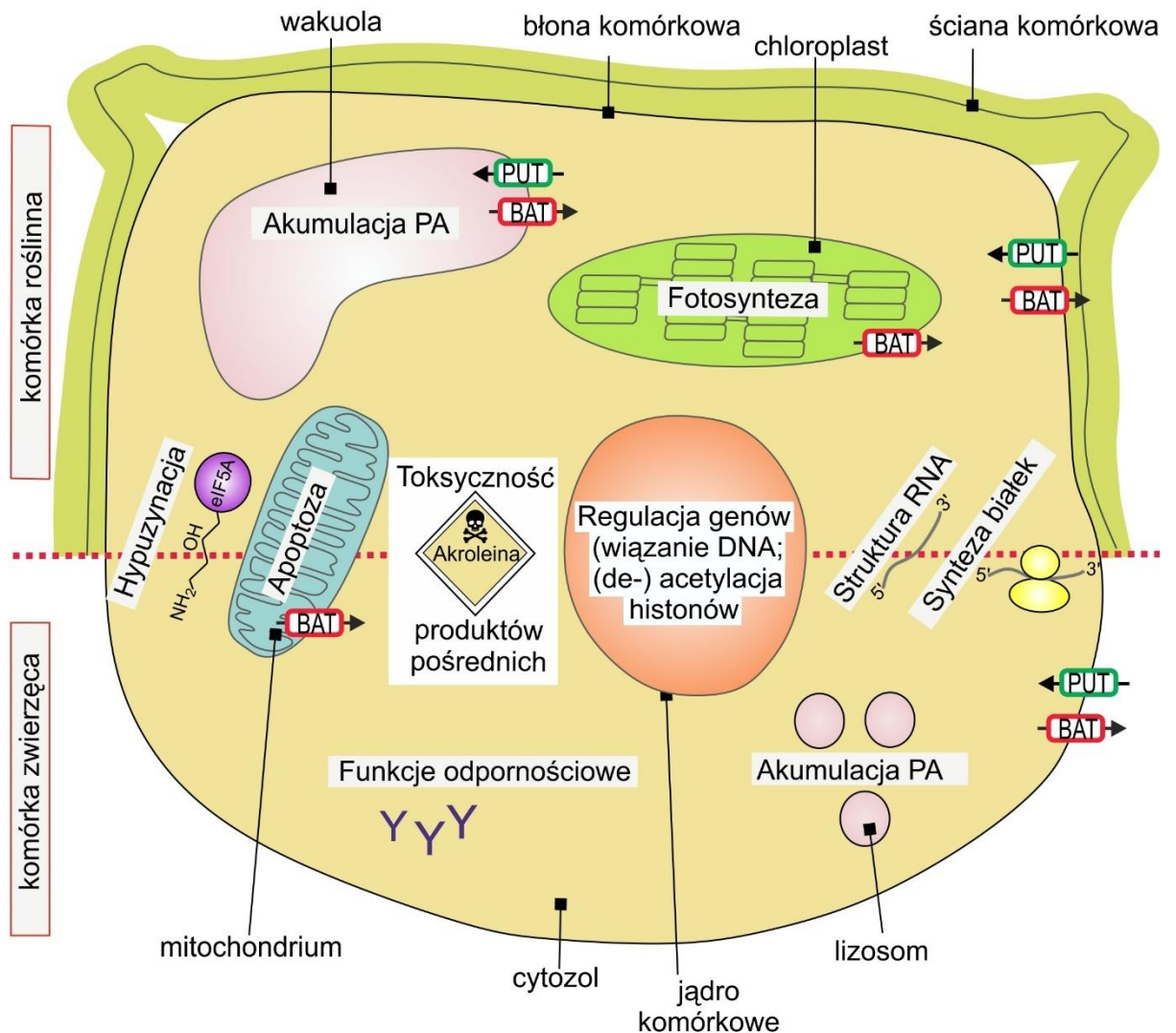
## 1.2 Poliaminy

Poliaminy są niskocząsteczkowymi organicznymi kationami należącymi do grupy biogennych amin, uczestniczą w wielu fizjologicznych i rozwojowych procesach u bakterii, zwierząt i roślin (Takahashi i Kakehi, 2010; Miller-Fleming i wsp., 2015). Powszechnie występującymi w roślinach wyższych PA są putrescyna (Put), spermidyna (Spd) i spermina (Spm). Są to związki o budowie łańcuchowej. Putrescyna zawiera dwie, Spd trzy, a Spm cztery grupy aminowe (Ryc. 2).



Rycina 2. Wzory strukturalne putrescyny, spermidyny i sperminy

PA należą do specyficznej grupy regulatorów wzrostu. W komórce roślinnej występują w stężeniach od mikro- do milimolarnych. Są to stężenia znacznie wyższe od stężeń charakterystycznych dla hormonów roślinnych (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka, 2014). Poliaminy to regulatory, których sposób działania jest wciąż odkrywany. Są one ściśle związane z przebiegiem wielu procesów fizjologicznych u roślin i zwierząt (Ryc. 3) i są niezbędne dla żywotności komórek z uwagi na ich rolę w fundamentalnych procesach komórkowych, w tym w regulacji transkrypcji i translacji, regulacji epigenetycznej, integralności strukturalnej komórek i sygnalizacji (Kusano i Suzuki, 2015; Mattoo i Sobieszczuk-Nowicka, 2019; Aye i wsp., 2022; **Stolarska i wsp., 2023b – Publikacja 3**). Dzięki występowaniu kationowych grup aminowych i iminowych PA są zdolne do elektrostatycznego wiązania się do grup fosforanowych i karboksylowych takich związków chemicznych jak: kwasy nukleinowe, białka, fosfolipidy i kwaśne polisacharydy. Modyfikują w ten sposób strukturę tych związków, wpływając na ich właściwości (Bachrach, 2005). Poliaminy różnią się od kationów nieorganicznych, takich jak  $Mg^{2+}$  czy  $Ca^{2+}$ , charakterem działania, ich ładunki dodatnie są rozmieszczone w określonych odległościach za pomocą elastycznych łańcuchów węglowych, które mogą uczestniczyć w oddziaływaniach hydrofobowych (Igarashi i Kashiwagi, 2000; Thomas, 2001; Igarashi i Kashiwagi, 2010), np. bezpośrednie wiązanie PA równoległe do osi podłużnej DNA sprzyja stabilizacji podwójnej helisy DNA (Thomas, Tajmir-Riahi i Thomas, 2016; Nishio i wsp., 2018). Co więcej, wiązanie PA z DNA sprzyja tworzeniu niekanonicznych struktur DNA, które – jak stwierdzono – stabilizują nukleosomy i warunkują kondensację chromatyny (Raspaud i wsp., 1999; Brooks, 2013; Visvanathan i wsp., 2013; Imre i wsp., 2022).



**Rycina 3. Schemat przedstawiający rolę poliamin w biologii komórki.** Górna część rysunku przedstawia schematyczną komórkę roślinną, dolna część komórkę zwierzęcą. Poliaminy regulują ekspresję genów na poziomie transkrypcji (poprzez wiązanie się do DNA, deacetylowanie/acetylowanie histonów) oraz na poziomie translacji (poprzez wpływ na strukturę RNA). Akroleina, będąca produktem ubocznym katabolizmu PA, jest toksyczną cząsteczką, która może powodować hamowanie fotosyntezy i nasilać śmierć komórek. Kolejnym produktem ubocznym katabolizmu PA jest hipuzyna – związek konieczny do aktywności czynnika elongacyjnego translacji eIF5A i absolutnie niezbędny do przeżycia komórki. Poliaminy w komórce roślinnej magazynowane są w wakuoli, a w komórce zwierzęcej w lizosomach. Poziom PA spada wraz z wiekiem zarówno w komórkach roślin, jak i zwierząt. Poliaminy mają działanie przeciwstarzeniowe zarówno u roślin, jak i zwierząt. W komórkach zwierzęcych poliaminy pełnią również funkcje odpornościowe. BAT: eksportery PA; PUT: importery PA (Stolarska i wsp., 2023b, zmienione – Publikacja 3)

Ponieważ homeostaza PA w komórce podlega ścisłej kontroli z udziałem skomplikowanych mechanizmów sprzężenia zwrotnego z poziomu biosyntezy, katabolizmu, importu i eksportu PA, wahania stężeń PA w prawidłowo funkcjonującej komórce są mało prawdopodobne (za Stolarska i wsp., 2023b – Publikacja 3). Obie grupy transporterów są w niewielkim stopniu rozpoznane u roślin uprawnych. Transportery importu PA (ang. *polyamine uptake transporter*, PUT) zostały opisane w rzodkiewniku, ryżu i pomarańczy (Fujita i Shinozaki, 2015; Alhag i wsp., 2021). Dwukierunkowe transportery aminokwasów (ang. *bi-directional amino acid*

*transporters*, BAT) są rozpoznane u roślin w niewielkim stopniu. Niedawno zasugerowano, że mogą być eksporterami PA u rzodkiewnika i ryżu (Ge, 2015; Ariyaratne, Ge i Morris, 2019).

Poziom PA wzrasta lub maleje u roślin narażonych na różne stresory (a)biotyczne. Komórka roślinna, zmieniając kierunek ich metabolizmu, bardzo szybko odpowiada na zmieniające się warunki środowiska zmianami stężeń PA (Walters, 2003; Legocka i Sobieszczuk-Nowicka, 2012; Upadhyay i wsp., 2020, 2021; Upadhyay, Shao i Mattoo, 2021).

### 1.3 Cykl poliaminowy

Szlak biosyntezy PA w roślinach bazuje na metabolizmie trzech aminokwasów: argininy, ornityny i metioniny (Ryc. 4) (Stolarska i wsp., 2023b – Publikacja 3). Arginina jest przekształcana w ornitynę w procesie hydrolizy katalizowanej przez arginazę (ARGAH, EC 3.5.3.1), a następnie w Put przez dekarboksylazę ornityny (ODC, EC 4.1.1.17). Arginina może być również przekształcona przez dekarboksylazę argininy (ADC, EC 4.1.1.19) w agmatynę, która jest substratem dla dwóch różnych szlaków prowadzących do syntezy Put. W pierwszym szlaku iminohydrolaza agmatyny (AIH, EC 3.5.3.12) katalizuje tworzenie *N*-karbamoiloputrescyny (NCPut), a NCPut jest substratem reakcji katalizowanej przez aminohydrolazę *N*-karbamoiloputrescyny (CPA, EC 3.5.1.53). Produktem tej dwuetapowej reakcji jest Put (za Stolarska i wsp., 2023b – Publikacja 3). Agmatyna w drugim szlaku jest przekształcana bezpośrednio do Put, a reakcja ta jest katalizowana przez arginazę/agmatynazę [ARGAH, EC 3.5.3.1(1)] (za Stolarska i wsp., 2023b – Publikacja 3). Niektóre rośliny, takie jak rzodkiewnik, spirodela wielokorzeniowa czy mech *Physcomitrella patens*, nie mają genów kodujących ODC, a niektóre zielone algi pozbawione są szlaku syntezy Put z udziałem ADC (za Stolarska i wsp., 2023b – Publikacja 3). Metionina jest substratem w syntezie Spd i Spm. Aminokwas ten jest przekształcany przez syntetazę *S*-adenozylu-*L*-metioniny (SAMS, EC 2.5.1.6) do *S*-adenozylu-*L*-metioniny (SAM), a następnie poprzez dekarboksylazę *S*-adenozylu-*L*-metioniny (SAMDC, EC 4.1.1.50) do dekarboksylowanej *S*-adenozylu-*L*-metioniny (dcSAM). Finalnie dcSAM służy jako donator grup aminopropylowych do syntezy Spd z Put i syntezy Spm ze Spd. Reakcje te są katalizowane odpowiednio przez syntazę spermidyny (SPDS, EC 2.5.1.16) i syntazę sperminy (SPMS, EC 2.5.1.22) (Mattoo i wsp., 2015; Guo i wsp., 2020). Z Spd zamiast Spm może także powstać termospermina przy udziale syntazy termosperminy (TSPMS lub ACL5, EC 2.5.1.14) – szlak ten został opisany m.in. w rzodkiewniku (Vera-Sirera i wsp., 2010; Guo i wsp., 2020).

W katabolizmie PA można wyróżnić dwie ścieżki:

- szlak kataboliczny (ang. *terminal catabolic pathway*, **TC**);
- szlak konwersji wstecznej (przekształcanie metabolitu do związku macierzystego; ang. *back conversion pathway*, **BC**) (Tab. 1 **Stolarska i wsp., 2023b – Publikacja 3**).

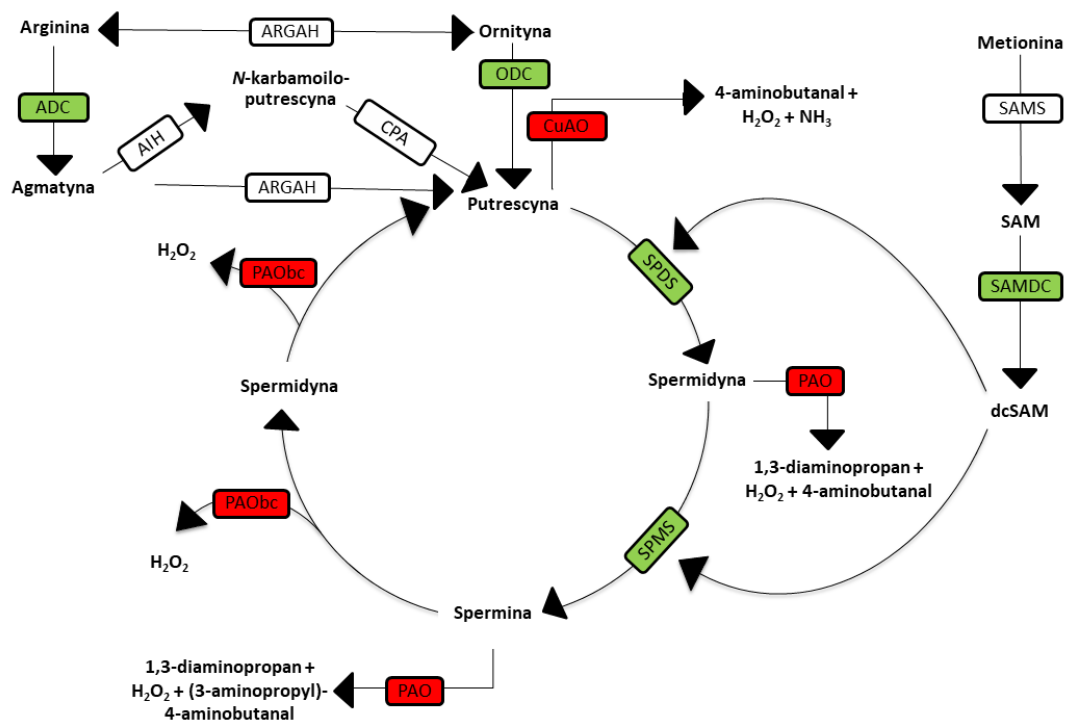
Szlak TC prowadzi do całkowitego i nieodwracalnego rozkładu PA, natomiast szlak BC do rozkładu wyższych PA do niższych PA (Spm → Spd → Put). Głównymi enzymami katabolizmu PA są oksydazy, które są podzielone na dwie grupy: oksydazy aminowe zawierające miedź (CuAO, EC 1.4.3.6) i oksydazy poliaminowe zawierające flawinę (PAO, EC 1.5.3.11) (Ryc. 4) (Kusano i wsp., 2008; Tavladoraki i wsp., 2012; Navakoudis i Kotzabasis, 2022).

Białka CuAO są enzymami biorącym udział w szlaku TC, w którym zachodzi utlenianie Put. W wyniku tej reakcji powstają H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> i 4-aminobutanal, który w kolejnych reakcjach może zostać przekształcony w kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (Ryc. 4). Roślinne CuAO mają najwyższą wydajność katalityczną w przypadku Put, ale katabolizują również Spd i Spm (Bagni i Tassoni, 2001; Agostinelli i wsp., 2010).

W szlaku BC Spm i Spd są utleniane przez oksydazę poliaminową PAObc odpowiednio do Spd i Put, a także do 3-aminopropanalu i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cona i wsp., 2006; Angelini i wsp., 2008; Tavladoraki i wsp., 2012) (Ryc. 4). W szlaku TC PAO utleniają Spd i Spm, tworząc odpowiednio 4-aminobutanal i *N*-(3-aminopropylo)-4-aminobutanal, a także 1,3-diaminopropan i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ryc. 4). Produkty katabolizmu PA, tj. 4-aminobutanal i 3-aminopropanal to niestabilne aldehydy, które mogą samorzutnie rozkładać się do toksycznej akroleiny, która w wysokich stężeniach powoduje np. hamowanie fotosyntezy i propaguje śmierć komórek, co sugeruje, że bierze ona udział w inicjacji PCD (Wood, Khan i Moskal, 2007).

Szlaki metabolizmu PA łączy możliwość szybkiej wzajemnej konwersji (Put → Spd → Spm) lub (Spm → Spd → Put). Metaboliczna interkonwersja, czyli odwracalna przemiana metaboliczna, wraz z transportem pozwala na skuteczną kontrolę stężenia PA w różnych kompartmentach i pomiędzy komórkami (Seiler, 2004; Moschou i wsp., 2008; Tavladoraki i wsp., 2012; Handa, Fatima i Mattoo, 2018; Navakoudis i Kotzabasis, 2022).





**Rycina 4. Cykl poliaminowy.** Synteza PA w roślinach polega na niezależnej dekarboksylacji dwóch aminokwasów: ornityny i argininy. Produktem dekarboksylacji argininy przez dekarboksylazę argininy (ADC) jest agmatyna, która jest następnie hydrolizowana albo do Put przez hydrolizę arginazy (ARGAH), albo najpierw do *N*-karbamoiloputrescyny (NCPut) przez iminohydrolazę agmatyny (AIH), a następnie do Put przez aminohydrolazę *N*-karbamoiloputrescyny (CPA). Natomiast dekarboksylacja ornityny przez dekarboksylazę ornityny (ODC) bezpośrednio wytwarza Put. Z metioniny przy udziale syntetazy *S*-adenozylu-*L*-metioniny (SAMS) powstaje *S*-adenozylu-*L*-metionina (SAM), która następnie jest substratem reakcji katalizowanej przez dekarboksylazę *S*-adenozylu-*L*-metioniny (SAMDC) i wytwarzana jest dekarboksylowana SAM (dcSAM). Z kolei dcSAM jest źródłem grup aminopropylowych do syntezy Spd z Put i syntezy Spm z Spd, reakcje te są katalizowane odpowiednio przez syntazę spermidyny (SPDS) i syntazę sperminy (SPMS). Oksydaza zawierająca miedź (CuAO) i oksydaza poliaminowa (PAO) katalizują deaminację poliamin. Spm jest utleniana do Spd, która następnie jest utleniana do Put, reakcje te katalizowane są przez oksydazę poliaminową (PAObc). ADC: dekarboksylaza argininy; AIH: iminohydrolaza agmatyny; ARGAH: arginaza/agmatynaza; CPA: aminohydrolaza *N*-karbamoiloputrescyny; CuAO: oksydazy aminowe zawierające miedź; dcSAM: dekarboksylowana *S*-adenozylu-*L*-metionina; ODC: dekarboksylaza ornityny; PAO/PAObc: oksydaza poliaminowa; SAM: *S*-adenozylu-*L*-metionina; SAMDC: dekarboksylaza *S*-adenozylu-*L*-metioniny; SAMS: syntetaza *S*-adenozylu-*L*-metioniny SPDS: syntaza spermidyny; SPMS: syntaza sperminy (Tanwar, Stolarska i wsp., 2022, zmienione – Publikacja 1)

#### 1.4 Poliaminy a starzenie liści

Na podstawie wyników zaprezentowanych w pracach Sobieszczuk-Nowicka i wsp. (2009; 2015; 2016) zaproponowany został model działania PA w programie przedwczesnego, indukowanego ciemnością, starzenia liścia (Sobieszczuk-Nowicka, 2017). Badania wykazały, że sygnałem do indukcji procesu starzenia liścia jest akumulacja PA, po której następuje spadek ich miana. PA syntetyzowane w cytoplazmie są transportowane do apoplastu i tam utlenianie (rozkładane) do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz diaminopropanu – metabolitów usprawniających procesy degradacyjne. Oksydacja PA kontroluje również tempo przebiegu procesu poprzez syntezę kwasu  $\gamma$ -amino masłowego (GABA) i pod pewnymi warunkami może przyspieszać starzenie. Ogólnie jednak blokowanie rozkładu PA zasadniczo opóźnia starzenie liści. Również w pracy Sequera-Mutiozabal

i wsp. (2016) zasugerowano, że katabolizm Spd i/lub Spm przez oksydazy poliaminowe może sprzyjać starzeniu poprzez produkcję  $H_2O_2$ . U mutantów rzodkiewnika, u których nie następuje konwersja Spm do Spd w wyniku braku aktywności PAO4(bc), wystąpiło opóźnione wejście liścia w fazę starzenia wywołanego ciemnością (Sequera-Mutiozabal i wsp., 2016). Opóźnione starzenie wywołane ciemnością u mutantów powiązane jest również z wyższym poziomem Spm, zmniejszoną produkcją reaktywnych form tlenu i zwiększeniem poziomu tlenu azotu. Szczegółowa analiza danych opublikowanych przez Sequera-Mutiozabal i wsp. (2016) sugeruje, że regulacyjna rola PA opiera się na zapewnieniu ochrony przed stresem przez konwersję metaboliczną obejmującą zmiany stanu oksydacyjno-redukcyjnego układu askorbinianu/dehydro-askorbinianu, zmiany w metabolizmie cukru i azotu i oddziaływanie (ang. *crosstalk*) z biosyntezą etylenu (Sequera-Mutiozabal i wsp., 2016). Molekularne podstawy tych zjawisk nie zostały dostatecznie opisane.

Poliaminy są również istotne dla żywienia mineralnego roślin. Zboża akumulują 60–80% potrzebnego azotu w okresie wzrostu wegetatywnego, natomiast w fazie nalewania ziarna zachodzi proces przemieszczania azotu z organów wegetatywnych (remobilizacja) (za Sandhu i wsp., 2021). Azot jonów amonowych wbudowywany w glutaminę i glutaminian jest przekazywany w procesach syntezy innych metabolitów azotowych, m.in. PA (Wuddineh, Minocha i Minocha, 2018). Poprawa efektywności wykorzystania azotu jest niezbędna do obniżenia kosztów komercyjnego nawożenia w produkcji roślinnej (Mattoo i wsp., 2010; Wuddineh, Minocha i Minocha, 2018). Manipulowanie poziomem PA może zatem stanowić metodę zwiększenia wydajności remobilizacji azotu i węgla leżącą u podstawy procesu starzenia liścia. Poprawę efektywności plonowania zbóż można osiągnąć poprzez regulację procesu starzenia liści, zarówno w kierunku jego opóźnienia, jak i przyspieszenia (Ryc. 5).



**Rycina 5. Poprawę efektywności plonowania zbóż można osiągnąć poprzez regulację procesu starzenia liści, w kierunku zarówno jego opóźnienia poprzez zwiększenie poziomu PA, jak i przyspieszenia poprzez zmniejszenie poziomu PA w roślinie. Rycinę utworzono przy użyciu programu BioRender.com**

**Poznanie wielokierunkowych powiązań metabolizmu poliamin z siecią metaboliczną organizującą proces starzenia wydaje się ważnym zagadnieniem agronomicznym.**

## 2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY DOKTORSKIEJ

Celem zespołu kierowanego przez prof. Ewę Sobieszczuk-Nowicką jest poznanie wielokierunkowego związku między homeostazą poliamin a sieciami metabolicznymi organizującymi proces starzenia się liści jęczmienia. Kierunek metabolizmu i transport PA może kontrolować skuteczność leżącej u podłoża starzenia się liścia remobilizacji. Sugeruje to wykorzystanie PA w planowaniu strategii uprawy zbóż. Egzogenicznie ukierunkowane zastosowanie PA może poprawić tolerancję roślin na różne czynniki stresowe. Podejście oparte na genomice funkcjonalnej pomogłoby wyjaśnić molekularne podstawy tych zjawisk.

Brak w literaturze informacji na temat sekwencji genów metabolizmu PA w jęczmieniu był dużym ograniczeniem, dlatego potrzebna była identyfikacja tych genów. W badania włączyłam również analizę transporterów PA. Transportery PA są rozpoznane u roślin w niewielkim stopniu.

Celem pracy doktorskiej była kompleksowa identyfikacja genów zaangażowanych w homeostazę PA w genomie jęczmienia oraz wstępna ocena ich udziału w przemianach metabolicznych towarzyszących procesom starzenia liści. Aby go osiągnąć, zaplanowałam realizację trzech następujących zadań badawczych:

1. Identyfikacja i analiza genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych zaangażowanych w metabolizm i transport poliamin na podstawie badań homologii i filogenetycznych.

Aby osiągnąć ten cel na podstawie homologii z opisanymi już wcześniej w literaturze białkami w innych roślinach, zidentyfikowałam geny metabolizmu i transportu PA w jęczmieniu. Następnie obecność w genomie zidentyfikowanych genów została potwierdzona laboratoryjnie. Analiza filogenetyczna sekwencji aminokwasowych białek metabolizmu i transportu PA wykazała ścisłe powiązanie ze swoimi homologami innych gatunków roślin.

2. Charakterystyka funkcjonalna zidentyfikowanych genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych na podstawie analiz *in silico*.

Aby osiągnąć ten cel, określiłam metodami *in silico* budowę strukturalną zidentyfikowanych genów, elementy regulacyjne działające na poziomie transkrypcji i translacji. W kolejnym kroku za pomocą narzędzia Genevestigator v3 analizowałam *in silico* poziomy ekspresji genów metabolizmu i transporterów PA jęczmienia:

- na ośmiu etapach rozwoju rośliny – od kiełkowania ziarniaka przez kwitnienie po dojrzałość nowych ziarniaków;
- w różnych organach roślinnych;
- w różnych warunkach stresu (a)biotycznego.

Za pomocą modelowania homologicznego wszystkich badanych transporterów mogłam z dużą dokładnością przewidzieć struktury trójwymiarowe interesujących mnie białek i potwierdziłam ich funkcję. Następnie wykonałam kompleksową analizę *in silico* przewidywanych produktów białkowych zidentyfikowanych genów. Określiłam punkt izoelektryczny (pI), długość sekwencji aminokwasowej, masę cząsteczkową i współczynnik hydropatyczności (GRAVY). Określiłam prawdopodobne interakcje typu białko-białko. Następnie przeprowadziłam analizę *in silico* przewidującą miejsca modyfikacji potranslacyjnej, które wpływają na właściwości chemiczne i fizyczne, stabilność i aktywność białek. Za pomocą metody dokowania molekularnego potwierdziłam możliwości wiązania interesujących mnie białek z ligandami PA.

### 3. Ocena ekspresji badanych genów w przemianach metabolicznych towarzyszących starzeniu się liści.

Wyniki otrzymane dzięki analizom *in silico* dotyczące ekspresji genów metabolizmu PA w różnych tkankach jęczmienia potwierdziłam laboratoryjnie poprzez określenie poziomu ekspresji genów *HvPMG* w organach takich jak: koleoptyle z 5-dniowych siewek; korzenie i pędy z 7-dniowych siewek; liście i łodygi z 10-dniowych siewek. Na podstawie tych analiz wybrałam 13 genów, których ekspresja była obserwowana w liściach. Model DILS został wykorzystany jako układ doświadczalny do oceny ekspresji genów metabolizmu i transportu PA. Oceny ekspresji genów *HvPMG* dokonałam metodą RT-qPCR. Ekspresję genów transporterów PA w liściach poddanych DILS zbadałam z wykorzystaniem metody analizy transkryptomu (podejście RNA-seq).

Postawiłam hipotezę, że w **obrębie rodzin genów zaangażowanych w homeostazę PA są geny, których ekspresja jest organospecyficzna (liść) i starzeniowo-zależna.**

### 3. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

#### 3.1 Identyfikacja i analiza genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych zaangażowanych w metabolizm i transport poliamin na podstawie badań homologii i filogenetycznych

Badania rozpoczęłam od identyfikacji jęczmiennych genów metabolizmu PA, dla których zespół zaproponował nazwę *PMG* (ang. *polyamine metabolism genes*) (Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1) i genów transportu PA, dla których zespół zaproponował nazwę *PAT* (ang. *polyamine transporters*), (Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2).

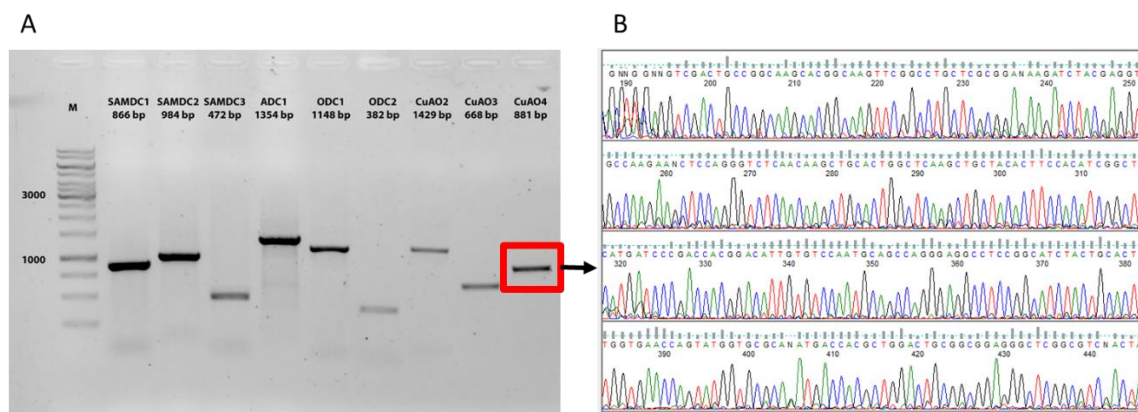
Najpierw użyłam wcześniej opisanych w literaturze sekwencji aminokwasowych *PMG* i *PAT* u rzodkiewnika, które były zdeponowane w bazie TAIR. Sekwencje te zostały wykorzystane jako zapytania w programie BLASTP w bazie danych Ensembl Plant do wyznaczenia homologicznych sekwencji aminokwasowych jęczmienia, a w przypadku białek dekarboksylazy ornityny, które są nieobecne u rzodkiewnika, jako zapytania wykorzystałam sekwencje białkowe pobrane z bazy danych ryżu (<https://www.plantgdb.org/OsGDB>). Przepuszczalne sekwencje białek jęczmiennych PA zostały przeanalizowane przy użyciu ukrytego modelu Markowa pod kątem obecności specyficznej domeny reprezentującej odpowiednią klasę białek. Dla dokładności sekwencje te zostały również zweryfikowane krzyżowo za pomocą InterProScan, a kandydaci, zawierający którąkolwiek z typowych domen odpowiednich białek, zostali rozpoznani jako geny potencjalnie kodujące białka metabolizmu i transportu PA.

**W efekcie wyodrębniłam siedem rodzin genów, które obejmowały 23 *HvPMG*** (Tab. 1). Wśród nich zidentyfikowałam trzy geny dekarboksylazy S-adenozyl-L-metioniny (*HvSAMDC 1-3*), dwa dekarboksylazy ornityny (*HvODC1-2*), jeden dekarboksylazy argininy (*HvADC1*), jeden syntazy spermidyny (*HvSPDS1*), dwa syntazy sperminy (*HvSPMS1-2*), pięć oksydazy diaminowej zawierającej miedź (*HvCuAO2, 3, 4, 6 i 7*) i dziewięć oksydazy poliaminowej (*HvPAO1-9*). W jęczmieniu nie zidentyfikowałam genu syntazy termosperminy. Natomiast **wśród *HvPAT* zidentyfikowałam siedem genów importerów (*HvPUT1-7*) i sześć genów eksporterów PA (*HvBAT1-6*).**

	Biosynteza PA					Katabolizm PA		Transport PA	
	Dekarboksylaza S-adenozyl-L-metioniny	Dekarboksylaza ornityny	Dekarboksylaza argininy	Syntaza spermidyny	Syntaza sperminy	Dioksydaza zawierająca miedź	Oksydaza poliaminowa	Import	Eksport
Enzymy								Importery PA	Eksportery PA
Geny	<i>HvSAMDC1</i> <i>HvSAMDC2</i> <i>HvSAMDC3</i>	<i>HvODC1</i> <i>HvODC2</i>	<i>HvADC1</i>	<i>HvSPDS1</i>	<i>HvSPDS1</i> <i>HvSPDS2</i>	<i>HvCuAO2</i> <i>HvCuAO3</i> <i>HvCuAO4</i> <i>HvCuAO6</i> <i>HvCuAO7</i>	<i>HvPAO1</i> <i>HvPAO2</i> <i>HvPAO3</i> <i>HvPAO4</i> <i>HvPAO5</i> <i>HvPAO6</i> <i>HvPAO7</i> <i>HvPAO8</i> <i>HvPAO9</i>	<i>HvPUT1</i> <i>HvPUT2</i> <i>HvPUT3</i> <i>HvPUT4</i> <i>HvPUT5</i> <i>HvPUT6</i> <i>HvPUT7</i>	<i>HvBAT1</i> <i>HvBAT2</i> <i>HvBAT3</i> <i>HvBAT4</i> <i>HvBAT5</i> <i>HvBAT6</i>
Suma genów	3	2	1	1	2	5	6	7	6

**Tabela 1. Zidentyfikowane geny metabolizmu poliamin w genomie jęczmienia odmiany Golden promise.** *ADC*: dekarboksylaza argininy; *BAT*: eksportery poliamin; *CuAO*: oksydaza zawierająca miedź; *Hv*: jęczmień zwyczajny; *PAO*: oksydaza poliaminowa; *PAT*: importery poliamin; *SAMDC*: dekarboksylaza S-adenozyl-L-metioniny; *SPDS*: syntaza spermidyny; *SPMS*: syntaza sperminy

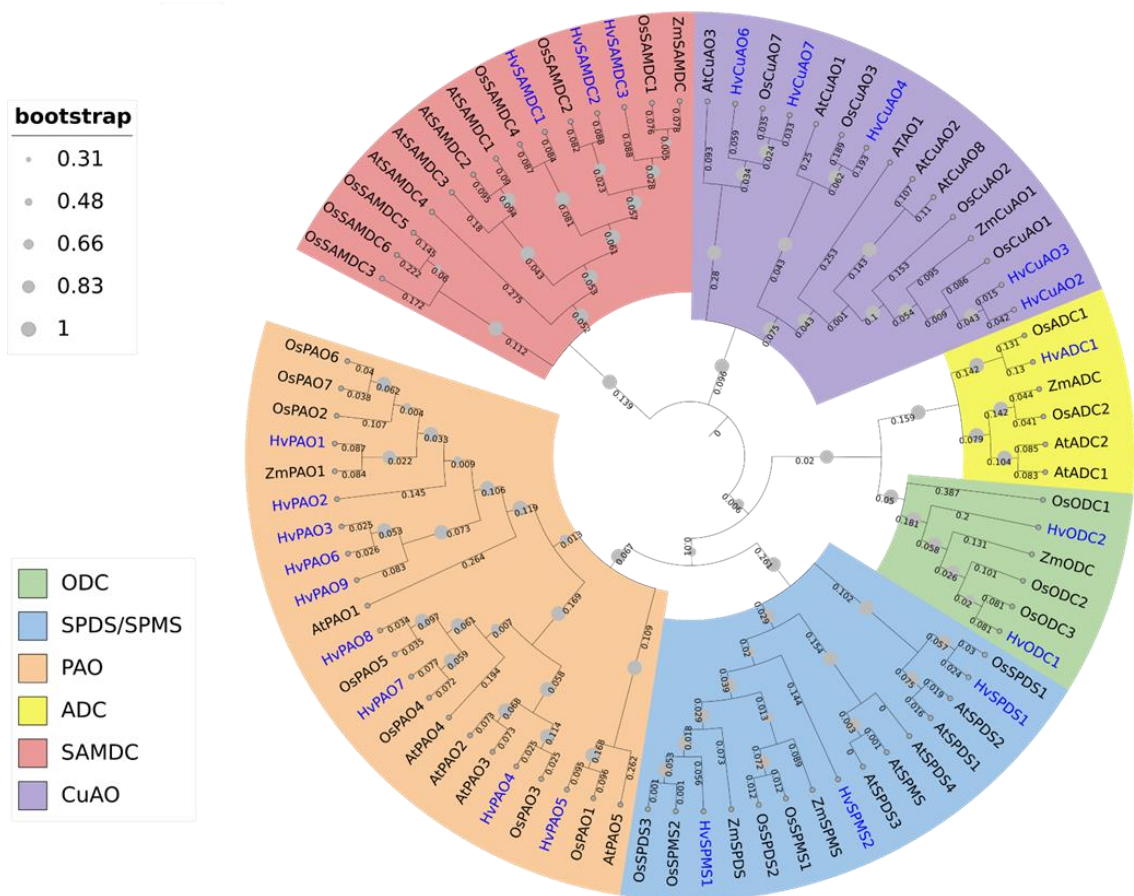
Obecność w genomie zidentyfikowanych *in silico* 23 genów *HvPMG* została dodatkowo potwierdzona przy użyciu tradycyjnych metod laboratoryjnych poprzez wykonanie sekwencjonowania produktów otrzymanych w reakcji PCR z wykorzystaniem jako matrycy genomowego DNA (gDNA) wyizolowanego z liści jęczmienia i odpowiednich starterów. Sekwencjonowanie produktu zostało wykonane przez firmę NexBio z Lublina (Ryc. 6).



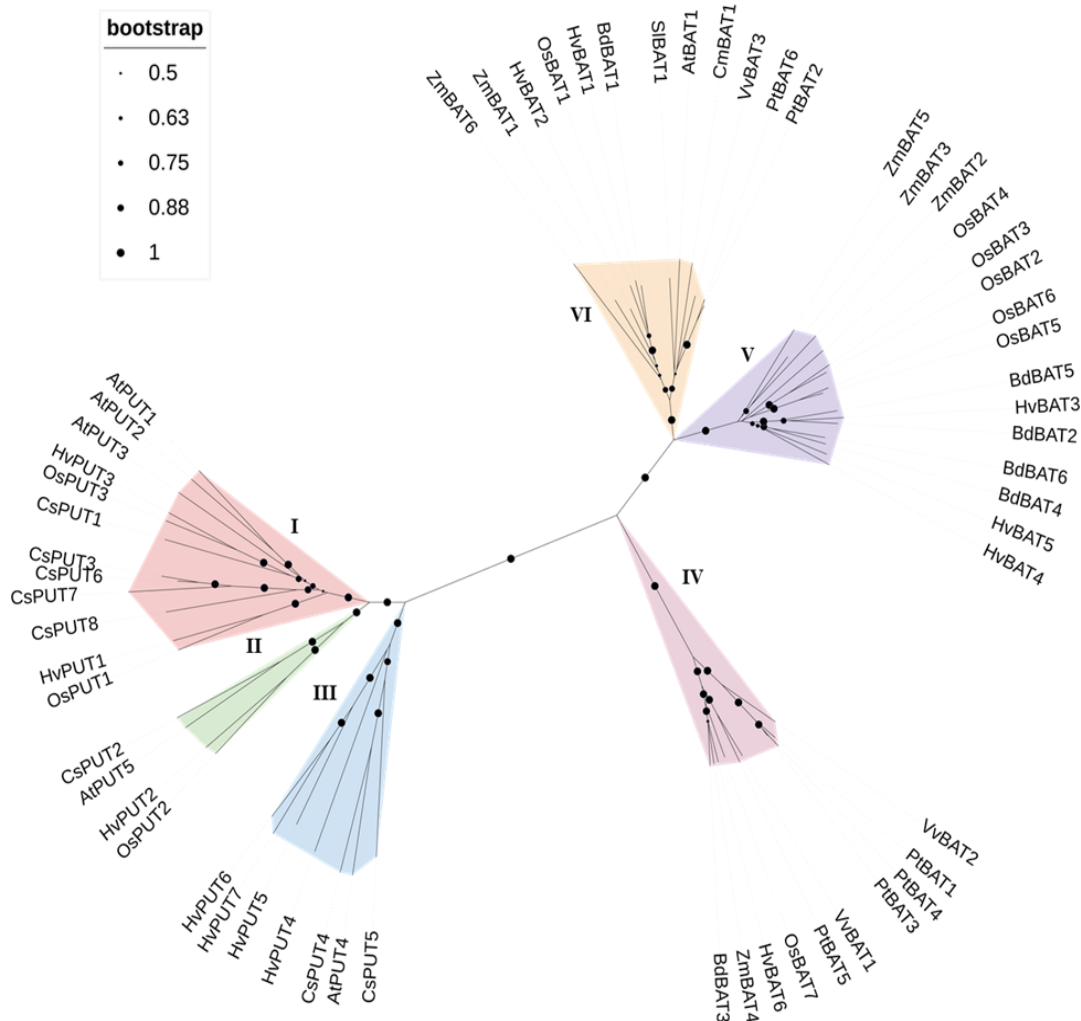
**Rycina 6. Potwierdzenie obecności zidentyfikowanych *in silico* 23 genów *HvPMG* metodami laboratoryjnymi w materiale badawczym.** (A) Przykładowe zdjęcie żelu z produktami reakcji PCR, w której jako matrycę wykorzystano gDNA wyizolowane z jęczmienia odmiany Golden promise. (B) Fluorogram jednego z produktów PCR poddanych sekwencjonowaniu

Przeprowadziłam również analizę filogenetyczną białek *HvPMG* i *HvPAT* przy użyciu metody najbliższego sąsiada (ang. *neighbor-joining*) z wykorzystaniem programu MEGA-11. Do analizy *HvPMG* użyłam sekwencji aminokwasowych rzodkiewnika, ryżu i kukurydzy. Białka szlaku metabolicznego PA są wysoce konserwatywne u tych czterech gatunków, *SAMDC*, *PAO*, *CuAO*, *ADC*, *ODC* i *SPDS/SPMS* są zgrupowane kolejno w odrębnych grupach

(Ryc. 7). Do analizy HvPAT dodatkowo użyłam sekwencji topoli, kłosownicy dwukłoskowej, winorośli właściwej, szafranu uprawnego, pomidora zwyczajnego i melona (Ryc. 8). Sekwencje aminokwasowe importerów i eksporterów PA wykazały ścisłe powiązanie ze swoimi homologami innych gatunków roślin.



**Rycina 7. Drzewo filogenetyczne białek uczestniczących w metabolizmie poliamin w jęczmieniu.** Relacje ewolucyjne zostały ustalone z wykorzystaniem programu MEGA-11 z użyciem metody NJ przy wartości samopróbkowania (bootstrap) równej 1000. At: rzodkiewnik; Hv: jęczmień zwyczajny, Os: ryż; Zm: kukurydza. ADC: dekarboksylaza argininy; CuAO: oksydaza zawierająca miedź; PAO: oksydaza poliaminowa; SAMDC: dekarboksylaza S-adenozyl-L-metioniny; SPDS: syntaza spermidyny; SPMS: syntaza sperminy (Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1)



**Rycina 8. Drzewo filogenetyczne białek transporterów poliamin w jęczmieniu.** Relacje ewolucyjne zostały ustalone z wykorzystaniem programu MEGA-11 z użyciem metody NJ przy wartości samopróbkowania (bootstrap) równej 1000. Wszystkie 60 białek zgrupowano w 6 klastrow wyróżnionych innymi kolorami. At: rzodkiewnik; Bd: kłosownica dwukłosa; Cs: szafran uprawny; Cm: melon; Hv: jęczmień, Os: ryż; Pt: topola; Sl: pomidor; Vv: winorośl właściwa; Zm: kukurydza. BAT: eksportery poliamin; PUT: importery poliamin (**Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**)

### 3.2 Charakterystyka funkcjonalna zidentyfikowanych genów oraz ich przewidywanych produktów białkowych na podstawie analiz *in silico*

W celu szczegółowej charakterystyki funkcjonalnej zidentyfikowanych genów z bazy danych Ensembl Plants pobrałam pliki adnotacji GFF3/GTF, które zawierają informacje na temat lokalizacji *HvPMG* i *HvPAT* w genomie i ich budowy strukturalnej. Organizacja intron-ekson *HvPMG* wykazała, że geny *HvODC1-2*, *HvPAO5*, *HvSPDS1* i *HvSAMDC2* były pozbawione intronów, podczas gdy wszystkie inne geny zawierały różną liczbę intronów w zakresie od 1 do 11 (Fig. 1A **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**). Spośród *HvPAT* większość genów importerów PA miała jeden intron, z wyjątkiem *HvPUT3*, który składał się z trzech



intronów w 5'UTR, podczas gdy geny eksporterów PA składały się z od czterech do siedmiu intronów (Fig. 1C **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**).

W celu analizy elementów regulacyjnych działających w układzie *cis* (ang. *cis-acting regulatory elements*, CRE) z bazy danych genomu *H. vulgare* Ensembl Plant zostały pobrane sekwencje promotorów (ustalonych jako 1000 par zasad poprzedzających sekwencję kodującą gen dla *HvPMG* i 1500 dla *HvPAT*). Uzyskane sekwencje zostały następnie przesłane do bazy danych PlantCARE. W sumie *in silico* przewidziano 961 elementów CRE w sekwencjach promotorów *HvPMG* (Fig. 3A **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**) i 1159 CRE w sekwencjach promotorów *HvPAT* (Fig. 3, Tab. S4 **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**). Najmniej liczna grupa prawdopodobnych elementów była związana z reakcją na światło, kolejne pod tym względem były grupy elementów związanych z fitohormonami oraz z reakcją rośliny na stres. Najliczniejsza grupa przewidzianych CRE to elementy związane ze wzrostem i rozwojem rośliny. Grupa ta zawierała 21 typów CRE dla *HvPMG* i 19 dla *HvPAT*, wśród których najliczniejszymi elementami były CAAT-box i TATA-box (Fig. 3A **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**; Fig. 3, Tab. S4 **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**).

Na poziomie translacji geny metabolizmu i transportu PA mogą być regulowane poprzez mikroRNA (miRNA) na drodze kierowania docelowych transkryptów genów kodujących białka do cięcia lub supresji translacji. Dlatego w celu weryfikacji, czy w obrębie genów *HvPMG* i *HvPAT* mogą występować miejsca docelowe wiązania się miRNA, sekwencje kodujące genów zostały zanalizowane pod tym kątem na serwerze psRNATarget. Zidentyfikowałam dziewięć miRNA *H. vulgare* (hvu-miR), dla których przewidywane miejsca docelowe znajdowały się w obrębie genów *HvPMG* (Tab. 3 **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**). Analiza *in silico* wykazała, że prawie wszystkie zidentyfikowane miRNA, z wyjątkiem hvu-miR5049b, mogą wyciszyć ekspresję genów *HvPMG* poprzez cięcie transkryptów genów kodujących białko. Zidentyfikowałam również sześć miRNA, dla których przewidywane miejsca docelowe znajdowały się w obrębie genów transporterów PA, ekspresja wszystkich tych genów oprócz *HvPUT7* może zostać wyciszona poprzez cięcie mRNA (Fig. 5, Tab. S6 **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**).

W kolejnym kroku za pomocą narzędzia Genevestigator v3 analizowałam *in silico* poziomy ekspresji genów metabolizmu i transporterów PA jęczmienia:

- na ośmiu etapach rozwoju rośliny, od kiełkowania ziarniaka przez kwitnienie po dojrzałość nowych ziarniaków;
- w różnych organach roślinnych;
- w różnych warunkach stresu (a)biotycznego.

Wśród wszystkich 23 *HvPMG* znalazłam dane dotyczące ekspresji 19 genów. Okazało się, że wiele z tych genów podlega ekspresji jedynie na określonych etapach rozwoju jęczmienia, w wybranych organach lub jedynie w odpowiedzi na konkretny stres (a)biotyczny (Fig. 4 **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**). Większość genów *HvPMG* ulegała ekspresji na etapie kiełkowania, z wyjątkiem *HvODC1*, *HvCuAO6*, *HvPAO1 i 2* (Fig. 4B **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**). Geny *HvPAO3 i 6*, *HvODC1 i 2* ulegały ekspresji do stadium siewki, podczas gdy na późniejszych etapach nie zaobserwowałam ich ekspresji. Wiele genów, m.in. *HvCuAO7*, *HvSAMDC3*, *HvPAO4 i HvSPMS1*, ulegało ekspresji na wszystkich etapach rozwoju. Ponadto gen *HvSAMDC3* wykazywał wysoką ekspresję w prawie wszystkich badanych tkankach, podczas gdy geny *HvODC1 i 2* wykazywały bardzo niską ekspresję w większości analizowanych tkanek (Fig. 4A **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**). W odpowiedzi na stres wysokiej temperatury, suszy, symulowanej suszy oraz zasolenia *HvADC1* ulegał podwyższonej ekspresji, podczas gdy ekspresja *HvSAMDC2* była nieznacznie indukowana w odpowiedzi na stres symulowanej suszy i stres niskiej temperatury (Fig. 4C **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**).

W analizowanych genach transporterów PA ujawniłam, że *HvPUT1-4* wykazują stosunkowo stabilny i wysoki poziom ekspresji na kolejnych etapach wzrostu i rozwoju roślin (Fig. 9A **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**). *HvPUT5* ulegał ekspresji tylko na etapie siewki, podczas gdy *HvPUT6* ulegał ekspresji na etapach wydłużania łodygi, kwitnienia i dojrzewania. Ekspresja *HvPUT7* nie została wykryta w roślinach jęczmienia na żadnym etapie rozwoju. *HvBAT1, 2 i 6* ulegały stabilnej ekspresji podczas całego rozwoju rośliny, podczas gdy *HvBAT3 i 5* ulegały ekspresji głównie w fazie siewek i kwitnienia. Wszystkie geny transporterów PA wykazują bardzo niską lub niewykrywalną ekspresję na ostatnim etapie rozwoju jęczmienia, w fazie dojrzałości. Analiza ekspresji specyficznej dla organów dowiodła, że spośród genów importerów PA tylko *HvPUT3* wykazuje wysoki poziom ekspresji w prawie wszystkich badanych organach (Fig. 9B **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**). Pozostałe geny importerów PA wykazywały bardzo niską lub niewykrywalną ekspresję w badanych organach roślinnych. Wśród genów eksporterów PA *HvBAT1 i 2* wykazywały wysoką ekspresję w większości analizowanych organów. *HvBAT3, 5 i 6* ulegały ekspresji głównie w korzeniach i siewkach. Ekspresja *HvBAT4* nie została wykryta w żadnym z analizowanych organów. Dodatkowo ekspresja genów transporterów PA w jęczmieniu była analizowana w różnych warunkach stresu abiotycznego. Gen *HvPUT2* ulegał wyraźnej indukcji ekspresji w stresie zranienia i supresji w stresie niskiej temperatury, podczas gdy pozostałe geny importerów PA nie wykazywały znaczących zmian ekspresji w odpowiedzi na stesy abiotyczne

(Fig. 10 **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**). Co więcej, stres zranienia spowodował wyraźną indukcję ekspresji genów *HvBAT1* i *2*, a także niewielki wzrost ekspresji *HvBAT5* i *6*.

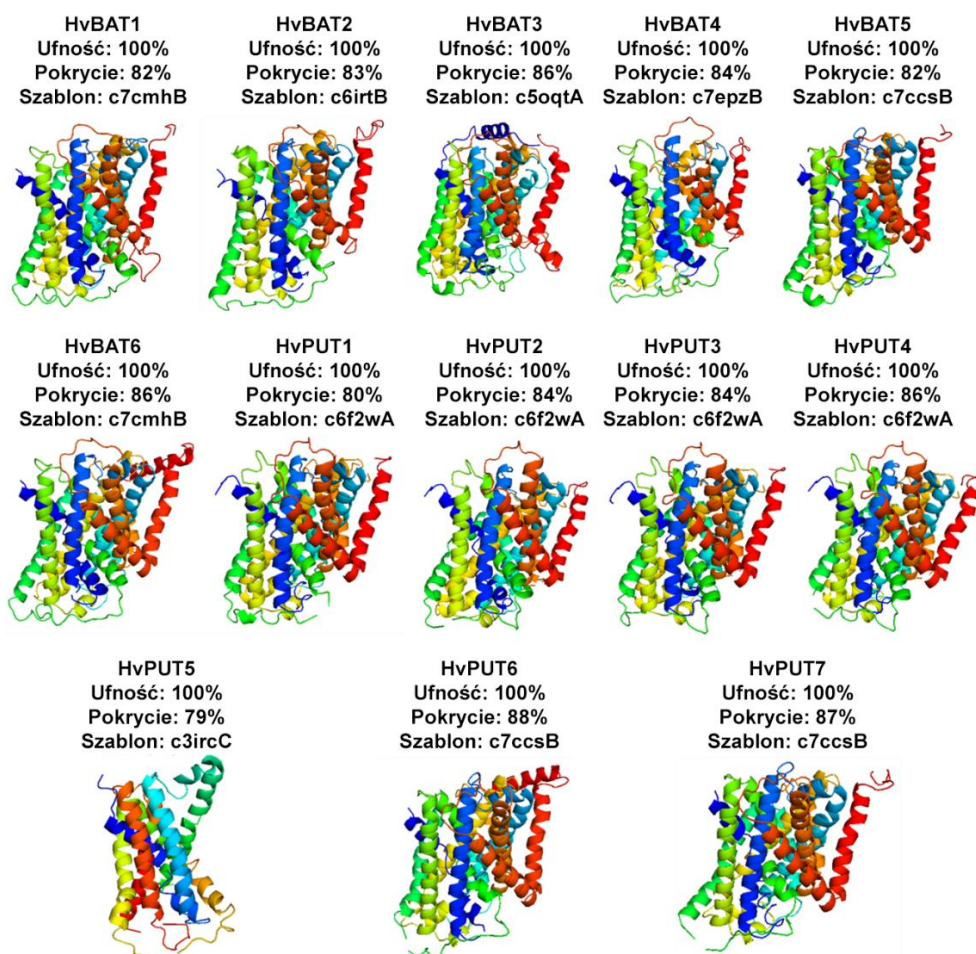
Modelowanie homologiczne wszystkich badanych transporterów pozwoliło z dużą dokładnością przewidzieć struktury trójwymiarowe interesujących mnie białek i potwierdzić ich funkcję (Ryc. 9). Struktury 3D białek HvPAT przewidziałam za pomocą serwera Phyre2, a następnie oceniłam za pomocą wykresu Ramachandrana, ANOLEA (ang. Atomic Non-Local Environment Assessment) i analiz ProSA, a testem ProCheck sprawdziłam struktury 3D białek HvPAT w serwerze SAVES. Miejsca aktywne białek transporterowych PA przewidziałam za pomocą serwera CASTp 3.0.

Następnie wykonałam kompleksową analizę *in silico* przewidywanych produktów białkowych zidentyfikowanych genów. Określałam: punkt izoelektryczny (pI), długość sekwencji aminokwasowej, masę cząsteczkową i współczynnik hydropatyczności (GRAVY). Lokalizacje subkomórkowe przewidziałam za pomocą narzędzia internetowego Plant-mPloc. Białka HvPMG miały stosunkowo niski punkt izoelektryczny (pI < 7) (Tab. 1 **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 – Publikacja 1**). Wszystkie białka miały ujemne wartości GRAVY, co oznacza, że są to białka hydrofilowe, z wyjątkiem HvODC1, dla którego wartość GRAVY była równa 0,013, co świadczy o hydrofobowości białka i jego błonowym charakterze. Przewidywanie lokalizacji subkomórkowej wykazało, że 18 z 23 białek HvPMG było zlokalizowanych w chloroplastach, a pozostałe w cytoplazmie, peroksysomach i ścianie komórkowej. Lokalizacja niektórych białek została przewidziana w kilku organelach: HvSAMDC1 (chloroplast, jądro), HvSAMDC2 (błona komórkowa, chloroplast, jądro), HvCuAO7 (ściana komórkowa, peroksysom) i HvADC1 (chloroplast, cytoplazma, mitochondrium). Większość białek HvPMG nie zawierała żadnych domen transbłonowych, z wyjątkiem HvPAO3, HvPAO6 i HvCuAO2, które miały jedną helisę transbłonową. Średnia teoretyczna wartość pI i dodatnie wartości GRAVY sekwencji białek HvPAT sugerują, że większość genów transporterów PA koduje alkaliczne, hydrofobowe i błonowe białka, co jest dodatkowo poparte przewidywaniami lokalizacji subkomórkowej, ponieważ umieszczenie wszystkich transporterów PA przewiduje się w błonie komórkowej (Tab. 2 **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**). Wszystkie białka HvPAT zawierały po 12 domen transbłonowych, z wyjątkiem HvPUT5, który zawierał ich 7 (Tab. S1 **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**).

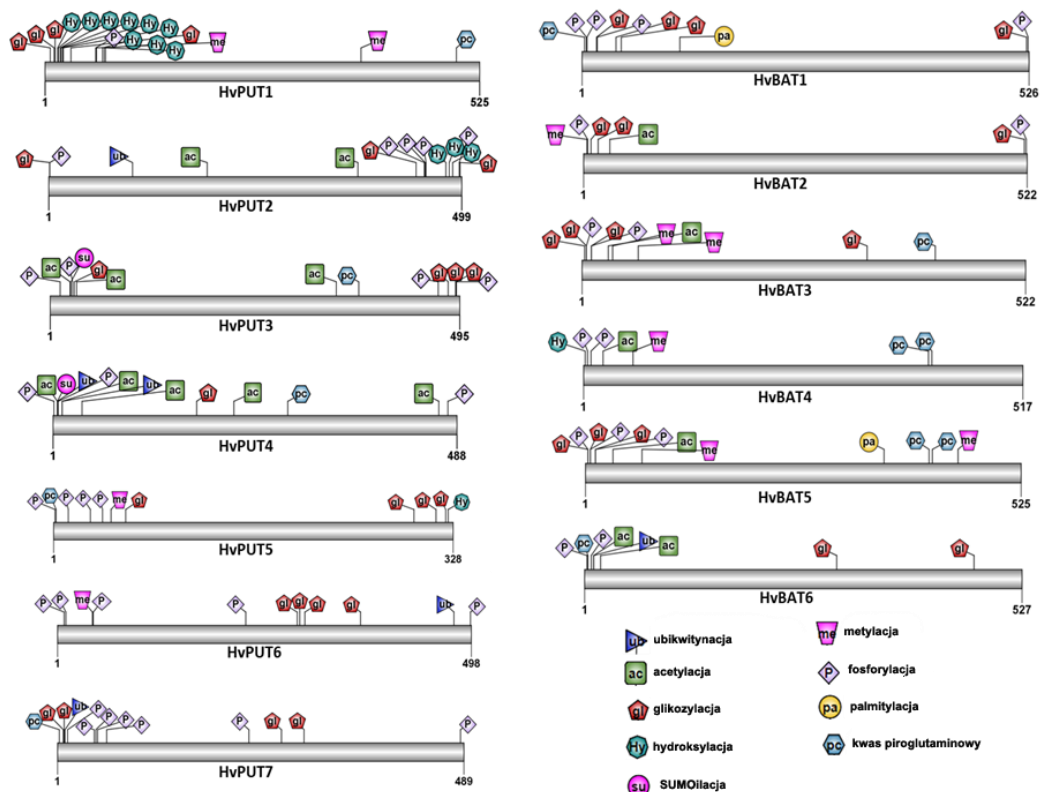
Potencjalną funkcję biologiczną niescharakteryzowanego białka można przybliżyć poprzez zbadanie oddziaływania danego białka z innymi, opisanymi już białkami. Za pomocą narzędzia STRING przeprowadziłam również analizę *in silico* interakcji białko–białko (ograniczyłam liczbę interakcji każdego białka do 20). Analiza interakcji białko–białko wykazała, że 18 z 23 białek HvPMG może wchodzić w interakcję z innymi białkami (Fig. 3B **Tanwar, Stolarska i wsp., 2022 –**

**Publikacja 1**), a ze wszystkich 13 analizowanych białek HvPAT tylko 5 białek importerów PA (HvPUT1, 2, 3, 4 i 7) może wykazywać interakcje białko–białko (Fig. 6 **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**).

Następnie przeprowadziłam analizę *in silico* przewidującą miejsca modyfikacji potranslacyjnej, które wpływają na właściwości chemiczne i fizyczne, stabilność i aktywność białek. Analizę *in silico* przewidującą miejsca modyfikacji potranslacyjnej w HvPAT jęczmienia wykonałam przy użyciu serwera internetowego MusiteDeep z domyślnymi parametrami. W białkach HvPAT przewidziałam dziewięć możliwych miejsc modyfikacji potranslacyjnej (acetylacja, glikozylacja, hydroksylacja, SUMOilacja, metylacja, fosforylacja, palmitylacja, ubikwitynacja i przyłączenie kwasu piroglutaminowego) (Ryc. 10). Większość przewidzianych miejsc modyfikacji potranslacyjnej była losowo rozmieszczona w pobliżu N-końca wszystkich białek z wyjątkiem HvPUT2, który miał miejsca modyfikacji potranslacyjnej głównie blisko C-końca. Co ciekawe, niektóre miejsca modyfikacji potranslacyjnej przewidziałam na określonych transporterach, np. miejsca SUMOilacji przewidywałam tylko w HvPUT3 i 4, miejsca palmitylacji obserwowałam w HvBAT1 i 5.

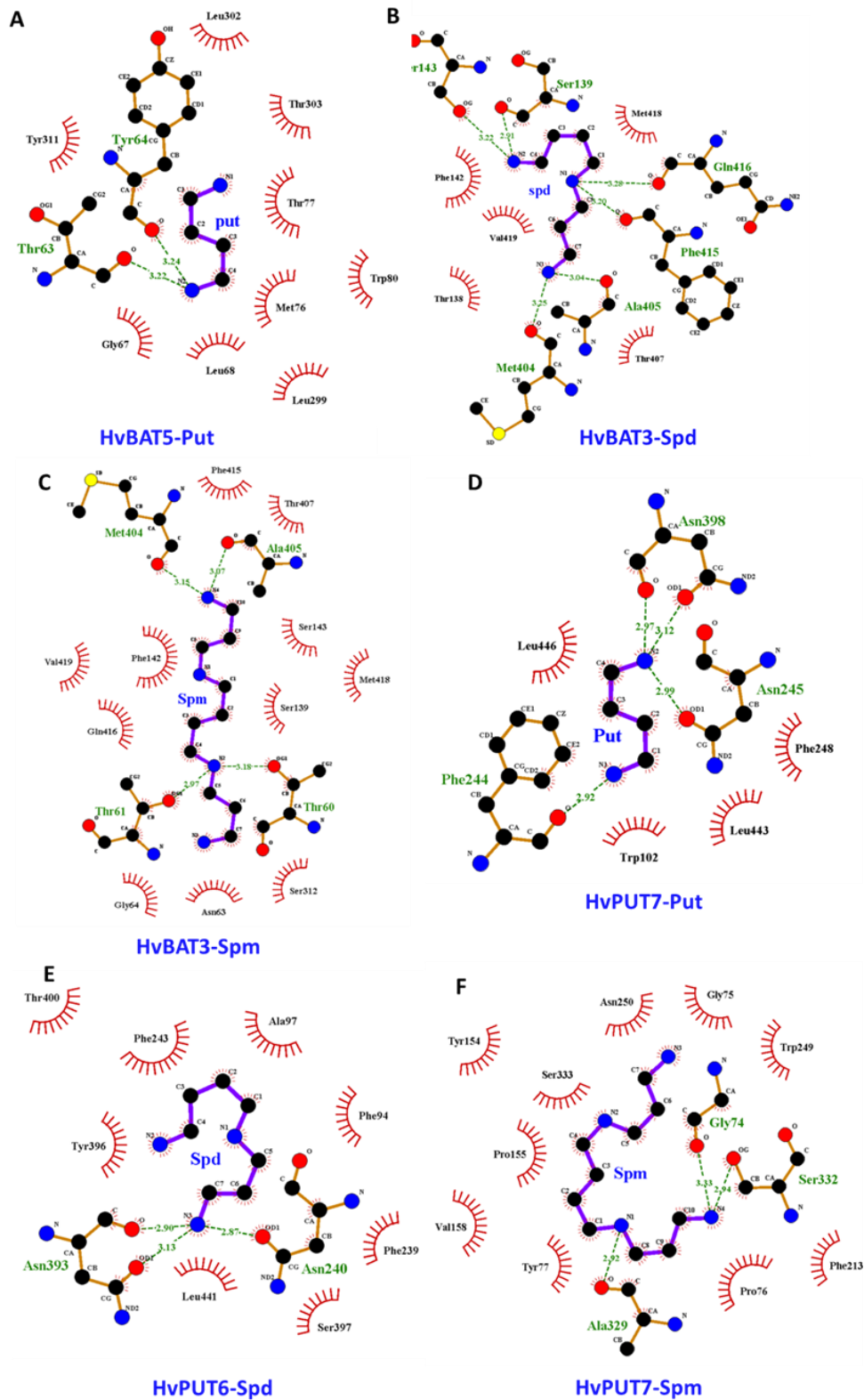


**Rycina 9. Przewidywane trójwymiarowe struktury białek transporterowych poliamin jęczmienia.** Przy każdej strukturze białka zapisano procentowy wynik ufności przewidywania i stopień pokrycia z najlepszym dostępnym szablonem używanym do budowania modeli 3D (**Stolarska i wsp., 2023a, zmienione – Publikacja 2**)



**Rycina 10. Przewidywane miejsca modyfikacji potranslacyjnych w sekwencjach białek transportujących PA jęczmienia.** Szare prostokąty przedstawiają pierwszorzędowe struktury białek HvBAT i HvPUT, podana jest liczba aminokwasów budujących białko. W strukturze białka zaznaczono dziewięć typów przewidywanych modyfikacji potranslacyjnych: 1) ubikwitynację, 2) acetylację, 3) glikozylację, 4) hydroksylację, 5) SUMOilację, 6) metylację, 7) fosforylację, 8) palmitylację i 9) kwas piroglutaminowy (Stolarska i wsp., 2023a, zmienione – Publikacja 2)

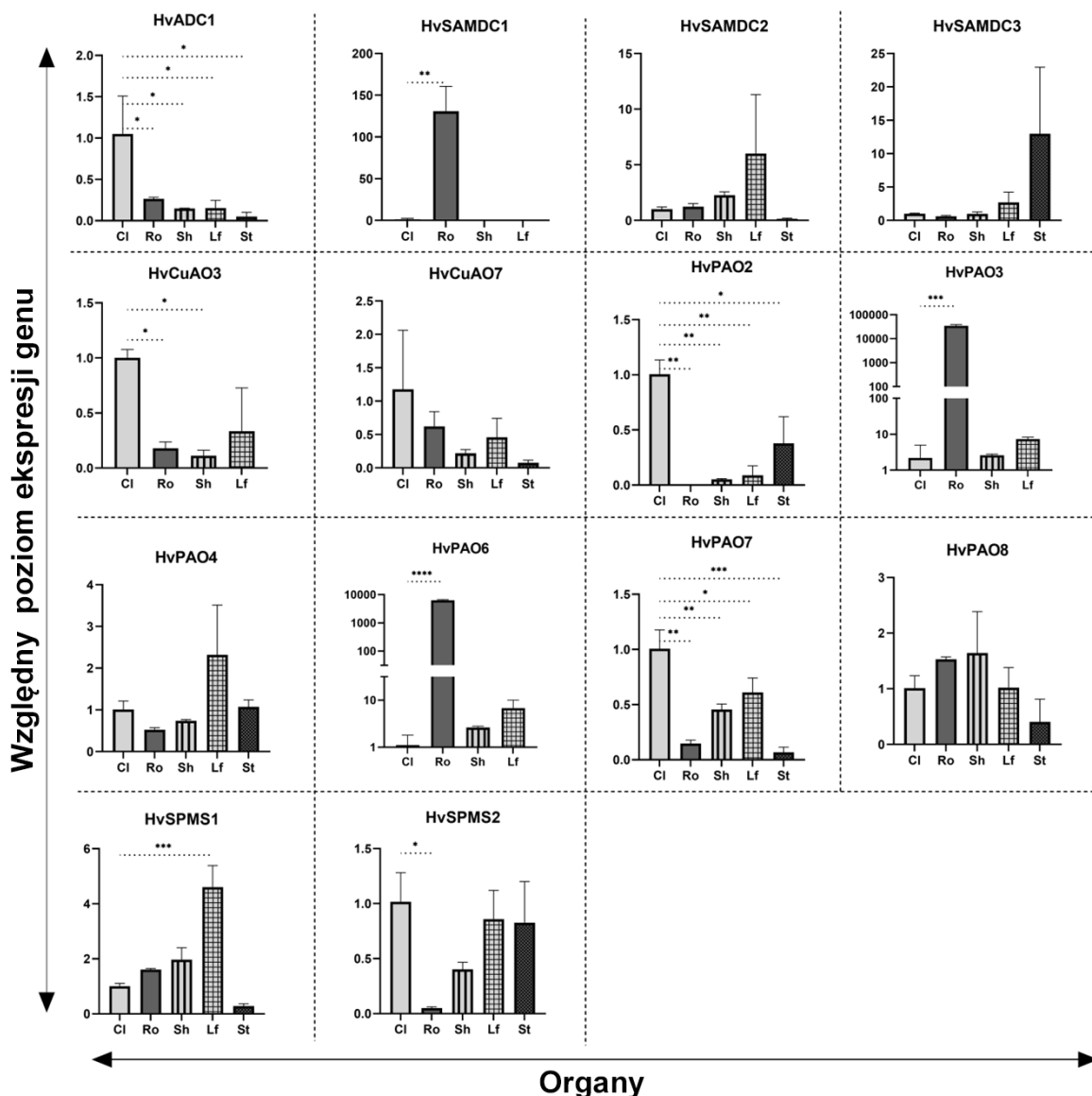
W celu potwierdzenia możliwości wiązania interesujących mnie białek z ligandami PA użyłam metody dokowania molekularnego. Metoda ta polega na wyszukiwaniu najkorzystniejszego, a więc odznaczającego się najniższą energią miejsca wiązania się ligandu z receptorem. Struktury 3D ligandów: putrescyny, spermidyny i sperminy zostały pobrane z bazy danych PubChem. Do przygotowania modeli białek receptorowych i ligandów oraz symulacji dokowania wykorzystałam odpowiednio oprogramowanie Autodock 4.2 i Autodock Vina. Następnie prawdopodobne interakcje HvBAT-PA i HvPUT-PA analizowałam za pomocą PyMOL. Przy użyciu tej metody przewidziałam miejsca wiązania PA w transporterach PA, które charakteryzują się najniższą energią wiązania i stałą inhibicji, tym samym potwierdziłam możliwość wiązania białek transporterów PA z cząsteczkami PA (Ryc. 11). W stabilizowaniu ligandów o energetycznie korzystnych właściwościach w otoczeniu struktur białkowych o otwartej konformacji kluczową rolę odgrywają słabe oddziaływania międzycząsteczkowe, takie jak wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe (Patil i wsp., 2010). W kompleksie transporter poliamin-PA przewidziana liczba wiązań wodorowych była mniejsza niż liczba oddziaływań hydrofobowych we wszystkich kompleksach białko-ligand. Przewidywane wyniki sugerowały, że najkorzystniejsze energetycznie interakcje ligand-białko obejmowały HvPUT7-Put/Spm, HvBAT3-Spm/Spd, HvBAT5-Put i HvPUT6-Spd.



Rycina 11. Przewidywane interakcje poliamin w miejscach aktywnych przewidywanych struktur 3D białek transporterowych poliamin w jęczmieniu. Diagramy przedstawiają miejsca wiązania białek eksporterów i importerów PA z cząsteczkami PA, które charakteryzują się najniższą energią wiązania i stałą oddziaływania (inhibicji). (A) HvBAT5-putrescyna, (B) HvBAT3-spermidyna, (C) HvBAT3-spermina, (D) HvPUT7-putrescyna, (E) HvPUT6-spermidyna i (F) HvPUT7-spermina. W przypadku PA atomy węgla oznaczono kolorem czarnym, tlen czerwonym, siarkę żółtym, azot niebieskim. Wiązania wodorowe utworzone pomiędzy PA i aminokwasami pokazano zielonymi przerywanymi liniami. Aminokwasy oddziałujące hydrofobowo z PA są przedstawione jako czerwone łuki z promienistymi liniami (Stolarska i wsp., 2023a, zmienione – Publikacja 2). Pozostałe interakcje HvPUT/HvBAT-PA można znaleźć w rycinach uzupełniających S7–S9 artykułu Stolarska i wsp. (2023a – Publikacja 2)

### 3.3 Ocena ekspresji badanych genów w przemianach metabolicznych towarzyszących starzeniu się liści jęczmienia

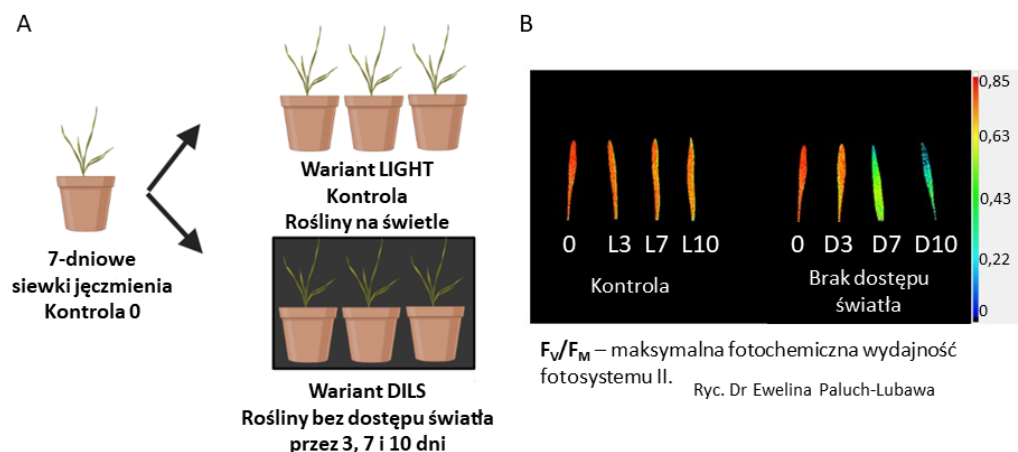
Wyniki otrzymane z analiz *in silico* dotyczące ekspresji genów *HvPMG* w różnych tkankach jęczmienia potwierdziłam laboratoryjnie poprzez określenie poziomu ekspresji genów *HvPMG* w organach takich jak: koleoptyle z 5-dniowych siewek; korzenie i pędy z 7-dniowych siewek; liście i łodygi z 10-dniowych siewek. W tym celu wyizolowałam RNA z poszczególnych organów jęczmienia i za pomocą reakcji RT-qPCR określiłam ekspresję *HvPMG*. Aby wyznaczyć względny poziom ekspresji badanych genów, zastosowałam metodę Pfaffla (Pfaffl, 2001). Normalizowałam dane względem genu aktyny (AY145451). Względną ekspresję danego genu w koleoptylu przyjmuję jako 1,0. Wiele badanych genów charakteryzowało się ekspresją ograniczoną do określonych organów (Ryc. 12). Do dalszych analiz wybranych zostało 12 genów metabolizmu PA ekspresjonowanych w liściu: ***HvADC1***, ***HvSAMDC2***, ***HvSAMDC3***, ***HvCuAO3***, ***HvCuAO7***, ***HvPAO2***, ***HvPAO4***, ***HvPAO7***, ***HvPAO8***, ***HvSPMS1***, ***HvSPMS2*** oraz ***HvSPDS1***. Choć ekspresja genu *HvSPDS1* w liściach była obserwowana w trakcie analiz RT-qPCR, to nie została przedstawiona na Ryc. 12, ponieważ gen ten nie był ekspresjonowany w koleoptylu, do którego była odnoszona ekspresja genu z pozostałych organów.



**Rycina 12. Poziom ekspresji genów szlaku metabolizmu poliamin w poszczególnych organach jęczmienia.** Względną ekspresję w koleoptylu przyjęto jako 1,0. Jako gen referencyjny zastosowano gen aktywny *H. vulgare* (AY145451). Dane reprezentują wartości średnie i odchylenie standardowe co najmniej dwóch powtórzeń biologicznych i trzech powtórzeń technicznych. Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem porównań wielokrotnych Dunnetta. Przyjęto następujące poziomy istotności statystycznej:  $P < 0,0001$  – \*\*\*\*;  $0,0001 < P < 0,001$  – \*\*\*;  $0,001 < P < 0,01$  – \*\*;  $0,01 < P < 0,05$  – \*. Cl: koleoptyl; Hv: jęczmień zwyczajny; Ro: korzeń; Sh: pęd; Lf: liść; St: łodyga (Tanwar, Stolarska i wsp., 2022, zmienione – Publikacja 1)

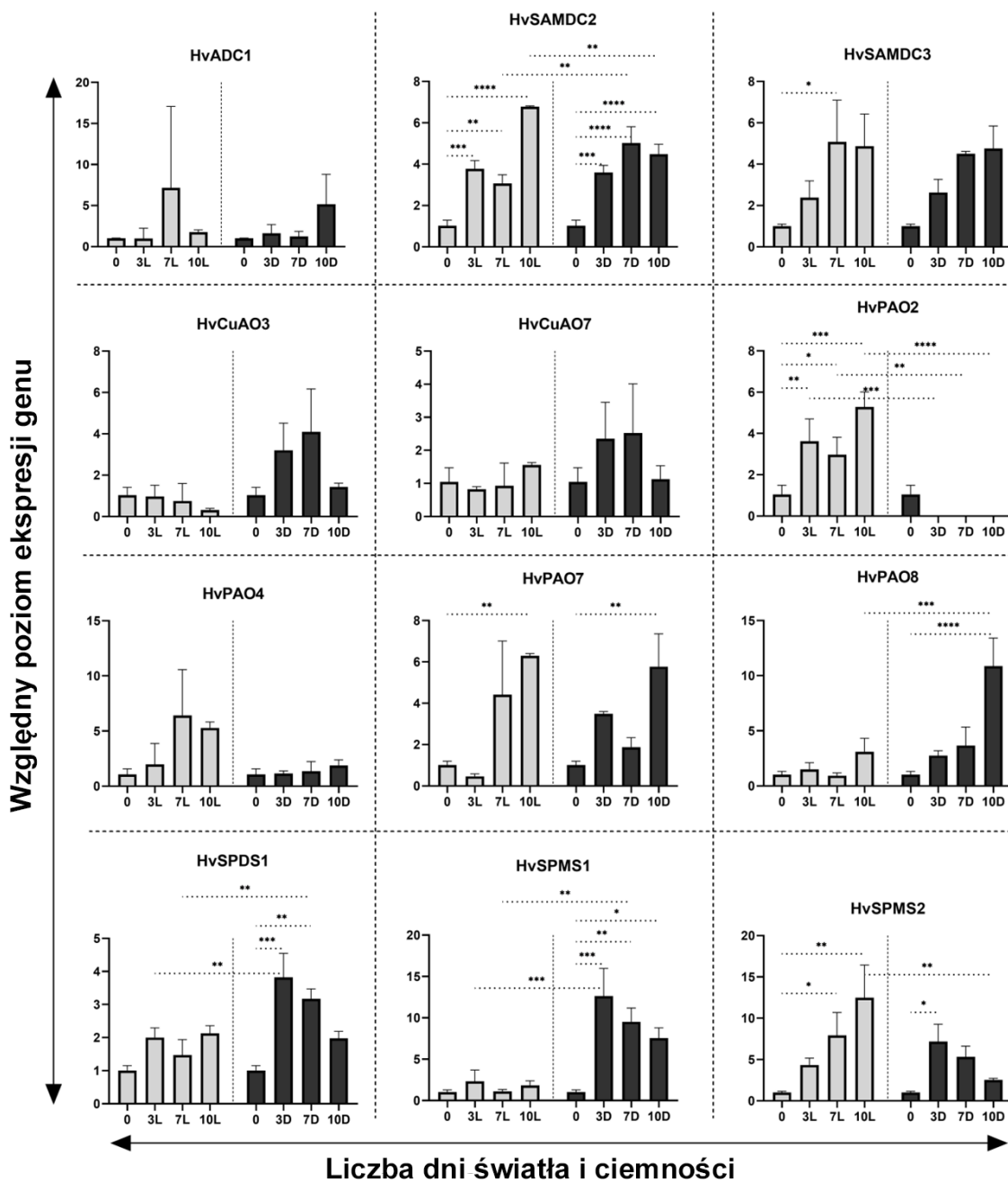
Model DILS został wykorzystany jako układ doświadczalny (Ryc. 13) do oceny ekspresji 13 wyselekcjonowanych genów *HvPMG* (Ryc. 20). Do eksperymentu wykorzystywałam 7-dniowe siewki jęczmienia stanowiące kontrolę określoną jako 0. Następnie część roślin została umieszczona w ciemności (wariant DILS – próby badane), a druga część pozostawała w świetle w fotoperiodzie 16/8 (dzień/noc) (wariant LIGHT – kontrola na świetle). Do analiz zbierano liście z dnia 0, 3, 7 i 10, gdzie punkty czasowe DILS określone są jako D3, D7 i D10 (D – ang. *dark*), a punkty czasowe kontroli na świetle jako L3, L7 i L10 (L – ang. *light*) (Ryc. 13).





**Rycina 13. Układ badawczy – model DILS.** (A) Starzenie 7-dniowych siewek jęczmienia (kontrola 0) było indukowane ciemnością trwającą od 3 do 10 dni (wariant DILS). Do analiz zbierano liście z dnia 0, 3, 7 i 10. Rośliny kontrolne (wariant LIGHT) hodowano na świetle w fotoperiodzie 16/8 (dzień/noc). (B) Starzenie liści obserwowano, monitorując m.in. parametr maksymalnej wydajności fotochemicznej fotosystemu drugiego ( $F_v/F_m$ ). D3 do D10 oznaczają dni starzenia. L3 do L10 oznaczają odpowiednie kontrole

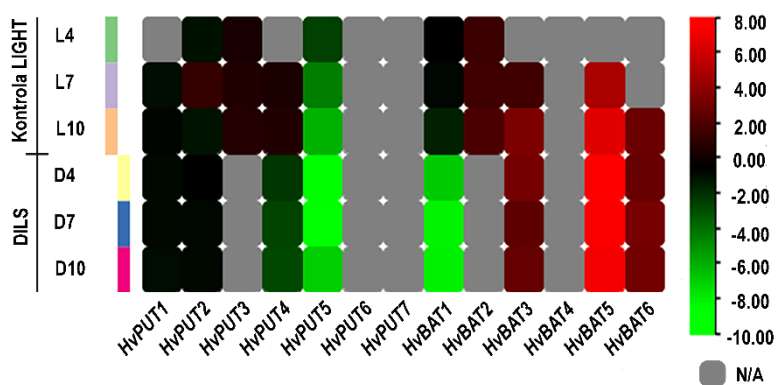
Oceny ekspresji genów *HvPMG* dokonałam metodą RT-qPCR. Do wyznaczenia względnego poziomu ekspresji badanych genów zastosowałam metodę Pfaffla (Pfaffl, 2001). Normalizowałam dane względem genu białka z rodziny kinaz pirogronianowych (AY145451) (Zmienko i wsp., 2015). Względą ekspresję danego genu w dniu 0 przyjąłam jako 1,0. Porównywałam ekspresje genów z liści kontrolnych 7-dniowych siewek jęczmienia określonych jako 0 i liści kontrolnych z roślin rosnących na świetle przez 3, 7 i 10 dni z liśćmi poddanymi DILS w każdym punkcie czasowym (Ryc. 14). Ekspresja genów *HvCuAO3*, *HvSPDS1* i *HvSPMS1* była znacząco indukowana w dniu 3 i 7 DILS, a genu *HvPAO8* w dniu 10 (Ryc. 14). Ponadto obserwowałam indukcję ekspresji *HvSAMDC2* w odpowiedzi na 7-dniowe traktowanie ciemnością, która uległa obniżeniu w dniu 10.



Rycina 14. Poziom ekspresji genów szlaku metabolizmu poliamin w pierwszym liściu jęczmienia podczas indukowanego ciemnością starzenia liści (DILS). Względny poziom ekspresji w dniu 0 przyjęto jako 1,0. Jako gen referencyjny zastosowano gen białka z rodziny kinaz pirogronianowych *H. vulgare* (AK356185), który został wybrany przez zespół na podstawie wcześniejszych wyników badań dotyczących identyfikacji genów o stosunkowo stabilnym poziomie ekspresji dla normalizacji eksperymentów qPCR w modelu DILS w jęczmieniu (Zmienko i wsp., 2015). Doświadczenie obejmowało trzy powtórzenia biologiczne i trzy powtórzenia techniczne. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej metodą analizy wariancji (ANOVA) oraz porównano wielokrotnym testem Bonferroniego. Istotność statystyczną między punktami danych oceniano w odniesieniu do punktów czasowych dnia 0 (kontrola) w porównaniu z innymi punktami czasowymi profilu ekspresji (dni 3, 7 i 10) oraz każdym punktem czasowym w świetle i ciemności i przyjęto następujące poziomy istotności statystycznej:  $P < 0,0001$  – \*\*\*\*;  $0,0001 < P < 0,001$  – \*\*\*;  $0,001 < P < 0,01$  – \*\*;  $0,01 < P < 0,05$  – \*. D: ciemność, liście poddane indukowanemu ciemnością starzeniu; L: światło, liście roślin hodowanych w fotoperiodzie (Tanwar, Stolarska i wsp., 2022, zmienione – Publikacja 2)

Ekspresję genów transporterów PA w liściach poddanych DILS zbadałam z wykorzystaniem metody analizy transkryptomu (podejście RNA-seq). W analizach wykorzystałam liście poddawane DILS oraz liście kontrolne, które zostały zebrane w odpowiednich punktach czasowych, a następnie wyizolowałam z nich RNA. RNA poddano sekwencjonowaniu wysokoprzepustowemu, które zostało zlecone firmie zewnętrznej BGI Genomics – Global w Warszawie. Otrzymane surowe dane zostały poddane szczegółowym analizom bioinformatycznym.

Na podstawie wyników analiz transkryptomicznych stwierdziłam, że poziom ekspresji *HvPUT4* był nieznacznie obniżony w DILS, a *HvPUT5* silnie (Ryc. 15). Poziom ekspresji *HvPUT1* i *HvPUT2* nie uległ zmianie podczas DILS, natomiast poziom ekspresji *HvBAT3*, *HvBAT5* i *HvBAT6* został podwyższony.



**Rycina 15. Profil ekspresji genów transporterów PA w pierwszym liściu jęczmienia podczas indukowanego ciemnością starzenia liści (DILS).** Mapa ciepła pokazująca różnice w ekspresji *HvPUT* i *HvBAT* w pierwszym liściu jęczmienia w 4, 7 i 10 dniu starzenia indukowanego ciemnością oraz w liściu roślin kontrolnych pozostawionych na świetle (LIGHT) w porównaniu z liśćmi kontrolnymi (liście w dniu 0) (Stolarska i wsp., 2023a, zmienione – Publikacja 2)

W pracy **Stolarska i wsp. (2023a – Publikacja 2)** ekspresję genów transporterów w DILS porównałam również z ekspresją tych genów w rozwojowo starzejących się liściach jęczmienia. W modelu starzenia rozwojowego badałam liście flagowe roślin zebrane w 30 dniu po kwitnieniu (starzenie) oraz 5 dni przed kwitnieniem (kontrola) (za Christiansen i Gregersen, 2014; Sobieszczuk-Nowicka i wsp., 2018) (Fig. 11 **Stolarska i wsp., 2023a – Publikacja 2**).

### 3.4 Omówienie wyników

Zidentyfikowałam *in silico* 36 genów, w tym 23 geny zaangażowane w metabolizm PA i 13 genów związanych z transportem PA. Dodatkowo obecność zidentyfikowanych genów *HvPMG* w genomie jęczmienia została potwierdzona laboratoryjnie. Badanie wykazało, że ekspresja genu *ODC* jest organospecyficzna. *HvODC1* i *2* ulegają ekspresji wyłącznie w korzeniach jęczmienia, podczas gdy szlak syntezy Put katalizowany z udziałem ADC jest aktywny zarówno w korzeniach, jak i innych organach (**Tanwar, Stolarska i wsp., – Publikacja 1**). Analiza

filogenetyczna sekwencji aminokwasowych białek metabolizmu i transportu PA wykazała ścisłe powiązanie ze swoimi homologami innych gatunków roślin.

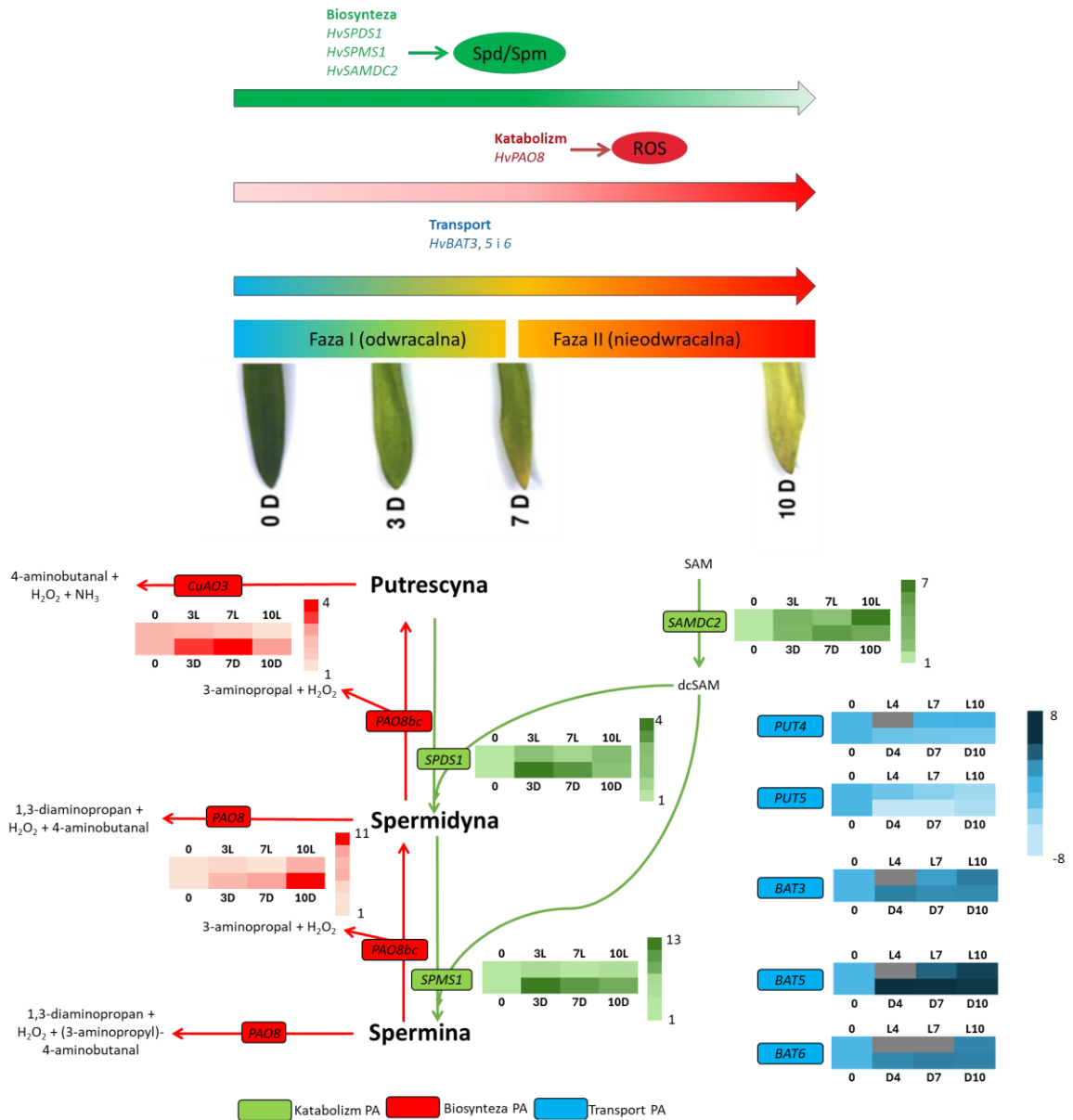
Identyfikacja wszystkich genów zaangażowanych w metabolizm PA w jęczmieniu pozwoliła na wskazanie tych, które ulegają ekspresji w liściu, a następnie na określenie starzeniowo-zależnych poziomów ich transkryptów. Geny *HvSPDS1*, *HvSPMS1* i *HvSAMDC2* w liściach jęczmienia wykazały statystycznie istotne podwyższenie ekspresji w trakcie indukowanego starzenia w porównaniu z liśćmi kontrolnymi (Ryc.16). Dane te sugerują, że geny *HvSPDS1*, *HvSPMS1* i *HvSAMDC2* zaangażowane w biosyntezę PA mogą być istotne w regulacji procesu starzenia liścia jęczmienia. Wcześniejsze badania Sobieszczuk-Nowicka i wsp. (2016) wykazały, że w trakcie DILS obserwowany jest zależny od starzenia wzrost miana wolnych PA na początku procesu, a następnie ich spadek. Badania wykazały, że PA są syntetyzowane w cytoplazmie i transportowane do apoplastu i tam utlenianie do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz diaminopropanu – metabolitów usprawniających procesy degradacyjne. Blokowanie rozkładu PA zasadniczo opóźnia starzenie liści (Sobieszczuk-Nowicka i wsp., 2016).

Sprawność regulacji indukowanego procesu starzenia jest oznaką żywotności starzejących się komórek, które na każdym etapie muszą zachować zdolność do utrzymania homeostazy, która przejawia się m.in. w kontrolowaniu homeostazy cyklu PA (za **Stolarska i wsp., 2023b – Publikacja 3**). Ponieważ homeostaza PA w komórce jest utrzymywana przez mechanizmy sprzężenia zwrotnego z poziomu biosyntezy, katabolizmu, importu i eksportu, w badaniach włączona została analiza transporterów PA.

Zmiany poziomów ekspresji genów importerów PA sugerują, że import PA jest nieistotny dla procesu starzenia. Dane te wskazują, że w starzejących się komórkach import PA jest nieaktywny, a wysoki poziom PA w pierwszej fazie starzenia jest zależny od syntezy PA *de novo*. Podwyższona ekspresja genów eksporterów PA w obu typach starzenia sugeruje udział ich eksportu w tym procesie (Ryc. 16). Poliaminy są również ważne dla żywienia mineralnego roślin. Cykl poliaminowy może być istotny w biochemii remobilizacji azotu i węgla leżącej u podstawy biologii starzenia liścia. Kierunek metabolizmu i transport PA kontroluje tempo i efektywność tej remobilizacji. Modelowanie homologiczne badanych transporterów pozwoliło z dużą dokładnością przewidzieć struktury trójwymiarowe ich białek, a analizy dokowania molekularnego potwierdziły możliwość interakcji pomiędzy białkami transportującymi a PA. Należy jednak przeprowadzić dalszą analizę eksperymentalną, aby zweryfikować te przewidywania i wykazać istotny udział eksportu PA w starzeniowo-zależnej remobilizacji azotu i węgla.

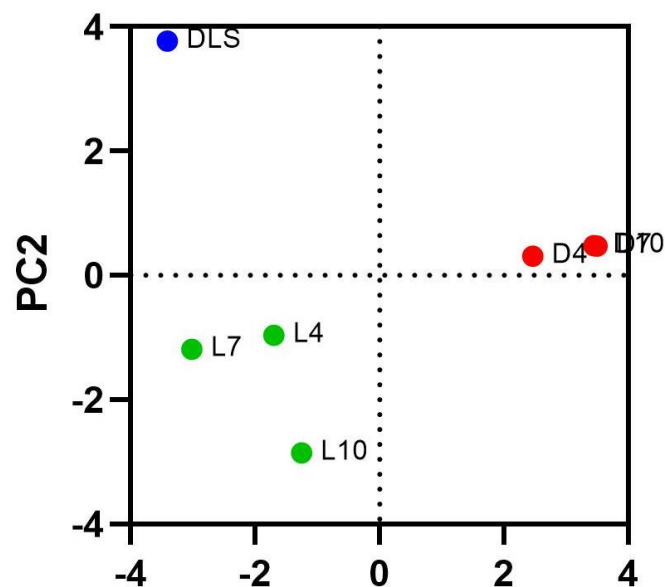
W roślinach indukowane starzenie jest procesem wysoce kontrolowanym i aktywnym. Roślina dąży do optymalizacji alokacji zasobów w celu przystosowania się do zmieniających się warunków środowiska (Paluch-Lubawa, Stolarska i Sobieszczuk-Nowicka, 2021).

Przeprowadzone badania wypełniają lukę w wiedzy na temat sposobu działania PA w indukowanym starzeniu, związanym z nieodkrytym dotychczas metabolicznym przejściem komórki w fazę śmierci.



Rycina 16. Graficzne podsumowanie profilu ekspresji jęczmiennych genów metabolizmu oraz transportu PA wskazanych jako geny kandydujące do badań funkcjonalnych nad udziałem PA w mechanizmach regulujących proces starzenia indukowanego ciemnością. D3 do D10 oznaczają dni starzenia. Strzałki skierowane w górę oznaczają wzrost ekspresji genów, linia pozioma oznacza brak zmiany w poziomie ekspresji genów, strzałki skierowane w dół oznaczają obniżenie ekspresji genów

W pracy **Stolarska i wsp. (2023a – Publikacja 2)** oraz Paluch-Lubawa, Tanwar, Stolarska i wsp. (w recenzji) porównałam m.in. profile ekspresji genów metabolizmu i transportu PA w DILS i starzeniu rozwojowym oraz przeprowadziliśmy analizę statystyczną PCA, tzw. analizę głównych składowych (ang. *principal component analysis*). Analiza PCA wykazała, że ekspresja interesujących mnie genów w starzeniu rozwojowym jest zbliżona do ekspresji tych genów w kontroli, natomiast ekspresja genów w DILS charakteryzuje się odmiennym profilem względem tych dwóch grup (Ryc. 17). Wyniki te sugerują, że indukowane ciemnością starzenie liści w kontekście metabolizmu PA jest procesem odmiennym od starzenia rozwojowego, a cykl PA może pełnić funkcję przełącznika molekularnego pomiędzy zdolnością komórek do przeżycia a ich śmiercią, funkcjonującego w myśl prostej zasady „żyj albo umieraj”. Wzrost ekspresji genu *HvPAO8* w dniu 10, który w badaniu filogenetycznym został wskazany jako gen kodujący oksydazę poliaminową, która może mieć również aktywność konwertazy, może być istotnym ogniwem cyklu PA kierującym starzejącą się komórkę na drogę programowanej śmierci.



Rycina 17. Analiza głównych składowych na podstawie profili ekspresji genów metabolizmu PA (*HvPMG*) i genów transporterów PA (*HvPAT*) podczas indukowanego ciemnością starzenia liści (D), starzenia rozwojowego (DLS) i warunków kontrolnych (L). Ekspresję analizowano w różnych dniach DILS (D4, D7, D10), starzeniu rozwojowym (DLS) i w kontroli (L4, L7, L10). Danymi wejściowymi wykorzystanymi w analizie były wartości  $\log_2FC$  z analizy RNA-seq

## 4. PODSUMOWANIE

Prowadzone przeze mnie badania pozwoliły na zidentyfikowanie, wyizolowanie i kompleksowe scharakteryzowanie genów warunkujących komórkową homeostazę PA w jęczmieniu oraz ocenę ich ekspresji organospecyficznego i starzeniowo-zależnej w metabolizmie liścia. Otrzymane wyniki stanowią punkt odniesienia badań funkcjonalnych wielu zespołów naukowców wyjaśniających mechanizmy molekularnej kontroli i regulacji przez PA procesów rozwojowych zbóż i ich reakcji na (a)biotyczne czynniki środowiska. Wyniki te są szczególnie ważne dla badań funkcjonalnych nad mechanizmem działania PA w indukowanym starzeniu liści. Poznanie regulacji procesu indukowanego i rozwojowego starzenia przy udziale PA daje możliwość wykorzystania PA w planowaniu strategii upraw zbóż. Potencjał aplikacyjny tych badań potwierdziłam już, testując nanocząsteczki chitozanu funkcjonalizowane PA i wykazując ich antystarzeniowy charakter. Stanowi to dowód słuszności koncepcji, że egzogenicznie ukierunkowana aplikacja PA może prowadzić do zwiększenia tolerancji roślin na działanie szerokiego spektrum czynników stresowych. A to z kolei może skutkować podwyższoną produktywnością roślin.

Ponadto poznanie mechanizmów komórkowej regulacji procesu starzenia przy udziale PA powinno prowadzić do lepszego zrozumienia mechanizmów procesu starzenia się i śmierci komórek, a także być źródłem nowej wiedzy na temat starzenia się i aktywnego zamierania w komórkach ssaków. Regulacja starzenia i śmierci komórek u roślin i zwierząt (w tym ludzi) o zupełnie odmiennej anatomii i fizjologii podkreśla, że PA są uniwersalnym bioregulatorem tych procesów w różnych królestwach (Cai i wsp., 2015). W układach zwierzęcych, np. liniach nowotworowych, podejmuje się próby blokowania żywotności komórek poprzez dodanie do układu inhibitorów PA. Może to wprowadzić komórki nowotworowe na ścieżkę autofagii (Madeo, Tavernarakis i Kroemer, 2010; Alexander i wsp., 2020; Liu i wsp., 2024). Wyniki badań mogą również przyczynić się do opracowania nowych sposobów interwencji na rzecz ludzkiego zdrowia.

Najważniejsze osiągnięcia zawarte w Publikacji 1 (**Tanwar, Stolarska i wsp., 2022**):

- Po raz pierwszy, na podstawie analizy całego genomu zidentyfikowano, wyizolowano i kompleksowo scharakteryzowano jęczmienne geny cyklu poliaminowego.
- Wykazano, że ekspresja genu dekarboksylazy ornityny może być organospecyficzną. Geny *HvODC1* i *2* ulegają ekspresji wyłącznie w korzeniu jęczmienia.
- Po raz pierwszy oceniono profil ekspresji genów cyklu poliaminowego w starzeniowo-zależnym metabolizmie liścia.

- Zidentyfikowano geny biosyntezy (*HvSPDS1*, *HvSPMS1* i *HvSAMDC2*) oraz katabolizmu (*HvPAO8*) PA, które charakteryzują się wysoką aktywnością w procesie starzenia i śmierci komórek.
- Identyfikacja ww. genów pozwoliła na wskazanie potencjalnych kierunków manipulacji genetycznej w celu poprawy tolerancji upraw jęczmienia na indukowane starzenie.
- Badania te otwierają nowe kierunki badań, np. nad funkcjonalnością metabolizmu PA i jego interakcji z innymi szlakami metabolicznymi organizującymi proces starzenia, jego dynamiki i złożoności.

Najważniejsze osiągnięcia zawarte w Publikacji 2 (**Stolarska i wsp., 2023a**):

- Badania przedstawiają kompleksową analizę *in silico* transporterów PA w jęczmieniu. Transportery PA w roślinach były do tej pory scharakteryzowane marginalnie – w szczególności eksportery poliamin.
- Geny jęczmiennych transporterów PA zostały zidentyfikowane, oceniono także ich ekspresję w starzeniu liścia.
- Wyniki dotyczące modelowania homologicznego i dokowania molekularnego będą stanowić podstawę przyszłych badań eksperymentalnych dotyczących mechanizmów i interakcji zaangażowanych w transport PA wewnątrzkomórkowych i między komórkami.
- Dzięki metodzie modelowania homologicznego zostały przewidziane struktury 3D białek transportujących PA.
- Dzięki metodzie dokowania molekularnego zostały potwierdzone możliwości interakcji pomiędzy kieszeniami modelowanych białek transportujących a PA.
- Zidentyfikowano określone transportery PA, które prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w regulacji procesu starzenia liści jęczmienia i stanowią potencjalne cele dla manipulacji genetycznych, co może prowadzić do zwiększenia tolerancji roślin na działanie szerokiego spektrum czynników stresowych, co z kolei może skutkować zwiększoną produktywnością roślin.
- Uzyskane wyniki otwierają drogę do nowych badań, gdyż rola roślinnych transporterów PA w regulacji procesu starzenia jest nierozpoznana.
- Przeprowadzone badania pogłębiają zrozumienie genetycznych podstaw homeostazy PA, kluczowego elementu w remobilizacji azotu w roślinach, co może być wykorzystane do opracowania ulepszonych odmian zbóż, co z kolei obniży koszty komercyjnego nawożenia oraz zwiększy plony.



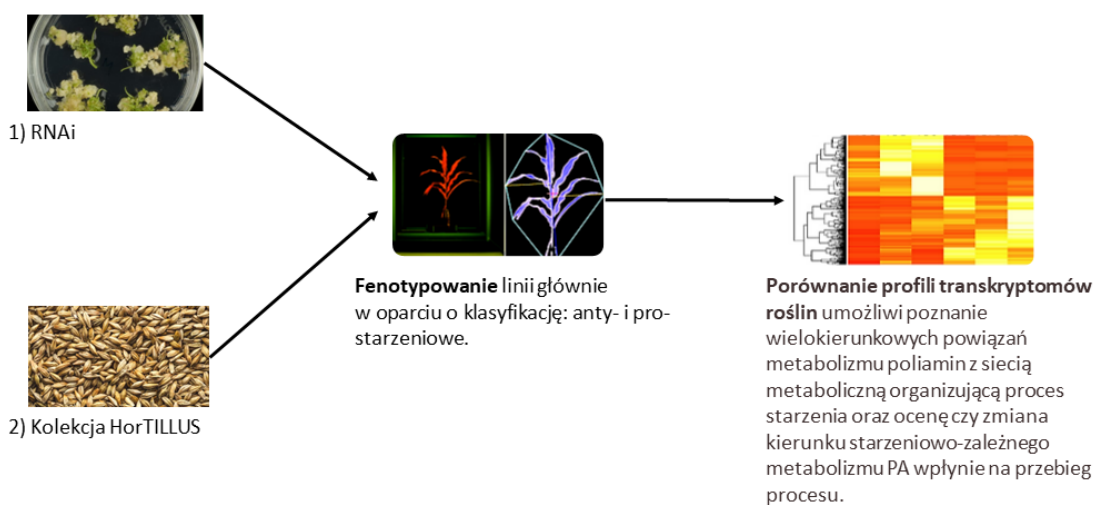
## 5. PERSPEKTYWY

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej pozwalają na prowadzenie dalszych badań dotyczących roli PA w indukowanym starzeniu.

W badaniach tych wykorzystane zostaną rośliny z metabolizmem PA zmienionym w stosunku do roślin typu dzikiego. Przeprowadzone zostanie fenotypowanie tych roślin na podstawie klasyfikacji anty- i prostarzeniowych oraz profilowanie ich transkryptomów w celu ustalenia zależności w sieciach metabolicznych pomiędzy metabolizmem PA a innymi szlakami zaangażowanymi w starzenie (Ryc. 18).

Modyfikacja metabolizmu PA w roślinach planowana jest na podstawie:

- transgenicznych linii jęczmienia, podejścia RNAi i/lub CRISPR/Cas9;
- przeszukania, za pomocą metody TILLING, zdeponowanej na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach kolekcji jęczmiennej populacji HorTILLUS obejmującej izolację wybranych genów (ang. *screening reverse*).



Rycina 18. Plany badawcze

## 6. LITERATURA

- Agostinelli, E., Marques, M., Calheiros, R., Gil, F., Tempera, G., Viceconte, N., Battaglia, V., Grancara, S., i Toninello, A. (2010). Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino acids*, 38(2), 393-403.
- Alexander, E. T., Mariner, K., Donnelly, J., Phanstiel IV, O., i Gilmour, S. K. (2020). Polyamine blocking therapy decreases survival of tumor-infiltrating immunosuppressive myeloid cells and enhances the antitumor efficacy of PD-1 blockade. *Molecular cancer therapeutics*, 19(10), 2012-2022.
- Alhag, A., Song, J., Dahro, B., Wu, H., Khan, M., Salih, H., i Liu, J. H. (2021). Genome-wide identification and expression analysis of Polyamine Uptake Transporter gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Plant Biology*, 23(6), 1157-1166.
- Angelini, R., Tisi, A., Rea, G., Chen, M. M., Botta, M., Federico, R., i Cona, A. (2008). Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant Physiology*, 146(1), 162-177.
- Ariyaratne, M., Ge, L., i Morris, P. F. (2019). Characterization of Membrane Transporters by Heterologous Expression in *E. coli* and Production of Membrane Vesicles. *Journal of Visualized Experiments: Jove*(154).
- Aye, I. L., Gong, S., Avellino, G., Barbagallo, R., Gaccioli, F., Jenkins, B. J., Koulman, A., Murray, A. J., Stephen Charnock-Jones, D., i Smith, G. C. (2022). Placental sex-dependent spermine synthesis regulates trophoblast gene expression through acetyl-coA metabolism and histone acetylation. *Communications Biology*, 5(1), 586.
- Bachrach, U. (2005). Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Current protein and peptide science*, 6(6), 559-566.
- Bagni, N., i Tassoni, A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino acids*, 20(3), 301-317.
- Brooks, W. H. (2013). Increased polyamines alter chromatin and stabilize autoantigens in autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, 4, 91.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., i Pink, D. (2003). The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1(1), 3-22.
- Buelbuel, S., Sakuraba, Y., Sedaghatmehr, M., Watanabe, M., Hoefgen, R., Balazadeh, S., i Mueller-Roeber, B. (2023). Arabidopsis BBX14 negatively regulates nitrogen starvation- and dark-induced leaf senescence. *The Plant Journal*, 116(1), 251-268.
- Christiansen, M. W., i Gregersen, P. L. (2014). Members of the barley NAC transcription factor gene family show differential co-regulation with senescence-associated genes during senescence of flag leaves. *Journal of Experimental Botany*, 65(14), 4009-4022.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., i Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in plant science*, 11(2), 80-88.
- FAO. (2019). *The state of food and agriculture 2019: Moving forward on food loss and waste reduction*. Rome: UN.
- Fujita, M., i Shinozaki, K. (2015). Polyamine Transport Systems in Plants. In T. Kusano & H. Suzuki (Eds.), *Polyamines: A Universal Molecular Nexus for Growth, Survival, and Specialized Metabolism* (pp. 179-185). Tokyo: Springer Japan.
- Ge, L. (2015). *The Export of Polyamines in Plants Is Mediated By a Novel Clade of Bidirectional Transporters*. (Doctor of Philosophy (Ph.D.)), Bowling Green State University, Retrieved from [http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc\\_num=bgsu1430486987](http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=bgsu1430486987)
- Gregersen, P. L., Holm, P. B., i Krupinska, K. (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology*, 10(s1), 37-49.
- Guo, Y., Ren, G., Zhang, K., Li, Z., Miao, Y., i Guo, H. (2021). Leaf senescence: progression, regulation, and application. *Molecular Horticulture*, 1(1), 5.

- Guo, Y., Ye, Q., Deng, P., Cao, Y., He, D., Zhou, Z., Wang, C., Zaytseva, Y. Y., Schwartz, C. E., i Lee, E. Y. (2020). Spermine synthase and MYC cooperate to maintain colorectal cancer cell survival by repressing Bim expression. *Nature communications*, *11*(1), 3243.
- Handa, A. K., Fatima, T., i Mattoo, A. K. (2018). Polyamines: bio-molecules with diverse functions in plant and human health and disease. *Frontiers in chemistry*, *6*, 10.
- Hussain, B., Akpınar, B. A., Alaux, M., Algharib, A. M., Sehgal, D., Ali, Z., Aradottir, G. I., Batley, J., Bellec, A., Bentley, A. R., Cagirici, H. B., Cattivelli, L., Choulet, F., Cockram, J., Desiderio, F., Devaux, P., Dogramaci, M., Dorado, G., Dreisigacker, S., Edwards, D., El-Hassouni, K., Eversole, K., Fahima, T., Figueroa, M., Gálvez, S., Gill, K. S., Govta, L., Gul, A., Hensel, G., Hernandez, P., Crespo-Herrera, L. A., Ibrahim, A., Kilian, B., Korzun, V., Krugman, T., Li, Y., Liu, S., Mahmoud, A. F., Morgounov, A., Muslu, T., Naseer, F., Ordon, F., Paux, E., Perovic, D., Reddy, G. V. P., Reif, J. C., Reynolds, M., Roychowdhury, R., Rudd, J., Sen, T. Z., Sukumaran, S., Ozdemir, B. S., Tiwari, V. K., Ullah, N., Unver, T., Yazar, S., Appels, R., i Budak, H. (2022). Capturing Wheat Phenotypes at the Genome Level. *Frontiers in Plant Science*, *13*.
- Igarashi, K., i Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *42*(1), 39-51.
- Igarashi, K., i Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, *271*(3), 559-564.
- Imre, L., Niaki, E. F., Bosire, R., Nanasi Jr, P., Nagy, P., Bacso, Z., Hamidova, N., Pommier, Y., Jordan, A., i Szabo, G. (2022). Nucleosome destabilization by polyamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *722*, 109184.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., i Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, *228*(3), 367-381.
- Kusano, T., i Suzuki, H. (2015). *Polyamines: A Universal Molecular Nexus for Growth, Survival, and Specialized Metabolism*. Japan: Springer
- Law, S. R., Chrobok, D., Juvany, M., Delhomme, N., Lindén, P., Brouwer, B., Ahad, A., Moritz, T., Jansson, S., Gardeström, P., i Keech, O. (2018). Darkened Leaves Use Different Metabolic Strategies for Senescence and Survival. *Plant Physiology*, *177*(1), 132-150.
- Legocka, J., i Sobieszczuk-Nowicka, E. (2012). Sorbitol and NaCl stresses affect free, microsome-associated and thylakoid-associated polyamine content in *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*. *Acta Physiologiae Plantarum*, *34*(3), 1145-1151.
- Liu, Q., Yan, X., Li, R., Yuan, Y., Wang, J., Zhao, Y., Fu, J., i Su, J. (2024). Polyamine Signal through HCC Microenvironment: A Key Regulator of Mitochondrial Preservation and Turnover in TAMs. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(2), 996.
- Madeo, F., Tavernarakis, N., i Kroemer, G. (2010). Can autophagy promote longevity? *Nature cell biology*, *12*(9), 842-846.
- Mattoo, A., Fatima, T., Upadhyay, R., i Handa, A. (2015). Polyamines in plants: biosynthesis from arginine, and metabolic, physiological and stress-response roles. *Amino Acids in Higher Plants; D’Mello, JPF, Ed.; CABI: Wallingford, UK*, 177-194.
- Mattoo, A. K., Minocha, S. C., Minocha, R., i Handa, A. K. (2010). Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. *Amino acids*, *38*, 405-413.
- Mattoo, A. K., i Sobieszczuk-Nowicka, E. (2019). Chapter 8 - Polyamine as Signaling Molecules and Leaf Senescence. In M. Sarwat & N. Tuteja (Eds.), *Senescence Signalling and Control in Plants* (pp. 125-138): Academic Press.
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., i Ralser, M. (2015). Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. *Journal of molecular biology*, *427*(21), 3389-3406.
- Monat, C., Schreiber, M., Stein, N., i Mascher, M. (2019). Prospects of pan-genomics in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, *132*(3), 785-796.

- Moschou, P. N., Sanmartin, M., Andriopoulou, A. H., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J. J., i Roubelakis-Angelakis, K. A. (2008). Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 147(4), 1845-1857.
- Muñoz-Amatriaín, M., Cuesta-Marcos, A., Hayes, P. M., i Muehlbauer, G. J. (2014). Barley genetic variation: implications for crop improvement. *Briefings in Functional Genomics*, 13(4), 341-350.
- Navakoudis, E., i Kotzabasis, K. (2022). Polyamines: A bioenergetic smart switch for plant protection and development. *Journal of Plant Physiology*, 270, 153618.
- Nishio, T., Yoshikawa, Y., Fukuda, W., Umezawa, N., Higuchi, T., Fujiwara, S., Imanaka, T., i Yoshikawa, K. (2018). Branched-chain polyamine found in hyperthermophiles induces unique temperature-dependent structural changes in genome-size DNA. *ChemPhysChem*, 19(18), 2299-2304.
- Paluch-Lubawa, E., Stolarska, E., i Sobieszczuk-Nowicka, E. (2021). Dark-Induced Barley Leaf Senescence - A Crop System for Studying Senescence and Autophagy Mechanisms. *Front Plant Sci*, 12, 635619.
- Paluch-Lubawa, E., Tanwar, U. K., Stolarska, E., Arasimowicz-Jelonek, M., Mattoo, A. K., i Sobieszczuk-Nowicka, E. (2024). Polyamine cycle - a missing link in barley leaf senescence-dependent nitrogen remobilization.
- Patil, R., Das, S., Stanley, A., Yadav, L., Sudhakar, A., i Varma, A. K. (2010). Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. *PloS one*, 5(8), e12029.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Raspaud, E., Chaperon, I., Leforestier, A., i Livolant, F. (1999). Spermine-induced aggregation of DNA, nucleosome, and chromatin. *Biophysical journal*, 77(3), 1547-1555.
- Sandhu, N., Sethi, M., Kumar, A., Dang, D., Singh, J., i Chhuneja, P. (2021). Biochemical and genetic approaches improving nitrogen use efficiency in cereal crops: A review. *Frontiers in plant science*, 12, 657629.
- Seiler, N. (2004). Catabolism of polyamines. *Amino acids*, 26(3), 217-233.
- Sequera-Mutiozabal, M. I., Erban, A., Kopka, J., Atanasov, K. E., Bastida, J., Fotopoulos, V., Alcázar, R., i Tiburcio, A. F. (2016). Global metabolic profiling of Arabidopsis polyamine oxidase 4 (AtPAO4) loss-of-function mutants exhibiting delayed dark-induced senescence. *Frontiers in Plant Science*, 7, 173.
- Sobieszczuk-Nowicka, E. (2017). Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino Acids*, 49(1), 49-56.
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Kubala, S., Zmienko, A., Małeczka, A., i Legocka, J. (2016). From accumulation to degradation: reprogramming polyamine metabolism facilitates dark-induced senescence in barley leaf cells. *Frontiers in plant science*, 6, 1198.
- Sobieszczuk-Nowicka, E., i Legocka, J. (2014). Plastid-associated polyamines: their role in differentiation, structure, functioning, stress response and senescence. *Plant Biology*, 16(2), 297-305.
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Wieczorek, P., i Legocka, J. (2009). Kinetin affects the level of chloroplast polyamines and transglutaminase activity during senescence of barley leaves. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), 255-260.
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Wrzesinski, T., Bagniewska-Zadworna, A., Kubala, S., Rucinska-Sobkowiak, R., Polcyn, W., Misztal, L., i Mattoo, A. K. (2018). Physio-Genetic Dissection of Dark-Induced Leaf Senescence and Timing Its Reversal in Barley. *Plant Physiol*, 178(2), 654-671.
- Sobieszczuk-Nowicka, E., Zmienko, A., Samelak-Czajka, A., Łuczak, M., Pietrowska-Borek, M., Iorio, R., Del Duca, S., Figlerowicz, M., i Legocka, J. (2015). Dark-induced senescence of

- barley leaves involves activation of plastid transglutaminases. *Amino Acids*, 47(4), 825-838.
- Stolarska, E., Paluch-Lubawa, E., Grabsztunowicz, M., Kumar Tanwar, U., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O., Mattoo, A. K., i Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023b). Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 42(6), 364-384.
- Stolarska, E., Tanwar, U. K., Guan, Y., Grabsztunowicz, M., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O. t., i Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023a). Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737.
- Takahashi, T., i Kakehi, J.-I. (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of botany*, 105(1), 1-6.
- Tanwar, U. K., Stolarska, E., Paluch-Lubawa, E., Mattoo, A. K., Arasimowicz-Jelonek, M., i Sobieszczuk-Nowicka, E. (2022). Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement. *International of Biological Macromolecules*, 221, 585-603.
- Tavladoraki, P., Cona, A., Federico, R., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Toninello, A., i Agostinelli, E. (2012). Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino acids*, 42(2), 411-426.
- Thomas, H. (2013). Senescence, ageing and death of the whole plant. *New Phytologist*, 197(3), 696-711.
- Thomas, T. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(2), 244-258.
- Thomas, T., Tajmir-Riahi, H., i Thomas, T. (2016). Polyamine–DNA interactions and development of gene delivery vehicles. *Amino Acids*, 48, 2423-2431.
- Upadhyay, R. K., Fatima, T., Handa, A. K., i Mattoo, A. K. (2021). Differential association of free, conjugated, and bound forms of polyamines and transcript abundance of their biosynthetic and catabolic genes during drought/salinity stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Leaves. *Frontiers in Plant Science*, 2224.
- Upadhyay, R. K., Fatima, T., Handa, A. K., i Mattoo, A. K. (2020). Polyamines and their biosynthesis/catabolism genes are differentially modulated in response to heat versus cold stress in tomato leaves (*Solanum lycopersicum* L.). *Cells*, 9(8), 1749.
- Upadhyay, R. K., Shao, J., i Mattoo, A. K. (2021). Genomic analysis of the polyamine biosynthesis pathway in duckweed *Spirodela polyrhiza* L.: presence of the arginine decarboxylase pathway, absence of the ornithine decarboxylase pathway, and response to abiotic stresses. *Planta*, 254, 1-17.
- Vera-Sirera, F., Minguet, E. G., Singh, S. K., Ljung, K., Tuominen, H., Blázquez, M. A., i Carbonell, J. (2010). Role of polyamines in plant vascular development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 534-539.
- Visvanathan, A., Ahmed, K., Even-Faitelson, L., Lleres, D., Bazett-Jones, D. P., i Lamond, A. I. (2013). Modulation of higher order chromatin conformation in mammalian cell nuclei can be mediated by polyamines and divalent cations. *PLoS One*, 8(6), e67689.
- Walters, D. R. (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64(1), 97-107.
- Wicker, T., Schulman, A. H., Tanskanen, J., Spannagl, M., Twardziok, S., Mascher, M., Springer, N. M., Li, Q., Waugh, R., Li, C., Zhang, G., Stein, N., Mayer, K. F. X., i Gundlach, H. (2017). The repetitive landscape of the 5100 Mbp barley genome. *Mobile DNA*, 8(1), 22.
- Wood, P. L., Khan, M. A., i Moskal, J. R. (2007). The concept of “aldehyde load” in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. *Brain Research*, 1145, 150-156.

- Wuddineh, W., Minocha, R., i Minocha, S. C. (2018). Polyamines in the context of metabolic networks. *Polyamines: methods and protocols*, 1-23.
- Zmienko, A., Samelak-Czajka, A., Goralski, M., Sobieszczuk-Nowicka, E., Kozłowski, P., i Figlerowicz, M. (2015). Selection of reference genes for qPCR- and ddPCR-based analyses of gene expression in Senescing Barley leaves. *PLoS One*, *10*(2), e0118226.

Prace naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego podstawę  
rozprawy doktorskiej

### Publikacja 1

Tanwar, U.K.\* , **Stolarska, E.\***, Paluch-Lubawa, E., Mattoo, A.K., Arasimowicz-Jelonek, M., Sobieszczuk-Nowicka, E. (2022). Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 585-603. doi: **10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813022019298>

\* pierwsze autorstwo współdzielone



## Publikacja 2

**Stolarska, E., Tanwar, U.K., Guan, Y., Grabsztunowicz, M., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O. IV, Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023a).** Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. **doi:10.3389/fpls.2023.1194737**

<https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1194737/full>

### Publikacja 3

**Stolarska, E.,** Paluch-Lubawa, E., Grabsztunowicz, M., Kumar Tanwar, U., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O. IV, Mattoo, A.K., Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023b). Polyamines as universal bioregulators across kingdoms and their role in cellular longevity and death. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. **doi:10.1080/07352689.2023.2247886**

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07352689.2023.2247886>

## Oświadczenia autorki

## AUTHORS STATEMENT

I hereby declare that the article:

“Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement” Tanwar, U. K.\*, **Stolarska, E.\***, Paluch-Lubawa, E., Mattoo, A. K., Arasimowicz-Jelonek, M., & Sobieszczuk-Nowicka, E. (2022) *International of Biological Macromolecules*, 221, 585-603. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006

is a part of my PhD dissertation. I am the co- first author of this article. I performed part of the bioinformatics analysis and the experimental work. Moreover, I was involved in analysing the obtained data. My results are shown as parts of Fig. 1-2, 3A, 4-6, Tab. 1, 3, Supplementary Fig. S1-S11, Supplementary Tab. S2, S5, and S11-S12. I contributed to writing the manuscript and I prepared Fig. 7.

\* co- first authors

I hereby declare that the article:

“Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence” **Stolarska, E.**, Tanwar, U. K., Guan, Y., Grabsztunowicz, M., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O., & Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023) *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. doi:10.3389/fpls.2023.1194737

is a part of my PhD dissertation. I performed part of the bioinformatics analysis, and I analysed part of the obtained data. My results are shown as parts of Fig. 1-4, 7-11, Tab. 1, 3, Supplementary Fig. S1, S3, Supplementary Tab. S1-S2, and S4. I contributed to writing the manuscript.

I hereby declare that the article:

“Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death” **Stolarska, E.**, Paluch-Lubawa, E., Grabsztunowicz, M., Tanwar, U. K., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O., Mattoo, A. K., & Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023) *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886

is a part of my PhD dissertation. I was responsible for the layout of the manuscript and involved in the writing of the “Introduction”, “Polyamine metabolism and biochemistry—plants vs animals”, and “Conclusions” section. I prepared the Tab.1.



Ewelina Stolarska



Prof. UAM dr hab. Ewa Sobieszczuk-Nowicka  
Supervisor of PhD candidate




Dr Umesh Kumar Tanwar  
Co-supervisor of PhD candidate

## Oświadczenia współautorów

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement**" Tanwar, U. K.\*, Stolarska, E.\*, Paluch-Lubawa, E., Mattoo, A. K., Arasimowicz-Jelonek, M., & Sobieszczuk-Nowicka, E. (2022) *International of Biological Macromolecules*, 221, 585-603. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

\*joint first authors

<b>Co-Author Name</b>	<b>Umesh Kumar Tanwar</b>
<b>Affiliation</b>	Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland Legume Genomics Team, Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, Poznan 60-479, Poland
<b>Contribution</b>	I performed the bioinformatics analysis, experimental work and analysed the data. I drafted the manuscript.
<b>Date</b>	01.02.24
<b>Signature</b>	

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement**" Tanwar U. K.\*, Stolarska E.\*, Paluch-Lubawa E., Mattoo A. K., Arasimowicz-Jelonek M., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2022) *International of Biological Macromolecules*, 221, 585-603. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

\*joint first authors

**Co-Author Name** Ewelina Paluch-Lubawa

**Affiliation**

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University,  
ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

**Contribution**

I assisted in bioinformatics analysis and conducted literature search.

**Date**

26.03.2024

**Signature**

Paluch-Lubawa

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article “**Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement**” Tanwar U. K.\*, Stolarska E.\*, Paluch-Lubawa E., Mattoo A. K., Arasimowicz-Jelonek M., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2022) *International of Biological Macromolecules*, 221, 585-603. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

\*joint first authors

<b>Co-Author Name</b>	<b>Autar Krishna Mattoo</b>
<b>Affiliation</b>	Sustainable Agricultural Systems Laboratory, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Henry A. Wallace Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD 20705-2350, USA
<b>Contribution</b>	I gave suggestions on bioinformatic and experimental analysis and contributed to writing the manuscript.
<b>Date</b>	<b>March 8, 2024</b>
<b>Signature</b>	<i>Autar Mattoo</i>



## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement**" Tanwar U. K.\*, Stolarska E.\*, Paluch-Lubawa E., Mattoo A. K., Arasimowicz-Jelonek M., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2022) *International of Biological Macromolecules*, 221, 585-603. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

\*joint first authors

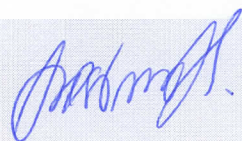
**Co-Author Name** Magdalena Arasimowicz-Jelonek

**Affiliation** Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

**Contribution** I gave suggestions on bioinformatic and experimental analysis and contributed to writing the manuscript.

**Date** 27.03.2024

**Signature**



## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement**" Tanwar U. K.\*, Stolarska E.\*, Paluch-Lubawa E., Mattoo A. K., Arasimowicz-Jelonek M., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2022) *International of Biological Macromolecules*, 221, 585-603. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.006 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

\*joint first authors

**Co-Author Name** Ewa Sobieszczuk-Nowicka

**Affiliation**

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University,  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland

**Contribution**

I designed and supervised the study and interpreted the results.  
I drafted the manuscript.  
I critically revised the manuscript


**Date**

**Signature**

Ewa Sobieszczuk-Nowicka

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence**" Stolarska, E., Tanwar, U. K., Guan, Y., Grabsztunowicz, M., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O. t., & Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023) *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. doi:10.3389/fpls.2023.1194737 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

<b>Co-Author Name</b>	<b>Umesh Kumar Tanwar</b>
<b>Affiliation</b>	Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland Legume Genomics Team, Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, Poznan 60-479, Poland
<b>Contribution</b>	I conceived of the presented idea. I performed the bioinformatics analysis and analyzed the data. I designed and supervised the study and interpreted the results. I drafted the manuscript.
<b>Date</b>	01.02.24
<b>Signature</b>	

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

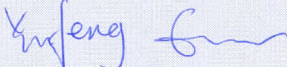
I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence**" Stolarska E., Tanwar U. K., Guan Y., Grabsztunowicz M., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. doi:10.3389/fpls.2023.1194737 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name** Yufeng Guan

**Affiliation** Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

**Contribution** I performed the bioinformatics analysis, and analyzed the data.

**Date** 19.03.2024

**Signature** 

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence**" Stolarska E., Tanwar U. K., Guan Y., Grabsztunowicz M., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. doi:10.3389/fpls.2023.1194737 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name** Magda Grabsztunowicz

**Affiliation**

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University,  
ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

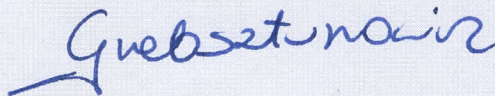
**Contribution**

I drafted the manuscript.

**Date**

26. 03. 2024

**Signature**



## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence**" Stolarska E., Tanwar U. K., Guan Y., Grabsztunowicz M., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. doi:10.3389/fpls.2023.1194737 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name**      **Magdalena Arasimowicz-Jelonek**

**Affiliation**

Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

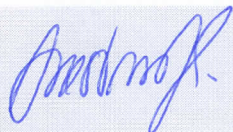
**Contribution**

I gave suggestions on bioinformatic and experimental analysis and contributed to writing the manuscript.

**Date**

27.03.2024

**Signature**



## AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence**" Stolarska E., Tanwar U. K., Guan Y., Grabsztunowicz M., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. doi:10.3389/fpls.2023.1194737 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

<b>Co-Author Name</b>	<b>Otto Phanstiel IV</b>
<b>Affiliation</b>	Department of Medical Education, College of Medicine, University of Central Florida, Orlando, FL, USA
<b>Contribution</b>	I gave suggestions on bioinformatic and experimental analysis and contributed to writing the manuscript.
<b>Date</b>	3/8/2024
<b>Signature</b>	

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Genetic portrait of polyamine transporters in barley: insights in the regulation of leaf senescence**" Stolarska E., Tanwar U. K., Guan Y., Grabsztunowicz M., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Frontiers in Plant Science*, 14, 1194737. doi:10.3389/fpls.2023.1194737 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name** Ewa Sobieszczuk-Nowicka

**Affiliation**

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University,  
ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

**Contribution**

I conceived of the presented idea.  
I designed and supervised the study and interpreted the results.  
I drafted the manuscript.

**Date**

**Signature**

Ewa Sobieszczuk-Nowicka



## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death**" Stolarska E., Paluch-Lubawa E., Grabsztunowicz M., Tanwar U. K., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., Mattoo A. K., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name** Ewelina Paluch-Lubawa

**Affiliation**

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University,  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland

**Contribution**

I was involved in the writing of the "Polyamine metabolism byproducts" section.

**Date**

26.03.2024

**Signature**

Paluch-Lubawa

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death**" Stolarska E., Paluch-Lubawa E., Grabsztunowicz M., Tanwar U. K., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., Mattoo A. K., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name**      **Magda Grabsztunowicz**

**Affiliation**

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University,  
ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

**Contribution**

I drew the figures and was involved in the writing of the "Polyamine role in regulation of gene expression" section.

**Date**

26.03.2024

**Signature**

*Grabsztunowicz*

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death**" Stolarska, E., Paluch-Lubawa, E., Grabsztunowicz, M., Tanwar, U. K., Arasimowicz-Jelonek, M., Phanstiel, O., Mattoo, A. K., i Sobieszczuk-Nowicka, E. (2023) *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name** Umesh Kumar Tanwar

**Affiliation** Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland  
Legume Genomics Team, Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, Poznan 60-479, Poland

**Contribution** I was involved in the writing of the "Aspects of Regulation of Polyamine Metabolism" section.

**Date** 01.02.24

**Signature**



## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death**" Stolarska E., Paluch-Lubawa E., Grabsztunowicz M., Tanwar U. K., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., Mattoo A. K., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name** Magdalena Arasimowicz-Jelonek

**Affiliation**

Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

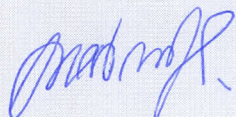
**Contribution**

I was involved in the writing of the "Polyamines and aging" section.

**Date**


27.03.2024

**Signature**



## AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article “**Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death**” Stolarska E., Paluch-Lubawa E., Grabsztunowicz M., Tanwar U. K., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., Mattoo A. K., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

<b>Co-Author Name</b>	<b>Otto Phanstiel IV</b>
<b>Affiliation</b>	Department of Medical Education, College of Medicine, University of Central Florida, Orlando, FL, USA
<b>Contribution</b>	I provided suggestions for revising the manuscript.
<b>Date</b>	3/8/2024
<b>Signature</b>	

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article “**Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death**” Stolarska E., Paluch-Lubawa E., Grabsztunowicz M., Tanwar U. K., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., Mattoo A. K., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

<b>Co-Author Name</b>	<b>Autar Krishna Mattoo</b>
<b>Affiliation</b>	Sustainable Agricultural Systems Laboratory, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Henry A. Wallace Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD 20705-2350, USA
<b>Contribution</b>	I provided suggestions for revising the manuscript.
<b>Date</b>	<b>March 8, 2024</b>
<b>Signature</b>	<i>Autar Mattoo</i>

## AUTORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I hereby declare that I am aware that the work in the article "**Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death**" Stolarska E., Paluch-Lubawa E., Grabsztunowicz M., Tanwar U. K., Arasimowicz-Jelonek M., Phanstiel O., Mattoo A. K., & Sobieszczuk-Nowicka E. (2023) *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1-21. doi:10.1080/07352689.2023.2247886 of which I am a co-author, has been included in the doctoral thesis of Ewelina Stolarska.

**Co-Author Name** Ewa Sobieszczuk-Nowicka

**Affiliation**

Department of Plant Physiology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University,  
ul. Uniwersytetu Poznanskiego 6, 61-614 Poznan, Poland

**Contribution**

I conceived the topic of the article.  
I was responsible for the layout of the manuscript and involved in the writing of the "Introduction" section.  
I was involved in the writing of the "Polyamines and aging" section.  
I was involved in the writing of the "Conclusions" section

**Date**

**Signature**

Ewa Sobieszczuk-Nowicka

## Sylwetka kandydatki

Pracę licencjacką wykonałam pod kierunkiem dr hab., Olgierda Stobienii w Zakładzie Bioenergetyki Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Temat pracy: „Specjalizacja anatomiczna i fizjologiczna zwierząt na przykładzie narządów elektrycznych, narządów świetlnych i bioluminescencji” (2012). Ukończyłam studia podyplomowe na kierunku Zaawansowane materiały i nanotechnologia w praktyce w Centrum NanoBioMedyczne UAM w Poznaniu (2015). Pracę magisterską zrealizowałam pod kierunkiem Prof. UAM dr hab. Teresy Lehmann w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Temat pracy: „Porównanie ekspresji wybranych genów metabolizmu azotowego u kukurydzy w zależności od jej statusu symbiotycznego i wodnego” (2016).

W roku 2016 byłam zatrudniona na stanowisku samodzielny referent techniczny w Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Biotechnologii Roślin Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku, Zakład Biochemii Nasion. W latach 2017-2019 brałam udział w projekcie dr hab. Ewy Marzeny Kalemby, pt. „Udział białek zawierających utlenioną metioninę oraz systemu reduktaz sulfotlenku metioniny w regulacji podstawowych etapów rozwojowych w fizjologii nasion” w Zakładzie Biochemii Nasion Instytutu Dendrologii Polskiej Akademii. Wynikiem współpracy jest sześć publikacji naukowych.

W 2019 roku rozpoczęłam studia doktoranckie pod kierunkiem Prof. UAM dr hab. Ewy Sobieszczuk-Nowickiej w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Byłam doktorantką-stypendystką w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, pt. „Poliaminy - nowy przełącznik metaboliczny starzenia liścia jęczmienia. Opracowanie molekularnej podstawy sieciowej regulacji procesu jako cel strategii uprawy zbóż”. Byłam także zaangażowana w dwa inne projekty wykonywane w Zakładzie Fizjologii Roślin w wyniku czego jestem współautorką dwóch publikacji naukowych.



## Wykaz pozostałych osiągnięć naukowych

### Publikacje

1. Tanwar U.K., **Stolarska E.**, Rudy E., Paluch-Lubawa E., Grabsztunowicz M., Arasimowicz-Jelonek M., Sobieszczuk-Nowicka E. (2022) Metal tolerance gene family in barley: an in silico comprehensive analysis *Journal of Applied Genetics* doi.org/10.1007/s13353-022-00744-6.
2. Paluch-Lubawa E., **Stolarska E.**, Sobieszczuk-Nowicka E. (2021) Dark-Induced Barley Leaf Senescence – A Crop System for Studying Senescence and Autophagy Mechanisms *Frontiers in Plant Science* 12:635619. doi: 10.3389/fpls.2021.635619
3. Alipour, S., Bilka, K., **Stolarska, E.**, Wojciechowska, N., and Kalembe, E.M. (2021). Nicotinamide adenine dinucleotides are associated with distinct redox control of germination in Acer seeds with contrasting physiology. *PLoS One* 16(1), e0245635. doi: 10.1371/journal.pone.0245635.
4. **Stolarska, E.**, Bilka, K., Wojciechowska, N., Bagniewska-Zadworna, A., Rey, P., and Kalembe, E.M. (2020). Integration of MsrB1 and MsrB2 in the Redox Network during the Development of Orthodox and Recalcitrant Acer Seeds. *Antioxidants (Basel)* 9(12). doi: 10.3390/antiox9121250.
5. Wojciechowska, N., Alipour, S., **Stolarska, E.**, Bilka, K., Rey, P., and Kalembe, E.M. (2020). Involvement of the MetO/Msr System in Two Acer Species That Display Contrasting Characteristics during Germination. *Int J Mol Sci* 21(23). doi: 10.3390/ijms21239197.
6. Alipour, S., Wojciechowska, N., **Stolarska, E.**, Bilka, K., and Kalembe, E.M. (2020). NAD(P)-Driven Redox Status Contributes to Desiccation Tolerance in Acer seeds. *Plant Cell Physiol* 61(6), 1158-1167. doi: 10.1093/pcp/pcaa044.
7. Wojciechowska, N., Alipour, S., **Stolarska, E.**, Bilka, K., Rey, P., and Kalembe, E.M. (2020). Peptide-Bound Methionine Sulfoxide (MetO) Levels and MsrB2 Abundance Are Differentially Regulated during the Desiccation Phase in Contrasted Acer Seeds. *Antioxidants (Basel)* 9(5). doi: 10.3390/antiox9050391.
8. Kalembe, E.M., and **Stolarska, E.** (2019). Regulation of Gene Expression of Methionine Sulfoxide Reductases and Their New Putative Roles in Plants. *Int J Mol Sci* 20(6). doi: 10.3390/ijms20061309.

### Publikacje w recenzji

Grabsztunowicz M., Stolarska E., Tanwar U.K., Arasimowicz-Jelonek M., Sobieszczuk-Nowicka E. (XXXX) Tolerancja stresu metali ciężkich u roślin uprawnych: charakterystyka in silico genów MTP (Metal Tolerance Protein) u jęczmienia

Paluch-Lubawa E., Tanwar U.K., Stolarska E., Arasimowicz-Jelonek M., Mattoo A.K., Sobieszczuk-Nowicka E. (XXXX) Polyamine cycle - a missing link in barley leaf senescence-dependent nitrogen remobilization.

#### Udział w projektach naukowych

Stypendysta-doktorant w grantcie Narodowego Centrum Nauki: SONATA BIS5 nr 2015/18/E/NZ9/00729.

Stypendysta-doktorant w grantcie Narodowego Centrum Nauki: OPUS15 nr 2018/29/B/NZ9/00734.

Wykonawca w grantcie Narodowego Centrum Nauki: PRELUDIUM14 nr 2017/27/N/NZ9/02135.

Wykonawca w grantcie Narodowego Centrum Nauki: SONATA BIS8 nr 2018/30/E/NZ9/00827.

#### Udział w konferencjach naukowych

##### 1) Wystąpienia ustne:

Ewa Sobieszczuk-Nowicka, Umesh Kumar Tanwar, **Ewelina Stolarska**, Ewelina Paluch-Lubawa, Autar K. Mattoo, Magdalena Arasimowicz-Jelonek *Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement*. 2<sup>nd</sup> Hungarian Polyamine Research Workshop, Szeged, Węgry, 02.12.2022.

Umesh Kumar Tanwar, **Ewelina Stolarska**, Ewelina Paluch-Lubawa, Autar K. Mattoo, Magdalena Arasimowicz-Jelonek, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Genome-wide exploration of the genetics of biogenic polyamines in barley*. 2<sup>nd</sup> Hungarian Polyamine Research Workshop, Szeged, Węgry 02.12.2022.

Umesh Kumar Tanwar, **Ewelina Stolarska**, Ewelina Paluch-Lubawa, Autar K. Mattoo, Magdalena Arasimowicz Jelonek, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Unraveling the genetics of polyamine metabolism in barley for senescence-related crop improvement*. 6<sup>th</sup> International Conference On Polyamines: Biochemical, Physiological And Clinical Perspectives, Rzym, Włochy, 04-09.09.2022.

Umesh Kumar Tanwar, **Ewelina Stolarska**, Ewelina Paluch-Lubawa, Autar K. Mattoo, Ewa Sobieszczuk-Nowicka, Magdalena Arasimowicz-Jelonek *Genome-wide exploration of the genetics of biogenic polyamines in barley*. 6<sup>th</sup> International Conference On Polyamines: Biochemical, Physiological And Clinical Perspectives, Rzym, Włochy, 04-09.09.2022.

**Ewelina Stolarska**, Umesh Kumar Tanwar, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Genome-wide analysis of the aminopropyl transferases in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their spatiotemporal expression profiles under dark-induced leaf senescence*. COMPASS: the future of interdisciplinary science, Poznań, Polska, 22-24.09.2021.

**Ewelina Stolarska**, Karolina Bilśka, Natalia Wojciechowska, Ewa Kalemba *The role of methionine sulfoxide reductases in regulation of seed physiology*. 12th International Conference of Young Naturalists - "From Biotechnology to Environmental Protection"- The Interdisciplinary Meeting of Young Naturalists, Zielona Góra, 22-24.11.2017. Nagroda za najlepsze wystąpienie ustne.

## Postery

**Ewelina Stolarska**, Umesh Kumar Tanwar, Ewelina Paluch-Lubawa, Magda Grabsztunowicz, Yufeng Guan, Autar Krishna Mattoo, Magdalena Arasimowicz-Jelonek, Per Langkjaer Gregersen, Otto Phanstiel IV, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Genome-wide identification and characterization of genes determining cellular polyamine homeostasis in senescing barley leaves*. 11th biennial PSEPB Conference, Poznań, Poland 19-22.09.2023.

**Ewa Sobieszczuk-Nowicka**, Umesh Kumar Tanwar, **Ewelina Stolarska**, Yufeng Guan, Magda Grabsztunowicz, Magdalena Arasimowicz-Jelonek *Genome-wide exploration of the genetics of transporters of biogenic polyamines in barley for nitrogen-remobilization crop improvement*. Plant Biology Europe 2023, Marsylia, Francja, 07.07.2023.

**Ewelina Paluch-Lubawa**, Umesh Kumar Tanwar, **Ewelina Stolarska**, Magdalena Arasimowicz-Jelonek, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Genes involved in nitrogen remobilization during dark and light conditions in barley leaves*. Plant Biology Europe 2023, Marsylia, Francja, 07.07.2023

Umesh Kumar Tanwar, **Ewelina Stolarska**, Yufeng Guan, Magda Grabsztunowicz, Magdalena Arasimowicz-Jelonek, Otto Phanstiel IV, Per Gregersen, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Unraveling the genetics of polyamine transporters in barley for senescence-related crop improvement*. At the forefront of plant research 2023, Barcelona, Hiszpania 08-10.05.2023.

**Ewelina Paluch-Lubawa**, Magdalena Arasimowicz-Jelonek, Autar K.Mattoo, **Ewelina Stolarska**, Umesh Kumar Tanwar, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Polyamines - a novel molecular coordinator of nitro oxidative signaling in barley senescing leaf*. Redox Biology Congress 2022, Ghent, Belgia, 24-26.08.2022.

**Umesh Kumar Tanwar**, **Ewelina Stolarska**, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Genome-wide analysis of the polyamine oxidase gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their expression profiles under dark-induced leaf senescence*. PSEPB Conference, Katowice, Polska, 20-23.09.2021.

**Ewelina Stolarska**, Ewelina Paluch-Lubawa, Agnieszka Ostrowska-Mazurek, Lucyna Misztal, Ewa Sobieszczuk-Nowicka *Polyamine metabolism genes isolation and identification*. BioLOGIES, Poznań, Polska, 22-24.09.2020.

**Ewelina Stolarska**, Ewa Marzena Kalemba, Aleksandra Maria Staszak, Iwona Ciereszko *The role of photosynthetic pigments in seeds differing in resistance to desiccation*. Plant, Cellular and Molecular biology, Walencja, Hiszpania, 18-19.01.2019.

## Nagrody i wyróżnienia

Rok akademicki 2020/2021:

- Stypendium Rektora UAM
- Stypendium Projakościowe dla najlepszych doktorantów Wydziału Biologii UAM
- Stypendium Motywacyjne POWER w ramach projektu: Paszport do przyszłości - Interdyscyplinarne studia doktoranckie na Wydziale Biologii UAM POWR.03.02.00-00-1006/17

Rok akademicki 2021/2022:

- Stypendium Rektora UAM
- Rok akademicki 2021/2022 Stypendium Projakościowe dla najlepszych doktorantów Wydziału Biologii UAM
- Stypendium Motywacyjne POWER w ramach projektu: Paszport do przyszłości - Interdyscyplinarne studia doktoranckie na Wydziale Biologii UAM POWR.03.02.00-00-1006/17

Rok akademicki 2022/2023:

- Stypendium Rektora UAM w roku akademickim
- Rok akademicki 2022/2023 Stypendium Fundacji UAM
- Stypendium Motywacyjne POWER w ramach projektu: Paszport do przyszłości - Interdyscyplinarne studia doktoranckie na Wydziale Biologii UAM POWR.03.02.00-00-1006/17

Rok akademicki 2023/2024:

- Stypendium Projakościowe dla najlepszych doktorantów Wydziału Biologii UAM