

Dr Michał Rurek

**Autoreferat przedstawiający opis
dorobku i osiągnięć naukowych**

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej

Poznań 2015

1. **Imię i nazwisko:** Michał Rurek

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

- doktor nauk biologicznych- 15.09.2000 r., Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka wybranych genów mitochondrialnych podjednostek dehydrogenazy NADH kompleksu I roślin i ich ekspresja” (praca obroniona z wyróżnieniem);

- magister nauk biologicznych- 8.05.1995 r., Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (studia ukończone z wyróżnieniem). Tytuł pracy magisterskiej: „Molekularna charakterystyka fragmentów chloroplastowego DNA łubinu żółtego zawierającego motyw adeninowy”

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- od 1.10.2000 r. do dnia dzisiejszego- adiunkt w Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin (od 2005 r. zmiana nazwy zakładu na Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej) Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (stosunek pracy na podstawie mianowania na czas nieokreślony);

- w 1995 r. (4 miesiące)- asystent w Katedrze Hematologii Akademii Medycznej w Poznaniu

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

a) **tytuł osiągnięcia naukowego:**

Kompleksowa analiza biogenezy mitochondriów roślin wyższych z uwzględnieniem stresu temperaturowego

b) **(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):**

1. **Rurek M**, Nuc K, Raczyńska KD, Augustyniak H (2003) Lupin *nad9* and *nad6* genes and their expression: 5' termini of the *nad9* gene transcripts differentiate lupin species. *Gene*, 315, 123-132 [IF 2,754; 16 pkt KBN]

2. Pawłowski T, **Rurek M**, Janicka S, Raczyńska KD, Augustyniak H (2005) Preliminary analysis of the cauliflower mitochondrial proteome. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 275-281 [IF 0,379; 10 pkt MNiSW]

3. **Rurek M** (2008) Proteins involved in maturation pathways of plant mitochondrial and plastid c-type cytochromes. *Acta Biochimica Polonica*, 55, 417-433 [IF 1,448; 15 pkt MNiSW]
4. **Rurek M** (2010) Diverse accumulation of several dehydrin-like proteins in yellow lupin (*Lupinus luteus*), cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) and *Arabidopsis thaliana* mitochondria under cold and heat stress. *BMC Plant Biology*, 10, 181 [IF 4,085; 32 pkt MNiSW]
5. **Rurek M** (2014) Plant mitochondria under a variety of temperature stress conditions. *Mitochondrion*, 19, 289-294 [IF 3,249; 30 pkt MNiSW]
6. **Rurek M**, Woyda-Ploszczyca A, Jarmuszkiewicz W (2015) Biogenesis of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) mitochondria in thermal stress and recovery depends on multiple steps and depends on diverse responses in complexome, activity of respiratory chain components and mitochondrial ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847, 399–417 [IF 5,353; 35 pkt MNiSW]

c) omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Odnosniki literaturowe wyróżnione pogrubioną czcionką dotyczą publikacji habilitanta stanowiących osiągnięcie naukowe zebranych w p. b. Pozostałe odnośniki literaturowe zamieszczono w podrozdziale „Literatura dodatkowa do p. 4”.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl **sześciu** oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych w latach 2003-2015 w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*. Sumaryczny **współczynnik wpływu IF** (zgodny z rokiem opublikowania) tych pozycji wynosi **17,268**. Sumaryczna liczba punktów **MNiSW** wynosi **122**; dodatkowo zdobyłem również **16** punktów **KBN**. W pięciu publikacjach jestem ich pierwszym autorem, w jednej publikacji (**publikacja 2**) - drugim autorem, który wywarł jednak decydujący wpływ na jej powstanie (włączając w to autorstwo całej koncepcji badań zamieszczonych w publikacji).

Wstęp

Prace badawcze ostatnich kilkunastu lat wykazały, że mitochondria roślinne, oprócz pełnienia podstawowych funkcji bioenergetycznych w komórce, są przedziałem, w którym zachodzą różnorodne procesy metaboliczne. Z drugiej strony, mitochondria roślin wyższych mają wiele unikalnych cech. Należy tutaj między innymi zaliczyć zdolność do syntezy niektórych związków drobnocząsteczkowych (w tym kofaktorów), obecność systemu rozszczepiającego glicynę (ang. *glycine cleavage system*, GCS) i związany z tym udział tych organelli w fotoodychaniu. Takie kompleksy enzymatyczne, jak przykładowo kompleks I (CI) łańcucha oddechowego, wydają się odgrywać szczególną rolę w złożoności strukturalnej

mitochondriów roślinnych oraz w bezpośredniej i pośredniej współpracy z innymi organellami (Braun i wsp., 2014). Mitochondria są również czynnie zaangażowane w takie zjawiska, jak programowana śmierć komórki oraz odpowiedź na warunki stresowe. Ten ostatni proces, w szczególności w odniesieniu do mitochondriów roślin wyższych nie został jednak do końca zbadany. W związku ze współdziałaniem mitochondriów roślinnych z jądrem komórkowym i plastydami, odpowiedź tych organelli na warunki stresowe ma charakter bardzo złożony i angażuje wiele białek w ramach odpowiedzi antero- i retrogradowej. Niektóre białka mitochondrialne, takie jak przykładowo alternatywna oksydaza (AOX), mogą być nie tylko efektorami działania warunków stresowych, lecz również aktywnie brać udział w precyzyjnej regulacji odpowiedzi komórki na te warunki (Vanlerberghe i wsp., 2009).

Prowadzone obecne prace doświadczalne z zakresu biologii molekularnej mitochondriów roślinnych weszły już w zaawansowaną fazę ery pogenomicznej. Jednakże wiele dostępnych danych literaturowych dotyczących wpływu różnego rodzaju warunków stresowych na biogenezę tych organelli jest fragmentarycznych, gdyż pochodzą one z niewielu kompleksowo analizowanych proteomów mitochondrialnych roślin wyższych. Wykazałem to w jednej z moich publikacji o charakterze przeglądowym (**publikacja 5**). Należy podkreślić, że stopień złożoności roślinnego proteomu mitochondrialnego jest wciąż zagadnieniem dyskusyjnym. Uważa się, że może on zawierać przynajmniej 1500 różnych białek (Taylor i wsp., 2011). Wiele danych odnośnie wpływu warunków stresowych na poziom akumulacji transkryptów lub białek mitochondrialnych pochodzi również z analiz całkowitych proteomów i transkryptomów i w związku z tym dane te niewystarczająco szacują ilościowo białka mitochondrialne (oraz kodujące je mRNA) o niższym poziomie akumulacji, które mogą wyznaczać nieznane uprzednio kierunki adaptacji do warunków stresowych. Zgodnie z danymi Taylor i wsp. (2009) przynajmniej 22% białek *Arabidopsis thaliana* uczestniczących w odpowiedzi na stres abiotyczny stanowią białka zlokalizowane w mitochondriach. Niemniej jednak ilość ta pozostaje wciąż niedoszacowana.

Dotychczas ukazało się niewiele prac, które analizowały zmiany w proteomie mitochondrialnym roślin wyższych pod wpływem chłodu lub ciepła (Taylor i wsp., 2005; Qin i wsp., 2009; Yin i wsp., 2009; Tan i wsp., 2012). Nasza wiedza dotycząca udziału poszczególnych etapów biogenezy mitochondriów roślinnych w odpowiedzi na warunki stresowe, w tym różnorodne warunki stresu temperaturowego (obniżonej i podwyższonej temperatury), a szczególnie po powrocie do warunków kontrolnych (ang. *stress recovery*) wzrostu i rozwoju roślin jest zatem wciąż niepełna. Odrębnym problemem jest również niedobór bardziej ogólnych analiz w odniesieniu **do całego organizmu roślinnego** (a nie tylko dotyczących układów doświadczalnych *in vitro*). Pozwala to na interpretację wyników badań posiadających rzeczywisty sens biologiczny. Takie podejście metodyczne nie było w

wystarczającym stopniu podkreślane w literaturze przedmiotu. Jednym z bardziej interesujących pytań wynikających z ostatnich analiz jest również zagadnienie, w jaki sposób ulega zmianie równowaga pomiędzy skoordynowaną ekspresją genów mitochondrialnych i jądrowych kodujących białka mitochondrialne w warunkach stresowych i w jaki sposób zmienia się wówczas składanie i rozpad wielkich kompleksów supramolekularnych w mitochondriach (Giegé i wsp., 2005; Howell i wsp., 2007). Dotychczasowe dane pozwalają zatem nie tylko postrzegać mitochondria roślin wyższych, jako istotny składnik odpowiedzi na warunki stresowe, lecz sprzyjają również przeprowadzaniu bardziej zintegrowanych analiz.

Cele badawcze i ogólne uwagi metodyczne

Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej uwarunkowania, za główny cel badawczy postawiłem sobie **szczegółowe zanalizowanie procesu biogenezy mitochondriów roślinnych z uwzględnieniem warunków stresu obniżonej oraz podwyższonej temperatury (stresu chłodu lub ciepła) poprzez przeprowadzenie w szerokim zakresie analizy poziomu ekspresji wybranych genów kodujących białka mitochondrialne kalafiora (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) oraz częściowo w aspekcie porównawczym - różnych gatunków łubinu (*Lupinus*) oraz *A. thaliana***. Należy zaznaczyć, że w uprzednich pracach doświadczalnych prowadzonych przez pracowników Zakładu Biologii Molekularnej Roślin użyto również gatunki roślin motylkowatych (Fabaceae). Za konieczne uznałem, zwłaszcza w początkowym okresie realizacji doświadczeń, przeprowadzenie szeregu wstępnych analiz transkryptomicznych oraz proteomicznych mitochondriów izolowanych z kilku gatunków roślin nasiennych (**publikacje 1 i 4**), które pozwoliły na wybranie do dalszych badań tylko jednego gatunku rośliny (**publikacje 2 i 6**). Nacisk położyłem na analizie ekspresji genów (przede wszystkim na poziomie białka i częściowo na poziomie RNA) kodujących składniki łańcucha oddechowego (systemu OXPHOS), białka będące składnikiem macierzy mitochondrialnej (w tym szczególnie białka enzymatyczne) oraz białka podobne do dehydryn (**publikacje 1, 4, 6**). Należy podkreślić, że niektóre z tych białek mitochondrialnych, przykładowo uczestniczące w dojrzewaniu cytochromów typu c (**publikacja 3**) oraz białka przypominające dehydryny (**publikacja 4**) nie są wystarczająco szeroko scharakteryzowane, nawet w przypadku gatunków modelowych, takich jak *A. thaliana*. Realizacja postawionych sobie celów badawczych wymagała ode mnie podjęcia analiz proteomu mitochondrialnego w warunkach stresowych. Doświadczenia przeprowadzano początkowo dla kilku wariantów nasilenia stresu, w celu wyboru takich warunków, które wywoływałyby znaczące zmiany jakościowe i ilościowe w proteomie mitochondrialnym. Analizowałem również efekty molekularne i fizjologiczne dotyczące

funkcjonowania mitochondriów podczas powrotu roślin do warunków kontrolnych (**publikacje 4 i 6**).

Z uwagi na fakt, że zawiązki kwiatostanów kalafiora (w przeciwieństwie do hipokotyli i korzeni siewek łubinu) okazały się bardzo bogatym źródłem sprzężonych mitochondriów o wysokim stopniu czystości, postanowiłem główne etapy moich prac badawczych, związanych przede wszystkim z ustaleniem wpływu analizowanych warunków stresowych na biogenezę mitochondriów, przeprowadzić na tym gatunku. Wymagało to ode mnie wstępnego scharakteryzowania proteomu mitochondrialnego tej rośliny (**publikacja 2**). Choć pełna sekwencja genomu jądrowego kalafiora w tym czasie nie była dostępna (z wyjątkiem wyników sekwencjonowania typu *shotgun* genomu jądrowego *B. oleracea*; Ayele i wsp., 2005), to jednak wyniki analiz nawet na wczesnych etapach realizacji zadań badawczych z łatwością mogły zostać przyrównane do odpowiednich danych dotyczących przedstawicieli tej samej rodziny, szczególnie *A. thaliana*. Warto podkreślić, że znana jest obecnie sekwencja genomu mitochondrialnego kalafiora (Grewe i wsp., 2014). Należy również zauważyć, że kalafior jest ważnym gatunkiem warzywnym uprawianym dla celów użytkowych. Obecnie zwraca się uwagę na konieczność analizy biogenezy organelli u ważnych użytkowo gatunków, gdyż stres abiotyczny, włączając w to szczególnie stres temperaturowy powoduje poważne straty w rolnictwie, zwłaszcza podczas zachodzących aktualnie globalnych zmian klimatycznych. Otrzymane wyniki pozwoliły mi nie tylko na zaproponowanie modelu zmian zachodzących w biogenezie mitochondriów roślinnych pod wpływem warunkach stresu temperaturowego (**publikacje 5 i 6**), ale prawdopodobnie pozwolą na skonstruowanie transgenicznych roślin kalafiora opornego na niekorzystne warunki środowiska.

Dyskusja osiągniętych wyników i ich wykorzystanie w pracy badawczej

Początkowo, przed rozpoczęciem właściwych analiz w warunkach stresowych, postanowiłem zbadać organizację wybranych genów *nad* (kodujących podjednostki kompleksu I) w genomie mitochondrialnym analizowanych gatunków roślin oraz określić obraz startu transkrypcji tych genów. W cyklu doświadczeń opisanych w **publikacji 1** po raz pierwszy przedstawiłem pełniejszy i bardziej całościowy obraz transkrypcji mitochondrialnych genów *nad* (na przykładzie genów *nad6* i *nad9*) u przedstawicieli rodziny motylkowatych. Analizy zostały przeprowadzone z wykorzystaniem czterech gatunków łubinu: łubinu żółtego (*L. luteus*), łubinu białego (*L. albus*), łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) oraz łubinu andyjskiego (*L. mutabilis* Sweet). W ramach wymienionej pracy wykazałem, że sekwencja nukleotydowa *nad6* i *nad9* oraz ich organizacja w genomie mitochondrialnym rodzaju *Lupinus* (zgrupowanie genów *rps3-rpl16-nad9* oraz liczba kopii genów *nad9* i *nad6*) jest silnie

zachowawcza. Był to wniosek zaskakujący, zważywszy, że lokalizacja tych genów w genomach mitochondrialnych roślin nasiennych jest zazwyczaj zmienna i że te same geny *nad* mogą wchodzić w skład odmiennych jednostek transkrypcyjnych u różnych gatunków roślin (Kubo i wsp., 2000; Notsu i wsp., 2002). Ekspresję genów *nad6* i *nad9* analizowałem również w różnych tkankach/ układach doświadczalnych (hipokotyle i korzenie, kalus, kultury zawieszinowe) i wykazałem, że z reguły ulegają w nich stosunkowo silnej akumulacji monocistronowe transkrypty analizowanych genów. Wyniki te kontrastowały z dotychczasowymi doniesieniami, podkreślającymi szczególnie złożony obraz transkrypcji roślinnego genu *nad9* (Lu i Hanson, 1996; Nakazono i wsp., 1996). Z drugiej strony, w mitochondriach łubinu białego stwierdziłem występowanie wyjątkowo długich transkryptów *nad6* i *nad9*.

Chociaż redagowanie mRNA *nad6* i *nad9* u przedstawicieli rodzaju *Lupinus* wykazuje niewiele różnic (więcej miejsc redagowania wykryłem w transkryptach genu *nad6*), to jednak po raz pierwszy wykazałem, że dwa kodony w transkryptach *nad9* łubinu żółtego i wąskolistnego ulegają edytowaniu w sposób zupełnie nietypowy dla roślin dwuliściennych, natomiast w transkryptach *nad6* łubinów nie dochodzi do redagowania pojedynczego kodonu w porównaniu z danymi dotyczącymi dwuliściennych. Ponadto obraz częściowego redagowania w trzech kodonach mRNA genu *nad6* łubinu wąskolistnego zależał od stadium rozwojowego. Wykazałem ponadto, że dwa spośród analizowanych przez nas gatunków łubinu, łubin żółty i wąskolistny charakteryzują się zróżnicowaną budową promotora genu *nad9*, co zdecydowanie wpływa na odmienny obraz startu transkrypcji *nad9* we wspomnianych gatunkach. Biorąc pod uwagę ich pozycję taksonomiczną, odkrycie to stanowiło dużą niespodziankę. Co więcej, mapowanie jednego z dwóch potencjalnych końców 5' transkryptów *nad9* łubinu żółtego i wąskolistnego wykazało, że dzieli je odległość 144 pz u wymienionych gatunków i że znajdują się one w odmiennych rejonach promotora nie zawierających przy tym kanonicznego motywu 5'-CRTA-3' charakterystycznego dla tego typu sekwencji. Motyw ten znalazłem natomiast w regionie położonym powyżej zmapowanego drugiego końca 5' transkryptu *nad9*, którego pozycja była zbliżona u łubinu żółtego i wąskolistnego. Okazało się zatem, że molekularne cechy miejsca startu transkrypcji *nad9* mogą różnicować analizowany materiał roślinny. Biorąc pod uwagę wyniki naszej pracy, zaproponowałem wykorzystanie ich jako układów markerowych. Warto również w tym miejscu zaznaczyć, że tego typu analizy, jak również analizy genomów różnych gatunków łubinu pozwalają na lepszą charakterystykę ich historii ewolucyjnej.

Przed rozpoczęciem dalszych analiz konieczna była optymalizacja poszczególnych etapów procedury izolacji mitochondriów kalafiora, w tym homogenizacji materiału biologicznego (z zewnętrznej warstwy zawiązków kwiatostanów 3-miesięcznych roślin),

wirowania różnicowego i optymalizacji warunków rozdziału na gradiencie Percollu. Konieczne okazało się również sprawdzenie czystości uzyskanej frakcji mitochondriów za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz przeprowadzenie testów z wykorzystaniem aktywności odpowiednich enzymów markerowych subfrakcji komórkowych (**publikacje 2 i 4**). Czystość preparatów zawierających białka mitochondrialne wyceniliśmy na >90%. Nasze wstępne analizy proteomiczne (**publikacja 2**) zostały przeprowadzone z wykorzystaniem m.in. frakcji wzbogaconych w mitochondrialne białka błonowe (w tym powierzchniowe i integralne) oraz białka rozpuszczalne. Wszystkie analizowane frakcje były rozdzielane w warunkach 2D PAGE (IEF/ SDS-PAGE). Podczas ogniskowania izoelektrycznego rutynowo stosowaliśmy gradient pH 3-10, natomiast podczas rozdziału białek w drugim kierunku zastosowaliśmy komercyjnie dostępne 8-18% żełe gradientowe do SDS-PAGE. Zastosowaliśmy standardową metodę barwienia białek azotanem srebra. Mapy proteomiczne analizowane były za pomocą programu *Imager Master 2D Elite*. Rozdzieliliśmy i zanalizowaliśmy 561 plamek białek mitochondrialnych; z kolei, we frakcji białek rozpuszczalnych (przede wszystkim reprezentujących macierz mitochondrialną) stwierdziliśmy obecność szczególnie wielu białek o stosunkowo wysokim poziomie akumulacji. Porównaliśmy mapy proteomu mitochondrialnego kalafiora oraz *A. thaliana* (Kruft i wsp., 2001; Millar i wsp., 2001), i wytypowaliśmy 30 białek mitochondrialnych kalafiora będących przypuszczalnymi homologami odpowiednich białek mitochondrialnych *A. thaliana*. Ponadto potwierdziliśmy identyfikację wybranych białek za pomocą spektrometrii mas. Generalnie stwierdziliśmy, że mapy proteomu mitochondrialnego kalafiora oraz *A. thaliana* są do siebie bardzo podobne. Należy podkreślić, że chociaż analizowany przez nas proteom mitochondrialny kalafiora był piątym ówczesznie „rozpoznanym” roślinnym proteomem mitochondrialnym (Millar i wsp., 2001; Bardel i wsp., 2002; Heazlewood i wsp., 2003; Hochholdinger i wsp., 2004), stanowił on pierwszy opublikowany proteom mitochondrialny przedstawiciela rodzaju *Brassica* i drugi proteom mitochondrialny przedstawiciela rodziny Brassicaceae. Wyniki naszej pracy ułatwiły późniejszą interpretację analiz typu DIGE oraz pozycji kluczowych białek markerowych rozdzielanych w drugim kierunku celem prawidłowej weryfikacji zidentyfikowanych plam białkowych (**publikacja 6**).

Ustalenie znaczenia niektórych białek mitochondrialnych w odpowiedzi na warunki stresowe może w dalszym ciągu być kłopotliwe z uwagi na ich stosunkowo niski poziom akumulacji. Próba przybliżenia charakterystyki takich białek została zawarta w **publikacji 3**. Stanowi ona pracę przeglądową poświęconą różnorodnym systemom dojrzewania cytochromów typu c. Opierając się na aktualnych danych literaturowych, przedstawiłem w niej modułarną koncepcję budowy tych systemów, zwracając szczególną uwagę na procesy dojrzewania cytochromów typu c w mitochondriach i plastydach. Dokładnie zostały

przedstawione składniki białkowe mitochondrialnego aparatu dojrzewania cytochromów typu c, czyli tzw. systemu I, oraz ich przypuszczalny udział w całym procesie wnioskowany częstokroć również na podstawie wyników analiz funkcjonalnych składników analogicznego systemu występującego w komórkach eubakteryjnych. Zestaw ten obejmuje białka uczestniczące w transporcie hemu oraz redukcji apocytochromów, oraz przypuszczalne białka wykazujące aktywność liazy hemowej. Dodatkowo przedyskutowałem w niej potencjalne oddziaływania występujące pomiędzy składnikami systemu I w komórkach prokariotycznych i w mitochondriach roślinnych. W tym okresie rozważałem możliwość prześledzenia zmian w poziomie niektórych białek będących składnikami systemu I w mitochondriach kalafiora w warunkach stresu temperaturowego. Z uwagi na problemy związane z wykrywalnością większości z nich wynikające z ich niskiego poziomu i niewystarczającej specyficzności przeciwciał, postanowiłem swoje analizy ograniczyć do sprawdzenia submitochondrialnej lokalizacji jednego z tych białek, białka CCMH kalafiora. Wykazuje ono aktywność tioredoksyny i zarazem jest postulowanym składnikiem kompleksu o aktywności liazy hemowej w mitochondriach roślinnych (Meyer i wsp., 2005). Wyniki moich analiz zostały zamieszczone w **publikacji 4**. Białko CCMH kalafiora, podobnie jak jego odpowiednik u *A. thaliana*, jest integralnym białkiem błonowym związanym z wewnętrzną błoną mitochondrialną, opornym na ekstrakcję w warunkach wysokiej siły jonowej. W tym samych warunkach eksperymentalnych, cyt. c oddziałujący z wewnętrzną błoną mitochondrialną ulegał intensywnemu wymyciu z frakcji submitochondrialnych kalafiora wzbogaconych w błony. Powyżej opisane doświadczenia zostały wykorzystane przy ocenie jakościowej przygotowanych frakcji i dokładniejszych analizach lokalizacji białek podobnych do dehydryn (patrz poniżej).

Przedmiotem dalszych dociekań naukowych (**publikacja 4**) stały się rozwinięte w szerszym zakresie badania mające na celu dokładniejszą charakterystykę kolejnej grupy białek mitochondrialnych - białek podobnych do dehydryn (ang. *dehydrin-like proteins*, dlps) w mitochondriach kalafiora, *A. thaliana* i łubinu żółtego z uwzględnieniem wszystkich analizowanych warunków stresowych. Dehydryny - jedna z klas zachowawczej rodziny białek LEA (ang. *late embryogenesis abundant*), obejmuje białka bogate w lizynę i glicynę, których poziom ulega znacznemu zwiększeniu, m.in. podczas kiełkowania nasion i w trakcie niedoboru wody. Wiadomo jednak, że tego typu białka ulegają indukcji również w innych warunkach stresowych (Close, 1997; Rorat i wsp., 2006). Dehydryny wykazują charakterystyczną budowę segmentową sekwencji I- rzędowej. Mają charakterystyczną zachowawczą domenę bogatą w lizynę, tzw. segment K (Campbell i Close, 1997). Dehydryny są zlokalizowane w wielu przedziałach komórkowych (Houde i wsp., 1995; Danyluk i wsp., 1998; Heyen i wsp., 2002) i charakteryzują się znaczną termostabilnością. Z

kolei, mitochondrialne białka podobne do dehydryn poznano dotychczas u niewielu stosunkowo gatunków roślin wyższych, przede wszystkim traw (Poaceae) i w niewystarczający sposób potwierdzono ich topologię oraz lokalizację submitochondrialną (Borovskii i wsp., 2000, 2002).

Biorąc pod uwagę przedstawione dane doświadczalne, wydawało się celowym bliższe scharakteryzowanie tych białek w mitochondriach gatunków roślin nasiennych badanych na wcześniejszych etapach prac badawczych (**publikacja 1**). Analizy tego typu wykonano po raz pierwszy dla przedstawicieli rodzin Fabaceae i Brassicaceae, biorąc pod uwagę również specyfikę tkankową dlps. Przeprowadzane doświadczenia po raz pierwszy pozwoliły na sprecyzowanie roli tych białek nie tylko w odpowiedzi na stres temperaturowy, ale również podczas powrotu roślin do warunków kontrolnych ze stresu obniżonej i podwyższonej temperatury (**publikacja 4**). Wykorzystałem dwa rodzaje przeciwciał skierowanych przeciwko różnym segmentom dehydryn: wspomniane wcześniej przeciwciała skierowane przeciwko segmentowi K oraz alternatywne przeciwciała rozpoznające zarówno segmenty S, jak i K. Takie podejście pozwoliło na ustalenie, że ilość immunoreaktywnych epitopów wykrywanych przez obydwa rodzaje przeciwciał była zróżnicowana. Co ciekawe, zarówno w mitochondriach kalafiora, jak i *A. thaliana* wykryłem znacznie więcej dlps o większym przedziale mas cząsteczkowych, niż znanych dotychczas dehydryn Brassicaceae (Bies-Ethève i wsp., 2008; Hundertmark i Hinch, 2008). Wydaje się przy tym, że dehydryny i dlps pomimo obecności zachowawczych motywów mogą wykazywać w niektórych przypadkach znaczną zmienność sekwencji. Wykazałem, że w mitochondriach kalafiora, łubinu żółtego i *A. thaliana* występuje znacznie bogatsza niż w mitochondriach traw (Poaceae) pula dlps. Stwierdziłem przy tym występowanie tkankowo - specyficznych różnic w akumulacji mitochondrialnych dlps u trzech analizowanych gatunków. Przykładowo, w mitochondriach kultur komórkowych (w przeciwieństwie do liści rozet) *A. thaliana* występowało większe zróżnicowanie dlps, które ulegały znacznej akumulacji zwłaszcza w fazie stacjonarnej wzrostu. Podobny wynik uzyskali wcześniej Bae i wsp. (2009) analizując pulę cytoplazmatycznych dehydryn typu SK₃ w kulturach topoli (*Populus alba* x *P. tremula* var. *glandulosa*). Część analizowanych dlps miała masę cząsteczkową powyżej 50 kDa. Co ciekawe, pula niskocząsteczkowych dlps charakteryzowała się większą zmiennością masy cząsteczkowej niż odpowiednie białka traw (Poaceae). Niskocząsteczkowe dlps ulegały szybkiej indukcji pod wpływem stosowanych warunków stresowych, natomiast inne dlps były zaangażowane w odpowiedź mitochondriów w fazie powrotu do warunków kontrolnych. Wyniki przeprowadzanych analiz wskazywały, że białka te mogą przypuszczalnie uczestniczyć w nabywaniu tolerancji na omawiane warunki stresowe. Okazało się również, że pula wysokocząsteczkowych dlps charakteryzuje się z reguły większą termostabilnością.

Dużą nowością w **publikacji 4** była przeprowadzona przeze mnie analiza lokalizacji niektórych z poznanych dlps w mitochondriach kalafiora za pomocą trzech niezależnych podejść eksperymentalnych. Jest to cenne uzupełnienie dotychczasowych danych. Większość tych białek była zlokalizowana w macierzy mitochondrialnej, ale przynajmniej trzy z nich oddziałują z błonami mitochondrialnymi. Wykazałem również, że jedno z tych trzech białek (65 kDa) charakteryzujące się wysoką termostabilnością, oddziałuje z zewnętrzną błoną mitochondrialną. Zaproponowałem, że może być ono potencjalnym kandydatem na termostabilną dehydrynę „osłaniającą” mitochondria kalafiora od strony cytoplazmatycznej przed skutkami działania stresu temperaturowego. Dotychczasowe dane literaturowe opierały się na niejasnych kryteriach eksperymentalnych, pozwalających na odróżnienie znanych uprzednio mitochondrialnych dehydryn od białek podobnych do dehydryn. W mojej publikacji sprecyzowałem to kryterium, kładąc nacisk na większe zróżnicowanie termowrażliwości dehydryn i białek podobnych do dehydryn. **Publikacja 4** precyzuje również model działania dlps w warunkach stresu chłodu, ciepła oraz podczas powrotu do warunków kontrolnych, częściowo oparty o dane literaturowe. Zgodnie z nim, wielkocząsteczkowe dehydryny cytoplazmatyczne oddziałują z zewnętrzną błoną mitochondrialną, natomiast małe dlps ulegają importowi do macierzy mitochondrialnej, stabilizując wewnętrzną błonę lub/i enzymy macierzy mitochondrialnej. **Publikacja 4** stanowi zatem istotny wkład w poszerzeniu wiedzy dotyczącej udziału mitochondriów w odpowiedzi na stres, a wyniki w niej przedstawione uzupełniają model biogenezy mitochondriów roślinnych w stresie temperaturowym przedstawiony w późniejszych pracach (**publikacje 5 i 6**).

Wyniki najważniejszych i najbardziej kompleksowych analiz biogenezy mitochondriów kalafiora pod wpływem stresu temperaturowego i w fazie powrotu do warunków kontrolnych zamieszczone zostały w **publikacji 6**, która jest wynikiem współpracy z kilkoma jednostkami naukowymi (Zakład Bioenergetyki UAM oraz Wydziałowa Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej UAM; Institut für Pflanzengenetik, Uniwersytet w Hanowerze, Niemcy; Katedra Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu). Zamieściłem w niej wyniki realizacji szeregu analiz o charakterze proteomicznym, transkryptomicznym, funkcjonalnym, a także wyniki analiz mikroskopowych. Przedyskutowane zostały w niej również potencjalne zmiany w metabolizmie mitochondrialnym w trakcie działania warunków stresowych.

Początkowe etapy prac doświadczalnych zostały przeprowadzone we współpracy z grupą badawczą prof. Hansa-Petera Brauna (Institut für Pflanzengenetik, Uniwersytet w Hanowerze). Posługując się 2D DIGE (ang. *difference in gel electrophoresis*) w warunkach BN/Tris-Tricine-SDS-PAGE po raz pierwszy analizowałem stabilność kompleksów i superkompleksów łańcucha oddechowego kalafiora podczas stresu podwyższonej

temperatury i w fazie powrotu do warunków kontrolnych wzrostu i rozwoju roślin. W przeciwieństwie do uprzednich doniesień (Amme i wsp., 2007; Kieffer i wsp., 2008; Kjellsen i wsp., 2010; Jacoby i wsp., 2013) w **publikacji 6** znakowanie kompleksu mitochondrialnego w warunkach natywnych przeprowadziłem dwoma niezależnymi systemami znaczników fluorescencyjnych. Dotychczasowe doniesienia literaturowe dotyczące zmian kompleksomicznych w mitochondriach roślin wyższych wywołanych warunkami stresowymi były bardzo skąpe i z wyjątkiem pracy Tan i wsp. (2012) niezwiązane z działaniem stresu temperaturowego. Heinemeyer i wsp. (2009) poddawali wyizolowane preparaty mitochondriów *A. thaliana* działaniu podwyższonej temperatury, lecz zaobserwowana przez nich destabilizacja niektórych kompleksów OXPHOS była konsekwencją oddziaływania czynnika termicznego w warunkach *in vitro* i w związku z tym nie wniosła istotnych implikacji biologicznych. W przeciwieństwie jednak do wniosków przedstawionych w pracy Tan i wsp. (2012), której autorzy na podstawie wyników analiz iTRAQ sprzężonych z LC-MS/MS postulowali koekspresję określonych podjednostek tych samych kompleksów OXPHOS w stresie chłodu, podejście przedstawione przeze mnie w **publikacji 6** jest z metodycznego punktu widzenia bardziej bezpośrednie. Przeprowadzone przeze mnie analizy nieoczekiwanie wykazały, że kompleks I (CI) oraz superkompleks I+III₂ (SCI+III₂) mitochondrialnego łańcucha oddechowego kalafiora wykazują znaczną oporność na stres podwyższonej temperatury. Z drugiej strony zaobserwowałem jednakże zaburzenia w składaniu holokompleksu syntazy ATP, związane z akumulacją wolnych podjednostek b i γ tego enzymu podczas powrotu do warunków kontrolnych. Towarzyszyły temu wyraźne zaburzenia w syntezie *de novo* innej podjednostki syntazy ATP.

Stosując sieciowanie chemiczne (za pomocą bifunkcyjnego estru ditiobis[propionianu sukcyimidylu], DSP) w warunkach natywnych przed solubilizacją superkompleksów i kompleksów mitochondrialnych kalafiora za pomocą digitoniny stwierdziłem, że obraz oddziaływań pomiędzy CI i CIII prowadzące do utworzenia SCI+III₂, a także stopień dimeryzacji mitochondrialnej syntazy ATP, mimo zaburzeń w jej składaniu, w zasadzie nie ulega zmianie w stresie ciepła. Należy podkreślić, że sieciowanie chemiczne stosowano dotychczas głównie podczas analizy struktury i budowy podjednostkowej określonych mitochondrialnych kompleksów białkowych, a nie oddziaływań pomiędzy tymi kompleksami (Back i wsp., 2002). Z kolei, posługując się elektroforezą niebieskonatywną (BN-PAGE) zaobserwowałem zmiany ilościowe i jakościowe w akumulacji kompleksów zawierających niektóre białka macierzy mitochondrialnej, takie jak akonitaza (ACO) czy dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH), a nawet niektórych kompleksów błonowych, takich jak izoforma 1 mitochondrialnej poriny (VDAC1) i metaloproteaza FtSH4. Wszystkie te zmiany, a przede

wszystkim obniżenie akumulacji wymienionych kompleksów, towarzyszyły adaptacji metabolizmu mitochondrialnego do stresu podwyższonej temperatury.

Stosując identyfikację plamek białkowych z żeli 2D DIGE za pomocą LC-ESI-Q-TOF-MS oraz posługując się programami *Delta2D* (Decodon) oraz *GelMap* (Rode i wsp., 2011), w **publikacji 6** stwierdziłem występowanie zmian w akumulacji wielu białek mitochondrialnych w stresie podwyższonej temperatury i znaczniejszych zmian zwłaszcza podczas powrotu do warunków kontrolnych po działaniu stresu temperaturowego. Dotyczyły one również białek dotychczas niepowiązanych z odpowiedzią na te warunki stresowe. Wiele zmian dotyczyło nie tylko enzymów odpowiedzialnych za metabolizm szkieletów węglowych lub aminokwasów, ale również składników mitochondrialnego aparatu importu białek. Co ciekawe, wahaniu ulegał również poziom niektórych podjednostek CI, CII i CIII. Zmiany w akumulacji podjednostek CI i CIII w zasadzie nie były skoordynowane ze zmianami ich poziomu w odpowiednich superkompleksach. Analizę ogólnych zmian w akumulacji wybranych białek mitochondrialnych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na poziom izoform AOX, w warunkach stresu temperaturowego przeprowadzałem również metodą Western blot. Największe różnice w zmianach akumulacji białek mitochondrialnych obserwowano z reguły po zakończeniu fazy powrotu roślin do warunków kontrolnych, a nie bezpośrednio po zaprzestaniu działania warunków stresowych. Wszystko to sugeruje występowanie kilku istotnych punktów regulacyjnych w metabolizmie mitochondrialnym zarówno podczas stresu ciepła, jak również w trakcie powrotu do warunków kontrolnych, uprzednio nie w pełni poznanych.

W tej samej publikacji stwierdziłem również występowanie określonych podobieństw pomiędzy kompleksomem mitochondrialnym kalafiora i *A. thaliana* (Klodmann i wsp., 2011). Niemniej jednak CII łańcucha oddechowego kalafiora wydaje się zawierać dodatkowe, swoiste gatunkowo izoformy niektórych podjednostek, co zwiększa naszą wiedzę o budowie tego enzymu u roślin wyższych (Millar i wsp., 2004). Podobnie jak u większości zbadanych gatunków roślin, w mitochondriach kalafiora występują dwie izoformy kompleksu oksydazy cytochromowej (CIVa i CIVb) o zróżnicowanym poziomie akumulacji i aktywności. Należy jednak podkreślić, że w mitochondriach ziemniaka (*Solanum tuberosum*) Eubel i wsp. (2004) wykazali występowanie tylko pojedynczej izoformy CIV. Wydaje się również, że akumulacja izoform tego kompleksu o zróżnicowanej aktywności w mitochondriach pewnych gatunków roślin może mieć charakter tkankowo - swoisty (Peters i wsp., 2012).

Z kolei analizy funkcjonalne zamieszczone w **publikacji 6** dowiodły, że aktywność kompleksów łańcucha oddechowego i wydajność syntezy ATP są znacząco zmienione w warunkach stresowych. Posługując się techniką *in-gel* assay wykazałem, że w trakcie stresu chłodu i ciepła następują wyraźne zmiany w aktywności enzymatycznej CI-CIV oraz syntazy

ATP. Podczas stresu ciepła aktywność kompleksów oddechowych była obniżona; ulegała ona natomiast zwiększeniu w trakcie powrotu do warunków kontrolnych po stresie podwyższonej temperatury, co korespondowało z odpowiednimi zmianami proteomicznymi. Ponieważ jednak aktywność wymienionych kompleksów zależy od ich obecności w wewnętrznej błony mitochondrialnej (Pfeiffer i wsp., 2003), a czynnik ten ulega wyeliminowaniu w trakcie analiz typu *in-gel* assay, we współpracy z pracownikami Zakładu Bioenergetyki UAM przeprowadziliśmy odpowiednie pomiary oksygraficzne izolowanych mitochondriów kalafiora w warunkach stresowych. Szybkość oddychania mitochondrialnego w stanie 3 i 4 była większa, gdy substratem oddechowym był bursztynian, w przeciwieństwie do jabłczanu. Wykazaliśmy, że w przeciwieństwie do stresu obniżonej temperatury, stres ciepła powodował zmniejszenie wydajności fosforylacji oksydacyjnej poprzez zmiany w aktywności AOX. Jedynie stres podwyższonej temperatury powodował zwiększenie akumulacji AOX i jej aktywności (a także puli niektórych transkryptów AOX), natomiast powrót do warunków kontrolnych powodował odwrócenie tych zmian. Stres ciepła obniżał również aktywność syntazy ATP, CI, CIV, lecz nie CII. Aktywności tych trzech ostatnich kompleksów ulegały obniżeniu podczas powrotu do warunków kontrolnych. Z kolei stres chłodu obniżał aktywność CII i CIV, ale nie CI, natomiast po powrocie do warunków kontrolnych aktywności wymienionych kompleksów białkowych ulegały podwyższeniu. Co ciekawe, każde zwiększenie temperatury (stres ciepła i powrót do warunków kontrolnych po stresie chłodu) powodowało zmniejszenie aktywności dehydrogenazy wewnętrznej NADH niewrażliwej na rotenon. Zróżnicowana regulacja aktywności dehydrogenazy wewnętrznej NADH i AOX w stresie temperaturowym jest niespodzianką w porównaniu z poprzednimi doniesieniami postulującymi koekspresję izoform tych dwóch enzymów (Clifton i wsp., 2005; Rasmusson i wsp., 2009; Van Aken i wsp., 2009).

W mitochondriach kalafiora wykryłem również obecność 3 izoform białkowych AOX o masie cząsteczkowej 29-33 kDa; poziom dwóch z nich ulegał obniżeniu w stresie obniżonej temperatury i podczas powrotu do warunków kontrolnych, natomiast poziom wszystkich trzech izoform ulegał znacząco zwiększonej akumulacji wyłącznie w stresie podwyższonej temperatury. W tych ostatnich warunkach zwiększeniu ulegała również pula transkryptów AOX1a i AOX1d. Jednak w trakcie powrotu do warunków kontrolnych po stresie podwyższonej i obniżonej temperatury, zwiększenie akumulacji wymienionych transkryptów kompensowało obniżeniu poziomu białka AOX, co uwidacznia znaczenie tej fazy w regulacji aktywności alternatywnej oksydazy. Interesującym pozostaje fakt, że poziom koordynacji ekspresji mitochondrialnych genów kalafiora kodujących podjednostki tego samego kompleksu białkowego był ograniczony w wypadku mRNA *nad3*, *nad6* i *nad9* zarówno w stresie chłodu, jak i ciepła, chociaż odpowiednie zmiany transkryptyczne były

skoordynowane ze zmianami puli *de novo* tych białek, analizowanymi podczas translacji *in organello*. Należy zaznaczyć, że spodziewaliśmy się jednak większej koordynacji zmian transkryptomicznych dotyczących mRNA kodujących podjednostki CI (Van Aken i wsp., 2009). Ogólnie jednak obraz translacji mitochondrialnej w stresie ulegał znacznym zmianom, co jest znaczną nowością, zważywszy na uprzednie doniesienia literaturowe (Giegé i wsp., 2005).

We współpracy z Wydziałową Pracownią Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej w **publikacji 6** przeanalizowałem liczebność, rozmiary oraz ultrastrukturę mitochondriów w apikalnej warstwie komórek zawiązków kwiatostanów kalafiora. Stwierdziłem, że zarówno ultrastruktura, jak i liczebność mitochondriów nie ulegały znaczącym zmianom pod wpływem analizowanych warunków stresowych. Zaskakujące, że większe zmiany w kształcie i liczebności mitochondriów, przejawiające się m.in. ich pęcznieniem udało się zaobserwować po powrocie roślin do warunków kontrolnych wzrostu, niezależnie od rodzaju stosowanego czynnika stresowego, chociaż szczegółowe zmiany w morfologii mitochondriów nie w pełni pokrywały się z danymi literaturowymi (Webster i Watson, 1993; Neumann i wsp., 1994; Vella i wsp., 2012). Postulujemy, że zaobserwowane zmiany mogły być związane z indukcją procesu programowanej śmierci komórek w zawiązkach kwiatostanów kalafiora, organu stosunkowo wrażliwego na zmiany temperatury. Wiadomo, że kalafior, w przeciwieństwie do *A. thaliana* jest gatunkiem tylko częściowo aklimatyzowanym do warunków stresu temperaturowego.

Ponadto we współpracy z pracownikami Katedry Warzywnictwa UP w Poznaniu sprawdziłem, czy analizowane warunki stresu podwyższonej lub obniżonej temperatury są w stanie wywołać specyficzne zmiany na poziomie fizjologicznym, wiążące się z metabolizmem mitochondrialnym. Zmierzyliśmy szybkość wymiany gazowej towarzyszącej oddychaniu mitochondrialnemu na świetle, a także szybkość fotooddechacji w dojrzałych liściach kalafiora. W doświadczeniach wykorzystaliśmy specjalistyczny system do pomiarów wymiany gazowej liści. Do pomiarów natężenia oddychania na świetle wykorzystano metodę Laiska (1977). Zależność pomiędzy natężeniem asymilacji CO₂ a międzykomórkowym stężeniem CO₂ w liściach ustalano dla trzech wartości natężenia światła. Dodatkowo monitorowaliśmy również temperaturę powierzchni liści. Większość warunków stresowych, a także powrót do warunków kontrolnych, w zróżnicowany sposób zmieniały analizowane parametry fizjologiczne. Przykładowo, po podniesieniu temperatury do 40°C następował szybki wzrost temperatury rośliny, a następnie temperatura ta się stabilizowała. Okres ten trwał około 2 godzin. Kiedy czas trwania stresu podwyższonej temperatury przedłużono o kolejne 2 godziny, stwierdziliśmy znaczny wzrost intensywności oddychania mitochondrialnego na świetle i spadek szybkości fotooddechania. Jednakże przedłużenie łącznego czasu

utrzymywania wysokiej temperatury ponad 4 godziny powodowało znacznie obniżanie turgoru liści, a na niektórych liściach pojawiły się trwałe uszkodzenia, czego efektem było ich żółknięcie i zamieranie w dalszych dniach wzrostu. W temperaturze 8°C reakcja fizjologiczna była widoczna po 8 godzinach od obniżenia temperatury. Stwierdziłmy spadek intensywności oddychania na świetle i drastyczne, ponad 10-krotne obniżenie szybkości fotooddychania. Jednakże opisane powyżej zmiany proteomiczne i transkryptomiczne były widoczne dopiero po 10 dniach trwania stresu obniżonej temperatury (**publikacja 6**).

Przeprowadzone prace pozwoliły zatem na poznanie bardziej całościowo biogenezy mitochondriów roślin wyższych w stresie obniżonej lub podwyższonej temperatury i w fazie powrotu do warunków kontrolnych wzrostu i rozwoju roślin. W **publikacji 5**, na podstawie aktualnych danych literaturowych, zaproponowałem ogólny model funkcjonowania mitochondriów roślin wyższych w tych warunkach. Wspomniana praca o charakterze przeglądowym powstała w porozumieniu z organizatorami *International Congress for Plant Mitochondrial Biology* w Rosario (Argentyna), który odbył się w 2013 r. Została w niej zwrócona uwaga nie tylko na różnorodne aspekty odpowiedzi mitochondriów roślinnych na warunki stresu temperaturowego na poziomie proteomicznym i transkryptomicznym, ale podkreślono w niej znaczenie rearanżacji genomowych, kierunków adaptacyjnych w morfologii i metabolizmie mitochondrialnym w odpowiedzi na chłód lub ciepło. Z uwagi na niewiele dotychczasowych doniesień literaturowych zaznaczono w niej również konieczność kontynuowania analiz zmian w kompleksie mitochondrialnym i imporcie białek mitochondrialnych w omawianych warunkach stresowych. Ogólny model funkcjonowania mitochondriów roślin wyższych przedstawiony w **publikacji 5** na podstawie danych literaturowych został uściślony w następnej pracy (**publikacja 6**) w odniesieniu do mitochondriów kalafiora. Stwierdziłem, że ograniczony poziom kontroli biogenezy mitochondriów tego gatunku podczas stresu temperaturowego związany jest nie tylko z zaburzeniami składania i rozpadu kompleksów, ale również z zaburzeniami mitochondrialnej translacji i zmianami w poziomie wielu białek mitochondrialnych, w tym szczególnie enzymów macierzy mitochondrialnej i składników aparatu importu białek do mitochondriów. Występowała przy tym ograniczona korelacja pomiędzy uzyskanymi wynikami analiz proteomicznych i funkcjonalnych, a także pomiędzy zmianami proteomicznymi i transkryptomicznymi w mitochondriach kalafiora. Zmiany te niekiedy miały charakter adaptacyjny do warunków stresowych.

W przeciwieństwie do układów modelowych, takich jak kultury komórkowe, regulacja biogenezy mitochondriów kalafiora w warunkach stresu temperaturowego jest bardziej skomplikowana; wydaje się ona również nie zależeć jedynie od odpowiedzi retrogradowej (mitochondria - jądro komórkowe) i zmian w ekspresji genów jądrowych kodujących białka

mitochondrialne. Tak więc odpowiedź mitochondriów tego gatunku na stres obniżonej lub podwyższonej temperatury ma pewne cechy swoiste, a ponadto bierze w niej udział więcej poziomów biogenezy mitochondriów, niż w przypadku kultur komórkowych *A. thaliana* (Giegé i wsp., 2005). Z drugiej jednak strony, nie wszystkie składniki mitochondrialnej odpowiedzi na stres temperaturowy odgrywają taką samą rolę. Opisanym zmianom towarzyszą również liczne regulacje funkcjonalne i regulacje dotyczące morfologii mitochondriów, zwłaszcza podczas powrotu do warunków kontrolnych wzrostu i rozwoju roślin.

Finansowanie prac doświadczalnych związanych z realizacją osiągnięcia naukowego

Powstałe publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego zawierają wyniki badań, których realizacja objęta była finansowaniem przede wszystkim dwuletniego grantu badawczego własnego nr N N303 338835 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (**publikacje 5 i 6**), a także innymi projektami badawczymi (projekt Komitetu Badań Naukowych nr 6 PO4C 033 19, projekt Wydziału Biologii UAM nr PBWB 212/2000). **Publikacja 5** została również częściowo dofinansowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki typu OPUS2 nr UMO-2011/03/B/NZ9/05237). We wszystkich wymienionych projektach badawczych byłem ich kierownikiem lub głównym wykonawcą. Dane przedstawione w **publikacjach 3 i 4** były objęte również finansowaniem ze strony M. Curie Host Fellowship for the Transfer of Knowledge (nr MTKD-CT-2004-517068) 6 Programu Ramowego Unii Europejskiej mojego stażu podoktorskiego w Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS-ULP, Strasbourg, Francja) w 2006 r. Dane zebrane w **publikacjach 3 i 4** były związane z moim stażem podoktorskim w tym samym ośrodku badawczym w 2004 i 2006 r. finansowanym przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, natomiast **publikacja 6** była finansowana dodatkowo w ramach KNOW Poznań RNA Centre, 01/KNOW2/2014.

Podsumowanie i dalsze perspektywy badawcze

Podsumowując uważam, że najważniejszymi wynikami przeprowadzonych analiz są:

- ▶ poznanie obrazu biogenezy i oddziaływań kompleksów i superkompleksów OXPHOS w warunkach stresowych i oszacowanie stopnia ich destabilizacji;
- ▶ ustalenie zmian w akumulacji kilkunastu białek mitochondrialnych uczestniczących w odpowiedzi na stres temperaturowy i po powrocie roślin do warunków kontrolnych;
- ▶ przeprowadzenie analiz funkcjonalnych pozwalających na rozpoznanie fizjologicznego i metabolicznego „stanu” mitochondriów w zależności od analizowanych warunków stresowych i po powrocie do warunków kontrolnych;

► ustalenie stopnia koordynacji zmian w akumulacji białek i kodujących je transkryptów w warunkach stresowych i po powrocie do warunków kontrolnych;

► pełniejsze scharakteryzowanie białek podobnych do dehydryn w mitochondriach w mitochondriach łubinu żółtego, *A. thaliana* i kalafiora nie tylko podczas stresu chłodu, ale również ciepła, a przede wszystkim po powrocie do warunków kontrolnych; zbadanie lokalizacji submitochondrialnej tych białek;

► przeanalizowanie proteomu mitochondrialnego kalafiora;

► pełniejsze scharakteryzowanie ekspresji niektórych genów kodujących białka mitochondrialne (np. mitochondrialnych genów *nad*) na poziomie RNA (w aspekcie gatunkowym i tkankowym).

W najbliższej przyszłości zamierzam położyć nacisk na oszacowanie dynamicznych zmian w obrazie wybranych modyfikacji potranslacyjnych białek mitochondrialnych w biogenezie mitochondriów pod wpływem stresu temperaturowego. Ponadto podjęte zostaną prace doświadczalne, których celem będzie sprecyzowanie udziału małych, niekodujących RNA oraz zmian w poziomie białek wiążących się z RNA we wspomnianym procesie. Równolegle toczą się prace badawcze mające na celu ustalenie zmian w biogenezie mitochondriów kalafiora, w tym znaczenia poznanych uprzednio białek podobnych do dehydryn w warunkach niedoboru wody. Podjęta zostanie m.in. próba identyfikacji mitochondrialnych białek podobnych do dehydryn ulegających indukcji w stresie suszy z trzech odmian kalafiora poprzez sekwencjonowanie metodą Edmana i klonowanie kodujących je cDNA. Prace te objęte są finansowaniem w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki typu OPUS (nr UMO-2011/03/B/NZ9/05237).

Literatura dodatkowa do p. 4:

- Amme S, Matros A, Schlesier B, Mock H-P (2006) Proteome analysis of cold stress response in *A. thaliana* using DIGE-technology. *J. Exp. Bot.*, 57, 1537-1546
- Ayele M, Haas BJ, Kumar N, Wu H, Xiao Y, Van Aken S, Utterback TR, Wortman JR, White OR, Town CD (2005) Whole genome shotgun sequencing of *Brassica oleracea* and its application to gene discovery and annotation in *Arabidopsis*. *Genome Res.*, 15, 487-495
- Back JW, Sanz MA, De Jong L, De Koning LJ, Nijtmans LGJ, De Koster CG, Grivell LA, Van Der Spek H, Muijsers AO (2002) A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry. *Protein Sci.*, 11, 2471-2478
- Bae EK, Lee H, Lee JS, Noh EW (2009) Differential expression of a poplar SK2-type dehydrin gene in response to various stresses. *BMB Rep.*, 42, 439-443
- Bardel J, Louwagie M, Jaquinod M, Jourdain A, Luche S, Rabilloud T, Macherel D, Garin J, Bourguignon J (2002) A survey of the plant mitochondrial proteome in relation to development. *Proteomics*, 2, 880-898
- Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 67, 107-124
- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Downs CA, Voinikov VK (2000) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cold-treated plants. *J Plant Physiol.*, 156, 797-800

- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, Voinikov VK (2002) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol.*, 2, 5
- Braun H-P, Binder S, Brennicke A, Eubel H, Fernie AR, Finkemeier I, Klodmann J, König A-C, Kühn K, Meyer E, Obata T, Schwarzländer M, Takenaka M, Zehrmann A (2014) The life of plant mitochondrial complex I. *Mitochondrion*, 19, 295–313
- Campbell SA, Close TJ (1997) Dehydrins: genes, proteins, and association with the phenotypic traits. *New Phytol.*, 137, 61–74
- Clifton R, Lister R, Parker KL, Sappl PG, Elhafez D, Millar AH, Day DA, Whelan J (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 58, 193–212
- Close TJ (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.*, 100, 291–296
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10, 623–638
- Eubel H, Heinemeyer J, Braun H-P (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol.*, 134, 1450–1459
- Giegé P, Sweetlove LJ, Cognat V, Leaver CJ (2005) Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 1497–1512
- Grewe F, Edger PP, Keren I, Sultan L, Pires JC, Ostersetzer-Biran O, Mower JP (2014) Comparative analysis of 11 Brassicales mitochondrial genomes and the mitochondrial transcriptome of *Brassica oleracea*. *Mitochondrion*, 19, 135–143
- Heazlewood JL, Howell KA, Whelan J, Millar AH (2003) Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol.*, 132, 230–242
- Heinemeyer J, Scheibe B, Schmitz UK, Braun H-P (2009) Blue native DIGE as a tool for comparative analyses of protein complexes. *J. Proteomics*, 72, 539–544
- Heyen BJ, Alskeikh MK, Smith EA, Torvik CF, Seals DF, Randall SK (2002) The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.*, 130, 675–687
- Hochholdinger F, Guo L, Schnable PS (2004) Cytoplasmic regulation of the accumulation of nuclear-encoded proteins in the mitochondrial proteome of maize. *Plant J.*, 37, 199–208
- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberte S, Sarhan F (1995) Immunolocalisation of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J.*, 8, 583–593
- Howell KA, Cheng K, Murcha MW, Jenkin LE, Millar AH, Whelan J (2007) Oxygen initiation of respiration and mitochondrial biogenesis in rice. *J. Biol. Chem.*, 282, 15619–15631
- Hundertmark M, Hinch DK (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 118
- Jacoby RP, Millar AH, Taylor NL (2013) Investigating the role of respiration in plant salinity tolerance by analyzing mitochondrial proteomes from wheat and a salinity-tolerant amphiploid (wheat × *Lophopyrum elongatum*). *J. Proteome Res.*, 2, 4807–4829
- Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, Hausman J-F, Renaut, J (2008) Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics*, 8, 2514–2530
- Kjellsen TD, Shiryayeva L, Schröder WP, Strimbeck GR (2010) Proteomics of extreme freezing tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *J. Proteomics*, 73, 965–975
- Klodmann J, Senkler M, Rode C, Braun H-P (2011) Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. *Plant Physiol.*, 157, 587–598
- Kruff V, Eubel H, Jansch L, Werhahn W, Braun H-P (2001) Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 127, 1694–1710
- Kubo T, Nishizawa S, Sugawara A, Itchoda N, Estiati N, Mikami T (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA^{Cys} (GCA). *Nucleic Acids Res.*, 28, 2571–2576
- Laik A (1977) Kinetics of photosynthesis and photorespiration in C3-plants. Nauka, Moskwa
- Lu B, Hanson MR (1996) Fully edited and partially edited *nad9* transcripts differ in size and both are associated with polysomes in potato mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, 24, 1369–1374
- Meyer EH, Giegé P, Gelhaye E, Rayapuram N, Ahuja U, Thöny-Meyer L, Grienemberger J-M, Bonnard G (2005) AtCCMH, an essential component of the c-type cytochrome maturation pathway in *Arabidopsis* mitochondria, interacts with apocytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 16113–16118
- Millar AH, Eubel H, Jansch L, Kruff V, Heazlewood JL, Braun H-P (2004) Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Mol. Biol.*, 56, 77–90
- Millar AH, Sweetlove LJ, Giegé P, Leaver CJ (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.*, 127, 1711–1727
- Nakazono M, Ito Y, Tsutsumi N, Hirai A (1996) The gene for a subunit of an ABC-type heme transporter is transcribed together with the gene for subunit 6 of NADH dehydrogenase in rice mitochondria. *Curr. Genet.*, 29, 412–416
- Neumann D, Scharf KD, Nover L (1984) Heat shock induced changes of plant cell ultrastructure and autoradiographic localization of heat shock proteins. *Eur. J. Cell Biol.*, 34, 254–264

- Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, Kubo N, Akiduki G, Nakazono M, Hirai A, Kadowaki K (2002) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet. Genom.*, 268, 434–445
- Peters K, Niessen M, Peterhänsel C, Späth B, Hölzle A, Binder S, Marchfelder A, Braun H-P (2012) Complex I-complex II ratio strongly differs in various organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 79, 273–284
- Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schagger H. (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.*, 278, 52873–52880
- Qin G, Meng X, Wang Q, Tian S (2009) Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: a redox proteomics analysis. *J. Proteome Res.*, 8, 2449–2462
- Rasmusson AG, Fernie AR, van Dongen JT (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol. Plant.*, 137, 371–382
- Rode C, Senkler M, Klodmann J, Winkelmann T, Braun H-P (2011) GelMap-a novel software tool for building and presenting proteome reference maps. *J. Proteomics*, 74, 2214–2219
- Rorat T, Szabala BM, Grygorowicz WJ, Wojtowicz B, Yin Z, Rey P (2006) Expression of SK₃-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta*, 224, 205–221
- Tan Y-F, Millar AH, Taylor NL (2012) Components of mitochondrial oxidative phosphorylation vary in abundance following exposure to cold and chemical stresses. *J. Proteome Res.*, 11, 3860–3879
- Taylor NL, Heazlewood JL, Day DA, Millar AH (2005) Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 1122–1133
- Taylor NL, Heazlewood JL, Millar AH (2011) The *Arabidopsis thaliana* 2-D gel mitochondrial proteome: Refining the value of reference maps for assessing protein abundance, contaminants and post-translational modifications. *Proteomics*, 11, 1720–1733
- Taylor NL, Tan YF, Jacoby RP, Millar AH (2009) Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *J. Proteomics*, 72, 367–378
- Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E, Whelan J (2009) Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant.*, 2, 1310–1324
- Vanlerberghe GC, Cvetkovska M, Wang J (2009) Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol. Plant.*, 137, 392–406
- Vella NGF, Joss TV, Roberts TH (2012) Chilling-induced ultrastructural changes to mesophyll cells of *Arabidopsis* grown under short days are almost completely reversible by plant re-warming. *Protoplasma*, 249, 1137–1149
- Webster DL, Watson K (1993) Ultrastructural changes in yeast following heat shock and recovery. *Yeast*, 9, 1165–1175
- Yin G, Sun H, Xin X, Qin G, Liang Z, Jing X (2009) Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. *Plant Cell Physiol.*, 50, 1305–1318

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:

Odnosniki literaturowe zamieszczone poniżej zebrano w podrozdziale „Literatura do p. 5”. Odnosniki dotyczące publikacji wchodzących w skład dorobku habilitanta zostały zaznaczone pogrubioną czcionką.

5.1. Osiągnięcia naukowo- badawcze przed przyznaniem stopnia doktora

Mój dorobek naukowy przed przyznaniem stopnia doktora nauk biologicznych obejmuje 7 prac, w tym 1 publikację eksperymentalną (**Rurek i wsp., 1998**), 2 prace przeglądowe (**Rurek, 1994a; Rurek, 2000**), 1 rozdział w pracy monograficznej (**Rurek i Augustyniak, 1998**), 2 prace doświadczalne w materiałach pokonferencyjnych (**Pietkiewicz i wsp., 1998; Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 1998**), a także 1 krótkie opracowanie metodyczne w czasopiśmie *Biotechnologia* (**Rurek, 1994b**).

Podczas studiów na Wydziale Biologii UAM opublikowałem pracę przeglądową poświęconą nowo odkrytym przypadkom redagowania chloroplastowych i mitochondrialnych genów tRNA na podstawie aktualnych danych (**Rurek, 1994a**). W tym samym czasie w

czasopiśmie *Biotechnologia* ukazała się moja krótka notatka metodyczna, przybliżająca Czytelnikowi zmodyfikowaną procedurę transgenezy *A. thaliana* poprzez infiltrację nasion i roślin z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens* (**Rurek, 1994b**).

W trakcie wykonywania doświadczeń związanych z przygotowywaną rozprawą doktorską opublikowałem pracę poświęconą ustaleniu sekwencji niektórych mitochondrialnych genów łubinu oraz poziomu ich ekspresji (**Rurek i wsp., 1998**). W ramach wspomnianej publikacji określiłem sekwencje operonu *nad3-rps12* czterech gatunków łubinu: łubinu żółtego, białego, andyjskiego oraz wąskolistnego. Zastosowanie zarówno hybrydyzacji typu northern, jak również RT-PCR pozwoliło po raz pierwszy na wykazanie, że zarówno sekwencja genów *nad3* i *rps12*, jak i obraz ich transkrypcji są silnie zachowawcze w rodzinie motylkowatych (Fabaceae).

W omawianym okresie byłem również autorem prac przeglądowych oraz opracowań monograficznych poświęconych szeroko pojętej biologii molekularnej mitochondriów. Wspólnie z prof. dr hab. Haliną Augustyniak napisałem jeden rozdział w monografii zatytułowanej *Biologia molekularna mitochondriów* (**Rurek i Augustyniak, 1998**). Monografia stanowi zbiór materiałów, które mogą być wykorzystane przez studentów biologii i biotechnologii, częściowo opartych na referatach wygłoszonych w ramach Otwartych Seminariów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w 1996 r. Redaktorami monografii byli pracownicy Zakładu Biologii Molekularnej Roślin. Wymieniony rozdział monografii przytacza aktualne dane o budowie roślinnego kompleksu I, budowie i ekspresji genów kodujących jego podjednostki oraz danych o mutacjach i rearanżacjach genów *nad*, i odpowiadających im efektom fenotypowym. Drugie z opracowań to obszerna praca przeglądowa (**Rurek, 2000**) będąca bardzo dokładnym zestawieniem danych doświadczalnych (152 pozycje literaturowe) dotyczących charakterystyki mitochondrialnych genów kodujących podjednostki kompleksu I roślin wyższych, grzybów, oraz zwierząt, a także procesu redagowania ich transkryptów. Dane dotyczące materiału roślinnego zostały w niej szczególnie wyeksponowane.

W tym samym okresie nawiązałem współpracę badawczą z pracownikami Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w szczególności z dr Renatą Galek i prof. dr hab. Ewą Sawicką-Sienkiewicz. Zaowocowała ona w tym czasie opublikowaniem 2 materiałów pokonferencyjnych. Pierwsza publikacja (**Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 1998**) związana była z *3rd European Conference on Grain Legumes*, która miała miejsce w Valladolid (Hiszpania) w 1998 r. W tym czasie poszukiwaliśmy optymalnych markerów genetycznych w celu różnicowania mieszańców

międzygatunkowych łubinu andyjskiego. Biorąc pod uwagę skład nasion i stosunkowo niską zawartość alkaloidów, stanowi on jeden z najważniejszych uprawianych gatunków łubinu. Z uwagi na trudności w przystosowaniu tego gatunku do warunków rolnictwa europejskiego istnieje konieczność selekcji nowych genotypów łubinu andyjskiego. Postanowiliśmy wykorzystać rodzinę genową kodującą leghemoglobiny (geny *LGI* i *LGII*), a także sekwencję mitochondrialnego plazmidu *K2* łubinu białego, uprzednio sklonowanego przez pracowników Zakładu Biologii Molekularnej Roślin celem selekcji analizowanych form rodzicielskich oraz odpowiednich form mieszańcowych. Obecność markerów *LG* (w przeciwieństwie do *K2*) była bardzo różna w formach rodzicielskich, natomiast formy mieszańcowe wykazały preferencyjną obecność markera *LGII*. Zastosowanie sekwencji plazmidu *K2* do genotypowania linii łubinu andyjskiego pozwoliło na prześledzenie efektów dziedziczenia matczynego tego markera. Z pozytywnym wynikiem testowałem ponadto przydatność 4 starterów DAF w genotypowaniu wspomnianego materiału roślinnego.

Druga nasza publikacja (**Pietkiewicz i wsp., 1998**) z tego okresu weszła w skład materiałów Ogólnopolskiego Seminarium Naukowego „Łubin – Białko – Ekologia”, które miało miejsce w Ośrodku Doradztwa Rolniczego w Przysieku w 1998 r. W tym wypadku pragnęliśmy w szerszym zakresie wykorzystać technikę DAF (w tym użyte uprzednio startery) w celu genotypowania różnych hodowlanych i kolekcyjnych linii łubinu białego, a także różnorodnych linii łubinu andyjskiego. Jeden ze starterów okazał się szczególnie dobry dla rozróżnienia 3 linii *L. mutabilis*, a inne startery DAF doskonale rozróżniały analizowane linie łubinu białego. Współpraca z Katedrą Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu była przez mnie kontynuowana również po uzyskaniu stopnia doktora (patrz p. 5.2).

5.2. Osiągnięcia naukowo- badawcze po przyznaniu stopnia doktora

Mój dorobek naukowy po przyznaniu stopnia doktora nauk biologicznych (niezwiązany z publikacjami do przewodu habilitacyjnego) obejmuje 13 prac, w tym 10 publikacji eksperymentalnych (**Olczak i wsp., 2001; Rurek i wsp., 2001a; Rurek i wsp., 2001b; Stefaniak i wsp., 2005; Raczyńska i wsp., 2006; Augustyniak-Bartosik i wsp., 2008; Uyttewaal i wsp., 2008; Galek i wsp., 2011; Augustyniak-Bartosik i wsp., 2013; Rurek i wsp., 2014**), 1 pracę przeglądową (**Augustyniak i wsp., 2002**) oraz 2 opracowania w materiałach pokonferencyjnych (**Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 2002; Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 2005**).

Grupę prac związanych bezpośrednio z biologią molekularną mitochondriów roślinnych stanowią 3 publikacje doświadczalne (**Rurek i wsp., 2001b**; **Raczyńska i wsp., 2006**; **Uyttewaal i wsp., 2008**). W ramach pracy **Rurek i wsp. (2001b)** współpracowałem z pracownikami Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. W przypadku genu *nad3* wykorzystałem znany w analizach molekularnych układ doświadczalny cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS), jakim jest marchew (*Daucus carota*). Wyniki tych prac wskazywały po raz pierwszy na występowanie różnic w obrazie intensywnego redagowania mitochondrialnych transkryptów *nad3* linii męskosterylnej (CMS typu petaloidowego) oraz płodnej linii dopełniającej. Wybór marchwi jako materiału badawczego w omawianych doświadczeniach wiązał się z uprzednimi analizami *Hanson i wsp. (1999)*, którzy nie znaleźli korelacji pomiędzy intensywnością procesów redagowania transkryptów mitochondrialnych, a pojawieniem się męskiej sterylności lub przywróceniem płodności. Wykazałem, że trzy substytucje nukleotydowe (występujące również na poziomie RNA) różnicowały gen *nad3* dwóch analizowanych linii marchwi, natomiast trzy miejsca redagowania (typu C-U) występowały tylko w linii płodnej, chociaż w obydwu liniach nie doprowadziło to do substytucji reszt aminokwasowych. Jednakże w transkryptach *nad3* linii płodnej występowało również częściowe redagowanie w czterech kodonach, w trzech wypadkach mogące prowadzić do heterogenności na poziomie białka. Dodatkowo ustaliłem, że geny *nad3* i *rps12* ulegają kotranskrypcji w obu analizowanych liniach marchwi. Generalnie, wykazałem, że mRNA *nad3* marchwi charakteryzuje się zmiennym obrazem redagowania w zależności od stopnia płodności linii i że w mitochondriach tego gatunku częściowo redagowane transkrypty genu *nad3* są łatwo wykrywalne.

Do najważniejszych prac mojego dorobku z tego okresu zaliczam dwie kolejne publikacje bezpośrednio związane ze stażem podoktorskim z 2004 r. odbytym w Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS-Université L. Pasteur) w Strasbourgu (Francja). Wcześniejsze kontakty z tym ośrodkiem badawczym zostały nawiązane już w latach 2000-2001. Współpracę kontynuowałem również w 2006 r. w ramach M. Curie Host Fellowship for the Transfer of Knowledge (nr MTKD-CT-2004-517068) 6 Programu Ramowego Unii Europejskiej przyznanemu Instytutowi Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM. Podczas obydwu staży naukowych brałem udział między innymi w charakterystyce mitochondrialnych kompleksów *A. thaliana* zawierających białka Ccm/CCM, uczestniczące w dojrzewaniu cytochromów typu c. W przeciwieństwie do mitochondriów większości eukariotów, mitochondria roślinne wykorzystują system I dojrzewania cytochromów typu c przypominający system znaleziony w bakteriiach gramujemnych, w skład którego wchodzi kilkanaście białek Ccm/CCM. Zidentyfikowano osiem genów jądrowych (CCM) i mitochondrialnych (*ccm*) *A. thaliana* kodujących te białka. W trakcie drugiego pobytu, w 2006

r., swoje analizy poszerzyłem również o analizę oddziaływań, w które zaangażowane są wspomniane białka za pomocą sieciowania chemicznego. Uczestniczyłem w sprawdzeniu lokalizacji jednego z białek Ccm w mitochondriach *A. thaliana* (**Raczyńska i wsp., 2006**) oraz scharakteryzowaniu nowego przedstawiciela uprzednio nieznanej podklasy białek PPR (**Uyttewaal i wsp., 2008**). We wspomnianych pracach wykorzystałem preparaty mitochondriów izolowanych z 6- dniowych etiolowanych kultur komórkowych *A. thaliana*. W tym wypadku użyłem zatem zasadniczo odmiennego układu doświadczalnego w stosunku do materiału stosowanego w większości analiz wchodzących w zakres mojego osiągnięcia naukowego (patrz p. 4).

Publikacja **Raczyńska i wsp. (2006)** powstała w wyniku wcześniejszego okresu współpracy z IBMP, rozpoczętej w 2004 r. Współpraca ta objęła dwie grupy badawcze tego ośrodka, kierowane przez dr G  r  ldine Bonnard i dr José Gualberto. Należy podkreślić, że w powstaniu tej publikacji uczestniczyli również doktoranci i pracownicy Zak  ladu Biologii Molekularnej i Komórkowej UAM (wcześniej: Zak  ladu Biologii Molekularnej Roślin). Wspomniana publikacja dotyczy   charakterystyki ekspresji niektórych mitochondrialnych genów *ccm* na poziomie RNA i białka. Białko CcmC zlokalizowane jest w wewnętrznej błony mitochondrialnej; zawiera przynajmniej 33% reszt hydrofobowych i sze   helis transbłonowych (*Bonnard i Grienemberger, 1995*). Uczestniczy ono najprawdopodobniej w transporcie hemu w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Okazało się, że dojrzałe transkrypty *ccm* mogą być skr  cone na 3' końcu i nie posiada   kodonu stop, jak w wypadku mRNA *ccmC* rzepaku (*B. napus; Handa, 2003*). Jednakże brak było dowodów wskazujących na to, że tego typu mRNA mogą syntetyzowa   funkcjonalne białka mitochondrialne.

Biorąc to pod uwagę, celem naszych bada  n było sprawdzenie po raz pierwszy, czy skr  cone na końcu 3' transkrypty mitochondrialne ulegają translacji. Okazało się, że mRNA kodujące mitochondrialne białko CcmC pomimo skr  cenia końca 3' są w pełni funkcjonalne i że w mitochondriach *A. thaliana* ulega akumulacji prawid  lowa izoforma CcmC (**Raczyńska i wsp., 2006**). Do mapowania transkryptów u  ży  my techniki cRT-PCR (ang. *circular RT-PCR*). Sekwencjonuj  c klony cDNA zawierające otwartą ramk   odczytu *ccmC* wykluczyl  my udział redagowania lub obecności dodatkowego egzonu w powstawaniu alternatywnych kodonów stop. Za pomocą RT-PCR nie wykazal  my tkankowo-specyficznych różnic w obrazie dojrzewania transkryptów *ccmC* *A. thaliana*. Wykorzystując ultrawirowanie kompleksów zawierających transkrypty mitochondrialne w gradiencie sacharozowym stwierdzil  my ponadto, że mRNA *ccmC* oddziałuje z frakcj   polisomów o wysokiej masie cząsteczkowej. Biorąc pod uwagę fakt, że tak uzyskany wynik nie może być bezpośrednim dowodem na aktywny udział wymienionych transkryptów w translacji mitochondrialnej, zdecydowałem się podj  c pr  b   immunologicznego wykrycia białka CcmC metod   Western

blot w mitochondriach *A. thaliana* oraz sprawdzić jego lokalizację submitochondrialną. Podczas immunoidentyfikacji CcmC wykorzystałem wcześniej oczyszczone przeze mnie przeciwciała skierowane przeciwko peptydowi odpowiadającemu resztom aminokwasowym 175-189 białka *A. thaliana* (rejon sekwencji zawarty pomiędzy dwoma domenami transbłonowymi CcmC). Wykryłem polipeptyd 24 kDa we frakcji zawierającej całkowite białka mitochondrialne oraz we frakcji błonowej. Jego masa cząsteczkowa odpowiadała teoretycznej wielkości białka syntetyzowanego z wykorzystaniem transkryptów *ccmC* nie zawierających kodonu stop.

Kolejna publikacja (**Uyttewaal i wsp., 2008**) powstała w wyniku mojej współpracy z dr Philippe Giegé z IBMP-CNRS oraz z grupą badawczą dr Hakima Mireau z Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) w Wersalu (Francja) w latach 2004-2006. Białka PPR (ang. *pentatricopeptide repeat*), określane tak w związku z występującym w nich uporządkowanym tandemowo kluczowym motywem sekwencyjnym złożonym z 35 reszt aminokwasowych, zaangażowane są w regulację kluczowych etapów ekspresji genów organellowych (*Schmitz-Linneweber i Small, 2008*). Występują one pospolicie u eukariotów, szczególnie u roślin wyższych. Zgromadzono wiele dowodów na ich udział nie tylko w dojrzewaniu i stabilizacji RNA w mitochondriach, ale również w redagowaniu transkryptów mitochondrialnych, jako czynniki białkowe wpływające na jego specyficzność (*Giegé i Brennicke, 2001; Holec i wsp., 2006*). Uważa się, że białka PPR wchodzą w skład wielopodjednostkowego kompleksu białkowego - edytosomu, odpowiedzialnego za ten proces. Białka PPR są również regulatorami translacji zachodzącej w plastydach i mitochondriach, a w wyjątkowych wypadkach uczestniczą również w biogenezie rybosomów mitochondrialnych (*Choquet i Wollman, 2002; Pusnik i wsp., 2007*). Należy jednakże podkreślić, że własności biochemiczne i sposób działania niektórych białek PPR nie został do końca poznany.

W pracach doświadczalnych związanych z publikacją **Uyttewaal i wsp. (2008)** brałem udział w scharakteryzowaniu nowego przedstawiciela rodziny białek PPR, białka PPR336 (At1g61870). Zbudowane jest ono z 408 reszt aminokwasowych, natomiast średnia liczba reszt aminokwasowych dla całej rodziny białek PPR wynosi 673. Zawiera mniej powtarzających się tandemowo powtórzonych motywów sekwencji; wydaje się zatem, że należy do subklasy obejmującej szczególnie małe białka PPR. Wykazałem, że PPR336 wchodzi w skład kompleksu o masie cząsteczkowej 800 kDa w mitochondriach *A. thaliana*. Warto podkreślić, że wymieniony kompleks stanowił jeden z pierwszych poznanych kompleksów PPR. W ostatnich latach grupa badawcza prof. Hansa-Petera Brauna opisała kilka mitochondrialnych kompleksów białkowych o niewielkich masach cząsteczkowych zawierających inne białka PPR, ale nie zostały one bliżej scharakteryzowane (*Klodmann i*

wsp., 2011). Dostępne dane z analiz mikromacierzowych wskazywały, że gen kodujący PPR336 ulega ekspresji na wysokim poziomie we wszystkich organach *A. thaliana*, szczególnie zaś w korzeniach i pąkach kwiatowych. Okazało się, że PPR336 należy do zupełnie nowej, nieznanej uprzednio podrodziny białek PPR klasy P. PPR336 ulega importowi wyłącznie do wewnętrznej błony mitochondrialnej (jest białkiem peryferyjnym), gdzie stanowi składnik kompleksu wrażliwego na działanie RNAz. Analiza northwestern oraz ultrawierowanie frakcji polisomalnej w gradiencie sacharozowym wykazały, że PPR336 jest białkiem oddziałującym z RNA i dodatkowo z rybosomami mitochondrialnymi. W naszych wspólnych badaniach użyliśmy również mutanty insercyjne *A. thaliana* (*Ppr336/Ppr336-like*), w których niskocząsteczkowa frakcja polisomów mitochondrialnych oddziałujących z transkryptami *Ppr336* ulegała akumulacji na wyższym poziomie, niż w mitochondriach roślin typu dzikiego. Przeprowadzone analizy sugerowały zatem, że PPR336 uczestniczy najprawdopodobniej w mitochondrialnej translacji.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych próbą szerszej popularyzacji wiedzy o transkrypcji genów mitochondrialnych była praca przeglądowa, której jestem współautorem (**Augustyniak i wsp., 2002**). Praca została opublikowana w języku polskim w czasopiśmie *Biotechnologia*. Należy zaznaczyć, że wolumen czasopisma, w którym znajduje się wymieniona publikacja, został poświęcony pamięci prof. dr hab. Jerzego Pawełkiewicza i zawiera prace doświadczalne i przeglądowe napisane przez Jego uczniów i wychowanków, do których zaliczała się między innymi prof. dr hab. Halina Augustyniak. Praca charakteryzuje ogólny obraz ekspresji roślinnych genów mitochondrialnych, opisuje budowę regionu promotorowego tych genów, podaje zidentyfikowane miejsca startu transkrypcji wybranych genów mitochondrialnych oraz aktualne informacje o mitochondrialnych czynnikach transkrypcyjnych i innych białkach biorących udział w mitochondrialnej transkrypcji.

Odrębny nurt badawczy wynikał z kontynuacji mojej współpracy z pracownikami Katedry Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, a szczególnie z dr Renatą Galek i prof. dr hab. Ewą Sawicką-Sienkiewicz. Współpraca ta została zapoczątkowana w okresie przygotowywania mojej rozprawy doktorskiej (patrz p. 5.1).

Początkowo nasza współpraca koncentrowała się na poszukiwaniu optymalnych markerów organellowych w celu rozróżnienia przedstawicieli rodzaju łubin (*Lupinus*) Starego i przede wszystkim Nowego Świata (grupa *mutabilis*). W omawianym okresie prace przeprowadzane w Katedrze Nasiennictwa i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego we

Wrocławiu koncentrowały się na przystosowaniu łubinu andyjskiego do warunków uprawy polowej w Polsce poprzez selekcję nowych linii mutantów, selekcję potomstwa krzyżówek z łubinami z sekcji *Albus*, a także identyfikację wczesnodojrzewających, wysokopennych genotypów. Dzięki naszej uprzedniej, wstępnej analizie mieszańców międzygatunkowych łubinu (**Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 1998**; patrz p. 5.1), możliwa stała się dokładniejsza analiza polimorfizmów organellowego DNA, w tym polimorfizmów mitochondrialnych. Podjąłem zatem próby genotypowania omawianego materiału roślinnego z zastosowaniem PCR wykorzystując sekwencje *nad* (rejony kodujące oraz międzygenowe; **Rurek i wsp., 2001a**) oraz sekwencje rodziny genów kodujących leghemoglobiny (LG; **Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 2005**). W tym samym celu zastosowałem technikę RFLP wykorzystując szereg organellowych sond hybrydizacyjnych o dużej specyficzności (**Olczak i wsp., 2001**).

W publikacji **Olczak i wsp. (2001)** przeprowadziłem porównawcze analizy RFLP celem oszacowania zmienności chloroplastowego i mitochondrialnego DNA pomiędzy różnymi genotypami *L. mutabilis* (siedem populacji oraz pięć linii mutantów), a czterema gatunkami łubinów z sekcji *Albus*. W analizach wykorzystałem całkowity DNA hydrolizowany enzymem restrykcyjnym *EcoRI*. Większość użytych sond organellowych rozróżniała analizowany materiał roślinny. Najwyższym stopniem zróżnicowania polimorfizmów mitochondrialnych charakteryzowały się populacje łubinu andyjskiego. W przeciwieństwie do tego, gatunki sekcji *Albus* charakteryzowały się wysokim stopniem monomorfizmu. Ponadto sondy mitochondrialne w lepszym stopniu genotypowały badany materiał niż sondy chloroplastowe, pozwalając na identyfikację zmienności międzygatunkowych i wewnątrzgatunkowych. Wobec tego zaproponowałem wykorzystanie niektórych z tych sekwencji jako nowych markerów, szczególnie w celu identyfikacji zmienności pomiędzy populacjami łubinu andyjskiego.

W badaniach opisanych w publikacji **Rurek i wsp. (2001a)** zaproponowałem użycie PCR do amplifikacji regionów genomu mitochondrialnego różnych gatunków łubinu zawierających wybrane geny *nad* (*nad6* i *nad9*) połączonego z hydrolizą restrykcyjną *RsaI* i reamplifikacją PCR z wykorzystaniem wewnętrznych starterów genowospecyficznych lub starterów RAPD. Takie podejście pozwoliło na wykrycie znacznych różnic międzygatunkowych. Wynik różnicowania niektórych gatunków łubinu przy użyciu starterów RAPD zależał od temperatury przyłączania startera.

Z kolei w pracy **Sawicka-Sienkiewicz i wsp. (2005)** przeprowadziłem genotypowanie mieszańców międzygatunkowych *L. mutabilis* i *L. albus* sensu lato oraz ich form rodzicielskich, wykorzystując rodzinę genową kodującą leghemoglobiny (geny *LGI* i *LGI*). Otrzymanie takich form mieszańcowych jest trudne i pozwoli w przyszłości na wyprowadzenie genotypów o dogodnych agronomicznie cechach użytkowych. Okazało się,

że marker *LGI* był nieobecny w *L. albus*, lecz obecny był w liniach *L. mutabilis* i 3 mieszańcach międzygatunkowych; ogólnie metoda PCR-DAF umożliwiła zatem stosunkowo optymalną detekcję zróżnicowania genetycznego *L. mutabilis*.

W tym samym okresie zająłem się również poszukiwaniem nowych układów markerowych w celu selekcji lokalnych tetraploidalnych kultywarów i linii hodowlanych ziemniaka opornych na atak mątwika ziemniaczanego (*Globodera rostochiensis*). Wiadomo, że co najmniej cztery geny oporności (*H1*, *GroVI*, *Grol* i *Gpa2*) ziemniaka odpowiadają za prawie całkowitą odporność na jeden lub kilka patotypów nicienia, podczas gdy inne geny są związane jedynie z częściową odpornością (Bakker i wsp., 2004). Od 2006 r. odporność na *G. rostochiensis* jest cechą prawnie obowiązującą również w selekcji nowych genotypów ziemniaka w Polsce. Jest to utrudnione przez fakt, że większość uprzednich prac przeprowadzano z wykorzystaniem diploidalnych linii i odmian. Przeniesienie markera do genotypów tetraploidalnych lub opracowanie nowych układów markerowych dla tego materiału jest zawsze dużym wyzwaniem. Procedura ta jest jednak niezbędna, nie tylko z uwagi na obowiązujące normy prawne, ale również dlatego, że dotychczasowa metodyka określania odporności na atak nicieni opierająca się na testach laboratoryjnych i polowych była bardzo czasochłonna.

W pierwszych dwóch opublikowanych pracach (Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 2002; Galek i wsp., 2011) przetestowałem zastosowanie dwóch układów markerowych sprzężonych z genem *H1* w celu selekcji tetraploidalnych odmian i linii (genotypów) opornych na atak mątwika ziemniaczanego. We wszystkich analizach tego typu brałem pod uwagę nieprzebadane uprzednio genotypy. Wstępne wyniki naszych analiz zostały zamieszczone w opracowaniu pokonferencyjnym (Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 2002). Początkowo zastosowałem metodę RAPD z wykorzystaniem startera znanego z pracy Ballvora i wsp. (1995). Jeden z produktów RAPD o wielkości 700 pz, pochodzący z namnożenia fragmentu sekwencji genomowej ziemniaka zawartej na chromosomie VII pozwolił na określenie stopnia heterozygotyczności form rodzicielskich użytych do wyprowadzenia form mieszańcowych. Z kolei, dodatkowy marker RAPD (2000 pz) okazał się ściśle związany z opornością analizowanych genotypów na mątwika. Dalsze prace związane z bliższą charakterystyką markera RAPD 2000 pz opublikowano w publikacji Rurek i wsp. (2014), której wyniki zostaną przedstawione poniżej. Ponieważ wykazano, że w rodzinie Solanaceae, do której należy ziemniak, geny związane z opornością na mątwika ziemniaczanego są sprzężone z niektórymi genami *Aps* kodującymi izoformy fosfatazy kwaśnej, wydawało się celowym sprawdzenie obecności określonych izoform tego enzymu w analizowanych tetraploidalnych genotypach za pomocą testów typu *in-gel assay* (Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 2002). Otrzymane wyniki (zwiększona ilość szybciej migrujących

prążków izoform fosfatazy kwaśnej w genotypach opornych na mątwika ziemniaczanego) świadczą o wysokiej heterozygotyczności form opornych.

Celem badań zamieszczonych w publikacji **Galek i wsp. (2011)** było sprawdzenie użyteczności dwóch markerów opartych na PCR sprzężonych z genem *H1* (marker 140 i 760 pz) w celu szybkiego rozróżnienia 91 polskich, uprzednio nieanalizowanych, genotypów ziemniaka pod względem cechy oporności na mątwika ziemniaczanego. Stwierdziłem, że obydwa markery były obecne w 88-100% opornych kultywarów i linii. Marker 760 pz wykryłem we wszystkich genotypach opornych na atak nicienia. Marker 140 pz był natomiast wykrywalny u 94% opornych kultywarów. Większość genotypów podatnych na atak mątwika nie wykazywała obecności markera 140 pz, co dowodzi, że jest on najlepszym układem markerowym do selekcji genotypów ziemniaka opornych na patotyp Ro1 tego nicienia.

Kolejna moja publikacja (**Rurek i wsp., 2014**) poświęcona była natomiast zastosowaniu innych układów markerowych związanych z opornością na mątwika ziemniaczanego (w tym markerów RAPD o długości 2000 pz i 700 pz), a także wykorzystaniu profilu metylacyjnego genu kodującego podjednostkę B *AGPazy* (ważnego enzymu szlaku syntezy skrobi) do genotypowania większej liczby tetraploidalnych genotypów. Sklonowałem i częściowo zsekwencjonowałem marker RAPD o długości 2000 pz (użyty uprzednio w pracy **Sawicka-Sienkiewicz i wsp., 2002**), a następnie zaproponowałem i zaplanowałem wykorzystanie na tej podstawie odpowiednich markerów typu SCAR z dwóch genotypów ziemniaka o zróżnicowanej podatności na infekcję mątwika. Stwierdziliśmy ponadto, że w analizowanych genotypach występują co najmniej trzy alleliczne formy genu *AGPazyB*. Okazało się również, że profil metylacji tego genu różnicował niektóre genotypy ziemniaka w zależności od stopnia oporności na atak nicienia, co sprawia, że wydaje się on stanowić dodatkową cechę markerową. W opisaney pracy przedstawiłem również praktyczne ograniczenia wynikające ze stosowania tych układów markerowych w selekcji typu MAS linii ziemniaka. Analizy opisane w publikacjach **Sawicka-Sienkiewicz i wsp. (2002)** oraz **Rurek i wsp. (2014)** przeprowadziłem również we współpracy z dr Małgorzatą Jakubowicz z Zakładu Biotechnologii UAM.

Współpracowałem również z pracownikami Zakładu Hydrobiologii UAM w zakresie genotypowania populacji sinic *Planktothrix agardhii* z próbek pobranych głównie z „zakwitających” jezior wielkopolskich. Konieczność monitorowania stanu tych jezior oraz ogólne zainteresowanie wpływem *P. agardhii* na środowisko wodne wynika z tego, że gatunek ten wytwarza hepatotoksyny i neurotoksyny, niebezpieczne dla człowieka i zwierząt. Owocem tej współpracy okazała się praca doświadczalna opublikowana w 2005 r. (**Stefaniak i wsp., 2005**). Opierając się na analizach *Humbert i Le Berre (2001)* celem

wspomnianych badań było sprawdzenie, czy izolaty *P. agardhii* pobrane z wielkopolskich jezior hipertroficzných wykazują znaczące podobieństwo genetyczne do kultur tego gatunku z innych rejonów Europy (głównie jezior alpejskich). Jako układ markerowy wykorzystałem odpowiednie fragmenty rejonów międzygenowych *psa* A/B i *rbc* L/X, biorąc pod uwagę możliwość występowania tzw. typów genetycznych P1, P2 lub P3 w analizowanym materiale. Otrzymane dane przyrównałem do odpowiednich sekwencji markerowych *P. agardhii* uzyskanych z północnej Europy (zdeponowanej w ramach NIVA Culture Collection). Okazało się, że struktura genetyczna populacji polskich i populacji z jezior zachodniej i północnej Europy jest relatywnie podobna pod względem przebadanych układów markerowych. Niemniej jednak zidentyfikowałem nowe miejsca polimorficzne w regionie międzygenowym *psaA-psaB*, co może wskazywać na występowanie odrębnego szczepu analizowanego gatunku sinicy w hipertroficzných jeziorach Wielkopolski.

Ostatni nurt mojej współpracy badawczej dotyczył wspólnych prac doświadczalnych prowadzonych z dr Hanną Augustyniak-Bartosik i innymi pracownikami Katedry Nefrologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Dotyczyły one analizy mutacji i polimorfizmów we fragmentach genu *polycystyny 1 (PKD1)* populacji dolnośląskiej. Uważa się, że zmiany tego typu mogą być skorelowane z występowaniem zespołu ADPKD (genetycznie uwarunkowanej polipowatości nerek w wielu wypadkach nieuchronnie prowadzącej do zaprzestania ich funkcjonowania i konieczności dializowania pacjentów). Autosomalna, dominująca postać zwyrodnienia torbielowatego nerek charakteryzuje się rozwojem licznych torbieli o zróżnicowanej wielkości w warstwie korowej i rdzeniu nerek. Jest ono jednym z najczęstszych schorzeń genetycznych i dotyka 0,1% populacji. Początkowo, w grupie 134 badanych pacjentów (23 rodziny) wykryłem 42 mutacje i polimorfizmy genetyczne. Analizy dotyczyły fragmentów genu *PKD1* obejmujących przede wszystkim egzony 43–46 oraz egzon 15 (**Augustyniak-Bartosik i wsp., 2008**). W kolejnej publikacji (**Augustyniak-Bartosik i wsp., 2013**) analizowałem mutacje i polimorfizmy fragmentów genu *PKD1* obejmujących egzony 43–44 oraz egzon 15. W grupie 134 pacjentów wykryłem 8 nowych, poprzednio nieopisanych mutacji oraz 2 już wcześniej znane. Potwierdziłem również występowanie 3 znanych polimorfizmów w analizowanych rejonach *PKD1*. Większość (7 na 8) nowych mutacji miała charakter heterozygotyczny. Częstotliwość mutacji w analizowanych fragmentach genu *PKD1* w populacji dolnośląskiej była mniejsza, niż donoszą dane literaturowe dotyczące innych populacji. Pomimo wykrycia nowych mutacji i zmian polimorficznych w genie *PKD1*, uderzający był brak wyraźnej asocjacji pomiędzy ich występowaniem, a przebiegiem klinicznym choroby. Niemniej jednak obecność i ciężkość nadciśnienia tętniczego oraz stopień powiększenia nerek wyraźnie korelowały z szybszą

progresją zespołu ADPKD (**Augustyniak- Bartosik i wsp., 2008; Augustyniak-Bartosik i wsp., 2013**).

Podsumowując, uważam, że pomimo nawiązania kontaktów z wieloma jednostkami naukowymi, zasadniczy nurt badawczy mojego dorobku naukowego jest skoncentrowany na biologii molekularnej mitochondriów roślinnych i harmonizuje z pracami doświadczalnymi będącymi częścią głównego odkrycia naukowego. Ponadto wybrane aspekty doświadczeń będących częścią koncepcji rozprawy habilitacyjnej, zostały praktycznie wykorzystane w pracach naukowych wchodzących w skład mojego dorobku. Szczegółowe dane pozapublikacyjne dotyczące dalszych moich osiągnięć naukowo- badawczych, a także dane dotyczące pozostałych osiągnięć zarówno w okresie przed, jak i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych zostały przedstawione w **załącznikach 4 i 5**.

Literatura do p. 5:

- Augustyniak-Bartosik H, Krajewska M, Weyde W, Mazanowska O, Rurek M, Klinger M (2008)** The phenotypic characteristics of adult polycystic kidney disease have greater impact on the course of progressive disease than the type of mutation of the polycystin 1 gene. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 17, 155-159
- Augustyniak-Bartosik H, Krajewska M, Weyde W, Maziarska K, Rurek M, Klinger M (2013)** Novel *PKD1* mutations – the effect on clinical phenotype of ADPKD patients in Lower Silesia. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 67, 157-163
- Augustyniak H, Leśniewicz K, Rurek M (2002)** Promotory mitochondrialnych genów roślin wyższych. *Biotechnologia*, 3, 61-73
- Bakker E, Achenbach U, Bakker J, van Vliet J, Peleman J, Segers B, van der Heijden S, van der Linde P, Graveland R, Hutten R, van Eck H, Coppoolse E, van der Vossen E, Bakker J, Goverse A (2004) A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 146-152
- Ballvora A, Hasselbach J, Niewöhner J, Leister D, Salamini F, Gebhardt C (1995) Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.*, 249, 82-90
- Bonnard G, Grienemberger JM (1995) A gene proposed to encode a transmembrane domain of an ABC transporter is expressed in wheat mitochondria. *Mol. Gen. Genet.*, 246, 91-99
- Choquet Y, Wollman FA (2002) Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett.*, 529, 39-42
- Galek R, Rurek M, De Jong WS, Pietkiewicz G, Augustyniak H, Sawicka- Sienkiewicz E (2011)** Application of DNA markers linked to the *H1* gene conferring potato resistance to pathotype Ro1 of *Globodera rostochiensis*. *J. Appl. Genet.*, 52, 407-411
- Giegé P., Brennicke A (2001) From gene to protein in higher plant mitochondria. *CR Acad. Sci. Ser. III*, 324, 209-217
- Handa H (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.*, 31, 5907-5916
- Hanson MR, Wilson RK, Bentolila S, Kohler RH, Chen HC (1999) Mitochondrial gene organization and expression in petunia male fertile and sterile plants. *J. Hered.*, 90, 362-368
- Holec S, Lange H, Kuhn K, Alioua M, Börner T, Gagliardi G (2006) Relaxed transcription in *Arabidopsis* mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mechanism by polyadenylation and polynucleotide pyrophosphorylase. *Mol. Cell Biol.*, 26, 2869-2876
- Humbert JF, Le Berre B (2001) Genetic diversity in two species of freshwater cyanobacteria, *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* and *P. agardhii*. *Arch. Hydrobiol.*, 150, 197-206
- Klodmann J, Senkler M, Rode C, Braun HP (2011) Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. *Plant Physiol.*, 157, 587-598

- Olczak T, Rurek M, Janska H, Augustyniak H, Sawicka- Sienkiewicz EJ (2001) Screening of cytoplasmic DNA diversity between and within *Lupinus mutabilis* Sweet and *Lupinus albus sensu lato* by restriction fragment length polymorphism (RFLP). *J. Appl. Genet.*, 42, 127-137
- Pietkiewicz G, Rurek M, Augustyniak H, Stawinski S, Sawicka- Sienkiewicz E (1998) Application of PCR based molecular markers for the estimation of lupin genetic diversity; DAF, [w:] *Lupin in ecological agriculture*, Przysiek, str. 78-79 (Proceedings: Ogólnopolskie Seminarium Naukowe, Przysiek)
- Pusnik M, Small I, Read LK, Fabbro T, Schneider A (2007) Pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei* function in mitochondrial ribosomes. *Mol. Cell Biol.*, 27, 6876-6888
- Raczyńska KD, Le Ret M, Rurek M, Bonnard G, Augustyniak H, Gualberto JM (2006) Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons. *FEBS Lett.*, 580, 5641-5646
- Rurek M (1994a) Redagowanie organellowych tRNA, *Postępy Biologii Komórki*, 4, 391-394
- Rurek M (1994b) Nowa metoda wprowadzania genów u roślin za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* [dział: Nowości], *Biotechnologia*, 3, 123
- Rurek M (2000) Mitochondrialne geny podjednostek dehydrogenazy NADH kompleksu I. Redagowanie ich transkryptów. *Postępy Biochemii*, 2, 163-176
- Rurek M, Augustyniak H (1998) Geny mitochondrialnej dehydrogenazy NADH kompleksu I roślin i ich ekspresja, [w:] *Biologia molekularna mitochondriów*, wyd. UAM, Poznań, str. 47-56
- Rurek M, Galek RA, Jakubowicz M, Pietkiewicz G, Styszko L, Sawicka-Sienkiewicz EJ (2014) Estimation of usefulness of RAPD, RFLP and SCAR molecular markers and *AGPaseB* gene methylation level in the screening of resistance to the golden cyst nematode (*Globodera rostochiensis*) pathotype Ro1 in different Polish potato genotypes. *Austr. J. Crop Sci.*, 8, 625-630
- Rurek M, Oczkowski M, Augustyniak H (1998) Conservation of the structure and organization of lupin mitochondrial *nad3* and *rps12* genes. *Acta Biochim. Pol.*, 3, 695-699
- Rurek M, Pietkiewicz G, Sawicka- Sienkiewicz E, Augustyniak H (2001a) Application of *nad* sequences as molecular markers for analysis of lupin genetic diversity. *Zeszyty Naukowe AR Wrocław, seria: Rolnictwo*, Wrocław, 427, 81-92
- Rurek M, Szklarczyk M, Adamczyk N, Michalik B, Augustyniak H (2001b) Differences in editing of mitochondrial *nad3* transcripts from CMS and fertile carrots. *Acta Biochim. Pol.*, 48, 711-717
- Sawicka-Sienkiewicz E, Augustyniak H, Jakubowicz M, Rurek M, Pietkiewicz G, Styszko L (2002) Wstępne wyniki badań nad opracowaniem markerów molekularnych przydatnych do selekcji genotypów ziemniaka odpornych na mątwika ziemniaczanego (*Globodera rostochiensis*). [w:] *Ziemniak spożywczy i przemysłowy oraz jego przetwarzanie. Perspektywy ekologicznej produkcji ziemniaka w Polsce*, Wrocław, str. 72-74 (Proceedings: II Konferencja Naukowa, Polanica Zdrój)
- Sawicka- Sienkiewicz E, Galek R, Zalewski D, Augiewicz J, Rurek M, Augustyniak H (2005) Morphological and molecular characteristics of interspecific hybrids in the genus *Lupinus*. [w:] Van Santen E, Hill GD (red.) *Mexico, Where Old and New World Lupins Meet*. Wyd. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand, str. 23-26 (Proceedings: 11th International Lupin Conference)
- Sawicka- Sienkiewicz E, Rurek M, Augustyniak H (1998) Searching for molecular markers in interspecific hybrids of *Lupinus mutabilis* Sweet, str. 460 (Proceedings: 3rd European Conference on Grain Legumes, Valladolid)
- Schmitz-Linneweber C, Small I (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: A socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.*, 13, 663-670
- Stefaniak K, Kokociński M, Rurek M, Romanowska A, Augustyniak H, Burchardt L (2005) The polymorphic *psa* and *rbc* loci in populations of *Plaktothrix agardhii* in Polish hypertrophic lakes. *Biologia*, Bratislava, 60, 1-5
- Uyttewaal M, Mireau H, Rurek M, Hammani K, Arnal N, Quadrado M, Giegé P (2008) PPR366 is associated to polysomes in plant mitochondria. *J. Mol. Biol.*, 375, 626-636

M. Rurek
Poznań, 8.07.2015