

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Małgorzata Adamiec

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

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność: fizjologia roślin – Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu - 2007

Praca doktorska pt. „Status redoks puli plastochinonu jako sygnał pośredniczący w modulacji globalnego profilu ekspresji genów jądrowych *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na podwyższone natężenie światła”

Stopień naukowy magistra w zakresie biologii molekularnej –Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski - 2002

Praca magisterska pt.” Analiza aktywności transkrypcyjnej promotora genu *CTA1 Saccharomyces cerevisiae*”

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

Zatrudniona w:

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii; Eksperymentalnej, Zakład Fizjologii Roślin

- Adiunkt od 01.10.2008 – do chwili obecnej
- Specjalista od 01.03.2008 do 30.09.2008

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

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

M. Adamiec, J. Dobrogojski, Ł Wojtyła, R. Luciński

Stress-related expression of the chloroplast EGY3 pseudoprotease and its possible impact on chloroplasts' proteome composition.

DOI 10.3389/fpls.2022.965143 Frontiers in Plant Science 2022, 13

IF_{2020/2021} = 6,627 MEiN = 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji pracy i prowadzeniu badań. Wykonałam eksperymenty z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej (fig.3-6 oraz tab.1 i 2) oraz pomiarów fluorescencji chlorofilu (fig.10 i 11, oraz tab.3). Przeprowadziłam, we współpracy z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim doświadczeń z wykorzystaniem techniki western-blot (fig.2, 7 i 8). Uczestniczyłam również, we współpracy z dr. Łukaszem Wojtyłą oraz mgr. Jędrzejem Dobrogojskim, w oznaczeniach poziomu akumulacji nadtlenu wodoru (fig. 9). Wspólnie z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim dokonaliśmy analizy statystycznej i interpretacji wszystkich otrzymanych wyników. Przygotowałam manuskrypt.

M. Adamiec, M. Szomek, E. Gabała, J. Dobrogojski, L. Misztal, R. Luciński

Fatty acid composition and cpDNA content in *Arabidopsis thaliana* mutants deprived of Egy1 protease

DOI 10.32615/ps.2021.053 Photosynthetica 2021, 59 (4): 633-639

IF_{2020/2021} = 3,189 MEiN = 70

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy oraz we współpracy z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim, na projektowaniu wszystkich doświadczeń. Przeprowadziłam eksperymenty dokumentujące brak, w wyprowadzonych liniach mutantów insercyjnych, białka Egy1 (fig.1). Współpracowałam z mgr Marią Szomek przy wykonywaniu eksperymentów związanych z wizualizacją nukleoidów chloroplastowych (fig.3) oraz z dr Lucyną Misztal przy analizie wyników doświadczeń zmierzających do określenia zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w liściach *A. thaliana* (tab.1). Wspólnie z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim dokonałam interpretacji wszystkich otrzymanych wyników. Przygotowałam manuskrypt.*

Adamiec M, Misztal L, Ciesielska M, Luciński R

The changes of PSII supercomplex stoichiometry in *egy1* mutants are related to chlorophyll *b* deficiency

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy i współdziałale w projektowaniu wszystkich doświadczeń. Samodzielnie wykonałam doświadczenia zmierzające do określenia stosunków ilościowych w preparatach BBY mutantów egy1 i roślin typu dzikiego (fig.2). Brałam udział w wykonywaniu eksperymentów z wykorzystaniem techniki western-blot, których wyniki przedstawione zostały na figurach 4 i 5, oraz na figurze 7. Samodzielnie przeprowadziłam pomiary zawartości chlorofilu oraz karotenoidów (tab.1). Współpracowałam, z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim, przy wykonywaniu pomiarów maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II w warunkach fotoinhibicyjnych (zarówno w obecności linkomycyny jak i bez) oraz w fazie regeneracji (fig.6). Wspólnie z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim dokonaliśmy także interpretacji wyników eksperymentów. Przygotowałam manuskrypt.

Adamiec M, Misztal L, Kasproicz-Maluśki A, Luciński R.

EGY3: homolog of S2P protease located in chloroplasts.

Plant Biology 2020, 22:735-743; DOI 10.1111/plb.13087.doi: 10.1111/plb.13087

IF₂₀₂₀ = 3,081 MNiSW = 70,

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu we współpracy z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim, jej koncepcji, współdziałale w projektowaniu i wykonaniu doświadczeń. Brałam udział w wykonywaniu doświadczeń z wykorzystaniem techniki immunoblot, których wyniki przedstawione zostały na figurach 3, 5 i 7, a także eksperymentów prowadzących do potwierdzenia homozygotyczności linii mutantów, lokalizacji insercji DNA oraz braku ekspresji białka Egy3 w otrzymanych liniach (fig.1). Przeprowadziłam również analizę zawartości chlorofilu i karotenoidów, oraz parametrów związanych ze statusem funkcjonalnym fotosystemu II, których wyniki zebrane zostały w tabeli. 1. Wykonałam doświadczenia, których celem było określenie zmian ilościowych w kompleksach zespolonych błon tylakoidowych. Ich wyniki przedstawione zostały w pracy w postaci figury 7. Wspólnie z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim przeprowadziłam eksperymenty z linkomycyną zmierzające do określania wrażliwości analizowanych linii mutantów na fotoinhibicję i porównania tempa regeneracji fotosystemu II. We współpracy z prof. UAM dr. hab. Robertem Luciński dokonałam także interpretacji wyników. Przygotowałam manuskrypt.

Adamiec M, Misztal M, Kosicka E, Paluch – Lubawa E, Luciński R.

Arabidopsis thaliana egy2 mutants display altered expression level of genes encoding crucial photosystem II proteins.

Journal of Plant Physiology 2018, 231: 155–167; DOI: 10.1016/j.jplph.2018.09.010

IF₂₀₁₈ = 2,825 MNiSW = 35 (według systemu punktacji MNiSW obowiązującego do 2018 r.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu, we współpracy z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim, jej koncepcji oraz wykonywaniu doświadczeń. Wykonałam analizy zmierzające do określenia poziomu akumulacji proteazy Egy2 w homozygotycznych liniach mutantów egy2, a także porównawczą analizę fenotypową uzyskanych mutantów oraz roślin typu dzikiego (fig.2), analizę zawartości chlorofilu i karotenoidów, oraz analizy stanu funkcjonalnego fotosystemu II (tab.1, fig.3). Przeprowadziłam analizy poziomu akumulacji wybranych białek fotosystemu II (fig.5) oraz białek pTAC10 i pTAC16 (fig.10) w liniach mutantów egy2. Zbadałam poziom akumulacji białka PsbA w różnych czasach ekspozycji na wysokie natężenie światła (fig.6). Wykonałam eksperymenty obejmujące analizę zmian relacji stechiometrycznych pomiędzy kompleksami białkowymi w preparatach BBY (fig.7, tab.3). Byłam zaangażowana w analizę wyników pochodzących z elektroforezy dwukierunkowej pod kątem wytypowania plamek białkowych, których poziom akumulacji ulegał zmianie w obu analizowanych liniach mutantów (fig.9) oraz analizę danych otrzymanych w wyniku identyfikacji składu wytypowanych plamek białkowych metodą LC-MS/MS (tab.2). Wspólnie z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim dokonałam analizy wyników i interpretacji danych. Przygotowałam manuskrypt.

Adamiec M., Ciesielska M, Zalaś P, Luciński R.

Arabidopsis thaliana intramembrane proteases.

Acta Physiologiae Plantarum 2017, 39:146; DOI:10.1007/s11738-017-2445-2

IF₂₀₁₇ = 1,438 Punkty MNiSW: 25 (według systemu punktacji MNiSW obowiązującego do 2018 r.)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu jej koncepcji, opracowaniu i integracji dostępnych danych literaturowych. Wspólnie z prof. UAM dr. hab. Robertem Lucińskim przygotowałam manuskrypt.

IF sumaryczny 20,349;

MNiSW/MEiN: 370 w tym 60 pkt. według systemu punktacji MNiSW obowiązującego do 2018 r.

Omówienie:

Znaczenie proteaz Egy1 i Egy2 oraz pseudoproteazy Egy3 dla funkcjonowania chloroplastów Arabidopsis thaliana.

Moje osiągnięcie naukowe składa się z 5 oryginalnych prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej, z których wszystkie zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report. Celem moich badań było przybliżenie fizjologicznej roli chloroplastowych proteaz miejsca drugiego (S2P) oraz określenia ich funkcji w prawidłowym funkcjonowaniu tych organelli.

Proteazy S2P należą do grupy tak zwanych proteaz wewnątrzłonowych, które występują powszechnie u wszystkich organizmów żywych, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. Proteazy tego typu są silnie hydrofobowymi białkami, zawierającymi w swojej strukturze kilka domen transłonowych. W domenach tych zlokalizowane są motywy kluczowe dla ich aktywności proteolitycznej, a hydroliza wiązania peptydowego zachodzi w obrębie dwuwarstwy fosfolipidowej. Proteazy wewnątrzłonowe są zaangażowane w regulację ekspresji genów. Proces ten określany jest jako regulacyjna proteoliza wewnątrzłonowa (RIP) i polega na uwolnieniu, poprzez cięcie proteolityczne, zakotwiczonych w błonach biologicznych czynników transkrypcyjnych. Mechanizmy proteolityczne prowadzące do hydrolizy wiązania peptydowego są u proteaz wewnątrzłonowych zróżnicowane i stanowią kryterium podziału tej grupy białek na cztery rodziny: romboidy, preseniliny, peptydazy peptydu sygnałowego (SPP) oraz proteazy miejsca 2 (S2P). Informacje, dostępne w chwili rozpoczęcia przez nas badań, dotyczące wspomnianych czterech rodzin proteaz i występowania ich przedstawicieli u *Arabidopsis thaliana* zebrane zostały we włączonej do mojego osiągnięcia naukowego pracy przeglądowej (Adamiec i wsp. 2017).

Najliczniejszą rodzinę proteaz wewnątrzłonowych stanowią romboidy. Należą one do klasy proteaz serynowych charakteryzujących się obecnością w centrum katalitycznym reszty serynowej, której grupa hydroksylowa odpowiada za przeprowadzenie ataku nukleofilowego na karbonylowy atom węgla w wiązaniu peptydowym. Nukleofilowość reszty serynowej jest warunkowana obecnością w centrum katalitycznym innych reszt aminokwasowych. Najczęściej spotykanym układem obecnym w centrum aktywnym proteaz serynowych jest triada kwas asparaginowy – histydyna – seryna (Di Cera 2009), jednak romboidy prowadzą hydrolizę wiązania peptydowego opierając się na obecności w centrum katalitycznym diady seryna – histydyna (Lemberg i Freeman 2007). Mimo wspólnego mechanizmu proteolitycznego, romboidy pozostają proteazami o niejednorodnej topologii i strukturze

pierwszorzędowej, co sprawia, że są one trudne do sklasyfikowania. Wyróżnia się dwie podrodziny romboidów: proteazy typu PARL i sekretazy. Wśród sekretaz wyróżnia się z kolei sekretazy typu A i typu B. Jednak wiele romboidów wykazuje cechy białek należących do obu tych typów i określanych jest jako sekretazy mieszane (Lemberg i Freeman 2007). Szczegóły tego podziału opisaliśmy, wspólnie ze współautorami, w pracy przeglądowej włączonej do mojego osiągnięcia naukowego (Adamiec i wsp. 2017).

Preseniliny i SPP należą do proteaz aspartylowych. Charakterystyczną cechą tej klasy proteaz jest obecność w centrum katalitycznym reszt kwasu asparaginowego. Odpowiadają one za wiązanie i aktywację cząsteczki wody, która następnie przeprowadza atak nukleofilowy na wiązanie peptydowe (Northrop 2001). Proteazy należące do obu tych rodzin charakteryzują się nie tylko podobną strukturą miejsca katalitycznego, ale również zbliżoną topologią, cechującą się obecnością 9 domen transbłonowych (Wang i wsp. 2006). Proteazy należące do obu tych rodzin różnią się jednak od siebie orientacją w błonie biologicznej. Charakterystyczną cechą presenilin jest ekspozycja N-końca sekwencji białkowej do cytozolu, podczas gdy u SPP w cytozolu znajduje się C-końcowy odcinek sekwencji (Erez i wsp. 2009). Co więcej, proteazy SPP funkcjonują niezależnie, preseniliny natomiast wchodzą w skład kompleksów enzymatycznych (Erez i wsp. 2009).

Ostatnią grupę proteaz wewnątrzłonowych stanowią proteazy S2P, na których były skupione moje badania. Proteazy te należą do metaloproteaz cynkowych. W centrum katalitycznym tego typu enzymów obecny jest jon cynku, którego rolą jest aktywacja cząsteczki wody biorącej udział w ataku nukleofilowym na węgiel grupy karbonylowej wiązania peptydowego (Erez i wsp. 2009). W swojej strukturze proteazy S2P posiadają co najmniej 4 domeny wewnątrzłonowe. Odpowiedzialny za wiązanie jonu cynku motyw HExxH zlokalizowany jest najczęściej w pierwszej z tych domen (Feng i wsp. 2007). Obok motywu wiążącego jon cynku do aktywności proteolitycznej S2P niezbędny jest także drugi motyw zaangażowany w stabilizację jonu – NxxPxxxxDG, który zlokalizowany jest zazwyczaj w obrębie trzeciej domeny transbłonowej. U *A. thaliana*, która była obiektem moich badań, zidentyfikowano 5 genów kodujących proteazy S2P oraz jeden gen kodujący pseudoproteazę, nieaktywne proteolitycznie białko o sekwencji aminokwasowej charakteryzującej się wysokim stopniem podobieństwa do sekwencji aminokwasowej proteaz z tej rodziny. Spośród wspomnianych 6 genów, 5 koduje białka zlokalizowane w chloroplastach, jeden natomiast proteazę zlokalizowaną w aparacie Golgiego (Adamiec i wsp. 2017). Moje badania skupione były na trzech białkach chloroplastowych, a mianowicie na aktywnych proteolitycznie białkach

Egy1 i Egy2 oraz pozbawionej, kluczowego dla aktywności proteolitycznej motywu wiążącego jon cynku, pseudoproteazie Egy3.

Proteaza Egy1 była pierwszą proteazą wewnątrzbłonową zidentyfikowaną u roślin. Jej brak prowadzi, w młodych siewkach *A. thaliana*, do ograniczenia zależnej od etylenu reakcji grawitropijnej oraz do pogłębiającej się wraz z wiekiem roślin żółto-zielonej pigmentacji liści rozety. W oparciu o te charakterystyczne zmiany fenotypowe mutantów pozbawionych tego białka proteazę tę nazwano Egy1 (ang. *ethylen-dependent gravitropism deficient and yellow-green*) (Chen i wsp. 2005). Żółto-zielona barwa liści mutantów *egy1* związana jest z zaburzonym rozwojem chloroplastów, w których zaobserwowano znacząco mniejszą liczbę tylakoidów gran oraz zmiany w poziomie akumulacji białek LHCII (Chen i wsp. 2005). Mutanty *egy1* wykazują także szereg cech wskazujących na wcześniejsze starzenie. Należą tu wcześniejszy spadek zawartości chlorofilu oraz maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II (F_v/F_m), zmniejszona zawartość białek rozpuszczalnych i zwiększony poziom wycieku elektrolitów, a w konsekwencji krótszy czas życia pojedynczych liści. Zaobserwowano również podwyższony poziom ekspresji genów, które uważane są za związane z procesem starzenia: *SAG12* (ang. *senescence-associated gene 12*), *SAG24* (ang. *senescence-associated gene 24*) i *SEN4* (ang. *senescence 4*) (Chen i wsp. 2016). Część z obserwowanych symptomów wcześniejszego starzenia może jednak zostać ograniczona w wyniku suplementacji glukozą (Chen i wsp. 2016). Proteaza Egy1 zaangażowana jest także w regulację ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres amonowy (Li i wsp. 2012) i utrzymanie homeostazy fosforanowej (Yu i wsp. 2016). W obu tych mechanizmach regulacyjnych istotną rolę pełni kwas abscysynowy (Li i wsp. 2012; Yu i wsp. 2016), jednak dokładne szlaki sygnalizacyjne zależne od Egy1 pozostają nieznane.

Do badań nad rolą proteazy Egy1 w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania chloroplastów korzystaliśmy, razem z pozostałymi współwykonawcami eksperymentów, z dwóch, niezależnie wyprowadzonych i komercyjnie dostępnych, linii mutantów insercyjnych *A. thaliana*: SALK_134931 (*egy1-2*) and SALK_061494 (*egy1-3*). Przed rozpoczęciem właściwych eksperymentów linie te zostały zweryfikowane pod względem homozygotyczności i dokładnej lokalizacji insercji T-DNA. Potwierdziliśmy także brak samego białka Egy1 w chloroplastach otrzymanych linii mutantów.

W obu badanych liniach mutantów *egy1*, zaobserwowaliśmy obniżony poziom całkowitego chlorofilu oraz podwyższony stosunek chlorofilu *a/b*. Wyniki te były zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi i stały się przesłanką do przeprowadzenia eksperymentów zmierzających do określenia roli proteazy Egy1 w utrzymaniu prawidłowych

stosunków stechiometrycznych białek fotosystemu II i wydajności funkcjonowania tego kompleksu. Obie analizowane linie mutantów charakteryzowały się obniżonym poziomem akumulacji superkompleksów PSII, trimerów LHCII oraz monomerów białek LHCII. Podwyższoną akumulację zaobserwowano z kolei w przypadku monomerów PSII oraz kompleksu syntazy ATP (Adamiec i wsp. 2021a). Uzyskane przez nas wyniki przeczą tezie, że pogłębiające się z wiekiem żółknięcie liści rozetowych u mutantów *egy1 A. thaliana* jest jednym z symptomów wcześniejszego starzenia. W procesie naturalnego starzenia *A. thaliana* poziom trimerów LHCII pozostaje bowiem stabilny i dochodzi do obniżenia stosunku chlorofilu *a/b* (Nath i wsp. 2013), podczas gdy u mutantów pozbawionych proteazy Egy1 obserwujemy sytuację odwrotną – spadek poziomu LHCII i wzrost stosunku chlorofilu *a/b*. Porównawcza analiza ilościowa poziomu poszczególnych białek Lhcb1-6 wykazała, że w obu liniach mutantów *egy1* obniżony był poziom białek Lhcb1, Lhcb2, Lhcb4 i Lhcb6. Poziom białek Lhcb3 i Lhcb5 pozostawał natomiast niezmienny. Wzór zmian w relacjach stechiometrycznych białek Lhcb1-6 w mutantach *egy1*, pokrywał się w dużym stopniu ze wzorem zmian obserwowanym wcześniej u mutantów pozbawionych chlorofilu *b* (Kim i wsp. 2009a). Wynik ten, razem z podwyższonym stosunkiem chlorofilu *a/b* obserwowanym w badanych liniach mutantów, wskazuje na niedobór chlorofilu *b* w mutantach *egy1*. Enzymem kluczowym dla biosyntezy chlorofilu *b* jest oksigenaza chlorofilidu *a* (CAO) (Kim i wsp. 2009b), jednak poziomu akumulacji tego enzymu w liniach mutantów *egy1* pozostawał zbliżony do obserwowanego u roślin typu dzikiego (Adamiec i wsp. 2021a). Dla wyjaśnienia roli proteazy Egy1 w utrzymaniu prawidłowego poziomu chlorofilu *b* konieczne będą więc dalsze badania.

W liniach mutantów *egy1* zaobserwowaliśmy również znaczny wzrost poziomu akumulacji białka PsbA oraz zwiększoną liczbę monomerów PSII (Adamiec i wsp. 2021a). Białko PsbA jest szczególnie wrażliwym na trwałe uszkodzenia, wywołane nadmiernym natężeniem światła, komponentem centrum reakcji PSII, co w konsekwencji prowadzi do fotoinhibicji całego PSII. Uszkodzone białko PsbA jest usuwane z superkompleksu PSII, a na jego miejsce wprowadzana jest nowo zsyntetyzowana kopia. Proces ten wymaga demontażu znacznej części kompleksu PSII, a następnie jego ponownego złożenia. Degradacja uszkodzonego PsbA jest procesem złożonym i wieloetapowym, w który zaangażowane są między innymi proteazy z rodziny Deg i FtsH (Järvi i wsp. 2015). Wobec wzrostu poziomu akumulacji białka PsbA oraz monomerów PSII u mutantów *egy1*, uzasadniona wydała się więc analiza wrażliwości PSII na fotoinhibicję oraz tempa jego regeneracji po ustąpieniu warunków fotoinhibicyjnych. W tym celu wykonaliśmy pomiary zmian maksymalnej wydajności

kwantowej PSII (F_v/F_m) w liściach mutantów *egy1* i roślin typu dzikiego w trakcie ich ekspozycji na wysokie natężenie światła ($1000 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$). Eksperyment przeprowadzony był zarówno w obecności linkomycyny, która jest inhibitorem biosyntezy białek chloroplastowych jak i bez jej obecności. Zastosowanie tego inhibitora uniemożliwia naprawę uszkodzonych kompleksów PSII, poprzez wprowadzenie do nich zsyntetyzowanego *de novo* białka PsbA. Zarówno w wariancie eksperymentalnym bez linkomycyny jak i jej w obecności, spadek parametru F_v/F_m w mutantach *egy1* był głębszy niż u roślin typu dzikiego, co wskazuje na ich większą wrażliwość na fotoinhibicję. Aby ocenić czy zwiększona wrażliwość mutantów *egy1* jest wynikiem zwiększonej fotodezaktywacji PSII obie linie mutantów oraz rośliny typu dzikiego eksponowaliśmy na wysokie natężenie światła, w ten sposób, aby wywołać podobny poziom fotoinhibicji (wyrażony zbliżoną wartością parametru F_v/F_m). Następnie rośliny przeniesione zostały na światło o standardowym natężeniu w celu umożliwienia regeneracji PSII. Wzrost parametru F_v/F_m był u mutantów *egy1* niższy również w tym wariancie eksperymentalnym, co wskazuje na niższą wydajność procesu naprawy PSII (Adamiec i wsp. 2021a). Przeprowadziliśmy również ilościową analizę poziomu akumulacji wybranych proteaz zaangażowanych w obrót metaboliczny białka PsbA i zaobserwowaliśmy niższą zawartość proteazy Deg1, co może stanowić jedną z przyczyn obniżonej efektywności regeneracji PSII (Adamiec i wsp. 2021a).

Innym podjętym wątkiem badawczym związanym z funkcją proteazy Egy1 była próba określenia jej roli w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania szlaków biosyntezy kwasów tłuszczowych u *A. thaliana*. Proteaza ta wykazuje stosunkowo wysoką homologię ze ssaczą proteazą z rodziny S2P, która poprzez uwalnianie z błony aparatu Golgiego czynnika transkrypcyjnego SREBP (ang. sterol-regulatory element binding protein), zaangażowana jest w regulację biosyntezy kwasów tłuszczowych (Rawson 2013). Co więcej, w młodych siewkach mutantów *A. thaliana* zaobserwowano obniżony poziom lipidów i obniżony stosunek 18-sto węglowych kwasów tłuszczowych do 16-sto węglowych kwasów tłuszczowych (C18/C16). Przeprowadzona w trakcie naszych badań analiza zmian w kompozycji kwasów tłuszczowych u czterotygodniowych mutantów *egy1* wykazała obniżony poziom akumulacji głównie nienasyconych kwasów tłuszczowych, zarówno 16-sto jak i 18-sto węglowych. Jedynie w przypadku kwasu α -linolenowego (18:3) zaobserwowaliśmy znaczący wzrost jego zawartości, co ze względu na jego obfitość w błonach *A. thaliana* spowodowało, w czterotygodniowych mutantach *egy1*, podwyższenie całkowitego stosunku C18/C16. Nie zaobserwowaliśmy natomiast zmian w zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych.

W komórkach *A. thaliana* istnieją dwie ścieżki desaturacji kwasów tłuszczowych, z których pierwsza zlokalizowana jest w chloroplastach, druga natomiast w retikulum endoplazmatycznym. Desaturacja 16-sto węglowych kwasów tłuszczowych odbywa się wyłącznie w chloroplastach, podczas gdy 18-sto węglowe kwasy tłuszczowe mogą podlegać desaturacji z wykorzystaniem obu szlaków (Afitlhile i wsp. 2015). Obserwowane zmiany poziomu akumulacji poszczególnych nienasyconych kwasów tłuszczowych mogą wynikać z zaburzeń w funkcjonowaniu chloroplastów mutantów *egy1*, które są następstwem słabo rozwiniętego systemu błon wewnętrznych. Nieprawidłowość ta może niekorzystnie wpływać na aktywność chloroplastowych desaturaz. Konsekwencją tej sytuacji może być większa aktywność szlaku desaturacji kwasów tłuszczowych zlokalizowanego w retikulum endoplazmatycznym, którego końcowym produktem jest kwas α -linolenowy (Adamiec i wsp. 2021b).

Kolejnym podjętym zagadnieniem badawczym było określenie czy zaburzenia w rozwoju chloroplastów, wynikające z braku proteazy *Egy1*, powodują zmiany w ilości nukleoidów chloroplastowych. Chloroplasty *egy1* charakteryzują się słabo rozwiniętym systemem błon wewnętrznych, natomiast w chloroplastach dorosłych roślin *A. thaliana* typu dzikiego, znaczna część nukleoidów pozostaje związana z błonami tylakoidowymi, co jest istotne w procesie replikacji i naprawy chloroplastowego DNA (cpDNA) (Oldenburg i Bendich 2015). W literaturze nie było jednak doniesień dotyczących zawartości cpDNA w chloroplastach mutantów *egy1*. Analizy przeprowadzone zostały dwoma niezależnymi metodami, z których pierwsza wykorzystywała transmisyjną mikroskopię elektronową, druga natomiast fluorescencyjną mikroskopię konfokalną. Pierwsza z tych metod pozwoliła na wizualną ocenę liczby obszarów nukleoidopodobnych na uzyskanych zdjęciach chloroplastów. Zastosowanie drugiej metody pozwoliło nam z kolei określić natężenia i stopień kolokalizacji sygnałów fluorescencyjnych pochodzących z chlorofilu oraz kompleksu DAPI – cpDNA. Wykazaliśmy, że brak proteazy *Egy1* powodował nie tylko znaczny spadek sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z kompleksu DAPI – cpDNA, ale również istotne obniżenie stopnia kolokalizacji obu sygnałów fluorescencyjnych. Otrzymane wyniki wskazują nie tylko na niższą zawartość cpDNA w chloroplastach mutantów *egy1*, ale także na fakt, że dużo większa frakcja nukleoidów pozostaje niezwiązana z błonami tylakoidowymi (Adamiec i wsp. 2021b).

Wyniki badań nad proteazą *Egy1* zostały opublikowane w formie dwóch oryginalnych prac badawczych w czasopiśmie „Photosynthetica”.

Egy2 jest kolejną zlokalizowaną w chloroplastach proteazą z rodziny S2P, której dotyczyły prowadzone badania. Nazwę nadano tej proteazie przez analogię do Egy1, ze względu na wysokie podobieństwo sekwencji genów kodujących oba białka. Jednak mutanty pozbawione proteazy Egy2 nie wykazują wyraźnych zmian fenotypowych w stosunku do roślin typu dzikiego. Wykazano jedynie, że siewki mutantów *egy2* charakteryzują się krótszą długością hypocotyli i obniżonym poziomem kwasów tłuszczowych, co może wynikać z obniżonego poziomu akumulacji enzymów zaangażowanych w biosyntezę kwasów tłuszczowych takich jak: białkowy nośnik grup acylowych (ACP1) i podjednostki kompleksu plastydowej karboksylazy acetylo-koenzymu A – CAC2 i BCCP1 (Chen i wsp. 2012). Badania prowadzone były jednak głównie na młodych siewkach *A. thaliana*, co skłoniło nas do podjęcia badań nad rolą proteazy Egy2 w chloroplastach dorosłych roślin.

Podobnie jak w przypadku badań nad proteazą Egy1, badania nad fizjologiczną rolą proteazy Egy2 prowadziliśmy, wraz ze współwykonawcami doświadczeń na dwóch niezależnie wyprowadzonych liniach mutantów insercyjnych. Były to linie SALK_028514C (*egy2-3*) oraz SALK_093297C (*egy2-5*). Oprócz potwierdzenia homozygotyczności i lokalizacji insercji T-DNA w badanych liniach mutantów *egy2* z wykorzystaniem, uzyskanych we współpracy z firmą Agrisera, przeciwciał anti-Egy2 potwierdzony został również brak samej proteazy w obu liniach mutantów.

Analiza stanu funkcjonalnego PSII w trakcie ekspozycji na standardowe natężenie światła ($150 \mu\text{moli kwantów światła} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) wykazała, że mutanty *egy2* charakteryzują się podwyższonym poziomem fluorescencji minimalnej (F_0) oraz niefotochemicznego wygaszania fluorescencji (NPQ). Nie obserwowaliśmy natomiast różnic w pozostałych analizowanych parametrach takich jak maksymalna wydajność fotosystemu II (F_v/F_m) oraz fotochemiczne wygaszanie fluorescencji (q_p). Określiśmy również stopień wrażliwości PSII w mutantach *egy2* na fotoinhibicję. Przeprowadzony w tym celu eksperyment przebiegał podobnie do badań przeprowadzonych z wykorzystaniem mutantów *egy1* i polegał na serii pomiarów parametru F_v/F_m , wykonywanych w trakcie ekspozycji roślin na wysokie natężenie światła w obecności linkomycyny oraz bez zastosowania tego inhibitora. W obu wariantach eksperymentalnych, dla obu linii mutantów *egy2*, obserwowaliśmy większe spadki parametru F_v/F_m . Prowadzone, po ponownym przeniesieniu roślin do standardowego natężenia światła, badania tempa regeneracji PSII wykazały natomiast, że u mutantów pozbawionych proteazy Egy2 przebiega ona szybciej (Adamiec i wsp. 2018). Obserwowane zmiany stały się przesłanką do analiz stechiometrycznych relacji superkompleksów PSII, a także do porównania poziomu akumulacji wybranych białek PSII w mutantach *egy2* i u roślin typu dzikiego. Zaobserwowaliśmy, że brak

proteazy Egy2 prowadzi do podwyższonego poziomu superkompleksów $C_2S_2M_2$ złożonych z dimeru kompleksu rdzeniowego PSII (C_2) oraz przyłączonych do niego 4 trimerów LHCII, z których dwa pozostają silnie zasocjowane z kompleksem rdzeniowym (S_2), dwa natomiast asocjują z kompleksem rdzeniowym ze średnią siłą (M_2). Zwiększony poziom akumulacji wykazywały także inne formy superkompleksów PSII, a mianowicie warianty typu C_2S_2M oraz C_2S_2 . Z kolei monomery PSII występowały w mniejszej ilości (Adamiec i wsp. 2018). Przeprowadziliśmy również analizę zmian poziomu akumulacji pojedynczych, wybranych białek PSII w mutantach *egy2*. Nie zaobserwowaliśmy zmian w ilości kodowanych jądrowo białek Lhcb1-6, jednak różnice w poziomie akumulacji pojawiły się w przypadku trzech białek kodowanych w genomie chloroplastowym: PsbA, PsbC i PsbD. Ilość PsbA, stanowiącego jedno z dwóch białek centrum reakcji PSII, była wyraźnie podwyższona w porównaniu do zawartości tego białka w roślinach typu dzikiego. Drugie z białek centrum reakcji PSII - PsbD występowało natomiast w mniejszej ilości, podobnie jak wchodzące w skład wewnętrznego kompleksu antenowego CP43 białko PsbC. Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem techniki real-time PCR, pozwoliły z kolei określić, że zmiany poziomu akumulacji tych białek mocno korelują ze zmianami na poziomie ekspresji kodujących je genów chloroplastowych. Obserwowaliśmy wyższy, w stosunku do roślin typu dzikiego, poziom ekspresji genu *PSBA* oraz spadek poziomu ekspresji genów *PSBC* i *PSBD*, które pozostają pod kontrolą wspólnego operonu (Adamiec i wsp. 2018). Otrzymany wynik wskazuje na zaangażowanie proteazy Egy2 w regulację ekspresji genów chloroplastowych. Za transkrypcję operonów *PSBA* i *PSBC/D* odpowiada kompleks plastydowej polimerazy RNA (PEP). Przeprowadziliśmy całościową analizę porównawczą proteomu chloroplastowego, która wykazała, że w błonach tylakoidowych mutantów *egy2* akumulują się między innymi dwa białka oddziałujące z kompleksem PEP, mianowicie pTAC10 i pTAC16. Wzrost poziomu akumulacji białek pTAC10 i pTAC16 w błonach tylakoidowych mutantów *egy2* potwierdziliśmy również metodą immunoblot. Jest więc prawdopodobne, że proteaza Egy2 może uczestniczyć w regulacji poziomu ekspresji genów: *PSBA*, *PSBC* i *PSBD*, poprzez uwalnianie z błony tylakoidowej białek pTAC10 i pTAC16 (Adamiec i wsp. 2018).

Powyższe wyniki zostały opublikowane w formie oryginalnej pracy badawczej w czasopiśmie *Journal of Plant Physiology*. Było to pierwsze doniesienie dotyczące potencjalnych substratów proteazy Egy2.

Poza eksperymentami zmierzającymi do przybliżenia fizjologicznej roli i mechanizmów działania proteaz Egy1 i Egy2, podjęliśmy także badania dotyczące białka, które mimo dużego podobieństwa sekwencji do proteaz z rodziny S2P jest nieaktywne

proteolitycznie. Brak tej aktywności wynika z nieobecności w sekwencji białka Egy3 motywu wiążącego jon cynku (HExxH). Drugi, kluczowy dla aktywności proteaz S2P motyw jest wprawdzie obecny, jednak ze względu na substytucję reszty kwasu asparaginowego resztą kwasu glutaminowego (NxxPxxxxEG) pozostaje nieaktywny (Adamiec i wsp. 2020). Na podstawie sekwencji Egy3 programy predykcyjne określiły lokalizację tego białka jako chloroplastową, nie było jednak żadnego dowodu eksperymentalnego potwierdzającego te przewidywania. Pierwszym krokiem było więc przeprowadzenie eksperymentów potwierdzających chloroplastową lokalizację Egy3. W tym celu transformowaliśmy protoplasty *A. thaliana* konstruktem niosącym gen kodujący białko fuzyjne EGY3-GFP, a następnie z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej określiliśmy stopień kolokalizacji sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z białka GFP oraz autofluorescencji chlorofilu. Wysoka kolokalizacja obu sygnałów jednoznacznie wykazała, że pseudoproteaza Egy3 zlokalizowana jest w chloroplastach. Chloroplastową lokalizację tego białka potwierdziliśmy również serią eksperymentów z wykorzystaniem techniki immunoblot oraz preparatów białka całkowitego, białka chloroplastowego oraz białek wyizolowanych z frakcji chloroplastowych: stromy, błon tylakoidowych oraz błon otoczki chloroplastowej. Te badania pozwoliły dodatkowo określić, że białko Egy3 zlokalizowane jest w błonie tylakoidowej (Adamiec i wsp. 2020). Kolejne eksperymenty prowadziłam, razem ze współwykonawcami, na dwóch, niezależnie wyprowadzonych, liniach mutantów niosących insercję T-DNA w genie kodującym Egy3: SALK_128120 (*egy3-1*) i SALK_042231 (*egy3-2*). Przed rozpoczęciem właściwych doświadczeń potwierdziliśmy zarówno lokalizację insercji T-DNA jak i homozygotyczność tych linii, a także z wykorzystaniem przeciwciał anti-Egy3, wyprodukowanych przy współpracy z firmą Agrisera, brak samej pseudoproteazy w obu liniach mutantów (Adamiec i wsp. 2020). Wyniki badań z wykorzystaniem mutantów *egy3* nie były wcześniej dostępne w literaturze.

Analizy fenotypowe nie wykazały różnic pomiędzy mutantami *egy3*, a roślinami typu dzikiego hodowanymi w standardowych warunkach laboratoryjnych. Nie zaobserwowaliśmy też różnic w stężeniach chlorofilu *a* i *b*, czy karotenoidów. Analiza stanu funkcjonalnego fotosystemu II metodą modulowanej fluorescencji chlorofilu *a*, również nie wykazała znaczących różnic w jego funkcjonowaniu, poza podwyższonym poziomem nefotochemicznego wygaszania fluorescencji (NPQ). Parametry odzwierciedlające maksymalną wydajność kwantową PSII (F_v/F_m) i poziom fluorescencji minimalnej (F_0) pozostawały na podobnym poziomie, co w roślinach typu dzikiego. Na podstawie pomiarów przeprowadzonych w warunkach ekspozycji roślin na wysokie natężenie światła stwierdziliśmy też, że w mutantach *egy3* wrażliwość PSII

na fotoinhibicję nie różniła się znacząco od obserwowanej w roślinach typu dzikiego. Brak zmian w parametrach określających status funkcjonalny PSII, zarówno w warunkach standardowego natężenia światła jak i w warunkach fotoinhibicyjnych, pozwala przypuszczać, że zaobserwowany wzrost wartości parametru NPQ nie wynikał z procesów zachodzących na poziomie centrów reakcji PSII, lecz był raczej powodowany procesami zachodzącymi w obrębie anten energetycznych, takimi jak podwyższona aktywność cyklu ksantofilowego czy protonacją białek kompleksów antenowych (Adamiec i wsp. 2020). Przeprowadziliśmy również eksperymenty, które pozwoliły określić tempo regeneracji PSII mutantów *egy3* po ustąpieniu warunków fotoinhibicyjnych i wykazaliśmy, że brak białka Egy3 prowadzi do obniżenia tempa naprawy PSII. Wydajność tego procesu jest ściśle uzależniona od szybkości degradacji fotouszkodzonego białka PsbA i zastąpienia go przez nowo zsyntetyzowaną kopię. W ten proces zaangażowane są między innymi proteazy Deg1 oraz FtsH2/8. Wykazaliśmy, że poziom akumulacji tych proteaz jest u mutantów *egy3* obniżony, co może stanowić jedną z przyczyn wolniejszego tempa regeneracji PSII (Adamiec i wsp. 2020).

Mimo iż w standardowych warunkach laboratoryjnych brak pseudoproteazy Egy3 nie powoduje, u *A. thaliana*, znaczących zmian fenotypowych, białko to jest silnie konserwowane w komórkach roślinnych. Z informacji zamieszczonych w transkrypcyjnych bazach danych wynika również, że gen kodujący Egy3 ulega silnej ekspresji w odpowiedzi na stres wysokiej temperatury (Winter i wsp. 2007). Na podstawie tych przesłanek podjęliśmy badania zmierzające do przybliżenia roli pseudoproteazy Egy3 w warunkach stresu abiotycznego. Wyniki badań wstępnych potwierdziły, że u roślin typu dzikiego, zarówno ekspresja genu kodującego Egy3, jak i poziom samego białka silnie wzrastają w warunkach ekspozycji na wysoką temperaturę (40°C) i wysokie natężenie światła (1000 $\mu\text{moli} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$). Największy wzrost poziomu ekspresji genu dla obu analizowanych stresów zaobserwowaliśmy po 1h i 3h ekspozycji na dany czynnik stresowy. Poziom akumulacji pseudoproteazy Egy3, był natomiast podwyższony po 1h, 3h i 6h w odpowiedzi na działanie obu warunków stresowych (Adamiec i wsp. 2022).

Prowadziliśmy również badania nad funkcjonowaniem PSII u mutantów *egy3* w warunkach ekspozycji na wysokie natężenie światła oraz wysoką temperaturę. Analizowaliśmy takie parametry jak: fluorescencja minimalna (F_0), maksymalna wydajność kwantowa fotosystemu II (F_v/F_m), fotochemiczne wygaszanie fluorescencji (q_p) oraz niefotochemiczne wygaszanie fluorescencji (NPQ) w różnych wariantach czasowych ekspozycji na warunki stresowe (1h, 3h, 6h oraz 24h ekspozycji). Te same warianty czasowe zastosowaliśmy w obu stresach. Nie zaobserwowaliśmy jednak istotnych różnic w funkcjonowaniu PSII pomiędzy

mutantami *egy3*, a roślinami typu dzikiego, ani w odpowiedzi na wysoką temperaturę, ani w odpowiedzi na wysokie natężenie światła (Adamiec i wsp. 2022).

W kolejnych eksperymentach przeprowadzaliśmy analizę porównawczą proteomu chloroplastowego roślin typu dzikiego oraz dwóch linii mutantów *egy3*.

W oparciu o wyniki wcześniejszych badań, dla obu czynników stresowych, jako wariant czasowy, w którym prowadzone będą dalsze analizy, wybraliśmy 3h ekspozycji. Eksperymenty wykonaliśmy na roślinach poddanych ekspozycji na wysoką temperaturę lub wysokie natężenie światła przez 3h. Rozdziały elektroforetyczne prowadziliśmy osobno dla rozpuszczalnych białek frakcji stromy oraz dla frakcji białek błonowych. Wśród białek frakcji stromy, których poziom akumulacji w warunkach ekspozycji na wysoką temperaturę był zależny od obecności *Egy3*, zidentyfikowaliśmy: izomerazę triozofosforanową, „białko podobne do czynnika akumulacji RubisCO”, które jest prawdopodobnie zaangażowane w składanie tego enzymu (Vitlin-Gruber i Feiz 2018), związane z metabolizmem glicyny białko *Acr11* (Sung i wsp. 2011) oraz białka dekarboksylazy glicyny P1 i P2. Kompleks dekarboksylazy glicyny jest zlokalizowanym w mitochondriach enzymem zaangażowanym w cykl fotorespiracji, jednak podjednostki P tego kompleksu są zlokalizowane również w chloroplastach (Zybailov i wsp. 2008; Ferro i wsp. 2010). Białko dekarboksylazy glicyny P1 zidentyfikowaliśmy również jako białko stromy, którego poziom akumulacji jest zależny od *Egy3* w warunkach ekspozycji na podwyższone natężenie światła. W tej grupie znalazły się również: transferaza glutationowa *Gstu20*, chloroplastowe białko szoku cieplnego *Hsc70-2* oraz zaangażowane w fałdowanie RubisCO białko opiekuńcze *Cpn60A* (Gutteridge i Gatenby 1995). Według bazy danych STRING białka *Hsc70-2* i *Cpn60A* wykazują wysoki poziom koekspresji nie tylko w komórkach *A. thaliana*, ale również w komórkach innych organizmów i oddziałują z białkiem *Gun1*, które pełni kluczową rolę w rozwoju chloroplastów i komunikacji retrogradowej plastyd-jądro (Colombo i wsp. 2016; Szklarczyk i wsp.). Z kolei we frakcji białek błonowych mutantów *egy3*, w wyniku ekspozycji na wysoką temperaturę, zmieniony poziom akumulacji obserwowaliśmy dla białek: *PsaD-2* (które jest białkiem o bardzo wysokim podobieństwie sekwencji do białka centrum reakcji fotosystemu I – *PsaD-1*), ferrochelatazy 2 (uważanej za zaangażowaną w retrogradową regulację związanych z fotosyntezą genów kodowanych przez genom jądrowy (Woodson i wsp. 2011)) oraz podjednostki F kompleksu ATPazy.

W odpowiedzi na wysokie natężenie światła, we frakcji białek błonowych, brak pseudoproteazy *Egy3* spowodował z kolei zmianę poziomu akumulacji *Ndh-M* (stanowiącego podjednostkę kompleksu dehydrogenazy NADH zaangażowanego w cykliczny transport elektronów w obrębie PSI), *PsaB* (stanowiącego centrum reakcji fotosystemu I), *Lhcb6* (białka

mniejszościowego kompleksu antenowego CP24 PSII), podjednostki E kompleksu ATPazy oraz białka Pde334 (również zaangażowanego w proces syntezy ATP (Berardini i wsp. 2015)) (Adamiec i wsp. 2022).

Zmiany poziomu akumulacji białek PsaB i białek GldP przeanalizowaliśmy również z wykorzystaniem techniki immunoblot. Należy jednak zaznaczyć, że zastosowane przeciwciała anty-GldP były specyficzne zarówno dla białka GldP1 jak i GldP2. Zarówno poziom białka PsaB jak i puli białek GldP był niższy w obu liniach mutantów *egy3* zarówno w odpowiedzi na 3h ekspozycję na wysoką temperaturę jak i na wysokie natężenie światła. Otrzymane wyniki wskazują, że dalsze badania nad fizjologiczną rolą *Egy3* powinny skupiać się wokół funkcjonowania fotosystemu I i reakcjach niezależnej od światła fazy fotosyntezy (Adamiec i wsp. 2022).

W trakcie trwania naszych badań nad fizjologiczną rolą pseudoproteazy *Egy3* pojawiło się doniesienie o zaangażowaniu tego białka w odpowiedź na stres solny i jego uczestnictwie w regulacji stężenia nadtlenu wodoru poprzez stabilizację chloroplastowej, miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenu wodoru (Csd2) (Zhuang i wsp. 2021). Kierując się tą informacją podjęliśmy również wątek badawczy zmierzający do ustalenia roli pseudoproteazy *Egy3* w regulacji poziomu nadtlenu wodoru w odpowiedzi na wysokie natężenie światła i wysoką temperaturę. Analizy wykonaliśmy trzema różnymi metodami: poprzez barwienie DAB, pomiar spektrofotometryczny z wykorzystaniem DAB oraz metodą tytanową. Wyniki eksperymentów z wykorzystaniem wszystkich trzech metod były zbieżne i wykazały niższe stężenie nadtlenu wodoru w komórkach mutantów *egy3* w odpowiedzi na oba stresy, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi zmian w poziomie nadtlenu wodoru w warunkach stresu solnego. Przeprowadziliśmy również badania zmian poziomu akumulacji Csd2 w mutantach *egy3* po 3h ekspozycji na oba analizowane stresy. W odpowiedzi na wysokie natężenie światła poziom akumulacji Csd2 był w obu liniach mutantów *egy3* niższy niż u roślin typu dzikiego, jednak w odpowiedzi na wysoką temperaturę nie zaobserwowaliśmy istotnie statystycznych zmian w poziomie akumulacji tego enzymu. Sugeruje to istnienie innych niż stabilizacja Csd2, zależnych od pseudoproteazy *Egy3*, mechanizmów regulujących stężenie nadtlenu wodoru w odpowiedzi na stres wysokiej temperatury.

Podsumowując, artykuły składające się na moje osiągnięcie naukowe wnoszą, w mojej ocenie, istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczący funkcji proteaz chloroplastowych *Egy1*, *Egy2* oraz pseudoproteazy *Egy3*. Za szczególnie istotne uznaję:

- wykazanie, że proteaza Egy1 jest zaangażowana w utrzymanie prawidłowych relacji stechiometrycznych pomiędzy kompleksami PSII oraz poprawnego funkcjonowania szlaków desaturacji kwasów tłuszczowych w komórkach *A. thaliana*,
- wskazanie potencjalnych substratów dla proteazy Egy2 – białek pTAC16 i pTAC10,
- dostarczenie eksperymentalnego dowodu wykazującego, że pseudoproteaza Egy3 zlokalizowana jest w błonach tylakoidowych chloroplastów,
- wykazanie, że pseudoproteaza Egy3 jest zaangażowana w odpowiedź na stres cieplny oraz stres wysokiej temperatury,
- wykazanie, że pseudoproteaza Egy3 pełni ważną rolę w utrzymaniu produkcji nadtlenku wodoru, a także prawdopodobnie wspomaga prawidłowe funkcjonowanie PSI oraz reakcji fotosyntezy niezależnych od światła.

Bibliografia

- Adamiec M, Ciesielska M, Zalaś P, Luciński R (2017) *Arabidopsis thaliana* intramembrane proteases. *Acta Physiol. Plant.* 39: 1-7
- Adamiec M, Dobrogojski J, Wojtyła Ł, Luciński R (2022) Stress-related expression of the chloroplast Egy3 pseudoprotease and its possible impact on chloroplasts' proteome composition. *Front Plant Sci* 13: 965143
- Adamiec M, Misztal L, Ciesielska M, Luciński R (2021a) The changes of PSII supercomplex stoichiometry in *egy1* mutants are related to chlorophyll *b* deficiency. *Photosynthetica* 59:294–302.
- Adamiec M, Misztal L, Kasproicz-Maluśki A, Luciński R (2020) EGY3: homologue of S2P protease located in chloroplasts. *Plant Biol* 22:735–743.
- Adamiec M, Misztal L, Kosicka E, Paluch-Lubawa E, Luciński R (2018) *Arabidopsis thaliana egy2* mutants display altered expression level of genes encoding crucial photosystem II proteins. *J Plant Physiol* 231:155–167.
- Adamiec M, Szomek M, Gabała E, Dobrogojski J, Misztal L, Luciński R (2021b) Fatty acid composition and cpDNA content in *Arabidopsis thaliana* mutants deprived of Egy1 protease. *Photosynthetica* 59:633–639.
- Afithile M, Duffield-Duncan K, Fry M, Workman S, Hum-Musser S, Hildebrand D. (2015) The *toc132toc120* heterozygote mutant of *Arabidopsis thaliana* accumulates reduced levels of hexadecatrienoic acid. *Plant Physiol Biochem* 96:426–435.
- Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E (2015) The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome. *Genesis* 53:474-485.
- Chen C, Wang J, Zhao X (2016) Leaf senescence induced by EGY1 defection was partially restored by glucose in *Arabidopsis thaliana*. *Bot Stud* 57: 5
- Chen G, Bi YR, Li N (2005) EGY1 encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. *Plant J* 41:364–375.
- Chen G, Law K, Ho P (2012) EGY2 , a chloroplast membrane metalloprotease, plays a role in hypocotyl

- elongation in *Arabidopsis*. Mol Biol Rep.39: 2147–2155.
- Colombo M, Tadini L, Peracchio C, Ferrari R, Pesaresi P (2016) GUN1, a Jack-Of-All-Trades in Chloroplast Protein Homeostasis and Signaling. Front Plant Sci. 22:1427
- Di Cera E (2009) Serine protease assays: Measuring the enzyme targets for serpins, serine protease inhibitors. IUBMB Life 61:510–515.
- Erez E, Fass D, Bibi E (2009) How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. Nature 459:371–378.
- Feng L, Yan H, Wu Z, Yan N, Wang Z, Jeffrey PD, Shi Y (2007) Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease. Science 318:1608–1612.
- Ferro M, Brugière S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, Moyet L, Ramus C, Miras S, Mellal M, Le Gall S, Kieffer-Jaquinod S, Bruley C, Garin J, Joyard J, Masselon C, Rolland N (2010) AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. Mol Cell Proteomics 9:1063-1084.
- Järvi S, Suorsa M, Aro EM (2015) Photosystem II repair in plant chloroplasts - Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. Biochim Biophys Acta - Bioenerg 1847:900–909.
- Kim EH, Li XP, Razeghifard R, Anderson JM, Niyogi KK, Pogson BJ, Chow WS (2009a) The multiple roles of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes define structure and optimize function of *Arabidopsis* chloroplasts: A study using two chlorophyll *b*-less mutants. Biochim Biophys Acta - Bioenerg 1787:973–984.
- Lemberg MK, Freeman M (2007) Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. Genome Res. 17:1634–1646.
- Li B, Li Q, Xiong L, Kronzucker HJ, Krämer U, Shi W (2012) Arabidopsis Plastid AMOS1/EGY1 integrates abscisic acid signaling to regulate global gene expression response to ammonium stress. Plant Physiol 160:2040–2051.
- Nath K, Phee BK, Jeong S, Lee SY, Tateno Y, Allakhverdiev SI, Lee CH, Nam HG (2013) Age-dependent changes in the functions and compositions of photosynthetic complexes in the thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. Photosynth Res 117:547–556.
- Northrop DB (2001) Follow the protons: A low-barrier hydrogen bond unifies the mechanisms of the aspartic proteases. Acc Chem Res 34:790–797.
- Oldenburg DJ, Bendich AJ (2015) DNA maintenance in plastids and mitochondria of plants. Front Plant Sci 29:6:883
- Rawson RB (2013) The site-2 protease. Biochim Biophys Acta - Biomembr 1828:2801–2807.
- Sung TY, Chung TY, Hsu CP, Hsieh MH (2011) The ACR11 encodes a novel type of chloroplastic ACT domain repeat protein that is coordinately expressed with GLN2 in *Arabidopsis*. BMC Plant Biol. 24:11:118.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 8:47(D1):D607-D613.
- Wang J, Beher D, Nyborg AC, Shearman MS, Golde TE, Goate A (2006) C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. J Neurochem 96:218–227.

- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2:1–12.
- Woodson JD, Perez-Ruiz JM, Chory J (2011) Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants *Curr Biol.* 2011 24:897-903.
- Vitlin Gruber A, Feiz L (2018) Rubisco Assembly in the Chloroplast. *Front Mol Biosci.*13:5:24.
- Yu FW, Zhu XF, Li GJ, Kronzucker HJ, Shi WM (2016) The chloroplast protease AMOS1/EGY1 affects phosphate homeostasis under phosphate stress. *Plant Physiol* 172:pp.00786.2016.
- Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ (2008) Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One* 23:3(4)
- Zhuang Y, Wei M, Ling C, Liu Y, Amin AK, Li P, Li P, Hu X, Bao H, Huo H, Smalle J, Wang S (2021) EGY3 mediates chloroplastic ROS homeostasis and promotes retrograde signaling in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Cell Rep* 36:109384

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

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii i specjalności fizjologia roślin uzyskałam w 2007 roku w Zakładzie Fizjologii Roślin na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, gdzie pod kierunkiem prof. dr. hab. Grzegorza Jackowskiego zrealizowałam pracę doktorską zatytułowaną „Status redoks puli plastochinonu jako sygnał pośredniczący w modulacji globalnego profilu ekspresji genów jądrowych *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na podwyższone natężenie światła.”

W trakcie studiów doktoranckich byłam kierownikiem jednorocznego projektu badawczego finansowanego przez Dziekana Wydziału Biologii pod tytułem „Wpływ podwyższonego natężenia światła i czasu ekspozycji na podwyższone natężenie światła na stan funkcjonalny PSII *Arabidopsis thaliana*” (nr: PBWB-502/2004) oraz głównym wykonawcą projektu „Plastydowe sygnały redoks jako czynniki pośredniczące w modulacji ekspresji genów jądrowych *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na podwyższone natężenia światła”, którego kierownikiem był prof. dr hab. Grzegorz Jackowski (projekt badawczy KBN 2 P04C 036 26; okres realizacji: 2004-2006). W trakcie studiów doktoranckich byłam również współautorem 2 artykułów przeglądowych. Pierwsza z tych prac, której jestem pierwszym autorem, poświęcona jest technice mikromacierzy DNA, zawiera jej szczegółowy opis oraz podsumowuje wykonane tą metodą badania nad zmianami poziomu ekspresji genów w

odpowiedzi na podwyższone natężenie światła i suszę glebową w genomach roślinnych (Solińska i wsp. 2004).

Druga praca przeglądowa, w powstawanie której byłam zaangażowana poświęcona była natomiast roślinnym transglutaminazom – zależnym od jonów Ca^{2+} acetylotransferazom zaangażowanym w modyfikacje postranslacyjne. Są to powszechnie występujące u roślin enzymy, zlokalizowane w wielu różnych przedziałach wewnątrzkomórkowych takich jak cytoplazma, chloroplasty, mitochondria czy ściana komórkowa. W pracy zebrane zostały dostępne w danym czasie informacje dotyczące zaangażowania transglutaminaz w procesy wzrostowe, takie jak cykl komórkowy, wzrost apikalny i wzrost siewek, a także w programowaną śmierć komórki i reakcje roślin na czynniki stresowe (Sobieszczuk-Nowicka i wsp. 2005). W tym czasie byłam również współautorem 3 doniesień konferencyjnych na konferencjach krajowych oraz jednego doniesienia na konferencji międzynarodowej.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, w październiku 2008 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Fizjologii Roślin na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i mogłam kontynuować swój rozwój naukowy. W tym samym roku ukazały się również dwie kolejne prace, z których jedna była pracą przeglądową, druga natomiast pracą eksperymentalną, zawierającą wyniki uzyskane w trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej. Opisane w manuskrypcie badania prowadzone były we współpracy z Laboratorium Genetyki Nowotworów Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk. Wykorzystano w nich technikę mikromacierzy DNA, co pozwoliło na analizę zmian poziomu ekspresji 24 000 genów *A. thaliana*, w odpowiedzi na różne warianty natężenia światła odpowiadające niskiemu (kontrola), umiarkowanemu, wysokiemu i nadmiernie wysokiemu natężeniu światła. Zaobserwowano 663 geny, których poziom ekspresji ulegał zmianom w odpowiedzi na przynajmniej jedno natężenie światła. Zastosowanie DCMU, jako inhibitora specyficznego blokującego transport elektronów pomiędzy cząsteczkami plastochinonu QA i QB, spowodowało odwrócenie zaobserwowanych zmian poziomu ekspresji u 50 genów, spośród których, ekspresja 24 modulowana była w odpowiedzi na umiarkowane natężenie światła, 32 w odpowiedzi na wysokie natężenie światła, a tylko jednego w odpowiedzi na nadmiernie wysokie natężenie światła. Uzyskane wyniki pozwoliły nam wysunąć hipotezę, że rola statusu redoks puli plastochinonu w retrogradowej ścieżce transdukcji sygnału, ograniczona jest do warunków niestresowych. W pracy wykazano również, że w rejonach promotorowych genów, których poziom ekspresji regulowany jest przez status redoks puli plastochinonu znajdują się wspólne elementy wiążące czynniki trans-

regulatorowe, co może wskazywać na to, że współuczestniczą we wspólnej ścieżce transdukcji sygnału (Adamiec i wsp. 2008).

W pierwszych latach pracy na stanowisku adiunkta moje zainteresowania naukowe pozostawały skupione wokół zależnej od natężenia światła regulacji ekspresji genów jądrowych *A. thaliana*. Uzyskane przez nasz zespół wyniki badań udowodniły, że takiej regulacji podlega kodujący chloroplastowe białko opiekuńcze ClpB3, zlokalizowany w genomie jądrowym gen *At5g15450*. Wskazaliśmy również PAP1 jako czynnik transkrypcyjny potencjalnie zaangażowany w regulację poziomu ekspresji tego genu. Wyniki te zostały przedstawione w formie pracy eksperymentalnej opublikowanej w *Plant Science* (Adamiec i wsp. 2011).

W kolejnych latach zaangażowałam się w badania dotyczące roli wybranych białek PSII w przekazywaniu energii wzbudzenia elektronowego. Badania te były prowadzone w ramach projektu „Udział CP29, CP26 i CP24 – mniejszościowych, peryferycznych anten energetycznych fotosystemu II – w przenoszeniu energii wzbudzenia elektronowego”, którego kierownikiem był prof. dr hab. Grzegorz Jackowski (nr: MNiSzW N N303 563539; okres realizacji: 2010 – 2013), a w którym pełniłam rolę głównego wykonawcy. Eksperymenty w ramach tych badań wykonywane były we współpracy z Zakładem Biofizyki Molekularnej Wydziału Fizyki UAM, Centrum Ultraszybkowej Spektroskopii Laserowej Wydziału Fizyki UAM, a także Wydziałem Fizyki i Astronomii Wolnego Uniwersytetu w Amsterdamie. Badania prowadzone były na preparatach zespolonych błon tylakoidowych mutantów *A. thaliana*, zawierających insercje T-DNA w genach kodujących wybrane białka PSII lub proteazy zaangażowane w prawidłowe funkcjonowanie PSII. Preparaty zespolonych błon tylakoidowych, nazywane również preparatami BBY (nazwa pochodzi od inicjałów nazwisk autorów metody ich izolacji Berthold, Babcock and Yocum) zawierają fragmenty błon, w których zlokalizowany jest głównie PSII. Uzyskane tą metodą preparaty cechuje nie tylko wysoka zawartość superkompleksów PSII i niewielki stopień zanieczyszczenia PSI, ale także duża aktywność i stabilność (Schiller i Dau 2000). Wykorzystaliśmy preparaty BBY oraz technikę czasowo-rozdzielczych pomiarów zaniku fluorescencji do analizy dynamiki przekazywania energii wzbudzenia elektronowego w obrębie PSII.

Do najciekawszych z uzyskanych przez nas wyników należą pomiary dokonane dla cząstek BBY pochodzących z linii mutantów *deg5*. Proteaza Deg5 jest serynową proteazą zakotwiczoną w błonie tylakoidowej od strony lumen i zaangażowaną w obrót metaboliczny białek PSII (Luciński i wsp. 2011; Kato i wsp. 2012). Wyniki przeprowadzonych przez nasz zespół badawczy analiz wykazały, że w preparatach BBY linii mutantów pozbawionych tej

proteazy, hodowanych w standardowych warunkach laboratoryjnych, poziom akumulacji białek Lhcb1-5 pozostaje na poziomie zbliżonym do obserwowanego w preparatach pochodzących z roślin typu dzikiego, natomiast poziom białka Lhcb6 jest o ~27% niższy. Mniejsza pula tego białka spowodowała przyspieszenie zaniku fluorescencji energii wzbudzenia z ~120 do ~100 ps. Białko Lhcb6 uczestniczy w kotwiczeniu kompleksów zewnętrznych anten energetycznych PSII, określanych jako LHCI, w tak zwanym miejscu M (czyli miejscu o średniej sile wiązania). Obserwowany efekt przyspieszenia dynamiki fluorescencji jest najprawdopodobniej spowodowany mniejszą liczbą zasocjowanych trimerów LHCI, czemu towarzyszy pogłębienie pułapki energetycznej centrum reakcji (Gibasiewicz i wsp. 2015).

Ciekawe zmiany w prędkości przekazywania fluorescencji energii wzbudzenia elektronowego zaobserwowaliśmy także w preparatach BBY pochodzących z mutantów *lhcb3*. Białko Lhcb3 jest jednym z białek budujących wspomniane wcześniej trimery LHCI, jednak jego zawartość w tych kompleksach ocenia się na około 10%. Głównymi składnikami trimerów LHCI pozostają białka Lhcb1 i Lhcb2. W liniach mutantów pozbawionych białka Lhcb3 obserwowaliśmy kompensacyjny wzrost poziomu akumulacji tych białek, które najprawdopodobniej zastępowały Lhcb3 w trimerach LHCI. Sama pula trimerów LHCI uległa natomiast w liniach mutantów *lhcb3* niewielkiemu zwiększeniu. Czasowo-rozdzielcze pomiary zaniku fluorescencji wykazały, że w tak zmodyfikowanych superkompleksach PSII spowolnieniu o ~ 15 ps ulega szybka składowa zaniku fluorescencji, podczas gdy sam średni czas trwania fluorescencji pozostaje niezmienny. Wyniki symulacji metodą Monte Carlo, wykazały, że najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest wydłużenie średniego czasu przeskoku energii wzbudzenia i zwiększona stabilizacja rozdziału ładunku pierwotnego. Uzyskane wyniki wskazują, że białko Lhcb3 pełni, w przenoszeniu energii wzbudzenia elektronowego, unikalną rolę i nie może zostać zastąpione przez białka Lhcb1 i Lhcb2 bez konsekwencji dla dynamiki tego procesu (Adamiec i wsp. 2005). Całość danych zebrana w trakcie eksperymentów pozwoliła również, w oparciu o metodę symulacji Monte Carlo, wyznaczyć parametry opisujące dynamikę przesyłania energii wzbudzenia elektronowego w obrębie PSII.

Wyniki otrzymane w toku tych badań opublikowane zostały w formie dwóch manuskryptów, z których jeden ukazał się w *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, drugi natomiast w *Journal of Photochemistry and Photobiology B* (Adamiec i wsp. 2015; Gibasiewicz i wsp. 2015), a także w formie szeregu doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Odrębnym wątkiem mojej pracy badawczej były zagadnienia związane z diagnozą miskoncepcji z obszaru fizjologii roślin. Miskoncepcje w nauczaniu biologii to sprzeczne z ustaleniami naukowymi, alternatywne koncepcje lub zniekształcone przekonania funkcjonujące w osobistym modelu pojęciowym czy też w konstrukcie myślowym (Mintzes i wsp. 2005). Badania nad rozumieniem pojęć biologicznych przez uczniów i studentów wykazały, że miskoncepcje dotyczą wielu zjawisk i procesów. W literaturze światowej dużo miejsca poświęcono licznym, sprzecznym z ustaleniami naukowymi, alternatywnym koncepcjom dotyczącym pojęć takich jak dyfuzja czy osmoza. Wiele opracowań naukowych wskazuje, że są to procesy trudne do wyjaśnienia i zdefiniowania, co przekłada się na poziom zrozumienia tego zjawiska wśród uczniów oraz studentów (Meir i wsp. 2005; Kramer i Myers 2012). Przeprowadziliśmy diagnozę dotyczącą poziomu wiedzy o osmozie oraz stopnia rozpowszechnienia miskoncepcji dotyczących tego zjawiska wśród studentów drugiego roku biologii. Diagnozę oparto na badaniach sondażowych, ilościowo-jakościowych o charakterze eksploracyjnym (kwestionariusz). Analiza otrzymanych wyników jednoznacznie wykazała, że wiedza studentów dotycząca procesu osmozy jest niewielka, fragmentaryczna i obarczona licznymi miskoncepcjami. Wskazaliśmy również, że najczęściej występujące błędne przekonania mogą być wzmacniane przez sposób definiowania pojęcia osmozy w podręcznikach szkolnych i akademickich (Malinska i wsp. 2014). Co więcej w toku dalszych badań wykazaliśmy, że raz powstałe miskoncepcje są niezwykle trudne do weryfikacji i nie ulegają zmianom nawet po ukończeniu złożonego z wykładów i bloku ćwiczeniowego modułu akademickiego obejmującego analizowane zagadnienia (Malinska i wsp. 2016). Podobną diagnozę wykonaliśmy, aby określić poziom zrozumienia, pojęć i mechanizmów związanych z ruchami roślin wśród studentów realizujących kurs z fizjologii roślin na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.. Analiza uzyskanych wyników badań wskazuje, że uczniowie opuszczają szkołę średnią z silnie zakorzenionymi błędnymi przekonaniem dotyczącymi ruchów roślin. W toku edukacji akademickiej miskoncepcje te nie zostają zweryfikowane i stanowią barierę znacznie utrudniającą studentom rozumienie procesów związanych z ruchami roślin oraz definiowanie pojęć związanych z tymi procesami w sposób akademicki, a także prowadzą do dalszych błędnych przekonań (Jędrzykowski i wsp. 2014; Sobieszczuk-Nowicka i wsp. 2018). Ten nurt badawczy zaowocował 5 publikacjami eksperymentalnymi. W trzech z tych prac jako osoba kierująca grupą badawczą, byłam ostatnim autorem. Jedna z tych prac opublikowana została w czasopiśmie z listy A czasopism punktowanych MNiSW, pozostałe dwie w czasopismach z listy B. Z pozostałych dwóch prac, których byłam współautorem jedna opublikowana została w czasopiśmie z listy B, druga w

czasopiśmie nie należącym do żadnej z list. Badania te były również prezentowane w trakcie kilku krajowych konferencji.

W ciągu następnych lat pracy na stanowisku adiunkta moje zainteresowania badawcze zwróciły się w kierunku proteaz chloroplastowych. Zostałam zaangażowana w badania nad rolą i aktywnością proteazy Deg2, której przypisuje się również funkcję białka opiekuńczego (Jagodzik i wsp. 2014). Badania prowadzone były w ramach finansowanego przez NCN projektu „AtDeg2-białko chloroplastowe o podwójnej aktywności: proteazy i białka opiekuńczego” (grant NCN 2013/09/B/NZ3/00449; okres realizacji: 2014 – 2017), którego kierownikiem był prof. dr hab. G. Jackowski. W ramach tych badań stworzyliśmy linie mutantów, w których ekspresji ulegała linia białka Deg2 pozbawiona aktywności proteazowej, opiekuńczej lub obu z nich. Badania przebiegu poszczególnych faz ontogenetycznych linii mutantów zawierających wersję białka Deg2 pozbawioną obu aktywności charakteryzowały się opóźnionym czasem pełnego otwarcia liścieni, czasem otwierania pierwszych 10% kwiatów, liczbą gałązek kwiatostanowych i długością dojrzałych nasion. Wykazaliśmy, że czas otwierania się pierwszych 10% kwiatów związany jest z pozbawieniem Deg2 aktywności proteazowej. Zmiany pozostałych cech fenotypowych były natomiast regulowane przez obie aktywności (proteazową i opiekuńczą) (Adamiec i wsp. 2018b). Prowadzone w tym nurcie badania przełożyły się na jedną pracę eksperymentalną oraz jedną pracę przeglądową, które opublikowane zastały w czasopismach z listy A czasopism punktowanych MNiSW.

W nurcie zainteresowań badawczych związanych z proteazami powstały również dwa projekty, poświęcone proteazom miejsca drugiego (S2P). W jednym z nich, uzyskanym w ramach konkursu MINIATURA i zatytułowanym „Ocena istotności białka EGY3 w odpowiedzi *Arabidopsis thaliana* na wysoką temperaturę oraz ekspozycję na wysokie natężenie światła” (Grant nr: DEC-2019/03/XN/NZ3/00303; okres realizacji: 2019 – 2020) pełniłam funkcję kierownika. W drugim uzyskanym w ramach konkursu OPUS i zatytułowanym „Fizjologiczne funkcje wewnątrzblonowych proteaz chloroplastowych AtEgy” (NCN 2014/15/B/NZ3/00412 okres realizacji: 2015 – 2019) byłam głównym wykonawcą, a funkcję kierownika pełnił prof. UAM dr hab. Robert Luciński. Badania prowadzone w ramach tych projektów były prowadzone głównie w Zakładzie Fizjologii Roślin Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Część eksperymentów przeprowadziliśmy jednak we współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Zakładem Biochemii i Biotechnologii, Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Instytutem Ochrony Roślin, Polskiej Akademii Nauk oraz Zakładem Biochemii i Biologii Molekularnej

Uniwersytetu Południowej Danii w Odense. W lutym 2022 roku w Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Południowej Danii w Odense odbyłam także staż naukowy, w ramach którego prowadziłam badania zmierzające do określenia, czy mutanty *Arabidopsis thaliana* pozbawione chloroplastowych białek transbłonowych Egy2 i Egy3, wykazują różnice w częstości występowania rejonów nukleoidowych, w bezpośrednim sąsiedztwie błon tylakoidowych.

Badania prowadzone w ramach tych projektów przełożyły się na 5 oryginalnych prac badawczych oraz pracę przeglądową, które stanowią moje osiągnięcie naukowe i zostały opisane powyżej, w punkcie 4. Wyniki dotyczące tych zagadnień zostały zaprezentowane również w formie 17 doniesień konferencyjnych i rozdziału w monografii.

W ostatnim czasie byłam również współautorem pracy przeglądowej poświęconej obecnemu stanowi wiedzy o genomie chloroplastowym i mechanizmach regulacji ekspresji genów chloroplastowych (Dobrogojski i wsp. 2020).

W trakcie swojej pracy na stanowisku adiunkta byłam również autorem ponad 40 recenzji dla czasopism takich jak: Edukacja Biologiczna i Środowiskowa, Acta Physiologiae Plantarum, Photosynthetica, International Journal of Molecular Sciences, Frontiers in Plant Science, Plants and Agriculture. Obecnie współpracuję z redakcjami dwóch renomowanych czasopism. Jestem członkiem tematycznego panelu doradczego w czasopiśmie International Journal of Molecular Science i gościnnie, redaktorem numeru specjalnego czasopisma Frontiers in Bioscience-Landmark poświęconego biochemicznym reakcjom roślin na stresy biotyczne i abiotyczne ("Biochemical Response of Plants to Biotic and Abiotic Stresses").

Podsumowując, obecnie mój całkowity dorobek naukowy to 24 publikacje, których łączny Impact Factor wynosi 38,844, z czego 22 opublikowane zostały po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk biologicznych. Spośród tych 22 manuskryptów 16 to oryginalne prace badawcze, 6 natomiast to prace przeglądowe. Po 2018 roku, to jest po zmianie przez MNiSW systemu punktacji byłam współautorem 5 opublikowanych artykułów, z których wszystkie znajdowały się w wykazie czasopism naukowych z dyscypliny „nauki biologiczne”. Do 2018 roku, to jest w czasie, kiedy istniała „Lista czasopism punktowanych MNiSW” złożona z części A-C byłam natomiast współautorem 17 prac, z których 11 (4 przeglądowe i 7 badawczych) opublikowane zostały w czasopismach znajdujących się w części A, natomiast pozostałe 6 (3 prace badawcze i 3 przeglądowe) w czasopismach z części B. Jestem też współautorem 47 doniesień konferencyjnych, z czego 13 doniesień (3 w formie ustnej i 10 w formie plakatów) zaprezentowanych zostało na konferencjach międzynarodowych. Wśród tych wystąpień znajduje się również jeden wykład wygłoszony na zaproszenie organizatorów. Był

to wykład zatytułowany „Plant intramembrane proteases and beyond...”, który wygłosiłam na konferencji Global Conference on Plant Science and Molecular Biology (Walencja; 2017r).

Na konferencjach krajowych prezentowałam swoje wyniki 34 razy, w tym 4-krotnie w formie referatu i 30-krotnie w formie plakatów. Współpracowałam łącznie z 5-cioma ośrodkami nie związanym z Uniwersytetem im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w tym trzema polskimi (Zakładem Biochemii i Biotechnologii, Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Instytutem Ochrony Roślin, Polskiej Akademii Nauk i Laboratorium Genetyki Nowotworów Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk) i dwoma zagranicznymi (Zakładem Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Południowej Danii i Wydziałem Fizyki i Astronomii Wolnego Uniwersytetu w Amsterdamzie). Jestem członkiem paneli redakcyjnych i recenzentem w renomowanych czasopismach.

Bibliografia

- Adamiec M, Drath M, Jackowski G. (2008) Redox state of plastoquinone pool regulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes in response to elevated irradiance. *Acta Biochim Pol* 55:161-173.
- Adamiec M, Gibasiewicz K, Luciński R, Giera W, Chełminiak P, Szewczyk S, Sipińska W, van Grondelle R, Jackowski G. (2015) Excitation energy transfer and charge separation are affected in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking light-harvesting chlorophyll a/b binding protein Lhcb3. *J Photochem Photobiol B*. 153:423-428.
- Adamiec M, Jagodzik P, Wyka TP, Ludwików A, Mituła F, Misztal L, Luciński R, Jackowski G. (2018b) Chloroplast protease/chaperone AtDeg2 influences cotyledons opening and reproductive development in *Arabidopsis*. *Acta Soc Bot Pol* 87:3584
- Adamiec M, Luciński R, Jackowski G. (2011) The irradiance dependent transcriptional regulation of AtCLPB3 expression. *Plant Sci*. 181: 449-456.
- Dobrogojski J, Adamiec M, Luciński R. (2020) The chloroplast genome: a review. *Acta Physiol Plant* 42:98
- Gibasiewicz K, Adamiec M, Luciński R, Giera W, Chełminiak P, Szewczyk S, Sipińska W, Głow E, Karolczak J, van Grondelle R, Jackowski G. (2015) Monte Carlo simulations of excitation and electron transfer in grana membranes. *Biochim Biophys* 1847:314-327
- Jagodzik P, Adamiec M, Jackowski G. (2014) AtDeg2 – a chloroplast protein with dual protease/chaperone activity. *Acta Soc Bot Pol* 83: 169-174
- Jędrzykowski M, Rybska E, Adamiec M, Sobieszczuk-Nowicka E. (2014) Diagnoza miskoncepcji z obszaru ruchów roślin wśród studentów biologii. *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa* S1: 99-106
- Kato Y, Sun X, Zhang L, Sakamoto W. (2012) Cooperative D1 degradation in the photosystem II repair mediated by chloroplastic proteases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 15:1428-1439
- Kramer EM, Myers DR. (2012) Five popular misconceptions about osmosis. *Am J* 80:694–699
- Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G. (2011) Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. *Plant Physiol Biochem*.49: 311-320

- Malinska L, Rybska E, Sobieszczuk-Nowicka E, Adamiec M. (2014) Osmoza dotyczy wody, a dyfuzja innych cząsteczek. Czyli błędnie mniemanie studentów o procesach dyfuzji i osmozy. *Edukacja Biologiczna i Środowiskowa* S1: 85-92
- Malińska L, Rybska E, Sobieszczuk-Nowicka E, Adamiec M. (2016) Teaching about Water Relations in Plant Cells: An Uneasy Struggle. *CBE-life sciences education* 15 pii: ar78
- Meir E, Perry J, Stal D, Maruca S, Klopfer E. (2005) How effective are simulated molecular-level experiments for teaching diffusion and osmosis. *Cell Biol Educ.* 4:235–248.
- Mintzes JJ, Wandersee JH, Novak JD. (2005) *Teaching Science for Understanding: A human Constructivist View*. San Diego, CA: Academic
- Pfundt H, Duit R. (2004) *Students' Alternative Frameworks and Science Education*. Kiel, Germany: University of Kiel Institute for Science Education
- Schiller H, Dau H. (2000) Preparation protocols for high-activity photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S2-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy. *J Photochem Photobiol B.* 55:138-44.
- Sobieszczuk-Nowicka E, Rybska E, Jarmużek J, Adamiec M, Chyleńska Z. (2018) Are We Aware of What Is Going on in a Student's Mind? Understanding Wrong Answers about Plant Tropisms and Connection between Student's Conceptions and Metacognition in Teacher and Learner Minds. *Educ. Sci.* 8, 164.
- Sobieszczuk-Nowicka E., Solińska M, Legocka J (2005) Roślinne transglutaminazy. *Pos. Biol Kom* 32: 463-476

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

W czasie swojej pracy na stanowisku adiunkta zaangażowana byłam także w szereg inicjatyw dydaktycznych, organizacyjnych i popularyzujących naukę.

Działalność dydaktyczna

Moja działalność dydaktyczna wsparta jest dodatkowymi kompetencjami. W trakcie studiów magisterskich ukończyłam blok pedagogiczny, który uprawnia do nauczania przyrody oraz biologii w szkołach podstawowych i średnich. W trakcie swojej pracy na stanowisku adiunkta podnosiłam swoje umiejętności dydaktyczne uczestnicząc zarówno w konferencjach naukowo-dydaktycznych organizowanych przez Wydział Biologii UAM, jak również w latach 2013-2015 w konferencjach poświęconych dydaktyce akademickiej organizowanych przez Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

Brałam także udział w prowadzonym w ramach projektu „UAM: Unikatowy Absolwent=Możliwości” kursie e-learningu (2012 r.) oraz organizowanych przez Wydział

Biologii Uniwersytetu Gdańskiego warsztatach dla nauczycieli akademickich „Ideatorium practicum”: gamifikacja zajęć (2014 r.) oraz tuning zajęć i ocenianie (2014 r.)

W późniejszym okresie ukończyłam certyfikowany kurs Szkoły Tutorów Akademickich Collegium Wratislaviense (2018 r.) i zostałam certyfikowanym tutorem.

W okresie pracy na stanowisku adiunkta prowadziłam zajęcia, z bardzo szerokiej gamy przedmiotów, głównie w formie ćwiczeń laboratoryjnych, ale również w formie konwersatoriów. Były to zajęcia obejmujące zarówno podstawowe zagadnienia z zakresu biologii (np. „Podstawy Biologii”, „Podstawy nauk przyrodniczych”) i fizjologii roślin (np. „Fizjologia Roślin”, „Procesy życiowe”) jak i biologii molekularnej („Aspekty molekularne w biologii eksperymentalnej”, „Biologia Eksperymentalna”) - łącznie 17 przedmiotów. Prowadzone przeze mnie zajęcia przeznaczone były dla studentów z różnych kierunków takich jak: biologia, biotechnologia, ochrona środowiska, nauczanie przyrody, biofizyka molekularna, fizyka medyczna. Prowadziłam również, w ramach studiów doktoranckich, zajęcia z przedmiotu „Diagnostyka kondycji roślin w warunkach stresu”, a także zajęcia w języku angielskim, dla studentów z Programu Wymiany Międzynarodowej UAM („Experimental Plant Physiology” i „Plant Physiology”). Byłam również wielokrotnym organizatorem i prowadzącym poświęconych gospodarce wodnej warsztatów przeznaczonych dla klas patronackich („Osmoza, dyfuzja, plazmoliza i droga wody z gleby do atmosfery przez roślinę” i „Rola wody w roślinie”). Współtworzyłam sylabus wykładu monograficznego zatytułowanego „Techniki elektroforetyczne w biologii eksperymentalnej”, skierowanego do studentów II i III roku biotechnologii, biologii i ochrony środowiska. Prowadziłam także część wykładów z tego przedmiotu.

W ramach swojej pracy dydaktycznej brałam także udział w opracowywaniu materiałów e-learningowych do wspomnianego wyżej przedmiotu „Techniki elektroforetyczne w biologii eksperymentalnej”. Zaangażowana byłam również w opracowanie materiałów do nauczania zdalnego przedmiotu „Budowa i fizjologia roślin” dla studentów biologii i biotechnologii studiów dziennych i studium zaocznego, a także w opracowanie materiałów do nauczania tego przedmiotu w trybie hybrydowym.

W czasie swojej pracy na stanowisku adiunkta byłam również promotorem 7 prac licencjackich i 3 prac magisterskich, a także recenzentem 4 prac licencjackich i 1 magisterskiej.

Zaangażowana byłam też w trzy projekty dydaktyczne prowadzone w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, a mianowicie: projekt „Myślenie przez działanie – Uniwersytet Młodych Odkrywców” POWR.03.01.00-00-U120/17, projekt „Świat

przyrody obszarem myślenia i działania młodych odkrywców na Wydziale Biologii UAM” POWR.03.01.000-00-U110/17 oraz projekt „Wyższe kompetencje - większa szansa na rynku pracy. Program rozwoju kompetencji studentów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.” (nr POWR.03.01.00-00-K388/16).

W 2020 roku dołączyłam do programu „Tutoring i mentoring” na Wydziale Biologii UAM najpierw jako tutor, a później również jako mentor. W ramach tego programu byłam tutorem 7 studentów oraz opiekunem naukowym dwóch studenckich projektów. Pierwszy z tych projektów zatytułowany „Wpływ proteazy EGY2 na akumulację białek PsaA oraz PsaB w osobnikach rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)” (032/39/UAM/0010) realizowany był w ramach projektu BestStudentGrant realizowanego przez Uniwersytet im. Adama Mickiewicza. Drugi projekt zatytułowany "Wpływ chlorpyrifosu na wzrost i rozwój oraz proteom osobników *Nepenthes x ventrata* hodowanych w kulturach in vitro" (075/39/UAM/0010) realizowany był natomiast w ramach projektu Advanced Best Student Grant realizowanego przez Uniwersytet im. Adama Mickiewicza.

Działalność organizacyjna

Moja działalność organizacyjna związana jest zarówno z aktywnością w strukturach związanych z Zakładem Fizjologii Roślin i Wydziału Biologii UAM, jak i działalnością w ramach członkostwa w sekcji Biochemii i Fizjologii Roślin Polskiego Towarzystwa Botanicznego.

W ramach mojej działalności na Wydziale Biologii UAM byłam przedstawicielem pracowników naukowych bez habilitacji w Radzie Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii UAM (2012-2016), a także koordynatorem do spraw dydaktyki w Zakładzie Fizjologii Roślin i koordynatorem zajęć laboratoryjnych z przedmiotów: „Biologia komórki i organizmu” oraz „Budowa i fizjologia roślin”.

W ramach swojej działalności w sekcji Biochemii i Fizjologii Roślin PTB trzykrotnie pełniłam funkcje w jej zarządzie: przez dwie kadencje (2013-2016 i 2016-2019) pełniłam funkcję sekretarza sekcji, a w latach 2019 -2022 byłam członkiem zarządu.

W ramach swojej działalności w sekcji byłam także członkiem komitetu organizacyjnego dwóch konferencji. Pierwsza z nich organizowana przez sekcję Biochemii i Fizjologii Roślin PTB i Oddział Poznański PTB pod hasłem „Fotosynteza od DNA do ekosystemu” odbyła się w Collegium Biologicum UAM 30 czerwca 2015 i wzięły w niej udział 33 osoby. Organizatorami drugiej konferencji poza Sekcją Fizjologii i Biochemii Roślin PTB był

także Oddział Lubelskiego PTB oraz Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS. Konferencja ta zatytułowana „Fotosynteza w świetle badań fizjologicznych i biochemicznych” odbyła się na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS 2 lipca 2018 i zgromadziła 35 uczestników.

Popularyzacja nauki

Byłam współautorem, trzech prac popularnonaukowych zatytułowanych „Co rośliny robią nocą?”, „Co rośliny robią zimą?” i „Proteazy i inne molekularne nożyce do cięcia białek”. Publikacje te zostały opublikowane w recenzowanym czasopiśmie „Edukacja Biologiczna i Środowiskowa” z listy B czasopism punktowanych i liczą łącznie 24 punkty MNiSW. Brałam także udział w wielu edycjach popularnonaukowych wydarzeń organizowanych przez Wydział Biologii UAM takich jak: „ Fascynujący Dzień Roślin”, „Noc Naukowców”, „Festiwal Nauki i Sztuki”. W latach 2012- 2015 w ramach tych wydarzeń byłam organizatorem (a w dwóch przypadkach także koordynatorem) 9 warsztatów o zróżnicowanej tematyce i przeznaczonych dla różnych grup wiekowych. Były to takie warsztaty jak: „Herbacyany krokodyl” (przeznaczone dla dzieci wczesnoszkolnych), „Zdrowo i kolorowo, czyli rośliny w nauce” (adresowane do uczniów ostatnich klas szkoły podstawowej i młodzieży gimnazjalnej), czy „Ogród w butelce” (skierowany do wszystkich chętnych). W ramach tych wydarzeń popularnonaukowych wielokrotnie prowadziłam też wykład „Roślinne inspiracje w nowoczesnych technologiach”.

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

W trakcie pracy na stanowisku adiunkta dwukrotnie przebywałam na urlopie macierzyńskim (od 10 marca do 27 lipca 2010 i od 24 czerwca do 24 listopada 2011).



.....
(podpis wnioskodawcy)