



Dr Urszula Elżbieta Krasuska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Wydział Rolnictwa i Biologii
Katedra Fizjologii Roślin

Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Reaktywne formy azotu i poliaminy - niezbędne związki
regulatorowe uczestniczące w kiełkowaniu zarodków jabłoni
i wzroście siewek pomidora**

Autoreferat w języku polskim

Warszawa, 2019

1. Imię i nazwisko

Urszula Elżbieta Krasuska
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Wydział Rolnictwa i Biologii
Katedra Fizjologii Roślin
ul. Nowoursynowska 159, budynek 37
02-776 Warszawa

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2009 - Doktor nauk rolniczych w zakresie agronomii, stopień naukowy uzyskany na Wydziale Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Praca doktorska realizowana w Katedrze Fizjologii Roślin. Promotor pracy: prof. dr hab. Renata Bogatek-Leszczynska. Praca doktorska pod tytułem: Współdziałanie cyjanowodoru i tlenu azotu w przelamywaniu głębokiego spoczynku nasion jabłoni (*Malus domestica* Borkh.).

2003 - Magister nauk biologicznych, stopień uzyskany na Wydziale Rolniczym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Praca magisterska realizowana w Katedrze Biochemii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem dr Sławomira Orzechowskiego. Praca magisterska pod tytułem: Izolowanie białek związanych z ziarnami skrobi.

2002 – uzyskanie uprawnień pedagogicznych do wykonywania zawodu nauczycielskiego po ukończeniu Roczego Równoległego Studium Pedagogiczne realizowanego na Wydziale Ekonomiczno-Rolniczym w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

12. 2010. - obecnie - stanowisko adiunkta w Katedrze Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa.

28.12. 2009. - stanowisko asystenta w Katedrze Fizjologii Roślin Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa.

4. Wykazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego

Reaktywne formy azotu i poliaminy - niezbędne związki regulatorowe uczestniczące w kiełkowaniu zarodków jabłoni i wzroście siewek pomidora

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

IF zgodny z rokiem opublikowania; punkty MNiSW (wg wykazu z dn. 9.12.2016r.)

1. **Krasuska U.**, Ciacka K., Bogatek R., Gniazdowska A. (2014) Polyamines and nitric oxide link in regulation of dormancy removal and germination of apple (*Malus domestica* Borkh.) embryos. *Journal of Plant Growth Regulation* 33: 590–601, doi:10.1007/s00344-013-9408-7 IF- 2,23, IF V- 2,64, 35 punktów MNiSW. Udział - 45%.
2. **Krasuska U.**, Dębska K., Otulak K., Bogatek R., Gniazdowska A. (2015) Switch from heterotrophy to autotrophy of apple cotyledons depends on NO signal. *Planta* 242: 1221-1236, doi: 10.1007/s00425-015-2361-x IF- 3,23, IF V – 3,69, 35 punktów MNiSW. Udział – 70%.
3. **Krasuska U.**, Andrzejczak O., Staszek P., Borucki W., Gniazdowska A. (2016) Toxicity of canavanine in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) roots is due to alterations in RNS, ROS and auxin levels. *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 84-95, doi:10.1016/j.plaphy.2016.03.005 IF- 3,36, IF V – 3,09, 35 punktów MNiSW. Udział – 60%.
4. **Krasuska U.**, Andrzejczak O., Staszek P., Bogatek R., Gniazdowska A. (2016) Canavanine alters ROS/RNS level and leads to posttranslational modification of proteins in roots of tomato seedlings. *Frontiers in Plant Science* 7: 840, doi: 10.3389/fpls.2016.00840 IF - 4,29, IF V – 4,67, 40 punktów MNiSW. Udział – 60%.
5. **Krasuska U.**, Ciacka K., Orzechowski S., Fettke J., Bogatek R., Gniazdowska A. (2016) Modification of the endogenous NO level influences apple embryos dormancy by alterations of nitrated and biotinylated protein patterns. *Planta* 244: 877-891, doi: 10.1007/s00425-016-2553-z IF- 3,36 IF V – 3,69, 35 punktów MNiSW. Udział - 65%.
6. **Krasuska U.**, Ciacka K., Gniazdowska A. (2017) Nitric oxide-polyamines cross talk during dormancy release and germination of apple embryos. *Nitric oxide - Biology and Chemistry* 68: 38-50, doi: 10.1016/j.niox.2016.11.003 IF = 4,36, IF V – 3,72, 30 punktów MNiSW. Udział - 70%.

Sumarycznie: **IF = 20,7; punkty MNiSW = 210**

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WPROWADZENIE

Jedyną mobilną postacią w całym cyklu życiowym roślin wyższych są nasiona, które umożliwiają rozprzestrzenianie się gatunków w środowisku naturalnym, a zatem zachowanie bioróżnorodności (Donohue i inni, 2010, Angelovici i inni, 2010, Footitt i inni, 2011). Jednakże, dla zapewnienia niezakłóconej kontynuacji gatunku, zwłaszcza w warunkach okresowo niesprzyjających dla wzrostu i rozwoju (nieodpowiednia temperatura, ilość wody czy światła) rośliny wykształciły pewne mechanizmy związane z unikaniem czynników stresowych, w tym spoczynek nasion (Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006, Nonogaki i inni, 2010). Stan ten jest przejściowy i ustępuje w odpowiednim czasie, tak by nasiona

kiełkowały w optymalnych warunkach środowiska. Stąd, spoczynek powszechnie definiuje się jako okresową niezdolność żywotnych nasion do kiełkowania, wynikającą z różnych blokad fizycznych bądź fizjologicznych (Nonogaki i inni, 2010, Footitt i inni, 2011, Weitbrecht i inni, 2011). Z kolei za głęboki spoczynek nasion uważa się stan, w którym mimo zapewnienia optymalnych warunków do kiełkowania (np. w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych) proces ten nie zachodzi z powodu istnienia różnych barier np. grubej okrywy nasiennej bądź inhibitorów kiełkowania. Głęboki spoczynek nasion w warunkach laboratoryjnych można przerwać stosując fitohormony np. gibereliny, czy inne regulatory wzrostu i rozwoju roślin np. poliaminy (PA), reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), czy reaktywne formy azotu (ang. reactive nitrogen species, RNS) (Lewak, 2011, Krasuska i inni, 2015b). Powszechnie stosowanym zabiegiem mającym na celu przerwanie głębokiego spoczynku nasion jest stratyfikacja np. w warunkach chłodu (Lewak, 2011).

Ustępowanie spoczynku wiąże się z inicjacją kiełkowania. Kiełkowanie nasion *sensu stricto* rozpoczyna proces imbibicji, a kończy przebicie łupiny nasiennej przez korzeń zarodkowy (Nonogaki i inni, 2010, Lewak, 2011). Kolejnym etapem jest wzrost siewki, kiedy młody organizm wykształca autotrofię. Zdolność do przeprowadzania procesu fotosyntezy umożliwia prawidłowy i równomierny rozwój, co z kolei sprzyja przetrwaniu w danym środowisku. Na świetle w rozwijających się siewkach chloroplasty powstają z proplastydów lub z etioplastów (Pogson i Albrecht, 2011). Kluczową w tym procesie jest zdolność do percepcji promieniowania świetlnego jak i do dalszej transdukcji sygnału. Dojrzewanie chloroplastów jest związane z transkrypcją genów regulatorowych, których produkty wpływają na syntezę chlorofilu jak i powstawanie komponentów aparatu fotosyntetycznego (Waters i Langdale, 2009). Ponadto niezakłócony rozwój chloroplastów umożliwia metaboliczną aktywność szeregu cząsteczek sygnałowych, włączając w to RNS.

Reaktywne formy azotu (RNS)

Tlenek azotu (NO), zaliczany do RNS to mała cząsteczka gazowa, której obecność notuje się zarówno w organizmach żywych jak i środowisku naturalnym (Corpas i Barroso, 2015, Keshavarz-Tohid i inni, 2016, Corpas i Palma, 2018). Wzrost zainteresowania RNS szczególnie notowano w ostatnich dekadach XX w., czego pokłosiem było nazwanie NO „cząsteczką roku” w 1992 roku przez Science (Yu i inni, 2014). W przypadku roślin pierwsze dane literaturowe dotyczące udziału NO w reakcji na stres sięgają 1998 r. (Delledonne i inni,

1998). Obecnie, powszechnie RNS zalicza się do związków regulatorowych uczestniczących w procesach wzrostu i rozwoju roślin (Corpas i Barroso, 2015, Corpas i Palma, 2018).

Do cech charakterystycznych NO należy lipofilność co ułatwia przenikanie przez błony biologiczne, aczkolwiek wykazano, że również akwaporyny aktywnie uczestniczą w transporcie tej cząsteczki (Stamler i inni, 1992, Katusic, 1992, Herrera i inni, 2006). Wysoka reaktywność NO wynika z obecności na atomie azotu jednego niesparowanego elektronu. Wyróżnia się trzy formy NO: rodnikową (NO^\bullet), anionową (NO^-) oraz kationową (NO^+) (Stamler i inni, 1992, Szuba i Wojtaszek 2010). Ponadto do RNS są zaliczane m.in. cząsteczki: dwutlenek azotu (NO_2), nadtlenoazotyn (ONOO^-) oraz trójtlenek dwuazotu (N_2O_3) (Mur i inni, 2013, Ciąćka i inni, 2015, Keshavarz-Tohid i inni, 2016). Obecność NO w środowisku naturalnym wynika z takich procesów jak denitryfikacja, nitryfikacja oraz redukcja azotanów (NO_3^-) do jonów amonowych (NH_4^+) (Mur i inni, 2013). W wyniku reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym (O_2^-) powstaje szczególnie aktywna RNS - ONOO^- (Izbiańska i inni, 2018), która uczestniczy m.in. w procesie nitracji aminokwasów, kwasów tłuszczowych i kwasów nukleinowych (Lozano-Juste i inni, 2011, Mata-Pérez i inni, 2017, Izbiańska i inni, 2018). Na dzień dzisiejszy nie udało się zidentyfikować receptorów dla RNS, ale wykazano, że transdukcja sygnału zachodzi m.in. poprzez mechanizm powiązany z degradacją specyficznych dla roślin regulatorów transkrypcji w wyniku tzw. reguły N-końca rozpadu białek np. czynników z grupy VII reakcji na etylen (Gibbs i inni, 2014). W ten sposób czynniki te stanowią swoiste sensory NO. Ponadto jak wykazano na przykładzie siewek rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.), krótkotrwałe traktowanie NO powoduje zmianę ekspresji genów, co z kolei umożliwiło wyodrębnienie czynników transkrypcyjnych związanych z transdukcją sygnału etylenu, przekazywaniem sygnału strigolaktonów jak i ich biosyntezą, nagromadzeniem i produkcją salicylanów (Castillo i inni, 2018). NO zarówno pozytywnie jak i negatywnie regulował funkcjonowanie receptorów kwasu absycynowego (ABA) i transkryptów kodujących komponenty ścieżki sygnałowej brasinosteroidów (Castillo i inni, 2018). Są to kolejne elementy zaangażowane w percepcję, przekazywanie lub nawet wzmacnianie sygnału NO.

Ogromne zainteresowanie biochemią i funkcją RNS, również u roślin sprzyja prowadzeniu badań i stosowaniu różnych związków chemicznych modyfikujących stężenie tych cząsteczek. Dostępnych w sprzedaży jest kilkadziesiąt preparatów różniących się m.in. kinetyką oraz rodzajem uwalnianych RNS. Z danych literaturowych, takimi powszechnie używanymi „donorami” są m.in. nitroprusydek sodu (SNP) - uwalniający NO^+ , ale również jony cyjankowe (CN^-) (reakcja wymagająca światła) oraz S-nitrozo-N-acetylofenicyloamina

(SNAP) - uwalniający NO^* (reakcja wymagająca światła). SNP jest bardziej stabilnym związkiem od SNAP. Jego zastosowanie staje się bardziej przydatne w przypadku kiedy istnieje potrzeba dłuższego czasu traktowania badanego materiału doświadczalnego (Floryszak-Wieczorek i inni, 2006, Mur i inni, 2013, Keshavarz-Tohid i inni, 2016). Stosując SNP powinno się jednocześnie przeprowadzać próby ze związkiem, który nie wyzwala NO, aby wykluczyć ewentualne działanie CN^- . RNS są uwalniane z soli azotynowych w obecności reduktantów, w kwaśnym pH. W tym przypadku reakcja również przebiega w ciemności (co bywa czasem ogromną zaletą) (Yamasaki, 2000). Ponadto materiał badawczy może być poddany krótkotrwałemu (kilka minut) działaniu NO, wstrzykiwanemu do układu zamkniętego z butli (Castillo i inni, 2018). Innymi związkami uwalniającymi NO są diolany diazoniowe, zwane NONOatami (np. spermino-NONO), powszechnie wykorzystywane w testach klinicznych dotyczących chorób układu krążenia (Keefer, 2011). Zatem wybierając konkretny donor NO do badań należy uwzględnić mechanizm oraz kinetykę uwalniania NO, które zależą od warunków reakcji (Floryszak-Wieczorek i inni, 2006). W celu regulacji stężenia RNS w danym układzie doświadczalnym stosuje się nie tylko „donory” NO ale również „zmiatacze” np. 3-N-tlenek 2-[4-karboksyfenylo]-4,4,5,5-tetrametylo-1-oksymidazolu (cPTIO), ester metylowy L-NG-nitroargininy (L-NAME) czy kanawaninę (Can) (Szuba i Wojtaszek, 2010, Mur i inni, 2013, Krasuska i inni, 2016 – publikacja nr 5 osiągnięcia naukowego). Wymienione wyżej związki nie do końca eliminują każdą formę RNS. Ich działanie też jest różne np. w przypadku L-NAME czy Can nie tyle uzyskuje się efekt eliminacji NO w badanym obiekcie, co hamuje aktywność enzymu odpowiedzialnego za biosyntezę tego związku. Na dzień dzisiejszy jest to jednak dosyć dyskusyjna metoda zmniejszania stężenia NO u roślin wyższych jako materiału doświadczalnego, co zostało wyjaśnione poniżej.

W przypadku roślin NO jest syntetyzowany w takich organelach komórkowych jak mitochondria, peroksysomy, chloroplasty ale również na terenie cytoplazmy i w apoplacie (Mur i inni, 2013, Keshavarz-Tohid i inni, 2016). Szlaki syntezy tej cząsteczki dzieli się na enzymatyczne i nieenzymatyczne (Astier i inni, 2018). Enzymami zaangażowanymi w biosyntezę są m.in.: reduktaza azotanowa (NR), enzym homologiczny do ssaczych syntaz NO (NOS), reduktaza azotyny: tlenek azotu (Ni-NOR) oraz oksydoreduktaza ksantynowa (XOR) (Yu i inni, 2014, Krasuska i inni, 2015b, Astier i inni, 2018). Niekwestionowanym enzymem biorącym udział w syntezie NO jest NR, którego obecność wykazano w cytozolu (Rockel i inni, 2002, Yu i inni, 2014). Enzym ten katalizuje reakcję redukcji NO_3^- do azotynów (NO_2^-) przy udziale dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD(P)H) jako donora elektronów.

Przy niedoborze tlenu i w ciemności NR bierze udział w przemianie NO_2^- do NO, a aktywność ta jest stosunkowo wysoka i może osiągnąć wartość nawet $150 \text{ nmol g}^{-1}\text{s.m. h}^{-1}$. Wytwarzanie NO w reakcji katalizowanej przez NR potwierdzono m.in. u kukurydzy (*Zea mays* L.) i słonecznika (*Helianthus annuus* L.) (Rockel i inni, 2002, Mur i inni, 2013). U zwierząt, w tym ludzi za syntezę NO odpowiada NOS (EC 1.14.13.39), enzym występujący w trzech podstawowych izoformach: indukowana NOS (iNOS), śródbłonkowa (ang. endothelial) NOS (eNOS) oraz neuronowa NOS (nNOS) (Förstermann i Sessa, 2012). Wszystkie izoformy zużywają L-argininę (Arg) jako substrat reakcji, a jako kosubstraty - tlen i NADPH. Kofaktorami są: dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), mononukleotyd flawinowy (FMN) i (6R-)5,6,7,8-tetrahydro-L-biopteryna (BH₄). Wszystkie izoformy NOS wiążą kalmodulinę, jednakże iNOS posiada inną w stosunku do eNOS i nNOS strukturę aminokwasów w domenie wiążącej kalmodulinę. Kalmodulina wiąże się z iNOS przy bardzo niskim stężeniu jonów wapnia (Ca^{2+}), których obecność nie ma wpływu na aktywność tej izoformy. W dwuetapowej reakcji NOS z Arg powstaje cytrulina i NO (Förstermann i Sessa, 2012). Do dnia dzisiejszego jedynymi organizmami fotosyntetyzującymi, u których potwierdzono obecność i aktywność enzymu wykazującego w 45% podobieństwo do ssaczy NOS są zielenice *Ostreococcus tauri* (Foresi i inni, 2010). Stąd biorą się pewne kontrowersje w przypadku oznaczania aktywności NOS-podobnej w tkankach roślin wyższych. Mimo to potwierdzono, że w peroksysomach, chloroplastach czy mitochondriach różnych gatunków roślin zachodzi reakcja wymagająca obecności tych samych substratów i kofaktorów jakie wykorzystują ssacze NOS do przeprowadzenia reakcji (Mur i inni, 2013, Yu i inni, 2014, Corpas i Barroso, 2015). Ponadto podobnie jak u zwierząt, wykazano, że NOS-podobna reakcja ulega hamowaniu po zastosowaniu analogów Arg m.in. L-NAME. Poszukiwania enzymu i genu kodującego to białko nadal trwają. Również dyskusyjna jest obecność w tkankach roślin jednego z kofaktorów ssaczy NOS – BH₄. Z drugiej strony rośliny produkują inne pteryny m.in. tetrahydrofoliany oraz ich pochodne i jak wykazano, związki te mogą zastępować BH₄ w reakcji analogicznej do NOS (Corpas i inni, 2009b, Foresi i inni, 20015). Innymi enzymami, które są badane pod kątem zdolności do syntezy NO są: peroksydazy klasy III, katalizujące reakcję syntezy NO z hydroksymocznika, cytochrom P450 utleniający N-hydroksyargininę w obecności NADPH i O₂ do NO, enzymy mitochondrialnego transportu elektronów - oksydazy cytochromu c (COX) i alternatywna oksydaza (AOX) (Mur i inni, 2013, Yu i inni, 2014).

Nieenzymatyczna synteza NO jest przede wszystkim związana z NO₂, szczególnie w kwaśnym pH i w obecności reduktanta np. kwasu askorbinowego. Reakcja zachodzi u roślin w apoplacie, cytozolu, peroksysomach i chloroplastach (Yu i inni, 2014).

Uważa się, że RNS w zależności od stężenia są cząsteczkami regulatorowymi bądź stanowią toksyczne związki prowadzące ostatecznie do śmierci komórek (Krasuska i inni, 2015b). Wysokie (patofizjologiczne) stężenie RNS odpowiada za uszkodzenie błon plazmatycznych (nitracja lub utlenianie elementów składowych błon) jak również za zmianę struktury i funkcji białek oraz kwasów nukleinowych. Uszkodzenie lub radykalne modyfikowanie podstawowych składników komórkowych nieuchronnie wiedzie do obniżania wydajności procesów fizjologicznych takich jak fotosynteza czy oddychanie mitochondrialne. RNS obecne w niższych stężeniach (fizjologicznych) pełnią rolę cząsteczek sygnałowych, regulatorowych, uczestniczących w reakcji roślin na czynniki stresowe, w fotosyntezie, oddychaniu mitochondrialnym, w przełamaniu spoczynku i kiełkowaniu nasion, ruchach aparatów szparkowych, kwitnieniu, dojrzewaniu i rozwoju owoców (Yu i inni, 2014, Castillo i inni, 2018). Wyniki licznych badań wykazały znaczący udział RNS w stymulacji kiełkowania nasion różnych gatunków roślin (Širová i inni, 2011, Arc i inni, 2013, Krasuska i inni, 2015b), w tym wrażliwych na światło, np. NO zastępuje sygnał światła czerwonego u nasion fotoblastycznie dodatnich (Beligni i Lamattina, 2000). Cząsteczka ta stymuluje powstawanie akwaporyn, ułatwiając w ten sposób pobierania wody (Liu i inni, 2007). Ponadto w trakcie przełamania spoczynku oraz stymulacji kiełkowania nasion RNS współdziałają z ROS (Krasuska i inni, 2015a) i takimi hormonami jak gibereliny (GA), etylen czy ABA (Bethke i inni, 2007, Gniazdowska i inni, 2007, 2010, Liu i inni, 2009, Arc i inni, 2013). Wykazano, że krótkotrwałe traktowanie zarodków jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) donorami NO powoduje wzrost emisji etylenu (Gniazdowska i inni, 2010) oraz obniża wrażliwość tkanek na ABA (Gniazdowska i inni, 2007). Jednocześnie udowodniono, że NO może bezpośrednio reagować z kwasem 1-aminocyklopropano-1-karboksylowym (ACC) - prekursorem etylenu (Gniazdowska i inni, 2010). Wzrost stężenia NO stymuluje ekspresję genów kodujących oksydazę GA₃, która z kolei katalizuje przekształcanie nieaktywnych form GA w aktywne (Bethke i inni, 2007). Ponadto NO reguluje metabolizm ABA. Obniżone stężenie ABA, wzrost ekspresji *CYP707A2* i stężenia białka *CYP707A2*, odpowiadającego za degradację tego hormonu wykazano w nasionach rzodkiewnika traktowanych NO (Liu i inni, 2009, Matakias i inni, 2009). Opisując działanie RNS w regulacji spoczynku i kiełkowania nasion zaproponowano model tzw. „drzwi nitrozacyjnych” (Krasuska i Gniazdowska, 2012). Koncepcja ta uwzględnia podwójną naturę cząsteczek RNS,

których „kluczowe” stężenie, odpowiednie dla konkretnego gatunku rośliny pozwala „otworzyć drzwi” czyli zainicjować kiełkowanie. Stymulacyjną rolę NO w kiełkowaniu nasion potwierdzają wyniki badań prowadzonych na transgenicznym rzodkiewniku posiadającym zdolność do syntezy białka NOS z *O. tauri*. Wykazano, że roślina ta produkuje nasiona o wyższej zdolności do kiełkowania, które charakteryzuje zwiększona zawartość NO (Foresi i inni, 2015).

Istotnym wydarzeniem fizjologicznym podczas rozwoju siewki jest uzyskanie autotrofii, czyli uruchomienie procesu fotosyntezy w chloroplastach. Niezakłócony wzrost i rozwój wymagają precyzyjnego mechanizmu komunikacji pomiędzy jądrem komórkowym, a chloroplastem i mitochondrium (Kleine i Leister 2016, de Souza i inni, 2017). Transdukcja sygnału z jądra komórkowego do organelli nosi nazwę sygnału anterogradowego, a sygnał retrogradowy obejmuje różne cząsteczki sygnałowe pochodzenia chloroplastowego czy mitochondrialnego, które są kierowane do jądra komórkowego. Koordynacja ekspresji genów zachodzi za pomocą różnych związków, które na dzień dzisiejszy nie zostały w pełni poznane. Uważa się jednak, że mogą w tym procesie brać udział ROS, bezpośrednio lub pośrednio (Kleine i Leister 2016, de Souza i inni, 2017). Przekształcenie etioplastów w dojrzałe chloroplasty na świetle jest związane z współdziałaniem NO, etylenu i auksyn, co zademonstrowano na przykładzie siewek pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) (Melo i inni, 2016). Autorzy wykazali, że NO brał udział w zazielenianiu poprzez hamowanie biosyntezy etylenu oraz nagromadzanie auksyn w liścieniach siewek. Z drugiej strony, wyniki przedstawione przez Gniazdowską i innych (2010), wykazały, że krótkotrwałe traktowanie NO spoczynkowych zarodków jabłoni prowadziło do wzrostu emisji etylenu z prawidłowo rozwijających się siewek o równomiernie zazielenionych liścieniach.

Udział NO w procesie biosyntezy chlorofilu wykazano na przykładzie etiolowanych siewek pszenicy (*Triticum aestivum* L.) (Beligni i Lamattina, 2000), a w fotomorfogenezie potwierdzono stosując mutanty rzodkiewnika, które charakteryzowały się obniżoną bądź zwiększoną zdolnością do syntezy tej cząsteczki (Lozano-Juste i León, 2011). Niższe stężenie NO było powiązane ze zmniejszoną zawartością fitochromu B w warunkach działania światłem czerwonym. Proces ten (fotomorfogeneza) znajduje się pod kontrolą czynników PIF (ang. phytochrome-interacting factors). U mutantów siewek rzodkiewnika o obniżonej zdolności do syntezy NO mierzono zwiększoną ekspresję genów kodujących PIF3, PIF1 i PIF4 (Lozano-Juste i León, 2011). Hamowanie wzrostu korzeni siewek rzodkiewnika poprzez obniżenie ekspresji *PIF3* również było efektem działania NO (Bai i inni, 2014). Ponadto

traktowanie NO było przyczyną przejściowego zmniejszenia wydajności fosforylacji fotosyntetycznej (Takahashi i Yamasaki, 2002).

Kluczowym enzymem w procesie fotosyntetycznej asymilacji CO₂ jest karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanowa RuBisCO (EC 4.1.1.39). U roślin wyższych enzym ten składa się z 8 mniejszych podjednostek (kodowanych przez rodzinę genów *RBCS* jądrowych) i 8 większych podjednostek (kodowanych przez pojedynczy gen plastydowy *rbcL*) (Suzuki i inni, 2010). Wykazano, że NO moduluje transkrypcję genów kodujących większą podjednostkę RubisCO u kukurydzy (Graziano i inni, 2002). Z kolei u żyworódki pierzastej (*Kalanchoe pinnata* Lam.) traktowanej NO obie podjednostki tego enzymu ulegały S-nitrozytacji (modyfikacji potranslacyjnej). Odwracalna na świetle S-nitrozyłacja RuBisCO jest przyczyną hamowania aktywności tego enzymu (Abat i inni, 2008). Jak wykazano, NO wiąże się do kilku różnych miejsc w fotosystemie II (PSII) i spowalnia transport elektronów (Wodala i inni, 2008). Hamowanie reakcji fotosyntezy bezpośrednio zależnych od światła można badać stosując m.in. pomiar fluorescencji chlorofilu *a*. Analizie poddaje się parametry fluorescencji takie jak: stosunek fluorescencji zmiennej i fluorescencji maksymalnej po adaptacji (badanego materiału) w ciemności: Fv/Fm oraz fluorescencji zmiennej do fluorescencji początkowej po adaptacji (badanego materiału) w ciemności: Fv/F0. Wartość parametru Fv/Fm określa maksymalną fotochemiczną wydajność PSII, a wskaźnik Fv/F0 efektywność kompleksu wydzielania O₂. Jakikolwiek zmiany (obniżenie wartości) parametru Fv/Fm świadczą o negatywnych zmianach w PSII (Baker, 2008). Inkubacja liści grochu (*Pisum sativum* L.) w 1 mM roztworze S-nitrozoglutationu (GSNO) przez 2 h spowodowała obniżenie wartości Fv/Fm (Wodala i inni, 2008). Z drugiej strony w przypadku izolowanych chloroplastów traktowanych SNAP wartość Fv/Fm nie ulegała zmianom (Takahashi i Yamasaki, 2002). Ostatni przykład wskazuje, że udział RNS w procesie fotosyntezy nie jest zawsze jednoznacznie negatywny.

Uniwersalnym oddziaływaniem RNS na cząsteczki biologiczne w komórkach roślin i zwierząt jest zdolność do reagowania z resztami aminokwasowymi w białkach/peptydach. W ten sposób dochodzi do potranslacyjnych modyfikacji białek (Szuba i Wojtaszek, 2010). Powszechnie wyróżnia się trzy podstawowe rodzaje modyfikacji białek, w których uczestniczą RNS: modyfikacja związana z oddziaływaniem RNS z metaloproteinami, reakcja RNS z grupą tiolową cysteiny (S-nitrozyłacja) oraz reakcja nitracji głównie reszt tyrozynowych (Tyr), ale również tryptofanu (Ciąćka i inni, 2015).

Nitracja Tyr, w wyniku której powstaje 3-nitroTyr (3-NT) polega na przyłączeniu do pierścienia aromatycznego grupy nitrowej (-NO₂), w pozycji *orto* grupy hydroksylowej fenolu

(Corpas i inni, 2009a, Leitner i inni, 2009; Mata-Pérez i inni, 2016). Reakcja przebiega m.in. w obecności ONOO⁻, który w warunkach fizjologicznych może reagować z CO₂ i następnie ulegać dekompozycji do CO₃⁻ i NO₂, będącego silnym czynnikiem nitrującym. Ponadto w nitracji Tyr uczestniczą: O₂⁻, nadtlenek wodoru (H₂O₂) i NO₂⁻ (Bayden i inni, 2011, Radi, 2012). Jak wykazano nitracja Tyr zachodzi zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*, nie bezpośrednio w reakcji z ONOO⁻, ale dwuetapowo. Najpierw z Tyr powstaje nietrwały rodnik tyrozylowy w wyniku utlenienia pierścienia fenolowego, następnie czynnik nitrujący umożliwia wprowadzenie *NO₂ do cząsteczki aminokwasu i w ten sposób powstaje 3-NT (Bayden i inni, 2011; Radi, 2012, Ciąćka i inni, 2015, Mata-Pérez i inni, 2016). Wyniki licznych badań wykazały, że nitracji ulegają najczęściej białka metabolizmu podstawowego, izolowane z tkanek roślin poddanych działaniu czynników stresowych o charakterze biotycznym i abiotycznym. (Lozano-Juste i inni, 2011, Ciąćka i inni, 2015, Mata-Pérez i inni, 2016). Corpas i inni (2009a) wykazali, że nawet w warunkach optymalnych dla wzrostu zachodzi proces nitracji, zatem modyfikacja ta ma znaczenie fizjologiczne, a nie tylko patofizjologiczne. Identyfikacja białek nitrowanych izolowanych z 2 tygodniowych siewek rzodkiewnika pozwoliła oszacować, że ponad 60% z analizowanych prób stanowią białka zaangażowane w podstawowy metabolizm (Lozano-Juste i inni, 2011). Nitracja znacząco modyfikuje funkcje białka, ponieważ włączenie NO₂ do pierścienia aromatycznego Tyr obniża pK_a grupy fenolowej, a to z kolei wpływa na utrzymanie konformacji przestrzennej cząsteczki (Corpas i inni, 2009a, Ciąćka i inni, 2015). W porównaniu do Tyr, 3-NT jest hydrofilowa i ujemnie naładowana. Zatem białka zawierające 3-NT mogą utracić dotychczasowe funkcje, ale i nabyć nowe (Corpas i inni, 2009a, Lozano-Juste i inni, 2011). Wyniki badań dotyczących tkanek zwierząt wykazały, że nitracja może regulować fosforylację/defosforylację reszt Tyr, co ma znaczenie w sygnalizacji komórkowej (Corpas i inni, 2009a, Szuba i Wojtaszek 2010, Kolbert i inni, 2017). Modułacje fosforylacji Tyr jak i nitrowanie tego aminokwasu powodują zakłócenia w organizacji mikrotubuli i morfologii włóśniaków, co wskazuje na związek między fosforylacją Tyr i nitrowaniem α -tubuliny (Kolbert i inni, 2017). Wydaje się, że nitracja konkuruje z fosforylacją o miejsca wiązania w resztach Tyr α -tubuliny. Wyniki badań prowadzonych przez Galetsky i innych (2011) wykazały, że w warunkach intensywnego oświetlenia stopień fosforylacji i/bądź nitracji białek ma zdecydowany wpływ na stabilność kompleksów fotosyntetycznych. Zatem nitracja kluczowych enzymów i późniejsze zmiany ich właściwości katalitycznych mogą stanowić istotny sposób regulacji pierwotnego metabolizmu komórki. Z kolei według Lozano-Juste i innych (2011) nitrowanie białek to sposób na modulowanie reakcji obronnych organizmu.

Poliaminy (PA)

Pierwsze badania dotyczące poliamin (PA) sięgają XVII wieku, ale dopiero w 1878 roku zostały zidentyfikowane i opisane jako jedne z podstawowych związków organicznych (Bachrach, 2010). W przypadku tkanek roślinnych w 1911 roku wykazano obecność putrescyny (Put) w bieluniu dziędzierzawie (*Datura stramonium* L.). Kolejne wyniki badań potwierdziły, że spermina (Spm), spermidyna (Spd) i agmatyna należą do związków organicznych powszechnie występujących w roślinach wyższych (Kusano i inni, 2008, Takahashi i Kakehi, 2010, Handa i inni, 2018).

PA to drobnocząsteczkowe związki alifatyczne posiadające grupy aminowe - NH₂, które umożliwiają łączenie się z innymi składnikami komórkowymi. Wykazano, że w tkance roślinnej stężenie tych regulatorów wynosi od około 5 µg g⁻¹ św. m. do około 500 µg g⁻¹ św. m. i zależy od jej rodzaju, etapu rozwojowego, a także rodzaju i natężenia działania czynnika stresowego na jaki roślina jest narażona (Krasuska i inni, 2012, Handa i inni, 2018). Komórkowa lokalizacja PA obejmuje: jąderko i jądro komórkowe, chloroplasty, chromoplasty, mitochondria, wakuolę, cytoplazmę, a także w ścianę komórkową (Kumar i inni, 1997, Handa i inni, 2018). Około 90% PA obecnych w komórce występuje w postaci związanej np. z pochodnymi kwasu cynamonowego takimi jak kwas *p*-kumarowy czy kwas ferulowy (Bagni i Tassoni, 2001, Martin-Tanguy, 2001). W neutralnym pH związki te przyjmują postać (poli)kationów (posiadają pozytywny ładunek), stąd mogą reagować z cząsteczkami posiadającymi ujemny ładunek, takimi jak RNA, DNA, chromatyna, fosfolipidy, a także z niektórymi białkami (Kumar i inni, 1997). Wytworzenie wiązania elektrostatycznego między PA, a wyżej wymienionymi cząsteczkami może je albo stabilizować albo destabilizować np. hamowaniu ulega aktywność endonukleaz (Kusano i inni, 2008). W przypadku tkanek roślinnych najwyższe stężenie osiągają: Put – 1,4-diaminobutan, Spd – N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan i Spm – NN'-bis-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan (Kusano i inni, 2008, Handa i inni, 2018). Ponadto wykazano obecność termosperminy (T-Spm) strukturalnego izomeru Spm, szczególnie istotnej w przypadku reakcji roślin na stresy (Takano i inni, 2012).

Put pod względem budowy jest najprostsza PA. Powstaje w wyniku dekarboksylacji L-ornityny (Orn) z udziałem dekarboksylazy Orn (ODC; EC 4.1.1.17). Tę reakcję poprzedza odłączenie mocznika od cząsteczki Arg, a enzymem katalizującym jest arginaza (EC 3.5.3.1). Put może powstawać z Arg również na innej drodze metabolicznej, której produktami pośrednimi są agmatyna i N-karbamoiloputrescyna. Enzymami zaangażowanymi w przemiany są kolejno dekarboksylaza argininy (ADC; EC 4.1.1.19), iminohydrolaza

agmatyny (AIH, EC 3.5.3.12) i aminohydrolaza N-karbamoyloputrescyny (CPA, EC 3.5.1.53) (Fuell i inni, 2010). Z kolei Spd i Spm są syntetyzowane poprzez przyłączanie do Put grup aminopropylowych pochodzących od dekarboksylowanej *S*-adenozylometioniny (dSAM). Spd powstaje w reakcji katalizowanej przez syntazę Spd (SPDS, EC 2.5.1.16), następnie Spd ulega przekształceniu do Spm z udziałem syntazy Spm (SPMS, EC 2.5.1.22). Szlak biosyntezy PA łączy się ze szlakiem biosyntezy etylenu poprzez dSAM (Kusano i inni, 2008, Fuell i inni, 2010; Krasuska i inni, 2012).

Degradacja PA zachodzi w wyniku aktywności oksydaz aminowych, w tym oksydaz diaminowych (DAO, EC 1.4.3.6) w procesie oksydatywnej deaminacji. Katabolizm Put, która jest diamina, przeprowadza DAO zawierająca jony miedzi. Produktami tej reakcji są pirolina, H₂O₂ i amoniak (NH₃) (Kusano i inni, 2008, Wimalasekera i inni, 2011b). Spd i Spm, posiadające więcej niż dwie grupy -NH₂ stanowią substrat dla oksydaz poliaminowych (PAO; EC 1.5.3.11), enzymów zawierających jako grupę prostetyczną flawinę (Kusano i inni, 2008). W tym przypadku hydroliza przebiega wielofazowo, w konsekwencji czego powstają różne produkty pośrednie, m.in. pirolina lub amylopropylpirolina przekształcana dalej do dwuazobicyclononanu lub dwuaminopropanu i H₂O₂. Następnie, dwuaminopropan może być przekształcany do β-alaniny, a pirolina do kwasu γ-aminomasłowego (GABA) (Kusano i inni, 2008).

PA są zaangażowane w różne procesy komórkowe m.in. transkrypcję, replikację, kondensację chromatyny, stabilizację błon komórkowych, pomp protonowych w błonach komórkowych, czy modulację aktywności enzymatycznej (Kusano i inni, 2008, Takahashi i Kakehi, 2010). Regulują kiełkowanie nasion i wzrost siewki, kwitnienie, dojrzewanie owoców oraz starzenie (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka, 2007, Krasuska i inni, 2012). Nagromadzenie PA jest obserwowane jako reakcja roślin na czynniki stresowe (Kumar i inni, 1997). Poprzez zastosowanie inhibitora enzymu uczestniczącego w biosyntezie PA – dekarboksylazy ornityny (ODC) wykazano, że związki te uczestniczą w ryzogenezie eksplantantów liści tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) i korzeni grochu (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka, 2007). Ponadto Put służy jako prekursor w biosyntezie pirydyny i niektórych alkaloidów tropanowych (Takahashi i Kakehi, 2010). Put wraz z Spd regulują proces fosforylacji Tyr (Bachrach i inni, 2001) i są niezbędne dla zachowania vitalności komórek eukariotycznych. Ponadto, głównie Spm wpływa na wzrost aktywności błonowych H⁺-ATPaz poprzez wzmocnienie oddziaływań enzymu z białkami 14-3-3 (Kusano i inni, 2008).

W nasionach obecność PA została potwierdzona wynikami licznych badań. Jednakże zarówno stężenie całkowitych PA jak i osobno każdej z nich jest uzależnione od stopnia

dojrzałości nasion jak i gatunku rośliny macierzystej. PA regulują zarówno spoczynek jak i kiełkowanie nasion. Ten ostatni proces stymulują nawet w warunkach stresowych (Krasuska i inni, 2012, Ciąćka i Krasuska, 2014). Stymulacja kiełkowania nasion poprzez wprowadzenie PA do kultury zależy od gatunku rośliny i stanu materiału doświadczalnego (Khan i inni, 2012). W przypadku nasion ostrej papryki (*Capsicum annuum* L.) zarówno Spd, Spm jak i Put stymulowały kiełkowanie. Ostatnia z wymienionych PA była najbardziej efektywna i działała nawet w stosunkowo niskich stężeniach (Khan i inni, 2012). Wyniki badań pozwoliły wykazać, że oddziaływanie PA na proces kiełkowania nasion zależy od stosunku Put do Spd. Jeżeli stosunek ten przewyższa wartość 1, to obserwuje się efektywny wzrost wydłużeniowy komórek, natomiast stosunek Put/Spd wynoszący poniżej 1 charakteryzuje tkanki merystematyczne, w których intensywnie zachodzą podziały komórkowe (Krasuska i inni, 2012). PA w nasionach mogą stanowić znacznik wigoru (Ciąćka i Krasuska, 2014). Egzogenne PA podnoszą wigor nasion, a zatem poprawiają jakość i zdolność do kiełkowania (Khan i inni, 2012).

Porównując wyniki badań dotyczących udziału PA jak i NO w różnych procesach fizjologicznych wykazano istnienie zależności i współdziałania tych cząsteczek tzw. „cross-talk” (Yamasaki i Cohen, 2006, Wimalasekera i inni, 2011a). Dotyczy to m.in. rozwoju korzeni, oddziaływań podczas reakcji na stresy takie jak: susza, zasolenie, niedobór minerałów, obecność metali ciężkich, promieniowanie, zmienna temperatura czy uszkodzenia mechaniczne (Arasimowicz-Jelonek i inni, 2009, Wimalasekera i inni, 2011a). Udział NO i PA wykazano również w procesie embriogenezy (Galston i inni, 1997). Wykazano wzmożoną emisję NO z siewek rzodkiewnika oraz kultury komórkowej tytoniu traktowanych Spm, Spd i Put (Tun i inni, 2006). U mutantów rzodkiewnika pozbawionych oksydazy aminowej *CuAO1* obserwowano obniżoną emisję NO, szczególnie z wierzchołków korzeni głównych (Wimalasekera i inni, 2011b), co wskazuje, że enzymy katabolizmu PA mogą brać udział w syntezie RNS. Wyniki licznych badań wykazały udział obu cząsteczek regulatorowych w modulacji spoczynku i kiełkowania nasion. Mutanty rzodkiewnika niezdolne do syntezy oksydazy aminowej *CuAO1* charakteryzowały się zwiększoną zdolnością do kiełkowania w obecności ABA. Autorzy sugerują, że oksydaza aminowa oddziałując na szlak sygnałowy NO może stanowić istotny regulator kiełkowania (Wimalasekera i inni, 2011b). Z kolei mutacje genów kodujących arginazę u rzodkiewnika skutkowały wzrostem zdolności do tworzenia korzeni bocznych i przybyszowych oraz nagromadzeniem NO w tkankach (Flores i inni, 2008). Powiązanie metabolizmu Arg, PA i NO wykazano dla korzeni i liści jabłoni (badano rośliny trzy letnie) (Gao i inni, 2009). Młodsze korzenie jak i liście charakteryzowało wyższe

stężenie Arg, wyższa aktywność arginazy oraz enzymu uznanego za NOS-podobny.

Współdziałanie PA i NO może wynikać z tego, że prekursorem w biosyntezie obu regulatorów jest Arg, przy jednoczesnym założeniu istnienia u roślin wyższych enzymu homologicznego do ssaczych NOS. Zatem stosując Can w badaniach można liczyć się z wpływem tego związku na metabolizm zarówno PA jak i NO.

Kanawanina (Can)

Can (kwas 2-amino-4-(guanidynooksy)-masłowy) należy do alifatycznych, niebiałkowych aminokwasów (Vranova i inni, 2011, Staszek i inni, 2017). Naturalnie występuje w roślinach strączkowych takich jak wyka kosmata (*Vicia villosa* Roth.) czy robinia pseudoakacja (*Robinia pseudoacacia* L.). Gromadzi się głównie w nasionach, w których pełni ważną funkcję jako forma zapasowa azotu (Huang i inni, 2011). Stężenie Can w nasionach waha się od 6 do 13% suchej masy (Rosenthal, 2001). Kanawalia mieczykowata (*Canavalia ensiformis* L.) to roślina, z której nasion po raz pierwszy wyizolowano Can stanowiącą aż do 13% suchej masy i do 90% azotu przypadającego na wolne aminokwasy (Huang i inni, 2011, Rosenthal, 1990). Z kolei w przypadku południowoafrykańskiej suderlandii (*Sutherlandia frutescens* L.) obecność tego aminokwasu potwierdzono w liściach w ilościach nawet do 14,5 mg g⁻¹ suchej masy (Colling i inni, 2010). Poza funkcją zapasową, Can odgrywa rolę w reakcjach obronnych roślin przed roślinożercami (Vranova i inni, 2011).

Wyniki badań prowadzonych na kulturach tkankowych kanawalii (*Canavalia lineata* Thunb.) wskazały na pozytywną korelację pomiędzy syntezą Can a tworzeniem chlorofilu, zatem zasugerowano, że komórkowym organellum, w którym powstaje ten aminokwas są właśnie chloroplasty (Hwang i inni, 1996). Stosując substraty enzymów cyklu Krebs-Henseleit (cyklu ornitynowo-mocznikowego) obserwowano wzrost syntezy Can w tkankach roślin zdolnych do produkcji tego związku, a metabolitami pośrednimi reakcji były ureido-L-homoseryna i kwas kanawaninobursztynowy (Hwang i inni, 1996).

Rosenthal (1990) wykazał, że enzymem katalizującym hydrolityczny rozpad Can do kanaliny i mocznika jest arginaza. Ponadto sugeruje się również udział w tym procesie ureazy (EC 3.5.1.5.). Z kolei kanalina (kolejny niebiałkowy aminokwas) to toksyczny analog ornityny (Rosenthal, 1990). Kamo i inni (2015) potwierdzili, że w tkankach roślin Can może być przekształcana do cyjanamidu, uważanego za związek allelopatyczny (Soltys i inni, 2011). Can jest obecna w siewkach lucerny (*Medicago sativa* L.), które są składnikiem diety zarówno zwierząt jak i ludzi. Konsumpcja nasion lub siewek lucerny wiąże się z rozwojem choroby autoimmunologicznej – tocznia rumieniowatego układowego oraz z anemią,

leukopenią i pancytopenią (Staszek i inni, 2017). Obserwacje dotyczące naturalnych ekosystemów kanawalii mieczykowatej umożliwiły wykazanie hamującego działania tej rośliny na wzrost innych roślin (oddziaływanie o charakterze allelopatycznym) związanego z uwalnianiem Can (Nakajima i inni, 2001). Aminokwas ten dodawany w stężeniach milimolarnych do kultury siewek ryżu (*Oryza sativa* L.) hamował wzrost elongacyjny drugiej pochwy liściowej. Działanie to było odwracalne po podaniu Arg (Nakajima i inni, 2001). Sugeruje się, że ze względu na swoje właściwości Can mogłaby być składnikiem naturalnych herbicydów (Staszek i inni, 2017). Aminokwas ten wchodzi w skład zachodnioafrykańskich fitofarmaceutyków przygotowywanych z suderlandii wykorzystywanej w terapii nowotworów oraz wspomagająco w zwalczaniu objawów gorączki, cukrzycy czy przy gojeniu ran (Colling i inni, 2010). Bierze się pod uwagę korzystny wpływ Can w walce z symptomami zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS) (Colling i inni, 2010).

Can to strukturalny analog białkowego aminokwasu Arg (Hwang i inni, 1996, Rosenthal, 2001, Nakajima i inni, 2001, Huang i inni, 2011), w którym grupa metylenowa (-CH₂) została zastąpiona atomem tlenu. Obecność dodatkowego atomu tlenu w sąsiedztwie grupy guanidynowej osłabia zasadowy charakter aminokwasu i istotnie wpływa na tworzenie wiązań jonowych (Rosenthal, 2001). Jako antymetabolit Can jest związkiem toksycznym (Bass i inni, 1995, Nakajima i inni, 2001, Huang i inni, 2011), a mechanizm działania wiąże się m.in. ze współzawodnictwem z Arg podczas syntezy białek (Huang i inni, 2011). Włączanie Can w strukturę białek zachodzi przy udziale syntetazy arginylo-tRNA, enzymu zaangażowanego w proces translacji (Rosenthal, 2001). To z kolei wiąże się z powstawaniem dysfunkcyjnych białek, tzw. białek kanawanylowych (Rosenthal, 2001, Staszek i inni, 2017). Wykazano, że u wirusów, bakterii i grzybów traktowanych Can dochodzi do zakłócenia syntezy kwasów nukleinowych (Ekanayake i inni, 2007). Na przykładzie linii komórkowych uzyskanych z nerek noworodka chomika udowodniono, że aminokwas ten odpowiada za obniżenie całkowitej ilości białka i DNA (Wallace i Keir, 1986).

Can służy jako substrat w reakcjach, w których biorą udział enzymy „standardowo” wykorzystujące Arg (Rosenthal, 2001). Hamowanie aktywności dekarboksylazy Arg, a poprzez to modyfikowanie zawartości PA w wyniku działania tego niebiałkowego aminokwasu wykazano dla korzeni fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) (Palavan-Ünsal, 1987) jak i siewek kukurydzy (Schwartz i inni, 1997). W tych ostatnich Can dodatkowo hamowała aktywność dekarboksylazy ornityny, a w konsekwencji powodowała obniżenie zawartości Spd (Schwartz i inni, 1997). Can ma wpływ na enzymy, których aktywność jest związana z metabolizmem NO, zarówno u ludzi jak i u roślin. W badaniach klinicznych prowadzonych

na tkankach zwierzęcych Can wykorzystuje się jako inhibitor NOS (głównie iNOS) (Abd El-Gawad i Khalifa 2001, Li i inni, 2001, Luzzi i Marletta, 2005). U kukurydzy traktowanej tym aminokwasem obniżenie aktywności NR obserwowano w wierzchołkach korzeni (Aslam i inni, 1987).

Wprowadzając Can do układu badawczego (materiału roślinnego) moduluje się nie tylko ścieżkę syntezy RNS ale również PA. Biorąc pod uwagę fakt, że istnieje niewiele opublikowanych danych dotyczących współdziałania PA-NO w aspekcie ustępowania spoczynku, stymulacji kiełkowania nasion oraz wzrostu młodej siewki wydaje się koniecznym uzupełnienie tej luki. Ponadto, jak wspomniałam obecność i aktywność enzymu homologicznego do ssaczych NOS u roślin wyższych budzi wiele kontrowersji. Zatem każda obserwacja wskazująca na istnienie reakcji, w której Arg ulegałaby przekształceniu do cytruliny z uwolnieniem NO w obecności tlenu, może przyczynić się do ostatecznego wykazania obecności tego enzymu (lub enzymu o podobnej budowie i funkcji). Również mimo licznych badań mechanizm działania RNS nie jest do końca poznany. Brakuje informacji o współdziałaniu PA-NO w metabolicznych szlakach sterujących fizjologią nasion. Stąd jako temat moich badań wybrałam funkcję NO i PA w regulacji kiełkowania zarodków i podczas wczesnego wzrostu siewek. Publikacje, które wchodzi w skład mojego osiągnięcia naukowego skupiają się wokół wyżej przedstawionej problematyki.

CEL BADAŃ

Liczne dane literaturowe dostarczają coraz więcej informacji na temat mechanizmów działania zarówno NO jak i PA, regulatorów zaangażowanych w różnych procesach fizjologicznych (m.in. w regulację spoczynku i kiełkowania nasion). Jednak wiedza ta, dalej niekompletna, pozostawia pytania bez odpowiedzi. Nadal toczą się spory i dyskusje dotyczące syntezy NO w warunkach tlenowych, z udziałem enzymu wykorzystującego jako substrat Arg, w tkankach roślin wyższych. Na dzień dzisiejszy, u tych organizmów obecność enzymu analogicznego do ssaczych NOS nie została potwierdzona. Również istnieje wiele pytań związanych z udziałem RNS jako cząsteczek sygnałowych w komunikacji między organellami komórkowymi, procesu o fundamentalnym znaczeniu fizjologicznym, szczególnie na wczesnych etapach rozwoju siewki, podczas dojrzewania chloroplastów.

Wyniki badań prowadzonych w Katedrze Fizjologii SGGW w Warszawie pozwoliły wykazać istotną rolę RNS w stymulacji kiełkowania zarodków jabłoni, które charakteryzuje głęboki spoczynek. Jednakże, dane z przeprowadzonych eksperymentów cały czas prowokują do stawiania kolejnych pytań z zakresu biochemii tych regulatorów. Ponadto projektowanie

doświadczeń związanych z RNS wymusza stosowanie odpowiednich donorów jak i „zmiataczy”, których skuteczność musi być potwierdzona kolejnymi badaniami. Związkiem, który stanowi potencjalny inhibitor roślinnego odpowiednika ssaczy NOS, a zatem modyfikuje endogenne stężenie RNS w tkankach jest m.in. Can. Aminokwas ten stanowi łącznik w badaniach dotyczących NO i PA.

NO i PA często pełnią podobne funkcje w roślinach, jednak niewiele wiadomo o ich wzajemnym współdziałaniu m.in. podczas ustępowania spoczynku (szczególnie głębokiego), kiełkowania nasion oraz wzrostu siewek. Z tego powodu wybrałam te cząsteczki regulatorowe w projektowaniu zadań badawczych, a przedstawione poniżej pytania umożliwiły mi określenie celu badań i jego eksperymentalną weryfikację.

1. Czy każda z podstawowych PA lub/i Arg w takim samym stopniu stymulują emisję RNS z tkanek osi zarodkowych i korzeni młodych siewek?
2. Czy suplementacja PA może całkowicie zastąpić działanie NO?
3. W jaki sposób NO modyfikuje zawartość podstawowych PA?
4. Czy PA mogą wpływać na metabolizm NO, a NO na metabolizm PA?
5. Czy Can hamuje kiełkowanie nasion i wzrost siewki?
6. Czy Can modyfikuje zawartość RNS, w tym aktywność NOS-podobną?
7. Czy NO jako cząsteczka sygnałowa bierze udział w przejściu siewki na autotrofię?
8. Czy zmienna ilość białek nitrowanych może mieć zastosowanie praktyczne np. w ocenie ustąpienia spoczynku na wczesnych etapach kiełkowania?

Celem moich badań było wykazanie mechanizmów działania NO i PA, jako cząsteczek biorących udział w regulacji spoczynku nasion oraz wzroście młodej siewki.

MODEL EKSPERYMENTALNY

W celu weryfikacji pytań jako materiał doświadczalny zastosowałam zarodki jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) odmiana Antonówka i siewki pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) odmiana Malinowy Ożarowski. Wybór zarodków jabłoni był podyktowany dobrą znajomością tego materiału (Lewak, 2011). Badania związane z ustępowaniem spoczynku zarodków jabłoni pod wpływem działania NO są prowadzone w Katedrze Fizjologii Roślin od ponad 10 lat, a kolejne uzyskane wyniki pozwalają na dogłębne studiowanie problemu. Nasiona jabłoni należą do typu ortodoksyjnego, zapadają w głęboki, embrionalny spoczynek oraz charakteryzują się niewrażliwością na desykcję podczas dojrzewania. Pozbawienie nasion jabłoni łupiny nasiennej i obielma nie przyspiesza kiełkowania, które nawet w

optymalnych warunkach laboratoryjnych jest powolne. Siewki rozwijające się z takich zarodków charakteryzuje obecność licznych anomalii rozwojowych, w tym zazielenianie tylko jednego liścienia oraz skrócenie hypokotyła i korzenia zarodkowego. Do badań wykorzystywano osie zarodkowe/korzenie zarodkowe lub liścienie młodych siewek. Większość eksperymentów prowadzono na świeżym materiale, ale jeżeli procedura badawcza tego wymagała materiał mrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w -70°C do dalszych analiz.

W przypadku nasion pomidora, materiał ten wybrano ze względu na szybkie i równomierne kiełkowanie. Pod uwagę brano również dostępność materiału i sposób jego uzyskania. Do badań wykorzystywano korzenie młodych siewek, najczęściej pracowano na świeżym materiale, ale jeśli procedura tego wymagała materiał mrożono w ciekłym azocie.

Nasiona jabłoni po izolacji z owoców, suszono powietrznie i przechowywano w szklanych słojach w temperaturze 4°C do dalszych analiz. Kontrolę stanowiły zarodki jabłoni izolowane z nasion, których kulturę prowadzono w szklanych szalkach Petriego na bibule filtracyjnej zwilżonej wodą destylowaną. Dokładny opis traktowania zarodków jabłoni donorami NO, zmiataczami NO lub roztworami PA i Arg oraz warunki prowadzonej kultury zarodków został umieszczony w pracach składających się na moje osiągnięcie naukowe.

Stosowane przeze mnie donory NO to m.in. azotyn sodu, który pod wpływem działania kwasu uwalnia różne formy RNS (Yamasaki, 2000), które działały na zarodki jabłoni umieszczone w szklanej, szczelnie zamkniętej kamerze, na bibule filtracyjnej nasączonej buforem fosforanowym pH 7,0. Traktowanie można prowadzić zarówno na świetle jak i w ciemności. Po inkubacji zarodki przepłukiwano wodą destylowaną i przenoszono do szalek Petriego na bibulę filtracyjną zwilżoną wodą destylowaną. Część eksperymentów była prowadzona na zarodkach krótkotrwanie (3h) traktowanych SNAP (traktowanie na świetle).

W przypadku PA stosowano wodne roztwory Put, Spd i Spm o stężeniach ustalonych eksperymentalnie (testy kiełkowania). Poza tym w niektórych przypadkach stosowano Can, Arg lub cPTIO, których stężenie również wybrano na podstawie wyników testów kiełkowania.

Kiełkowanie nasion pomidora prowadzono w wodzie w szalkach Petriego wyłożonych bibulą filtracyjną. Do dalszych analiz wybierano siewki, których korzenie osiągnęły długość około 5 mm. Kulturę siewek prowadzono dalej na bibule filtracyjnej zwilżonej wodą (kontrola) lub wodnymi roztworami Can. Wybrane stężenia Can określono eksperymentalnie.

Realizacja celu badań była możliwa dzięki zastosowaniu różnych technik laboratoryjnych (dokładny opis poszczególnych metod znajduje się w pracach składających się na osiągnięcie naukowe) np. rozdziałów elektroferetycznych, immunotechnik (Western blot i ELISA), wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), technik mikroskopowych, analizy transkrypcji genów czy identyfikacji białek techniką spektrometrii masowej (technika MALDI TOF).

OPIS UZYSKANYCH WYNIKÓW

Opis uzyskanych wyników – publikacja nr 1 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego.

PA stanowią ważne cząsteczki regulatorowe, które również biorą udział w modulacji spoczynku i kiełkowania nasion, w tym zarodków jabłoni, co zostało przedstawione w pracy Sińskiej i Lewandowskiej (1991).

Weryfikując pierwsze z wyżej przedstawionych pytań wykazałam, że Arg, Put i Spd stymulowały emisję RNS z osi zarodkowych (doświadczenie z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych dla NO – DAF-FM DA a dla ONOO⁻ - APF). Z kolei Spm hamowała emisję ONOO⁻, a emisję NO utrzymywała na poziomie uzyskanym dla kontroli. Wyniki te wskazują na istnienie zależności PA-NO w aspekcie regulacji spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni oraz na to, że Arg jest istotnym metabolitem w tym współdziałaniu, zwłaszcza, że dodana do kultury działa stymulująco na proces kiełkowania. Najprawdopodobniej Arg stanowi element łączący PA i NO m.in. na poziomie zazębienia się ich szlaków biosyntezy.

Kiełkowanie zarodków jabłoni w obecności Can ulega całkowitemu zahamowaniu, a przedłużona kultura prowadzi wręcz do ich obumarcia (weryfikacja **pytania nr 5.**). Ponadto badając wpływ NO i Arg (krótkotrwałe traktowanie zarodków NO i wprowadzenie Arg do podłoża prowadzonej kultury) uzyskałam wynik wskazujący na addytywne działanie tych związków w czasie kiełkowania zarodków jabłoni (stymulacja wyniosła 20%).

W pracy składającej się na moje osiągnięcie naukowe wykazałam, że hamujące działanie Spm jak i Can w stosunku do kiełkowania zarodków jabłoni jest odwracalne jeżeli zostaną one krótkotrwałe potraktowane NO na początku doświadczenia. W tym przypadku uzyskałam ponad trzykrotną stymulację kiełkowania, co z kolei wskazuje na udział RNS w katabolizmie Spm. Ponadto odwrócenie działania Can poprzez krótkotrwałe działanie NO ponownie wskazuje na Arg, jako metabolit zaangażowany w biosyntezę tego regulatora. Stymulację katabolizmu Spm (mierzoną jako aktywność PAO) obserwowałam w ekstraktach

enzymatycznych uzyskanych z osi zarodkowych jabłoni krótkotrwale traktowanych NO na różnych etapach ich kiełkowania. Z kolei w celu weryfikacji **pytania nr 2** do kultury zarodków wprowadziłam jednocześnie PA, które stymulują kiełkowanie (Put lub Spd) oraz zmiatacz NO – cPTIO. Obniżenie kiełkowania wyniosło około 80–90 % w stosunku do tego, które uzyskiwałam stosując same wyżej wymienione PA. Zatem PA nie mogą zastąpić działania RNS w procesie kiełkowania zarodków jabłoni.

Opis uzyskanych wyników – publikacja nr 6 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego.

Kontynuując badania dotyczące współdziałania PA-NO kolejno weryfikowałam pytania nr 3 i 4. Sygnałowa aplikacja NO zarodków jabłoni tuż po ich izolacji sprzyja obniżaniu stężenia wolnej Arg (metoda badawcza wykorzystująca technikę HPLC) w osiach zarodkowych. Z kolei aminokwas ten ulegał nagromadzeniu jeżeli do kultury zarodków wprowadzono Put lub Spd. Widoczne różnice dotyczące stężenia Arg w osiach zarodkowych zarodków traktowanych NO lub kiełkujących w obecności wybranych PA najprawdopodobniej wynikają ze zmian w szlakach metabolicznych tego aminokwasu pod wpływem działających bodźców i czasu ekspozycji. Z drugiej strony, w osiach zarodków traktowanych Spm, mimo widocznych oznak utrzymania spoczynku również odnotowano wzrost stężenia Arg. Zatem zawartość tego aminokwasu w tkankach nie jest wystarczającym wyznacznikiem aktywności metabolicznej na wczesnych etapach kiełkowania. Wyniki badań opublikowanych wcześniej (publikacja nr 5 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego) wskazały, że w ekstraktach białkowych uzyskanych z osi zarodków jabłoni zachodzi reakcja z udziałem enzymu, który przekształca Arg do NO w warunkach tlenowych i w obecności kofaktorów niezbędnych dla aktywności ssaczych NOS (metoda spektrofotometryczna z wykorzystaniem utlenionej hemoglobiny oraz L-NAME, dodawanego zamiast Arg, w celu uzyskania kontroli negatywnej). W dalszej części opisu wyników, dla uproszczenia stosuję termin NOS-podobna reakcja lub NOS-podobny enzym. Tak jak NOS-podobny enzym, arginaza również wykorzystuje Arg jako substrat, a oba enzymy podlegają kontroli poprzez stężenie metabolitów pośrednich (ujemne sprzężenie zwrotne). Te dwa enzymy stanowią łącznik metaboliczny szlaków syntezy PA i NO. Weryfikując pytanie nr 4 wykazałam, że obecność Put lub Spd w kulturze zarodków jabłoni działa stymulująco na aktywność NOS-podobną oznaczoną w ekstraktach białkowych izolowanych z osi zarodkowych. Ponadto obie PA stymulowały aktywność arginazy. Niższą aktywnością arginazy charakteryzowały się osie zarodkowe traktowane Spm. Krótkotrwale traktowanie NO zarodków jabłoni wpływało stymulująco na aktywność arginazy mierzonej w trakcie trwania kultury. Co więcej,

analogicznie jak ma to miejsce w przypadku tkanek zwierzęcych aktywność NOS-podobna była 1000 krotnie niższa w stosunku do aktywności arginazy.

Stężenie wolnych PA (Put i Spd) zależało od krótkotrwałego traktowania zarodków jabłoni izolowanych z nasion tuż po ich 24 h imbibicji w wodzie NO. Ponadto działanie tej reaktywnej cząsteczki sprzyjało wzrostowi stosunków Put:Spd oraz Put:Spm, które osiągały wartości charakterystyczne dla wzrostu elongacyjnego komórek osi zarodkowej. Zarówno NO jak i Put lub Spd wprowadzone do kultury powodowały wzrost stężenia mocznika. Obniżeniu stężenia NO₂⁻ w korzeniach zarodkowych młodych siewek kiełkujących w obecności Put lub Spd towarzyszyło obniżenie zawartości całkowitych, rozpuszczalnych białek z grupami 3-NT. Z kolei mniejsza ilość białek nitrowanych była powiązana ze wzrostem ilości białek znakowanych ubikwityną, zwłaszcza na etapie zakończenia kiełkowania *sensu stricto* zarodków jabłoni. Wyniki te wskazują na regulacyjne działanie PA i NO w procesie degradacji białek na drodze zależnej od proteasomu. Modulowanie zawartości NO w zarodkach jabłoni wpływa na ekspresję genów kodujących SAMDC (enzym służący jako łącznik szlaku biosyntezy etylenu i PA): *MdSAMDC1* (wzrost ekspresji) i *MdSAMDC2* (obniżenie ekspresji). Wyniki wcześniej opublikowanych prac potwierdzają udział NO jako cząsteczki regulującej biosyntezę etylenu podczas kiełkowania zarodków jabłoni. Z kolei dane zaprezentowane w publikacji nr 6 osiągnięcia naukowego wskazują nie tylko na współdziałanie PA i NO ale istnienie ścisłej relacji etylen-PA-NO w czasie ustępowania spoczynku zarodków jabłoni.

Opis uzyskanych wyników – publikacja nr 3 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego.

Can wykazuje właściwości antymetaboliczne m.in. w stosunku do roślinożerców, zatem rozważa się jej zastosowanie w bioherbicydach. W przypadku moich badań wykorzystanie tego niebiałkowego aminokwasu wiązało się z analizą wzajemnych oddziaływań PA-NO. Zadałam sobie pytanie, czy poza hamowaniem kiełkowania zarodków (na przykładzie zarodków jabłoni) można również spodziewać się negatywnego działania Can na siewkę, w tym wzrost i rozwój korzenia. Okazało się, że Can wprowadzona do kultury nasion pomidora nie miała tak negatywnego wpływu na ich kiełkowanie, co najprawdopodobniej wiąże się z obecnością łupiny nasiennej. Z kolei u 4 dniowych siewek pomidora umieszczonych w roztworze tego aminokwasu obserwowano hamowanie wzrostu korzenia, którego intensywność zależała od zastosowanego stężenia. Co więcej efekt ten był nieodwracalny, nawet jeśli siewki przenoszono na roztwór Arg. Negatywny efekt działania Can nie był letalny, co potwierdziły wyniki uzyskane po konduktometrycznym pomiarze

integralności błon komórkowych korzeni i barwieniu z wykorzystaniem błękitu Evans'a. Ponadto Can powodowała tylko niewielką degradację DNA, wzrost całkowitej zawartości RNA i białek rozpuszczalnych. Wykazałam, że w korzeniach siewek pomidora, które rosną w obecności Can modyfikacjom ulegała emisja NO i ONOO⁻. Potwierdziły to zarówno wizualizacja preparatów z wykorzystaniem konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (CLSM) jak i pomiar spektrofluorescencyjny. Wykazałam, że Can hamuje emisję NO jak i przejściowo zwiększa emisję ONOO⁻. W przypadku NO obniżona emisja dotyczyła korzenia, ale komórki graniczne charakteryzowały się wzrostem emisji tej cząsteczki w stosunku do kontroli. Krótkotrwałe traktowanie NO korzeni pomidora nie odwracało negatywnego działania Can, które było przełamane dopiero po ponawianym krótkotrwałym traktowaniu. Wynik ten wskazuje, że Can pobierana z podłoża stale modulowała zawartość RNS w tkankach. Z drugiej strony aminokwas ten nie wpływał na ilość NO₂⁻ w korzeniach siewek. Zatem, najprawdopodobniej negatywne działanie Can wiąże się z enzymatycznym szlakiem biosyntezy NO. W niewielkim stopniu może to potwierdzić obniżona aktywność oddychania mitochondrialnego, które odnotowałam w przypadku korzeni traktowanych Can.

Opis uzyskanych wyników – publikacja nr 4 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego.

Kontynuując badania dotyczące wpływu Can na wzrost korzeni siewek pomidora potwierdziłam wcześniej otrzymany wynik dotyczący przejściowego wzrostu emisji ONOO⁻. Ta forma RNS powstaje w obecności zarówno NO jak i ROS. Wzrost ROS bardzo często wiąże się z utlenianiem białek – m.in. ich karbonylacją. Wykazałam, że Can powoduje wzrost stężenia całkowitych, rozpuszczalnych białek karbonylowanych (zastosowanie metody ELISA), zwłaszcza po dłuższym okresie ekspozycji siewek na ten aminokwas. Ponadto uwidoczniły, pogrubiony prążek na membranie nitrocelulozowej na poziomie frontu żelu poliakrylamidowego (wykorzystanie techniki Western blot) najprawdopodobniej świadczy o tym, że karbonylacji ulegają białka o niskiej masie cząsteczkowej lub peptydy powstałe z rozpadu białek tak zmodyfikowanych. Z drugiej strony obserwowałam obecność dużych agregatów białkowych, które również ulegają karbonylacji pod wpływem przedłużonego działania Can.

Wykazałam, że obecność Can w kulturze siewek pomidora modyfikuje zawartość białek z grupami 3-NT. Wyższe stężenie białek nitrowanych obserwowano po krótszym czasie działania Can, co wiąże się z wcześniej uzyskanymi wynikami dotyczącymi emisji ONOO⁻ (publikacja nr 3). Z kolei dłuższy czas traktowania siewek pomidora tym aminokwasem powodował obniżenie stężenia białek nitrowanych, co z kolei pokrywa się z

wynikami dotyczącymi emisji NO (publikacja nr 3). Jak wspomniałam wyżej, Corpas i inni (2009) wykazali, że proces nitracji obejmuje prawidłowe (fizjologiczne) funkcjonowanie komórek, zatem wpływ Can na metabolizm NO i obniżenie zawartości białek nitrowanych może być kolejnym, ważnym mechanizmem działania tego aminokwasu.

Traktowanie siewek pomidora Can stymulowało aktywność PAO w ekstraktach białkowych izolowanych z korzeni, zatem aktywacji ulegał katabolizm PA. Wynik ten ponownie potwierdza powiązanie ścieżek PA-NO, także na etapie wzrostu korzenia młodej siewki.

Opis uzyskanych wyników – publikacja nr 2 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego.

Weryfikując pytanie nr 7 wykorzystałam prawidłowo rozwinięte siewki jabłoni oraz atypowe siewki kontrolne (z jednym białym liścieniem). W przypadku realizacji tych badań stworzyłam nowy model doświadczalny obejmujący różny czas traktowania badanego materiału NO. Kontrolę stanowiły zarodki nietraktowane i siewki z nich wyrastające. Ponadto wykorzystałam siewki rozwinięte z zarodków krótkotrwałe traktowanych NO. Do badań brałam również 5 dniowe kontrolne siewki, które poddawałam krótkotrwałemu traktowaniu NO, a następnie po trzech dniach wykonywałam dalsze analizy.

Stymulacja równomiernego zazieleniania liścieni (znacznego wzrostu zawartości chlorofilu, szczególnie w liścieniu, który pozostawał biały) po traktowaniu NO była powiązana ze wzrostem zawartości H_2O_2 . Ta forma ROS oraz metabolity będące produktami utleniania mogą brać udział w komunikacji chloroplast-jadro komórkowe (sygnał retrogradowy). Wykazano, że potencjał sygnałowy mają m.in. cykliczne oksylipiny, które mogą indukować ekspresję genów jądrowych (Galvez-Valdivieso i Mullineaux, 2010). Białka/peptydy karbonylowane, których obecność potwierdziłam w zarodkach i siewkach jabłoni (Krasuska i inni, 2014 - praca, która stanowi dodatkowe osiągnięcie naukowo-badawcze) mogłyby być zgodnie z koncepcją Møller'a i Sweetlove'a (2010) organello-specyficznymi cząsteczkami sygnałowymi transportowanymi do jądra komórkowego, mającymi wpływ na metabolizm. Niektóre enzymy cyklu Calvina, czy związane z biosyntezą skrobi znajdują się pod wpływem regulacji redoks (Stenbaek and Jensen 2010). Wykazałam, że krótkotrwałe traktowanie NO anormalnych siewek jabłoni nie wpływa negatywnie na wydajność procesu fotosyntezy (aktywność fotosyntezy w czasie rzeczywistym była mierzona elektrodą Clark'a) w liścieniu, który się rozwijał i zazieleniał. Ponadto uzyskane wyniki potwierdziłam dokonując analizy fluorescencji chlorofilu *a*, obejmującej podstawowe parametry jak Fv/Fm i Fv/F0. Wartość Fv/Fm wzrosła w liścieniach siewek, które były krótkotrwałe traktowane NO po 5 dniach kiełkowania w wodzie (siewki traktowane 5 dnia kultury). Wyniki te wskazują, że

krótkotrwałe aplikowanie NO ma korzystne działanie na przebieg procesu fotosyntezy w liścieniach siewek, dzięki czemu ułatwia przejście z heterotrofii na autotrofię. Wykazałam również, że krótkotrwałe traktowanie NO zarodków lub anormalnych siewek jabłoni powodowało wzrost nagromadzenia mniejszej podjednostki RuBisCO w rozwijającym się liścieniu w porównaniu z kontrolą (analiza Western blot). Białe liścienie, izolowane z kontrolnych siewek, charakteryzował brak mniejszej podjednostki RuBisCO do momentu całkowitego odblokowania (zazieleniania). Ponadto pojawienie się mniejszej podjednostki RuBisCO odnotowano również w liścieniach siewek kontrolnych (5 dniowych) poddanych krótkotrwałemu traktowaniu NO. Te wyniki wyraźnie wskazują na udział NO w percepcji światła, zatem w biogenezie chloroplastów. W procesie tym uczestniczą m.in. geny związane z fotosyntezą kodowane przez genom jądrowy (ang. photosynthesis-associated nuclear genes – PhANGs), np. geny kodujące mniejszą podjednostkę RuBisCO. W tym przypadku NO stanowi istotny regulator sygnału retrogradowego. Udział NO w stabilizacji autotrofii młodych siewek może również zachodzić poprzez działanie na metabolizm cukrów, o czym świadczą uzyskane wyniki tej pracy. Krótkotrwałe traktowanie NO powodowało wzrost zawartości cukrów redukujących (metoda spektrofotometryczna) w obu liścieniach. Obserwacje mikroskopowe (mikroskopia elektronowa) również potwierdziły udział NO w biogenezie chloroplastów. Od momentu krótkotrwałego (sygnałowego) potraktowania zarodków czy siewek NO ultrastruktura plastydów ulegała modyfikacjom - od proplastydów do chloroplastów z dobrze rozwiniętym systemem lamelarnym.

Opis uzyskanych wyników – publikacja nr 5 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego.

Weryfikując pytania nr 1, 6 i 8 wykazałam, że efekt działania Can na proces kiełkowania zarodków jabłoni jest podobny do uzyskanego po zastosowaniu L-NAME (inhibitor ssaczych NOS). Wykazałam, że oba inhibitory obniżały emisję zarówno NO jak i ONOO⁻ z osi zarodków kiełkujących w obecności tych związków. Z drugiej strony suplementacja zarodków Arg (wprowadzenie tego aminokwasu do kultury) powodowała wzrost emisji obu form RNS. Krótkotrwałe traktowanie zarodków jabłoni NO lub podanie roztworu Arg stymulowało aktywność NOS-podobną oznaczaną w ekstraktach białkowych uzyskanych z osi zarodkowych. Co więcej kiełkowanie zarodków w obecności Arg wiązało się ze zwiększoną aktywnością tego enzymu przez cały czas trwania kultury. Can lub L-NAME obecne w kulturze zarodków powodowały obniżenie lub całkowity brak aktywności NOS-podobnej mierzonej w ekstrakcie białkowym uzyskanym z osi/korzeni zarodkowych. Jednocześnie wykazałam, że wraz z postępem kiełkowania zarodków jabłoni krótkotrwałe

traktowanych NO lub poddanych suplementacji Arg obniżeniu ulegało stężenie NO_2^- w osiach lub korzeniach zarodkowych. Z kolei traktowanie zarodków Can lub L-NAME utrzymywało stężenie tego metabolitu na poziomie porównywalnym dla spoczynkowej kontroli.

Wykazałam, że ilość białek z grupami 3-NT zależy przede wszystkim od stopnia spoczynku. Obniżenie zawartości białek nitrowanych było charakterystyczne dla korzeni zarodkowych młodych siewek wyrastających z zarodków krótkotrwałe traktowanych donorami NO lub rosnących w obecności Arg. Największa różnica w grubości prążka białkowego uzyskanego po wizualizacji stosowanej w technice Western blot dotyczyła tego o masie cząsteczkowej około 95 kDa. Jednocześnie wykazałam, że prążek ten odpowiada obecności białek zawierających biotynę, stanowiących białka zapasowe (zastosowanie techniki Western blot). Dokładniejsza analiza prążków białkowych izolowanych z żelu poliakrylamidowego, odpowiadających masie cząsteczkowej 95 kDa (technika MALDI-TOF) potwierdziła obecność pewnych białek zapasowych takich jak: leguminy czy właśnie białka zawierające biotynę. Ponadto w prążkach poddanych identyfikacji została potwierdzona obecność syntetazy metioniny, która bierze udział w przeniesieniu grupy metylowej z 5-metylo-TFA, z którego uwalnia wolny TFA. Metabolit ten może stanowić substrat w reakcji NOS-podobnej zastępując BH_4 . Przedstawiony wynik jest unikatowy i szczególnie ważny w aspekcie wykazania obecności roślinnych odpowiedników ssaczych NOS jak i możliwości przeprowadzania reakcji NOS-podobnej.

PODSUMOWANIE

Realizując cel moich badań wykazałam znaczący udział RNS jak i PA oraz ich wzajemne współdziałanie w regulacji ustępowania spoczynku zarodków, kiełkowania zarodków i wzrostu młodej siewki. Uzyskane i opisane wyżej dane eksperymentalne pozwoliły zweryfikować postawione wcześniej pytania.

1. Nie każda z podstawowych PA w jednakowym stopniu stymuluje emisję RNS z komórek. Do PA, których wprowadzenie do kultury sprzyja wzrostowi emisji z tkanek należą Put i Spd, natomiast Spm ma działanie odwrotne. Traktowanie zarodków jabłoni Arg również powoduje wzrost emisji RNS z tkanek, co wskazuje na jej udział w syntezie NO.
2. Traktowanie PA (Put lub Spd) zarodków jabłoni mimo, że działa stymulująco na ich kiełkowanie, nie może jednak całkowicie zastąpić działania NO. Najprawdopodobniej suplementacja Put lub Spd wpływa korzystnie na wzrost endogennego stężenia RNS np. poprzez ograniczenie zużycia Arg.

3. Krótkotrwałe traktowanie NO spoczynkowych zarodków jabłoni modyfikuje zawartość Put i Spd oraz zmienia stosunek Put:Spd i Put:Spm. Świadczy to o współdziałaniu PA-NO.
4. Wzajemne oddziaływanie PA-NO najprawdopodobniej dotyczy głównie Arg, ale także zmian aktywności enzymów i ekspresji genów kodujących enzymy metabolizmu PA. Put i Spd wpływają korzystnie na aktywność enzymu uczestniczącego w syntezie NO – NOS-podobnego, a Spm ją obniża.
5. Can hamuje kiełkowanie zarodków jabłoni i wzrost elongacyjny korzenia siewek pomidora. Obecność łupiny nasiennej ogranicza dostęp Can do tkanek i w rezultacie nie obserwuje się negatywnego efektu działania tego aminokwasu.
6. Can obniża emisję RNS zarówno z osi zarodkowych jak i korzeni młodych siewek. Aminokwas ten radykalnie obniża aktywność NOS-podobną badaną w ekstrakcie białkowym izolowanym z tkanek osi lub korzeni zarodkowych, a działanie to jest porównywalne do działania L-NAME.
7. NO jako cząsteczka sygnałowa uczestniczy w procesie przekształcania proplastydów w dojrzałe chloroplasty na świetle, zatem umożliwia przejście młodej siewki na autotrofię. Najprawdopodobniej cząsteczka ta bezpośrednio lub pośrednio stanowi istotny element sygnału retrogradowego. W przypadku krótkotrwałego traktowania zarodków lub siewek jabłoni NO nie obserwuje się negatywnego (trwałego) efektu tej cząsteczki na wydajność PSII w liścieniach młodych siewek.
8. Zmienna ilość białek nitrowanych może stanowić znacznik nie tylko głębokości spoczynku nasion, ale także statusu potencjału redoks. Jednakże obecność białek zawierających biotynę również ulega obniżeniu w miarę postępowania procesu kiełkowania, a oznaczenie ich jest tańsze i szybsze, zatem białka te docelowo mogą służyć w ocenie stopnia ustąpienia spoczynku szczególnie na początku procesu imbibicji. Białka zawierające biotynę są potencjalnym celem nitracji co sprzyja ich utylizacji podczas kiełkowania nasion.

WYKORZYSTANIE OTRZYMANYCH WYNIKÓW

Uzyskane wyniki badań przede wszystkim uzupełniają wiedzę dotyczącą udziału PA i NO w regulacji procesu kiełkowania nasion jak i wzrostu młodej siewki. Ponadto, niewiele istnieje danych literaturowych dotyczących Can, szczególnie innych mechanizmów działania tego aminokwasu, poza zdolnością do włączania w strukturę białek w miejsce Arg.

Porównywalne działanie Can i L-NAME jako inhibitorów aktywności (hipotetycznego) enzymu NOS-podobnego może być przydatne w badaniach dotyczących wykazania obecności tego białka w tkankach roślin wyższych. Ponadto jeżeli Can miałaby być zastosowana w preparatach typu „bio” (np. bioherbicydy) do zwalczania chwastów czy szkodników to wyniki uzyskane przeze mnie wskazują, że najbardziej wrażliwe na ten aminokwas są młode siewki, szczególnie ich korzenie. Łupina nasienna ogranicza pobieranie Can z podłoża.

Dzięki wynikom dotyczącym działania NO w procesie kiełkowania zarodków jabłoni oraz podczas niezakłóconego wzrostu siewki mogłam stawiać kolejne pytania dotyczące tej cząsteczki. To z kolei umożliwiło mi pozyskanie środków finansowych z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS na projekt pt.: „Rola tlenu azotu jako cząsteczki poprawiającej zdolność do kiełkowania zarodków izolowanych z nasion jabłoni poddanych stratyfikacji w cieple” (Nr DEC-2016/23/B/NZ9/03462). Jak wykazały wyniki badań NO może działać korzystnie (odwracając blokady kiełkowania) na różnym etapie ustępowania spoczynku. Sprzyja to poprawie jakości siewek stymulując ich przejście na autotrofię.

Proste immunotechniki laboratoryjne oparte o działanie przeciwciał pozwalają na przeprowadzanie łatwych testów określających stopień zaawansowania procesu kiełkowania nasion m.in. na podstawie analizy obniżania ilości białek zawierających biotynę czy białek z grupami 3-NT.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje publikacje, których tematyka pośrednio lub bezpośrednio jest powiązana z głównym osiągnięciem naukowo-badawczym. Jestem współautorką dwóch prac, które dotyczą zmian w zawartości białek karbonylowanych izolowanych z zarodków jabłoni (Dębska i inni, 2013, Krasuska i inni, 2014).

Karbonylacja białek jest to potranslacyjna modyfikacja powstająca w wyniku obecności czynników utleniających w tym ROS. Nie ma obecnie danych literaturowych, które jednoznacznie potwierdziłyby odwracalność tego procesu. Białka z grupami karbonylowanymi najczęściej charakteryzuje zmieniona struktura i funkcja oraz podlegają one przyspieszonej proteolizie (Møller i inni, 2007, 2011, Ambrożewicz i Bielawska, 2016). Bezpośrednie utlenianie takich aminokwasów jak Arg, lizyna, treonina czy prolina oraz pośrednie (z udziałem reaktywnych lipidów czy węglowodanów) - cysteiny, lizyny czy histydyny prowadzi do powstania grup karbonylowych (C=O). Najczęściej karbonylacji sprzyja obecność jonów metali przejściowych np. Fe^{2+} lub Cu^{+} , które reagując z H_2O_2 (reakcja Fentona) powodują powstawanie rodników hydroksylowych

(Møller i inni, 2011). Rodnik ten uczestniczy w modyfikacji reszt łańcucha polipeptydowego. Z kolei rodnik alkoksylowy na drodze α -amidacji umożliwia wprowadzenie grup C=O do białka (Ambrożewicz i Bielawska, 2016). Białka karbonylowane są obecne w tkankach żywych organizmów również w warunkach fizjologicznych, ale ich wzrost stanowi dobry znacznik stresu oksydacyjnego. Wykazałam (Krasuska i inni, 2014), że krótkotrwałe traktowanie spoczynkowych zarodków jabłoni NO, podobnie jak cyjanowodorem (HCN), powoduje obniżanie zawartości białek karbonylowanych w osiach zarodkowych i korzeniach zarodkowych podczas kiełkowania. Przejściowy, niewielki wzrost zawartości białek z grupami C=O obserwowano w pierwszych 24 h kultury w ekstraktach białkowych uzyskanych z osi zarodkowych i liścieni zarodków. Obniżenie ilości białek (lub peptydów) karbonylowanych, szczególnie o masie cząsteczkowej około 24 kDa najprawdopodobniej wiąże się ze wzrostem aktywności proteolitycznej, szczególnie proteaz aktywnych w kwaśnym pH. Z drugiej strony wykazałam, że w liścieniu, którego wzrost i rozwój są zablokowane aktywność kwaśnych proteaz uległa obniżeniu. Z kolei, pod koniec kiełkowania *sensu stricto*, w siewkach wyrastających z zarodków krótkotrwałe traktowanych NO lub HCN obserwowałam wzrost aktywności proteaz w alkalicznym pH. Szczególnie ważnym wynikiem, który udało mi się przedstawić w niniejszej pracy było wykazanie udziału NO w karbonylacji białka izolowanego z osocza krwi wołu (BSA) w reakcji *in vitro*. Najintensywniejszą plamę na nitrocelulozie po wizualizacji z wykorzystaniem alkalicznej fosfatazy (technika dot blot) uzyskałam w przypadku zastosowania zakwaszonego azotynu sodu, słabszą po traktowaniu SNAP lub SNP. W przypadku cyjanku potasu uzyskałam plamę na nitrocelulozie o niewielkiej intensywności po wybarwieniu. Sugeruje to mniejszy udział HCN w bezpośredniej karbonylacji białek. HCN najprawdopodobniej sprzyja wzrostowi stężenia białek karbonylowanych poprzez stymulację powstawania ROS i RNS.

Ponadto jestem również współautorką prac, w których badam mechanizmy działania związków fitotoksycznych takich jak: *m*-Tyr (Krasuska i inni, 2017, 2018), citral (Graña i inni, 2013) oraz farneszan (Araniti i inni, 2016) pod kątem działania stresu nitrooksydacyjnego. Poza Can, której zarówno metabolizm jak działanie nie tylko w tkankach roślin przedstawiłam w pracy przeglądowej Staszek i inni (2017), której to jestem autorem korespondencyjnym, zajmuje się również *meta*-tyrozyną (*m*-Tyr). Związek ten, będący strukturalnym analogiem fenyloalaniny (Phe) został wyizolowany z eksudatów korzeniowych traw z rodzaju kostrzewy (*Festuca*) m.in. kostrzewy zwyczajnej

(*Festuca rubra* L. ssp. *commuata*) (Bertin i inni, 2007). Aminokwas ten jest fitotoksyczny w stosunku do wielu gatunków roślin akceptorowych (Bertin i inni, 2007) w tym do pomidora (Krasuska i inni, 2016). Jednym z podstawowych mechanizmów działania *m*-Tyr jest jej zdolność do inkorporacji w strukturę białek w miejsce Phe, co potwierdziły wyniki badań prowadzone m.in. przez Bertin i innych (2007). Uniwersalnym sposobem powstawania tego niebiałkowego aminokwasu w tkankach zwierząt i roślin jest nieenzymatyczne utlenianie Phe np. w obecności ONOO⁻, które prowadzi do nagromadzenia *m*-Tyr i jest uważane za jeden ze wskaźników procesów starzenia (Ipson i Fisher, 2016). W pracy Krasuska i inni (2017) wykazałam, że w korzeniach siewek pomidora traktowanych *m*-Tyr dochodzi do zmian w emisji NO i ONOO⁻, zależnych od stężenia tego aminokwasu jak i czasu jego działania. Wzrost emisji dotyczył głównie niższego stężenia *m*-Tyr i komórek granicznych oraz komórek epidermy korzenia. Oprócz tego przedłużające się działanie *m*-Tyr o stężeniu, które całkowicie hamuje wzrost wydłużeniowy komórek wiązało się z nagromadzeniem białek z grupami 3-NT, wskazując na stan stresu nitrooksydacyjnego w badanym materiale. Również zmianom podlegała aktywność reduktazy GSNO (GSNOR), enzymu regulującego komórkową zawartość RNS, która to wzrastała w miarę przedłużania kultury siewek pomidora w obecności *m*-Tyr. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że *m*-Tyr choć nie jest bezpośrednim inhibitorem NOS, jak Can to ewidentnie ma wpływ na metabolizm RNS. Na podstawie tych danych oraz wyników dotyczących udziału RNS w regulacji kiełkowania zarodków jabłoni złożyłam projekt pt.: „Rola tlenu azotu jako cząsteczki poprawiającej zdolność do kiełkowania zarodków izolowanych z nasion jabłoni poddanych stratyfikacji w cieple” do Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS i otrzymałam środki finansowe na jego realizację (Nr DEC-2016/23/B/NZ9/03462). Stratyfikacja w cieple zarodków jabłoni prowadzi do ich starzenia (Dębska i inni, 2013). Jednym z zadań badawczych będzie wykazanie obecności i zmian stężenia *m*-Tyr w zarodkach kontrolnych (izolowanych z nasion poddanych stratyfikacji w cieple) i zarodkach izolowanych z nasion stratyfikowanych w cieple krótkotrwale traktowanych NO. Na dzień dzisiejszy nie ma danych literaturowych, które dotyczyłyby potencjalnego nagromadzenia się tego aminokwasu w nasionach, również tych wykorzystywanych przez człowieka jako pokarm. W projekcie opisałam potencjalne wykorzystanie uzyskanych wyników.

Jestem również zaangażowana w badania dotyczące udziału RNS w procesie trawienia zachodzącego w cieczy trawiennej dzbanecznika brzuszego (*Nepenthes ventrata*) – rośliny mięsożernej. Wstępne wyniki zostały przedstawione w formie plakatu na zjeździe

o charakterze międzynarodowym w 2014 roku: Dzierżyńska A., Gniazdowska A., Urbański D., **Krasuska U.** (2014) Modification of RNS content in pitcher plant (*Nepenthes ventrata*) fluid during digestion. 5th Plant NO Club International Meeting, Monachium, Niemcy, Book of abstracts p. 63. Wyniki te są obecnie uzupełniane i przygotowywane do publikacji. Ponadto jestem współautorką prac przeglądowych dotyczących roślin mięsożernych (1) **Krasuska U.**, Glinka A., Gniazdowska A. (2012) Menu roślin mięsożernych. Kosmos 61: 635–646 oraz (2) **Krasuska U.**, Dzierżyńska A., Ciąćka K., Andrzejczak O., Staszek P., Gniazdowska A. (2015) Rośliny mięsożerne jako przykład adaptacji do niesprzyjających warunków środowiska naturalnego. W: Ciereszko I., Bajguz A. (red.), Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko-eksperyment-edukacja. Polskie Towarzystwo Botaniczne, Białystok str. 77-88.

Poza publikacjami, które mają charakter eksperymentalny jestem współautorką rozdziałów w monografiach jak i w publikacjach o charakterze edukacyjnym (publikacje przeglądowe, dołączony dorobek publikacyjny). W rozdziale autorstwa Krasuska i Gniazdowska (2015) pt.: „ROS - RNS - phytohormones network in root response strategy” zebrałam informacje związane z udziałem RNS w procesach wzrostu i rozwoju korzenia. Publikacja ta ukazała się w: Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants, Seria: Signaling and Communication in Plants 23, red: Gupta KJ, Igamberdiev AU, Springer International Publishing Switzerland. W tej samej książce przedstawiłam koncepcję „drzwi nitrozacyjnych” w aspekcie udziału RNS w regulacji spoczynku i kiełkowania nasion (Krasuska i inni, 2015).

Przedstawiony opis mojego osiągnięcia habilitacyjnego jak i dorobku naukowego stanowią podsumowanie aktywności naukowej. Zamieściłam również wykaz opublikowanych prac naukowych i wskaźników dokonań naukowych, przedstawionych szczegółowo w załączniku nr 5.

Zacytowana literatura

- Abat J.K., Mattoo A.K., Deswal R. (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. FEBS J 275: 2862–2872.
- Abd El-Gawad H.M., Khalifa A.E. (2001) Quercetin, coenzyme Q10, and L-canavanine as protective agents against lipid peroxidation and nitric oxide generation in endotoxin-induced shock in rat brain. Pharmacol Res 43: 257-263.
- Ambrożewicz E., Bielawska K. (2016) Karbonylacja białek – przyczyny, skutki i sposoby oceny. Postępy Biochemii 62: 459-471.

- Angelovici R., Galili G., Fernie A.R., Fait A. (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci* 15: 1360-1385.
- Araniti F., Graña E., Krasuska U., Bogatek R., Reigosa M.J., Abenavoli M.R., Sánchez-Moreiras A.M. (2016) Loss of gravitropism in farnesene-treated *Arabidopsis* is due to microtubule malformations related to hormonal and ROS unbalance. *PLoS ONE* 11: e0160202.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Kubiś J. (2009) Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *J Plant Growth Regul* 28: 177–186.
- Arc E., Sechet J., Corbineau F., Rajjou L., Marion-Poll A. (2013) ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Plant Cell Biol* 63: 1-19.
- Aslam M., Oaks A., Boesel I. (1987) Effect of L-canavanine on nitrate reductase in corn roots. *Plant Physiol* 62: 693-695.
- Astier J., Gross I., Dürner J. (2018) Nitric oxide production in plants: an update. *J Exp Bot* 69: 3401–3411.
- Bachrach U. (2010) The early history of polyamine research. *Plant Physiol Biochem* 48: 490- 495.
- Bachrach U., Wang Y.C., Tabib A. (2001) Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci* 16: 1058-1069.
- Bagni N., Tassoni A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301–317.
- Bai S., Yao T., Li M., Guo X., Zhang Y., Zhu S., He Y. (2014) PIF3 is involved in the primary root growth inhibition of *Arabidopsis* induced by nitric oxide in the light. *Mol Plant* 7: 616-625.
- Baker N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Ann Rev Plant Biol* 59: 89-113.
- Bass M., Harper L., Rosenthal G.A., Phuket A., Crooks P.A. (1995) Large-scale production and chemical characterization of the protective higher plant allelochemicals: L-canavanine and L-canaline. *Biochem System Ecol* 23: 717-721.
- Bayden A.S., Yakovlev V.A., Graves P.R., Mikkelsen R.B., Kellogg G.E. (2011) Factors influencing protein tyrosine nitration—structure-based predictive models. *Free Rad Biol Med* 50: 749–762.
- Beligni M.V., Lamattina L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination, de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221.
- Bertin C., Weston A., Huang T., Jander G., Owens T., Meinwald J., Schroeder F. C. (2007) Grass roots chemistry: *meta*-tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid. *PNAS* 104: 16965-16969.
- Bethke P.C., Libourel I.G., Aoyama N., Chung Y.Y., Still D.W., Jones R.L. (2007) The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* 143: 1173-1188.
- Castillo M.-C., Coego A., Costa-Broseta Á., León J. (2018) Nitric oxide responses in *Arabidopsis* hypocotyls are mediated by diverse phytohormone pathways. *J Exp Bot* doi:10.1093/jxb/ery286
- Ciąćka K., Krasuska U. (2014) Poliamininy – być albo nie być dla rośliny. *EBiŚ* 2: 3-10.
- Ciąćka K., Andrzejczak O., Krasuska U., Gniazdowska A. (2015) Nitrowane białka i kwasy tłuszczowe w komórkach roślin i zwierząt. *Postępy Biologii Komórki* 42: 539-558.

- Colling J., Stander M.A., Makunga N.P. (2010) Nitrogen supply and abiotic stress influence canavanine synthesis and the productivity of *in vitro* regenerated *Sutherlandia frutescens* microshoots. *J Plant Physiol* 167: 1521–1524.
- Corpas F.J., Chaki M., Leterrier M., Barroso J.B. (2009a) Protein tyrosine nitration. A new challenge in plants. *Plant Signal Behav* 4: 920-923.
- Corpas F.J., Palma J.M., del Río L.A., Barroso J.B. (2009b) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol* 184: 9–14.
- Corpas F.J., Barroso J.B. (2015) Nitric oxide from a “green” perspective. *Nitric Oxide* 45: 15–19.
- Corpas F.J., Palma J.M. (2018) Assessing nitric oxide (NO) in higher plants: an outline. *Nitrogen* 1: 12-20.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- De Souza A., Wang J.-Z., Dehesh K. (2017) Retrograde signals: integrators of interorganellar communication and orchestrators of plant development. *Annu Rev Plant Biol* 68: 85-108.
- Dębska K., Krasuska U., Budnicka K., Bogatek R., Gniazdowska A. (2013) Dormancy removal of apple seeds by cold stratification is associated with fluctuation in H₂O₂, NO production and protein carbonylation level. *J Plant Physiol* 170: 480– 488.
- Donohue K., Rubio de Casas R., Burghardt L., Kovach K., Willis C.G. (2010) Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annu Rev Ecol Evol Sys* 41: 293–319.
- Ekanayake S., Skog K., Asp N.G. (2007) Canavanine content in sword beans (*Canavalia gladiata*): analysis and effect of processing. *Food Chem Toxicol* 45: 797–803.
- Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 171: 501–523.
- Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T., Steber C. (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Plant Biol* 59: 387-415.
- Flores T., Todd C.D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P.K., Correa-Aragunde N., Hoyos M.E., Brownfield D.M., Mullen R.T., Lamattina L., Polacco J.C. (2008) Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol* 147: 1936-1946.
- Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., Arasimowicz M., Ciszewski A. (2006) Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* 224: 1363–1372.
- Footitt S.W., Douterelo-Solel I., Clay H., Finch-Savage W.E. (2011) Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *PNAS* 108: 20236-20241.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010) Characterization of a Nitric Oxide Synthase from the Plant Kingdom: NO Generation from the Green Alga *Ostreococcus tauri* Is Light Irradiance and Growth Phase Dependent. *Plant Cell* 22: 3816-3830.
- Foresi N., Mayta M.L., Lodeyro A.F., Scuffi D., Correa-Aragunde N., García-Mata C., Casalougué C., Carrillo N., Lamattina L. (2015) Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant J* 82: 806–821.

- Förstermann U., Sessa W.C (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33: 829–837.
- Fuell C., Elliott K.A., Colin C., Hanfrey C.C., Franceschetti M.J., Michael A.J. (2010) Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiol Biochem* 48: 513–520.
- Gao H.-J., Yang, H.-Q., Wang J.-X. (2009) Arginine metabolism in roots and leaves of apple (*Malus domestica* Borkh.): the tissue-specific formation of both nitric oxide and polyamines. *Sci Horticult* 119: 147–152.
- Galetskiy D., Lohscheider J.N., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Adamska I. (2011) Phosphorylation and nitration levels of photosynthetic proteins are conversely regulated by light stress. *Plant Mol Biol* 77: 461–473.
- Galston A.W., Kaur-Sawhney R., Altabella T., Tiburcio A.F. (1997) Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta* 110: 197–207.
- Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M. (2010) The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to nucleus. *Physiol Plant* 138: 430–439.
- Gibbs D.J., Md Isa N., Movahedi M., Lozano-Juste J., Mendiondo G.M., Berckhan S., Marín-de la Rosa N., Conde J. V., Correia C.S., Pearce S.P., Bassel G.W., Hamali B., Talloji P., Tomé D.F.A., Coego A., Beynon J., Alabadí D., Bachmair A., León J., Gray J.E., Theodoulou F.L., Holdsworth M.J. (2014) Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Mol Cell* 53: 369–379.
- Gniazdowska A., Dobrzyńska U., Babańczyk T., Bogatek R. (2007) Breaking the apple embryo dormancy by nitric oxide involves the stimulation of ethylene production. *Planta* 225: 1051–1057.
- Gniazdowska A., Krasuska U., Bogatek R. (2010) Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta* 32: 1397–1407.
- Graña E., Sotelo T., Díaz-Tielas C., Araniti F., Krasuska U., Bogatek R., Reigosa M.J., Sánchez-Moreiras A.M. (2013) Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. *J Chem Ecol* 39: 271–282.
- Graziano M., Beligni M.V., Lamattina L. (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol* 130: 1852–1859.
- Handa A.K., Fatima T., Mattoo A.K. (2018) Polyamines: bio-molecules with diverse functions in plant and human Health and disease. *Front Chem* 6:10.
- Herrera M., Hong N.J., Garvin J.L. (2006) Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension* 48:157–164.
- Huang T., Jander G., de Vos M. (2011) Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. *Phytochem* 72: 1531–1537.
- Hwang I. D., Lee Y., Kim S.G., Lee J. S., Kwon Y. M. (1996) Enzyme activities of canavanine metabolism in *Canavalia lineata* L. Callus. *J Physiol* 149: 494–500.
- Igarashi K., Kashiwagi K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 559–564.
- Ipson B.R., Fisher A.L. (2016). Roles of the tyrosine isomers *meta*-tyrosine and *ortho*-tyrosine in oxidative stress. *Ageing Res Rev* 27: 93–107.
- Izbiańska K., Floryszak-Wieczorek J., Gajewska J., Meller B., Kuźnicki D., Arasimowicz-Jelonek M. (2018) RNA and mRNA nitration as a novel metabolic link in potato immune response to *Phytophthora infestans*. *Front Plant Sci* 9: 672.

- Kamo T., Sakurai S., Yamanashi T., Todorok Y., (2015) Cyanamide is biosynthesized from L-canavanine in plants. *Sci Rep* 5: 10527.
- Katusic Z.S. (1992) Role of nitric oxide signal transduction pathway in regulation of vascular tone. *Anesthesiology* 11: 14-19.
- Keefer L.K. (2011) Fifty years of diazeniumdiolate research. From laboratory curiosity to broad-spectrum biomedical advances. *ACS Chem Biol* 6: 1147–55.
- Keshavarz-Tohid V., Taheri P., Taghavi S.M., Tarighi S. (2016) The role of nitric oxide in basal and induced resistance in relation with hydrogen peroxide and antioxidant enzymes. *J Plant Physiol* 199: 29–38.
- Khan H.A., Ziaf K., Amjad M., Iqbal Q (2012) Exogenous application of polyamines improves germination and early seedling growth of hot pepper. *Chil J Agricul Res* 72: 429-433.
- Kleine T., Leister D. (2016) Retrograde signalling: organelles go networking. *Biochim Biophys Acta* 1857: 1313–1325.
- Krasuska U., Budnicka K., Bogatek R., Gniazdowska A. (2012) Poliaminy w regulacji spoczynku i kiełkowania nasion. *Postępy biologii komórki* 39: 395-414.
- Krasuska U., Gniazdowska A. (2012) Nitric oxide and hydrogen cyanide as regulating factors of enzymatic antioxidant system in germinatin apple embryos. *Acta Physiol Plant* 34: 683-692.
- Krasuska U., Ciacka K., Debska K., Bogatek R., Gniazdowska A. (2014) Dormancy alleviation by NO or HCN leading to decline of protein carbonylation levels in apple (*Malus domestica* Borkh.) embryos. *J Plant Physiol* 171: 1132-1141.
- Krasuska U., Ciacka K., Andryka P., Bogatek R., Gniazdowska A. (2015) „Nitrosative door” in seed dormancy alleviation and germination. W: *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants*, Seria: *Signaling and Communication in Plants*, red: Gupta KJ, Igamberdiev AU, Springer International Publishing Switzerland 2015, str. 215-237.
- Krasuska U., Andrzejczak O., Staszek P., Borucki W., Gniazdowska A. (2017) *Meta*-Tyrosine induces modification of reactive nitrogen species level, protein nitration and nitroglutathione reductase in tomato roots. *Nitric Oxide* 68: 56-67.
- Kumar A., Altabella T., Taylor M., Tiburcio A.F. (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci* 2: 124–130.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367–381.
- Lewak S. (2011) Metabolic control of embryonic dormancy in apple seed: seven decades of research. *Acta Physiol Plant* 33: 1-24.
- Li X.L., Atkinson R.N., King S.B. (2001) Preparation and evaluation of new L-canavanine derivatives as nitric oxide synthase inhibitors. *Tetrahedron* 57: 6557-6565.
- Liu Y., Shi L., Ye N., Liu R., Jia W., Zhang J. (2009) Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytol* 183: 1030-1042.
- Lozano-Juste J., León J. (2011) Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 156: 1410-1423.
- Lozano-Juste J., Colom-Moreno R., León J. (2011) *In vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 62: 3501–3517.
- Luzzi S.D., Marletta M.A. (2005) L-arginine analogs as alternate substrates for nitric oxide synthase. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 3934–3941.

- Matakiaadis T., Alboresi A., Jikumaru Y., Tatematsu K., Pichon O., Renou J-P., Kamiya Y., Nambara E., Truong H-N. (2009) The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene *CYP707A2* plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiol* 149: 949-960.
- Martin-Tanguy J. (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul* 34: 135–148.
- Mata-Pérez C., Sánchez-Calvo B., Padilla M.N., Begara-Morales J.C., Luque F., Melguizo M., Jiménez-Ruiz J., Fierro-Risco J., Peñas-Sanjuán A., Valderrama R., Corpas F.J., Barroso J.B. (2016a) Nitro-fatty acids in plant signaling: nitro-linolenic acid induces the molecular chaperone network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 170: 686–701.
- Mata-Pérez C., Begara-Morales J.C., Chaki M., Sánchez-Calvo B., Valderrama R., Padilla M.N., Corpas F.J., Barroso J.B. (2016b) Protein tyrosine nitration during development and abiotic stress response in plants. *Front Plant Sci* 7: 1699.
- Melo N.K.G., Bianchetti R.E., Lira B.S., Oliveira P.M.R., Zuccarelli R., Dias D.L.O., Demarco D., Peres L.E.P., Rossi M., Freschi L. (2016) Nitric oxide, ethylene, and auxin cross talk mediates greening and plastid development in deetioliating tomato seedlings. *Plant Physiol* 170: 2278–2294.
- Mirza J.I., Rehman A. (1998) A spermine-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* displays precocious germination. *Acta Physiol Plant* 20: 235–240.
- Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Ann Rev Plant Biol* 58: 459–481.
- Møller I.M., Sweetlove L.J. (2010) ROS signalling – specificity is required. *Trends Plant Sci* 15: 370–374.
- Møller I.M., Rogowska-Wrzesinska A., Rao R.S.P. (2011) Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Prot* 74: 2228-2242.
- Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., Harren F.J.M., Hebelstrup K.M. i Gupta K.J. (2013) Nitric oxide in plant: an assessment of the Current state of knowledge. *AoB Plants* 5: 1-17.
- Nakajima N., Hiradate S., Fujii Y. (2001) Plant growth inhibitory activity of L-canavanine and its mode of action. *J Chem Ecol* 27: 19-31.
- Nonogaki H., Bassel G.W., Bewley J.D. (2010) Germination-still a mystery. *Plant Sci* 179: 574–581.
- Palavan-Ünsal N. (1987) Polyamine metabolism in the roots of *Phaseolus vulgaris*. Interaction of the inhibitors of polyamine biosynthesis with putrescine in growth and polyamine biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 28: 565-572.
- Pogson B.J., Albrecht V. (2011) Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant Physiol* 155: 1545–1551.
- Radi R. (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem* 288: 26464–26472.
- Radi R. (2012) Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res* 46: 550–559.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot* 53: 103-110.
- Rosenthal G. (1990) Metabolism of L-canavanine and L-canaline in leguminous plants. *Plant Physiol* 94: 1-3.
- Rosenthal G. (2001) L-canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical. *Amino Acids* 21: 319-330.

- Schwartz M., Altman A., Cohen Y., Arzee T. (1997) Inhibition of polyamine biosynthesis by L-canavanine and its effect on meristematic activity, growth, and development of *Zea mays* roots. *Isr J Plant Sci* 45: 23-30.
- Sińska I., Lewandowska U. (1991) Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds. *Physiol Plant* 81: 59-64.
- Šírová J., Sedářová M., Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2011) The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci* 181: 560-572.
- Sobieszczuk-Nowicka E., Legocka J. (2007) Nowe podejścia w badaniach nad rolą poliamin w komórce roślinnej. *Postępy Biologii Komórki*.3(34): 527-540.
- Sobieszczuk-Nowicka E. (2017) Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino Acids* 49: 49-56.
- Sołtys D., Rudzińska-Langwald A., Kurek W., Gniazdowska A., Sliwiska E., Bogatek R. (2011) Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta* 234: 609-621.
- Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
- Staszek P., Weston L., Ciacka K., Krasuska U., Gniazdowska A. (2017) L-Canavanine - how does a simple non-protein amino acid inhibit cellular function in a diverse living system? *Phytochem Rev* 16:1269-1282.
- Stenbaek A., Jensen P.E. (2010) Redox regulation of chlorophyll biosynthesis. *Phytochem* 71: 853-859.
- Suzuki Y., Kihara-Doi T., Kawazu T., Miyake C., Makino A. (2010) Differences in Rubisco content and its synthesis in leaves at different positions in *Eucalyptus globulus* seedlings. *Plant Cell Environ* 33: 1314-1323.
- Szuba A., Wojtaszek P. (2010) Modyfikacje strukturalne białek wywołane przez tlenek azotu. *Postępy Biochemii* 56: 107-114.
- Takahashi T., Kakehi J.-I. (2010) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot* 105: 1-6.
- Takahashi S., Yamasaki H. (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett* 512:145-148.
- Takano A., Kakehi J.-I., Takahashi T. (2012) Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom. *Plant Cell Physiol* 53: 606-616.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh I.S., Scherer G.F.E., (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Plant Cell Physiol* 47: 346-354.
- Wallace HM, Keir HM (1986) Factors affecting polyamine excretion from mammalian cells in culture: inhibitors of polyamine biosynthesis. *FEBS Lett* 194: 60-63.
- Waters M.T., Langdale J.A. (2009) The making of a chloroplast. *EMBO J* 28: 2861-2873.
- Weitbrecht K., Müller K., Leubner-Metzger G. (2011) First off the mark: early seed germination. *J Exp Bot* 62: 3289-3309.
- Wimalasekera R., Tebartz F., Scherer G.F.E. (2011a) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.* 181: 593-603.
- Wimalasekera R., Villar C., Begum T., Scherer G.F.E., (2011b) COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction. *Mol Plant* 4: 663-678.

- Wodala B., Deák Z., Vass I., Erdei L., Altorjay I., Horváth F. (2008) *In vivo* target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves. *Plant Physiol* 146: 1920-1927.
- Vranova V., Rejsek K., Skene K. R., Formanek P. (2011) Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interaction. *Plant Soil* 342: 31-48.
- Yamasaki H. (2000) Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Philos Trans R Soc B* 355: 1477-1488.
- Yamasaki H., Cohen M.F. (2006) NO signal at the crossroads: polyamine induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci* 11: 522-524.
- Yemets A.I., Krasylenko Y.A., Lytvyn D.I., Sheremet Y.A., Blume Y.B. (2011) Nitric oxide signalling *via* cytoskeleton in plants. *Plant Sci* 181: 545-554.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S. H., Loake G. J. (2014) Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol* 202: 1142-1156.

Urszula Krasuska

Dr Urszula Krasuska