

Załącznik 2

dr Robert Nawrot

Autoreferat

przedstawiający opis dorobku
i osiągnięć naukowych

**Białka obronne z lateksu *Chelidonium majus* L. jako
ważne składniki systemu obronnego roślin**

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Zakład Wirusologii Molekularnej

Poznań 2017

1. Imię i Nazwisko: Robert Nawrot

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

22.06.2007 r., dyplom doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia; specjalność biochemia; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii;

Temat pracy doktorskiej: „**Charakterystyka nukleaz izolowanych z soku mlecznego *Chelidonium majus* L.**”; Promotor: prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak

2003 r., dyplom magistra biotechnologii; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii

2001 r., dyplom licencjata biotechnologii; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2003 – 22.06.2007 - Studium Doktoranckie Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

01.10.2007 – obecnie – adiunkt, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Zakład Wirusologii Molekularnej

3.1. Staże naukowe

1.10.2001-31.03.2002 - Niemcy, studia na **Technische Universität Berlin** w ramach programu Socrates/Erasmus w semestrze zimowym roku akademickiego 2001/2002.

10.2003 - Francja, **Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)**, Laboratoire d'Etude des Interactions des Molécules Alimentaires, Nantes, Prof. Dr Thomas Haertle, miesięczny staż – w ramach polsko-francuskiego projektu POLONIUM, temat: „Aktywności antybakteryjne”.

07.2010 - Niemcy, **Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm**, Group: Signaling Proteomics, dr. W.X. Schulze, miesięczny staż – stypendium Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej - DAAD.

1.07-31.08 i 10.2012 - Niemcy, **Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben**, grupa badawcza biochemii stosowanej, PD Dr. Hansa-Peter Mock, 3-miesięczny staż - stypendium „UAM: Unikatowy Absolwent = Możliwości”.

27.09-28.11.2015 - USA, **University of California Berkeley**, 2-miesięczny staż w ramach programu MNiSW “**TOP 500 Innovators**”, Science - Management – Commercialization, grupa 35.13.

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Białka obronne z lateksu *Chelidonium majus* L. jako ważne składniki systemu obronnego roślin

b) Publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe składa się z cyklu **5** prac (4 prace eksperymentalne, 1 praca przeglądowa) opublikowanych w latach 2013-2017, których **sumaryczny IF** (wg roku opublikowania) jest równy **13,327**, a liczba **punktów MNiSW** (lista MNiSW wg roku opublikowania) wynosi **165**. We wszystkich **5** publikacjach jestem pierwszym autorem, a także korespondencyjnym.

1. **Nawrot R.**, Zauber H., Schulze W.X. (2014) Global proteomic analysis of *Chelidonium majus* and *Corydalis cava* (Papaveraceae) extracts revealed similar defense-related protein compositions. *Fitoterapia* 94, 77-87. **IF₂₀₁₄: 2,345; IF_{5-letni}: 2,466; pkt. 25** (mój udział procentowy szacuję na 80%).
2. **Nawrot R.**, Tomaszewski L., Czerwoniec A., Goździcka-Józefiak A. (2013) Identification of a coding sequence and structure modeling of glycine-rich RNA-binding protein (CmGRP1) from *Chelidonium majus* L. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31: 470-476. **IF₂₀₁₃: 2,374; IF_{5-letni}: 2,137; pkt. 40** (mój udział procentowy szacuję na 60%).
3. **Nawrot R.**, Lippmann R., Matros A., Musidlak O., Nowicki G., Mock H-P. (2017) Proteomic comparison of *Chelidonium majus* L. latex in different phases of plant development. *Plant Physiol. Biochem.* 112: 312-325. **IF₂₀₁₅ (brak IF dla 2016 i 2017): 2,928, IF_{5-letni}: 3,434; pkt. 35** (mój udział procentowy szacuję na 65%).
4. **Nawrot R.**, Barylski J., Lippmann R., Altschmied L., Mock H-P. (2016) Combination of transcriptomic and proteomic approaches helps to unravel the protein composition of *Chelidonium majus* L. milky sap. *Planta* 244: 1055–1064. **IF₂₀₁₅ (brak IF dla 2016): 3,239, IF_{5-letni}: 3,593; pkt. 40** (mój udział procentowy szacuję na 60%).
5. **Nawrot R.** (2017) Defense-related proteins from *Chelidonium majus* L. as important components of its latex. *Curr. Prot. Pep. Sci.* 18: 864-880. **IF₂₀₁₅ (brak IF dla 2016 i 2017): 2,441, IF_{5-letni}: 2,705; pkt. 25** (mój udział procentowy szacuję na 100%).

c) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Monotematyczny cykl prac pt. „Białka obronne z lateksu *Chelidonium majus* L. jako ważne składniki systemu obronnego roślin” obejmuje 5 prac opublikowanych w latach 2013-2017, w których wykazałem obecność białek obronnych (głównie należących do rodziny białek PR związanych z patogenezą) w lateksie, na przykładzie rośliny szeroko wykorzystywanej w lecznictwie ludowym i farmakologii – glistniku jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.). Białka te scharakteryzowałem oraz zaproponowałem ich rolę w systemie obronnym rośliny.

Glistnik jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.) jest wieloletnią rośliną zielną z rodziny makowatych (Papaveraceae) rosnącą zarówno w Europie, części Azji, jak również w Ameryce Północnej. Łodygi glistnika dochodzą zazwyczaj do ok. 50 cm wysokości, są koloru jasnozielonego z drobnymi włoskami, pierzastosiecznymi liśćmi, małymi żółtymi kwiatami oraz żółtym sokiem mlecznym, który wypływa po uszkodzeniu jakiegokolwiek części rośliny. Owoc stanowi równowąska, zielona torebka, pękająca dwiema klapami od nasady ku szczytowi, zawierająca bardzo liczne nasiona. Nasiona są małe, czarne z elajosomami przyciągającymi mrówki, które je roznoszą (myrmekochoria) (Arora i Sharma 2013). *C. majus* znany był od dawna w tradycyjnym lecznictwie ludowym z uwagi na swoje szerokie właściwości lecznicze. Świeży sok mleczny, zwany lateksem, pobrany z rośliny używano w leczeniu schorzeń skórnych, takich jak zakażenia grzybicze, odciski, wypryski, egzemę czy nowotwory skóry. Ekstrakty z rośliny były często stosowane w zaburzeniach funkcjonowania wątroby i dróg żółciowych oraz jako środek żółciopędny (Barnes i in. 2007; Etxenagusia i in. 2000). **Jednym z najważniejszych zastosowań lateksu *C. majus* w tradycyjnym lecznictwie ludowym była bezpośrednia zewnętrzna aplikacja świeżego soku na skórę w celu usunięcia brodawek, kłykcin i kurzajek, które powstają w wyniku infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. *human papilloma virus*) (Etxenagusia i in. 2000).** Aktywność lecznicza soku mlecznego, zwanego lateksem, i ekstraktów z glistnika zależy od okresu zbioru materiału roślinnego i jest najwyższa w maju podczas kwitnienia rośliny i dojrzewania owoców (Nawrot i in. 2007b; Arora and Sharma 2013; Etxenagusia i in. 2000; Monavari i in. 2012; Van Wyk i Wink 2004).

Lateks jest produktem wyspecjalizowanych komórek zwanych latycyferami (rurki mleczne, mleczniki), które są bardzo wydłużone i występują w całej roślinie, od korzeni poprzez łodygę do liści. Sok mleczny stanowi w rzeczywistości cytoplazmę latycyferów i

głównie składa się z zawartości ich wakuol (Zhou i Liu, 2011; Konno 2011). Jest to kompleksowa emulsja zawierająca różne terpenoidy, alkaloidy, skrobię, cukry, olejki, taniny, gumy oraz białka (Cho i in. 2014; Konno 2011). Obecne są w nim alkaloidy benzyloizochinolinowe (np. chelidonina, sangwinaryna, chelerytryna, koptyzyna, berberyna, protopina, stylopina, kanadyna), flawonoidy (np. rutyna, kwercetyna, luteolina), kwasy fenolowe (kwas gallowy, kwas chlorogenowy), nienasycone kwasy tłuszczowe (kwas linolenowy, kwas oleinowy), karotenoidy, saponiny, i kilka innych (Colombo i Bosisio 1996; Tomè i Colombo 1995; Arora i Sharma 2013). Uważa się, że te związki są odpowiedzialne za właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciw pasożytnicze, przeciwgrzybicze, przeciwbólowe, przeciwutleniające, grzybobójcze, choleretyczne, hepatochronne, immunomodulujące (Colombo i Bosisio 1996; Gilca i in. 2010; Biswas 2013; Arora i Sharma 2013; Maji i Banerji 2015) lateksu oraz ekstraktów z rośliny *C. majus*, jednak mechanizm tych aktywności nie jest poznany.

Lateks wypływa z rośliny natychmiast po uszkodzeniu mechanicznym, np. nagryzieniu przez owada lub większego roślinożercę (np. ssaka) i w większości przypadków krzepnie po wystawieniu na działanie powietrza (Cho i in. 2014). W wielu przypadkach jest wysoce lepki, dlatego może pokryć części aparatu gębowego atakującego roślinożercy lub nawet całe jego ciało (np. owada) (Agrawal i Konno 2009; Konno 2011). Typowy lateks to nieprzezroczysty biały sok, jak u maku lekarskiego (*Papaver somniferum*, Papaveraceae) lub kauczukowca brazylijskiego (*Hevea brasiliensis*, Euphorbiaceae), ale u niektórych roślin jest przezroczysty lub ma inny kolor, jak np. pomarańczowo-żółty sok mleczny glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus*, Papaveraceae) (Konno 2011; Nawrot i in. 2016).

Komórki latycyferów nieprzerwanie zachowują turgor jako wynik osmotycznego wychwyty wody (Pickard 2008). Ten wychwyt zapewnia utrzymanie wysokiego ciśnienia wewnątrz latycyferów, co pozwala na przepływ lateksu w systemie oraz szybki jego wypływ w dużych ilościach w miejscu zranienia (Konno 2011). Turgor wewnątrz latycyferów ułatwia również izolację lateksu z rośliny przy minimalnym zanieczyszczeniu z otaczających tkanek (Zulak i in. 2009). Latycyfery są miejscem, w którym syntezowane i magazynowane jest wiele bioproduktów w obronie przeciw roślinożercom i patogenom ważnych z punktu użyteczności dla człowieka (Hagel i in. 2008).

Lateks wytwarza ponad 20 tysięcy gatunków roślin (8,9% wszystkich roślin), zaliczanych do 40 rodzin roślin okrytonasiennych (rośliny wytwarzające lateks, ang. *latex-bearing plants*) (Konno 2011). Rośliny te należą do rodzin: astrowatych (Asteraceae),

wilczomleczowatych (Euphorbiaceae), toinowatych (Apocynaceae) i makowatych (Papaveraceae) (Cho i in. 2014). Warto zauważyć, że większość roślin wytwarzających lateks jest blisko spokrewniona z innymi roślinami zaliczanymi do tego samego rzędu, które nie mają lateksu [np. w większości wytwarzające lateks toinowate (Apocynaceae) a niewytwarzające go marzanowate (Rubiaceae), oba z rzędu goryczkowców (Gentianales)]. Ponadto lateks częściej występuje u roślin rosnących w strefie tropikalnej niż w rejonie o klimacie umiarkowanym (Konno 2011).

Moje zainteresowanie naukowe sokiem mlecznym glistnika jaskółcze ziele wynika z jego właściwości przeciwwirusowych wykorzystywanych w leczeniu ludowym do usuwania kurzajek czy brodawek. Właściwości biologiczne soku są silnie związane z fazą rozwoju rośliny, a ich mechanizm, jak wcześniej wspomniano, przypisywany był głównie znajdującym się w nim alkaloidom. Natomiast praktycznie nieznana była zawartość białek w soku mlecznym glistnika oraz ich ewentualny wpływ na właściwości biologiczne lateksu. **Z tego względu celem moich badań była analiza proteomu i identyfikacja głównych klas białek lateksu *C. majus* oraz poznanie charakteru tych białek w kontekście ich wpływu na aktywność biologiczną lateksu, głównie przeciwpatogenną oraz farmakologiczną.**

Odpowiedzi na te pytania są ściśle związane z mechanizmami obronnymi roślin przeciwko patogenom i roślinożercom. Roślinny system obronny możemy podzielić na dwa typy: konstytutywny i indukowany (Walters i Heil 2007; Krstić i in. 2016). Obrona konstytutywna obecna jest w roślinie już przed infekcją patogena, a składa się z barier mechanicznych, jak ściana komórkowa, woski kutykularne czy kora, a także akumulacji znacznych ilości produktów naturalnych (metabolitów wtórnych) potencjalnie toksycznych dla patogenów, takich jak związki fenolowe, terpenoidy i steroidy (Freeman i Beattie 2008). Synteza związków chemicznych o charakterze obronnym jest kosztowna dla roślin, dlatego jednym ze sposobów redukcji tych kosztów jest aktywacja produkcji takich związków tylko w przypadku rozpoznania atakującego patogena (Wittstock i Gershenzon 2002). Taki indukowany system obronny związany jest z syntezą toksycznych związków chemicznych (np. fitoaleksyny, niskocząteczkowe metabolity wtórne/produkty naturalne), białek związanych z patogenezą (ang. *pathogenesis-related proteins* – PRs), a także wystąpieniem zlokalizowanej programowanej śmierci zakażonych komórek (Krstić i in. 2016).

Obrona podstawowa (ang. *basal resistance*), zwana też obroną wrodzoną (ang. *innate immunity*), stanowi pierwszą linię obrony konstytutywnej, a także indukowanej roślin przeciw wielu różnym patogenom. Reakcje obrony podstawowej mogą być inicjowane przez elementy

roślinnych ścian komórkowych uwolnionych podczas ataku patogena, ale także przez wspólne cechy różnych patogenów na zewnętrznej stronie komórki gospodarza, zwane wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs), takimi jak chityna czy glukany grzybów, bakteryjna flagellina czy lipopolisacharydy (de Wit 2007; Gururani i in. 2012; Muthamilarasan i Prasad 2013). Wzorce PAMPs są rozpoznawane przez białka receptorowe PRRs (ang. *pattern recognition receptors* - PRRs), które są zachowawcze u różnych gatunków. Stymulacja receptorów rozpoznających cząsteczki patogenu PRRs prowadzi do tzw. odporności wyzwalanej przez PAMPs (ang. *PAMP-triggered immunity* - PTI) (Jones i Dangl 2006; Dodds i Rahjen 2010). Druga klasa percepcji bodźców, zwana odpornością przekazywaną przez geny R (ang. *R-gene mediated pathogen resistance*), związana jest z rozpoznaniem przez wewnątrzkomórkowe receptory komórek roślin (kodowanych przez geny R) cząsteczek wirulencji patogena, zwanych efektorami, kodowanych przez jego geny awirulencji *Avr*. Efektory są dostarczane do komórek roślinnych w początkowym stadium infekcji, natomiast roślinne białka R należą najczęściej do rodziny białek zawierających miejsce wiązania nukleotydu oraz bogatych w powtórzenia leucynowe (ang. *nucleotide binding site - leucine rich repeat - NBS-LRR protein family*). Takie wzajemne rozpoznanie odpowiadających sobie roślinnego białka R i produktu genu *Avr* patogenu wyzwała tzw. odporność indukowaną przez efektor, ETI (*effector-triggered immunity* - ETI), znaną wcześniej jako tzw. odporność gen-na-gen (Hurley i in. 2014; Wu i in. 2014). Biorąc pod uwagę ogromną różnorodność roślinnych genów R (zwanych też receptorami ETI) i efektorów patogenów, ten tryb rozpoznania prowadzi do dynamicznej ko-ewolucji roślin i patogenów (Jones i Dangl 2006; Caplan i in. 2008; Dodds i Rahjen 2010; Jones i in. 2016). Oba rodzaje odporności, zarówno PTI jak i ETI, wyzwalają podobne typy odpowiedzi, jednakże ETI jest szybsza i silniejsza i często indukuje programowaną śmierć komórki w miejscu infekcji, zwanej reakcją nadwrażliwości HR (ang. *hypersensitive response* - HR) (Jones i Dangl 2006; Gururani i in. 2012). Reakcja nadwrażliwości związana jest z produkcją reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species* - ROS), biosyntezą fitoaleksyn i akumulacją białek związanych z patogenezą PR, co wiąże się z ograniczeniem rozwoju infekcji patogena (Dong 2001; Iakimova i in. 2005). Nabyta odporność systemiczna (ang. *systemic acquired resistance* - SAR) jest indukowana po reakcji HR jako wynik lokalnej i systemicznej akumulacji kwasu salicylowego (SA), a także skoordynowanej ekspresji genów kodujących białka PR. SAR jest efektywna w stosunku do szerokiego spektrum patogenów wirulentnych, jak grzyby, bakterie i wirusy. W konsekwencji pozostała część rośliny jest chroniona przed wtórną infekcją przez kilka tygodni, a nawet

miesiący (Fu i Dong 2013; Walters i Heil 2007; Grant i Lamb 2006; Kachroo i Robin 2013). Oceniając szybkość reakcji obronnych, część z nich zachodzi szybko, w ciągu kilku godzin od momentu indukcji, natomiast część przebiega wolniej i występują nawet w kolejnym sezonie wegetacyjnym po indukcji (Karban i Kuc 1999).

Białka związane z patogenezą są użytecznymi markerami molekularnymi dla indukcji SAR. Ekspresja białek PR jest swoiście aktywowana po infekcji rośliny przez patogena lub w wyniku działania różnych czynników stresowych, jak zasolenie, susza lub niska temperatura. Białka te sklasyfikowano do 17 rodzin na podstawie różnych ich właściwości, takich jak chitynazy, endo-1,3-glukanazy, osmotyny, endoproteazy, peroksydazy, rybonukleazy, oksydazy szczawianu i kilka innych (Sels i in. 2008; van Loon i in. 2006).

Moje wcześniejsze badania wykazały, że aktywność biologiczna soku mlecznego z *C. majus* może być związana z zawartością w nim białek o aktywności nukleolitycznej. Wstępne analizy metodą zymografii „w żelu” (*in-gel DN-ase assay*) wykazały silną aktywność nukleolityczną w soku mlecznym zbieranym w okresie kwitnienia rośliny (**Nawrot i in. 2007b**) oraz **po zakażeniu wirusem (dane niepublikowane)**. Dalsze badania metodą 2-DE oraz MS/MS wykazały obecność w soku mlecznym glistnika 21 różnych białek, między innymi metabolizmu ogólnego, białek wiążących się do kwasów nukleinowych, tj. białko bogate w glicynę mające motyw wiązania RNA (ang. *glycine-rich RNA-binding protein* - GRRBP) oraz białek związanych z obroną rośliny przed atakiem patogena należących do białek PR (**Nawrot i in. 2007a**).

Obecność białek PR w lateksie sugerowała, że mogą one pełnić ważną rolę w aktywności biologicznej lateksu i stanowić jeden z elementów jego obrony przed działaniem czynników biotycznych i abiotycznych. **Mając to na uwadze na początku badań postawiłem pytanie, czy inna roślina, blisko spokrewniona z *C. majus*, o podobnych właściwościach farmakologicznych, ale nie wytwarzająca lateksu, zawiera podobny skład białek PR.** Rośliną taką jest kokorycz pusta (*Corydalis cava* Schweigg. & Koerte), należąca do tej samej rodziny makowatych (Papaveraceae) co glistnik. Kokorycz pusta nie ma latycyferów, ale wytwarza charakterystyczne puste w środku bulwy, które stanowią źródło wielu substancji aktywnych biologicznie, między innymi alkaloidów izochinolinowych, jak korydalina czy bulbokapnina. Alkaloidy te mają działanie przeciwbólowe, uspokajające i narkotyczne. Z tych względów ekstrakty z bulwy kokoryczy od dawna były stosowane w medycynie ludowej w leczeniu licznych dolegliwości, podobnie jak ekstrakty z pędu glistnika jaskółcze ziele. Dlatego postanowiłem wykonać proteomiczną ilościową analizę

porównawczą składu białkowego ekstraktów z glistnika jaskółcze ziele oraz z kokoryczy pustej (*Corydalis cava* Schweigg. & Koerte) (Nawrot i in. 2014a). W tym celu wykorzystałem nowe podejście do analizy proteomicznej, tzw. metodę “shotgun”, gdzie analizie za pomocą tandemowej spektrometrii mas (LC-ESI-MS/MS) poddałem całe profile białkowe po wstępnym ich rozdziale na żelach SDS-PAGE. Analiza ilościowa bez użycia znacznika (ang. *label-free protein quantitation*) otrzymanych wyników polegała na wyznaczeniu tzw. wykładniczo zmodyfikowanego indeksu ilościowego białka emPAI (ang. *exponentially modified protein abundance index*) dla każdego ze zidentyfikowanych białek. W ekstraktach z bulwy *C. cava* zidentyfikowałem 228 różnych białek, a w ekstraktach z pędów *C. majus* 1240. Wyniki analiz porównawczych pokazały podobną zawartość białek o właściwościach antyoksydacyjnych (peroksydazy, dysmutazy nadadtlenkowe, białka związane z metabolizmem glutationu itp.) w obu typach ekstraktów. Duże różnice dotyczyły zawartości małych białek obronnych należących do białek związanych z patogenezą (PR) oraz białek przeciwbakteryjnych (AMP – *antimicrobial peptides*), których znacznie więcej znajduje się w ekstraktach glistnika, niż w bulwach kokoryczy (Nawrot i in. 2014a). Badania te wykonałem we współpracy z Prof. dr Waltraud Schulze z Max Plant Institute of Molecular Plant Physiology w Potsdam-Golm w Niemczech w ramach stypendium DAAD, a wyniki opublikowałem w czasopiśmie *Fitoterapia* w roku 2014 (Nawrot i in. 2014a), w pracy wchodzącej w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego.

Wyniki tych badań sugerowały, że rośliny o silnych właściwościach farmakologicznych są bogate w białka pełniące funkcje obronne, które mogą stanowić ważny składnik ich systemu obronnego. Mimo licznych badań funkcja i właściwości białek PR nie są do końca poznane. Z tego względu **kolejnym etapem badań była charakterystyka wybranych białek obronnych PR** występujących w badanych ekstraktach. W ramach tych badań opisałem **sekwencję kodującą białko bogate w glicynę mające motyw wiązania RNA z *C. majus* oraz zaproponowałem model jego struktury** (Nawrot i in. 2013). GRP (ang. *glycine-rich proteins*) są to niewielkie białka, zawierające około 80 aminokwasów. W ich cząsteczce występuje domena wiążąca RNA oraz na końcu C cząsteczki bogata w reszty glicynowe i aminokwasy obdarzone ładunkiem. Białka te mogą mieć jednak różną lokalizację i funkcje w komórkach roślinnych. Cechą wspólną różnych GRP jest obecność domen z powtórzonymi wielokrotnie resztami glicyny, które są wysoce elastyczne i mogą uczestniczyć w oddziaływaniach typu białko-białko. Syntetyzowane są one w odpowiedzi na stres i związane z różnymi procesami regulacji post-transkrypcyjnej oraz prawdopodobnie wchodzą

w skład białek stanowiących wrodzony system obronny rośliny (Ringli i in. 2001; Mousavi i Hotta, 2005). Z powodu braku danych sekwencyjnych dla *C. majus* do reakcji PCR użyłem starterów zdegenerowanych, które zaprojektowałem w oparciu o wysoce zachowawczą sekwencję kodującą motyw RRM znanych białek GRP. W wyniku badań uzyskałem sekwencję nukleotydową zawierającą 439 pz, kodującą białko GRP z *Chelidonium majus* (nazwane CmGRP1) (NCBI GenBank HM173636). Obliczona masa cząsteczkowa polipeptydu wynosi 14931 Da. W sekwencji kodującej CmGRP1 wykryto jeden wysoce zachowawczy rejon, tzw. motyw rozpoznający RNA (RRM - ang. *RNA recognition motif* – pfam00076, a także domena RBD lub RNP). Domeny RRM obecne są w wielu różnych białkach wiążących się do ssRNA i ssDNA (Nomata i in. 2004). Drugim motywem obecnym w białku CmGRP1 jest krótki motyw C-końcowy bogaty w glicynę (GGGGxxGxGGGxxG). Zgodnie z klasyfikacją roślinnych białek GRP, CmGRP1 zostało zaklasyfikowane do klasy IVa roślinnych GRP, biorących udział w reakcjach obronnych rośliny. Struktura trzeciorzędowa białka CmGRP1 została wymodelowana metodami bioinformatycznymi. Model białka pokazał też, że CmGRP1 może dimeryzować tworząc kompleks z cząsteczką RNA. Białka bogate w glicynę z motywem wiążącym RNA (GRRBPs), tak jak inne białka wiążące RNA (RBPs – *RNA-binding proteins*), biorą udział w regulacji przemian RNA w komórce i stabilizują cząsteczki mRNA, które powstają w odpowiedzi na czynniki stresowe (Zhang i in. 2011; Nawrot i in. 2013a). Okazało się ponadto, że rośliny intensywnie wykorzystują białka wiążące RNA do obrony przed infekcją wirusową – niektóre białka RBP są zaangażowane w hamowanie replikacji, przemieszczania i translacji RNA wirusa, poprzez specyficzne wiązanie się do wirusowego RNA (Huh i Paek 2013). W konsekwencji, CmGRP1 może być uznane za jeden z elementów antywirusowego mechanizmu obronnego lateksu *C. majus* (Nawrot 2017a). Badania te prowadziłem w ramach projektu MNiSW 0872/B/P01/2008/34 w latach 2008-2011, a opublikowałem w *Plant Molecular Biology Reporter* w roku 2013, pracy będącej częścią mojego osiągnięcia habilitacyjnego (Nawrot i in. 2013a).

Innym białkiem występującym w aktywnym biologicznie soku mlecznym oraz ekstraktach *C. majus* było **białko MLP (główne białko lateksu, ang. major latex protein)**. MLP odkryto po raz pierwszy w lateksie maku lekarskiego (*Papaver somniferum*) jako grupę bardzo licznych peptydów swoistych dla latycyferów, o nieznannej funkcji (Nessler i in. 1994). MLP stanowią do 50% subproteomu lateksu *P. somniferum*, co koreluje ze względnie dużą ilością tych białek widoczną na żelach SDS-PAGE. MLP gromadzą się wcześniej w rozwoju

latycyferów i utrzymują się do okresu ich dojrzałości (Onoyovwe i in. 2013). Podobne wyniki uzyskałem dla lateksu *C. majus*, w którym MLP jest wysoce reprezentatywnym białkiem (Nawrot i in. 2016) i występuje na różnych etapach rozwoju rośliny aż do dojrzewania owoców (Nawrot i in. 2017b). Badania metodą elektroforezy 2D białek lateksu wykazały dużą zawartość białka we frakcjach o podobnych masach cząsteczkowych (około 30-35 kDa) i zakresie pI (ok. 5.5-6.5), które zostało zidentyfikowane jako główne białko lateksu (MLP). MLP z *C. majus* składa się z 147 aminokwasów o masie cząsteczkowej 16,77 kDa i teoretycznym pI 5,88, co jest zgodne z typowymi wielkościami białek MLP z innych roślin (Nawrot 2017a). Modelowanie 3D sekwencji aminokwasowej MLP z *C. majus* wykazało, że zawiera ono zachowawczą kieszeń hydrofobową, zdolną do wiązania innych niskocząsteczkowych związków lateksu (Lytle i in. 2009). **Analiza molekularna dokowania potwierdziła, że w tej kieszeni z wysokim stopniem powinowactwa może dokować kilka alkaloidów benzyloizochinolinowych, co sugeruje możliwą synergistyczną aktywność białek lateksu z innymi jego składnikami (Nawrot 2017a).** Ostatnie dane wskazują, że funkcjonalna rola MLP jest podobna do roli białek PR-10 (Lytle i in. 2009). Uważa się, że białka PR-10 biorą udział w obronie roślin przed patogenami (Chadha i Das 2006), ale sugerowano również pewne ich funkcje w metabolizmie roślin (Swoboda i in. 1996; Michalska i in. 2010). Pierwszą biochemiczną aktywnością zaproponowaną dla białek PR-10 była aktywność rybonukleolityczna, wykazana dla głównego alergenu pyłku brzozy Bet v1, który ma homologię z białkami PR-10 (Bufe i in. 1996). Aktywność rybonukleazy potwierdzono również dla białka podobnego do PR-10 z łubinu białego (*Lupinus albus*) (Bantignies i in. 2000). Zarówno MLP, jak i PR-10, należą do nadrodziny Bet v1, ale podobieństwo sekwencji między nimi jest raczej niskie (<25%) (Chruszcz i in. 2013). Ponadto, białko CaPR-10 izolowane z papryki chili działa jak białko przeciwwirusowe hamujące penetrację wirusa do komórki i/lub jego replikację. Po inokulacji wirusa TMV-P0, CaPR-10 jest fosforylowane i działa jako rodzaj RNazy, która przecina wirusowy RNA (Park i in. 2004). **Funkcjonalna rola MLP jest zatem podobna do białek PR-10, mając prawdopodobny udział w działaniu przeciwwirusowym lateksu *C. majus* (Nawrot 2017a).**

Aktywność biologiczna lateksu zmienia się w trakcie rozwoju rośliny. Z tego względu kolejnym postawionym przeze mnie pytaniem badawczym było, **czy poziom zawartości białek PR w lateksie *C. majus* zmienia się także w różnych fazach rozwoju rośliny?** Celem badań była analiza i porównanie białek zawartych w soku mlecznym *C. majus* na różnych etapach rozwoju rośliny. Rozwój *C. majus* można podzielić na kilka faz: faza I rozety

liściowej wiosennej, faza II początku kwitnienia, faza III pełni kwitnienia, faza IV dojrzewania owocu, faza V pełnej dojrzałości oraz faza VI rozety liściowej jesiennej (Jakovljevic 2013). **Kluczowymi fazami, w których sok mleczny glistnika wykorzystywany jest do celów farmakologicznych są fazy III pełni kwitnienia oraz IV dojrzewania owocu.** W tych fazach najwyższa jest również aktywność nukleolityczna analizowana metodą zymografii. Dlatego postanowiłem porównać skład białkowy obu tych faz. W tym celu wykonałem ilościową analizę porównawczą białek lateksu *C. majus* zebranych w tych fazach za pomocą podejścia proteomicznego metodą LC-MS bez użycia znacznika (ang. *label-free approach*) (8 powtórzeń dla każdej fazy – 4 biologiczne i po 2 techniczne) poprzez chemometryczną porównawczą analizę danych LC-MS (tzw. *multiplexed LC-MS*) programem Progenesis (Non-linear Dynamics). Wyniki analizy pokazały, że **w lateksie zebrany w fazie IV dojrzewania owocu, w porównaniu z tym zebrany w fazie III kwitnienia, wzrasta zawartość licznych białek, w tym PR.** Z drugiej strony, w lateksie zebrany w fazie III kwitnienia, dobrze reprezentowane są białka związane z intensywnymi procesami syntezy białek, ich fałdowania, a także transkrypcji i aktywnego transportu cząsteczek (transportery ABC). Wobec tego wnioskuję, iż **podczas kwitnienia i dojrzewania owocu *C. majus*, w jego soku mlecznym w sposób istotny statystycznie zwiększa się ilość białek związanych z obroną rośliny przed patogenami i innymi czynnikami stresowymi (Nawrot i in. 2017b).** Badania te zapoczątkowałem podczas pobytu w ramach stypendium z projektu „UAM: Unikatowy Absolwent = Możliwości” w grupie badawczej biochemii stosowanej kierowanej przez PD Dr. Hansa-Petera Mocka w **Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) w Gatersleben w Niemczech w roku 2012** i kontynuowałem we współpracy naukowej w kolejnych latach, co zaowocowało publikacją w *Plant Physiology and Biochemistry* w roku 2017, stanowiącej część mojego osiągnięcia habilitacyjnego (Nawrot i in. 2017b).

Analiza danych z tych badań proteomicznych była trudna, gdyż brak było informacji dotyczących sekwencji DNA i RNA dla *C. majus*. We wcześniejszych moich badaniach identyfikacja białek z *Chelidonium majus* metodą LC-ESI-MS/MS za pomocą algorytmu MASCOT opierała się na przeszukiwaniu bazy danych sekwencji NCBI nr z filtrem dla roślin (*Viridiplantae*). Pozwalało to na identyfikację białek *C. majus* na podstawie podobieństwa funkcjonalnego białek innych roślin, jednak nie pozwalało w pełni oddać składu białkowego soku mlecznego i ekstraktów z *C. majus*. Dlatego w toku moich badań postanowiłem wykonać sekwencjonowanie *de novo*, składowanie i adnotację transkryptomu *C. majus* za pomocą

technologii Illumina (Nawrot i in. 2016). W tym celu izolowałem RNA z młodej łodygi *C. majus*, który przepisano na cDNA i poddano sekwencjonowaniu przy użyciu aparatu Illumina HiSeq2000. Otrzymałem około 119 Mb surowych danych sekwencyjnych. Wśród 34965 unikatowych sekwencji kodujących (CDS), adnotowano 23004 z nich, które posłużyły do przygotowania bazy danych CDS jako podstawy dalszych analiz proteomicznych. Bazę danych wykorzystano następnie do identyfikacji białek z lateksu i ekstraktów z całych roślin *C. majus* stosując tandemową spektrometrię mas (LC-ESI-MS/MS). Zidentyfikowano 334 różne białka w soku mlecznym *C. majus* oraz 1155 w ekstrakcie z pędów tej rośliny. Ilościowa analiza porównawcza potwierdziła, że lateks *C. majus* zawiera białka związane z odpowiedzią na stres i wytwarzanie prekursorów metabolitów wtórnych. Porównanie proteomu lateksu *C. majus* do proteomu ekstraktu z pędu rośliny przy użyciu narzędzia BiNGO (ang. *biological networks gene ontology tool*) (poziom ufności 0.05) wykazało nadreprezentację w soku mlecznym ścieżek metabolicznych odpowiedzi na czynniki biotyczne, odpowiedzi na stres oraz wytwarzanie prekursorów metabolitów. Poznanie transkryptomu *C. majus* potwierdziło obecność głównych klas białek lateksu oraz wskazało na obecność wielu innych białek, co otwiera drogę do dalszych badań. **Dominującymi pod względem ilościowym białkami w lateksie *C. majus* poza głównym białkiem lateksu (MLP), są oksydaza polifenolowa (PPO), peroksydaza (POX), lipooksygenaza (LOX) i enzymy odpowiedzialne za biosyntezę fenylopropanoidów i alkaloidów (Nawrot i in. 2016).** Oksydaza polifenolowa może być odpowiedzialna za brązowienie lateksu po wystawieniu na działanie powietrza. PPO zidentyfikowano także w lateksie maku lekarskiego (*P. somniferum*) (Decker i in. 2000), należącego do tej samej rodziny. Stwierdzono, że PPO stanowi główny składnik białka lateksu mniszka (*Taraxacum* spp.), a zmniejszenie jego ekspresji w transgenicznych roślinach hamuje brązowienie i koagulację lateksu (Wahler i in. 2009). Sugeruje to, że proces koagulacji lateksu *C. majus* może być związany z obecnością PPO, podobnie jak u *Taraxacum* spp. (Wahler i in. 2009). Podobne brązowienie obserwowano dla lateksu *C. majus* po wystawieniu na działanie powietrza (Nawrot i in. 2016), co jest związane z właściwościami utleniającymi PPO. Enzym ten jest zaangażowany w wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) i utlenianie związków fenolowych, takich jak o-difenole i o-dichinony, odpowiedzialne za oksydacyjne brązowienie w owocach i warzywach po ich zranieniu (Wahler i in. 2009). Badania prowadzące do poznania transkryptomu *C. majus* prowadziłem we współpracy z naukowcami z **Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) w Gatersleben w Niemczech**, zakończone

publikacją wyników w czasopiśmie *Planta* w roku 2016, która stanowi część mojego osiągnięcia habilitacyjnego (Nawrot i in. 2016).

Wyniki wszystkich moich dotychczasowych badań zebrałem i przedyskutowałem w pracy przeglądowej opublikowanej w *Current Protein and Peptide Science* (Nawrot 2017a). W pracy tej przedstawiłem przegląd białek obronnych z soku mlecznego *C. majus* w szerszym kontekście ich znaczenia dla aktywności lateksu, jego funkcji, aktywności farmakologicznych i użycia jako leczniczego środka przeciwwirusowego oraz porównałem je z wynikami najnowszych badań nad białkami i związkami chemicznymi zawartymi w lateksie roślin innych gatunków. Szczególną uwagę zwracam na przeciwwirusową funkcję lateksu i udział białek w jej wykształceniu. **Jest to pierwszy tego typu artykuł przeglądowy, który szczegółowo podsumowuje zawartość różnych rodzin białek związanych z patogenezą (PR) w lateksie naturalnym i wskazuje na możliwe ich funkcje.** Analiza sekwencji z bazy danych wykazała obecność 12 z 17 rodzin białek związanych z patogenezą PR w soku mlecznym *C. majus*: PR-2 - β -1,3-glukanazy, PR-3 –chitynazy, PR-4 – chitynazy podobne do heveiny, PR-5 – podobne do taumatyny, PR-7 – endoproteazy, PR-9 – peroksydazy, PR-10 – rybonukleazy, PR-11 – chitynazy klasy V, PR-14 – białka przenoszące lipidy (LTP), PR-15 – oksydazy szczawianu, PR-16 – białka podobne do oksydazy szczawianu, PR-17 – słabo poznane, o prawdopodobnej funkcji proteazy. Badania ostatnich lat wskazują na obecność białek PR w lateksie roślin wielu gatunków (Nawrot i in. 2007a, 2014, 2016, 2017b; Decker i in. 2000; Zulak i in. 2009; Wang i in. 2013; Spano i in. 2015; Sytwała i in. 2015; Freitas i in. 2016). **Jak wynika z definicji, ekspresja białek PR jest indukowana podczas infekcji patogena, jednak w przypadku lateksu jest inaczej – białka PR zawarte w nim są produkowane w sposób konstytutywny, co między innymi powoduje, że lateks należy do konstytutywnego systemu obrony przeciw patogenom i roślinożercom** (Wittstock i Gershenzon 2002; Konno 2011; Souza i in. 2011; Nawrot i in. 2007a, 2016).

Konwergentna ewolucja lateksu u wielu różnych roślin odległych filogenetycznie sugeruje podobne korzyści wynikające z wykształcenia systemu obronnego związanego z lateksem (Konno 2011). **Główną zaletą systemu jest szybkość odpowiedzi.** Lateks zawiera wysoce stężone substancje obronne rozprowadzone poprzez system latycyferów w całej roślinie. W związku z tym natychmiast po uszkodzeniu komórek przez aparat gryzący owada jest on wydzielany w miejscu uszkodzenia, dzięki czemu możliwy jest natychmiastowy transport substancji obronnych do dokładnego miejsca ataku roślinożercy. **W takim sensie obrona w lateksie jest podobna do indukowalnych systemów obronnych, lecz obejmuje ona wstępnie przygotowaną (konstytutywną) obronę, więc system jest gotowy do**

działania już w ciągu kilku sekund od zdarzenia. Jest to znacznie szybsze niż w przypadku indukowanej obrony, w której mijają co najmniej godziny lub dni zanim stężenia substancji obronnych wzrosną do dostatecznych poziomów (Karban i Kuc 1999; Konno 2011).

W pracy pogrupowałem rodzaje białek występujące w soku mlecznym glistnika zgodnie z ich właściwościami biologicznymi. I tak do białek mających aktywność przeciw roślinożercom należą oksydaza polifenolowa (PPO), chitynaza typu heveiny (PR-4), lipooksygenaza (LOX). Wiele białek bierze udział w wytwarzaniu wolnych rodników w odpowiedzi na atak patogena, ale także przeciwnie – działając antyoksydacyjnie – należą tu peroksydaza (PR-9), oksydazy szczawianowe (germiny – PR-15), białka podobne do oksydazy szczawianowej (germino-podobne – PR-16), dysmutaza ponadtlenkowa (Cu/ZN-SOD). **Do białek potencjalnie przeciwwirusowych w soku mlecznym można zaliczyć główne białko lateksu (MLP) należące wraz z białkami PR-10 o aktywności rybonukleazy do nadrodziny Bet v1, a także białko bogate w glicynę wiążące RNA (GRP).** Wiele białek bierze udział w degradowaniu ścian komórkowych bakterii i grzybów – należą tu β -1,3-glukanazy (PR-2), różne klasy chitynaz (PR-3, PR-4, PR-11), białka podobne do taumatyny (PR-5), endoproteazy (PR-7) oraz białko przenoszące lipidy (PR-14). W lateksie obecne są także białka związane z ogólną odpowiedzią na czynniki stresowe, np. białka bogate w powtórzenia leucynowe (LRRs), białka „*dirigent-like*”, białka 14-3-3, czy też transportery ABC (ang. *ATP-binding cassette transporter*) pozwalające na przemieszczanie związków niskocząsteczkowych przez błony.

W oparciu o wyniki badań własnych i dane literaturowe w pracy przeglądowej **zapropnowałem model odpowiedzi przeciwwirusowej lateksu *C. majus*.** Warunkiem wstępnym zakażenia rośliny przez wirusa jest uszkodzenie mechaniczne jej ścian komórkowych (Mandadi i Scholthof 2013). Jednym z możliwych sposobów jest działanie roślinożerców, które nagryzają roślinę i uszkadzają jej komórki. **Lateks wypływa natychmiast po uszkodzeniu rośliny,** a ze względu na swoją lepkość i krzepliwość, w zależności od wielkości roślinożercy, może sklejać jego aparat gębowy lub stanowić pułapkę dla całego owada, uniemożliwiając dalsze uszkodzanie rośliny (Konno 2011). Na przykład kauczuk trojeściowatych (Asclepiadaceae) jest toksyczny dla owadów roślinożernych, ponieważ jego lepkość ogranicza ruch ich aparatów gębowych (Dussourd i Eisner, 1987). Mechanizm krzepnięcia lateksu jest różny u roślin z różnych taksonów. Biorąc pod uwagę zawartość białek PPO i LOX w lateksie *C. majus*, można dla niego zaproponować podobny mechanizm krzepnięcia jak w przypadku *Taraxacum spp.*, czyli zależny od PPO (Nawrot i in.,

2016; Wahler i in., 2009). Dlatego też PPO i LOX mogą tworzyć **pierwszą linię bezpośredniej reakcji obronnej związanej z lateksem *C. majus***.

Uszkodzeniu ściany komórkowej często towarzyszy tzw. wybuch oksydacyjny (Wojtaszek 1997), w którym biorą udział uczestniczą białka **zaliczane do drugiej linii reakcji obronnej**, czyli białka o właściwościach oksydacyjnych, takie jak peroksydaza (POX) i lipooksygenaza (LOX), obficie występujące w lateksie *C. majus* (Nawrot i in. 2007a; 2016). Peroksydazy mają zdolność generowania H₂O₂ w odpowiedzi na atak patogena, zwany wybuchem oksydacyjnym (Nawrot i in. 2007a; O'Brien i in. 2012).

Trzecia linia obrony związana jest z aktywnością przeciwwirusową konstytutywnych białek wiążących kwasy nukleinowe, takich jak MLP i GRP (Nawrot i in. 2013; 2016; 2017b). Mają one aktywności rybonukleazy i deoksyrybonukleazy, dlatego **mogą brać udział w trawieniu wirusowego RNA większości wirusów roślinnych** (Huh i Paek 2013) oraz być może także wirusów zwierzęcych typu DNA lub też działać inaczej wykorzystując dotąd niepoznane mechanizmy. **W przypadku przedostania się wirusa przez pierwszą i drugą linię obrony, w wpływającym lateksie gotowe są do działania białka o aktywności przeciwwirusowej, skutecznie hamując dalszy przebieg infekcji.** Aktywność przeciwwirusowa soku mlecznego i ekstraktów z *C. majus* przeciwko wirusom ludzkim (np. HPV, HSV-1, HIV) jest dobrze znana (Etxenagusia i in. 2000; Monavari i in. 2012; Gerenčer i in. 2006) i wykorzystywana w tradycyjnej medycynie ludowej do usuwania brodawek i kurzajek na skórze (Etxenagusia i in. 2000). Prawdopodobnie dzięki tym aktywnościom *C. majus* jest w wysokim stopniu odporny na różne choroby, głównie o podłożu wirusowym. Dlatego też dostępnych jest bardzo niewiele informacji literaturowych na temat zakażeń *C. majus* wirusami roślinnymi (Pospieszny i in. 2004). Jedynym wirusem roślinnym, dla którego wykazano zakażenie *C. majus* w jego naturalnym środowisku jest wirus mozaiki ogórka (CMV), wywołujący w zakażonej roślinie łagodne objawy w postaci niewielkich plamek na liściach (Brčak 1979) lub nie powodując żadnych widocznych objawów choroby (Pospieszny i in. 2004; Hrženjak i in. 1999). Podobnie informacje dla innych roślin z rodziny makowatych, np. dla maku lekarskiego (*P. somniferum*) potwierdzają wysoką odporność roślin wytwarzających lateks na zakażenia wirusowe, chociaż dostępne są dane historyczne na temat zakażenia monokultur maku wirusami wywołującymi mozaiki (Tang i in. 2016; Srivastava i in. 2016; Kapoor 1995).

Podsumowując wyniki moich badań przedstawione w monotematycznym cyklu prac, uważam, że uzyskane przez mnie wyniki zwracają uwagę na ważną rolę białek w systemie obronnym lateksu przed atakiem patogena. W pracach tych: 1) scharakteryzowałem proteom

lateksu *C. majus*, 2) poznałem sekwencje kodujące i struktury najważniejszych białek lateksu, 3) wskazałem na ważną rolę białek PR w systemie obronnym lateksu, 4) wykazałem, że ilość białek związanych z obroną rośliny przed patogenami w soku mlecznym *C. majus* zwiększa się podczas kwitnienia i dojrzewania owocu, 5) opracowałem transkryptom *C. majus*, który stanowi narzędzie do dalszych badań nad innymi białkami lateksu, 6) zaproponowałem model prawdopodobnej odpowiedzi przeciwwirusowej lateksu *C. majus*.

Obrona w lateksie jest podobna do indukowanych systemów obronnych, lecz obejmuje ona wstępnie przygotowany (konstytutywny) mechanizm obronny. System jest gotowy do działania już w ciągu kilku sekund od zdarzenia, co związane jest z turgorem laticyferów, lepkością lateksu oraz zawartością w nim związków obronnych.

Wyniki uzyskane przeze mnie zbliżają nas do lepszego zrozumienia funkcjonowania lateksu oraz roli białek w nim występujących. Wyniki te wskazują na ważną rolę białek w lateksie poza wcześniej zidentyfikowanymi w nim związkami, co może mieć także potencjał aplikacyjny.

Przeprowadzone wstępne badania metodą dokowania *in silico* kilku alkaloidów benzylochinolinowych do modeli białek GRP i MLP, przy wykorzystaniu metod bioinformatycznych wykazało, że badane białka mogą mieć miejsca aktywne do wiązania tych związków. Sugeruje to możliwą rolę dla niektórych z białek obronnych jako transporterów związków niskocząsteczkowych w roślinie. Dlatego w następnych moich pracach chciałbym skupić się na **dalszym wyjaśnianiu roli białek w mechanizmach obronnych, biorąc pod uwagę fakt, iż związki niskocząsteczkowe obecne w lateksie mogą działać synergistycznie z białkami.**

Poznanie struktury i funkcji białek obronnych *C. majus* jest ważne ze względu na możliwości aplikacyjne, np. w transgenizacji roślin czy farmakologii. Wyniki moich badań mogą mieć **wpływ na wykorzystanie preparatów z glistnika w farmakologii** poprzez zmianę sposobu postępowania z badań nad pojedynczymi związkami w kierunku badań nad kompozycjami związków oraz pozwolą na lepsze zrozumienie mechanizmu działania przeciwwirusowego, przeciwbakteryjnego i cytotoksycznego ekstraktów i preparatów z *Chelidonium majus*, co jest niezbędne dla wykorzystania ekstraktów z tej rośliny w celach farmakologicznych.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

A. Dane bibliometryczne (stan na dzień 7.05.2017 r.)

Sumaryczny „impact factor” dotychczasowych publikacji IF = 35,062, MNiSW= 462 pkt.

Łączna liczba cytowań = 115

Łączna liczba cytowań bez autocytowań = 96

Indeks-H = 6

(wg bazy Web of Science Core Collection, sprawdzono dnia 7.05.2017 r.)

Jestem autorem lub współautorem **37** publikacji naukowych oraz **51** doniesień prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych. **25** publikacji to oryginalne prace twórcze (w tym 21 publikacji jako pierwszy (lub drugi) autor).

B. Tematyka pozostałych prac badawczych

1) Po uzyskaniu stopnia doktora

Główny nurt mojej pracy badawczej przed i po uzyskaniu stopnia doktora, poza badaniami przedstawionymi w osiągnięciu habilitacyjnym, dotyczył analizy właściwości farmakologicznych i cytotoksycznych białek izolowanych z glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus*), ale także ze spokrewnionej rośliny z tej samej rodziny makowatych – kokoryczy pustej (*Corydalis cava*). Rośliny pełnią ważną rolę we współczesnej farmakologii i stanowią cenne źródło licznych cząsteczek terapeutycznych stosowanych w leczeniu wielu chorób, w tym nowotworów. Stosowanie ich ogranicza toksyczność roślinnych produktów naturalnych oraz słabo poznany mechanizm molekularny ich działania. Przeprowadzone badania wykazały, że wiążące się z kolumną heparynową frakcje białek z soku mlecznego *C. majus* o aktywnościach nukleolitycznych **hamują proliferację komórek nowotworowych linii HeLa w zależności od dawki białka**, co może mieć znaczenie w wykorzystaniu ekstraktów roślinnych w lecznictwie. Wyniki te opisane są w publikacji w *Folia Histochemica et Cytobiologica* w roku 2008 (Nawrot i in. 2008). W 2009 roku realizowałem grant międzyuczelniany UAM-UM-UP „Wpływ ekstraktów białkowych z *Corydalis cava* na komórki w hodowlach *in vitro*”. Celem badań było sprawdzenie, czy

aktywność biologiczna ekstraktów z bulw *C. cava* zależy od znajdujących się w nich białek. Wyniki badań opublikowane w *BMC Complementary and Alternative Medicine* w roku 2010 wykazały, iż hamujący efekt jaki wywierały badane białka w stosunku do komórek linii HeLa jest zależny od zwiększającego się ich stężenia (Nawrot i in. 2010a). Ponadto sugerowały, że testowane frakcje białkowe mogą zawierać pewne ilości powiązanych z nimi związków niskocząsteczkowych, głównie alkaloidów. Dlatego w 2011 roku nawiązałem kontakt i współpracę naukową z **Zakładem Farmakologii Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie**. Zaowocowało to złożeniem i uzyskaniem finansowania dla projektu NCN 2011/03/B/NZ9/01335 (2012-2016) pt. „**Badania właściwości farmakologicznych składników soku mlecznego i ekstraktów z glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.)**”. Celem projektu było poznanie mechanizmów aktywności farmakologicznej ekstraktów izolowanych z glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.). W ramach projektu prowadziłem frakcjonowanie białek z soku mlecznego i ekstraktów *C. majus* na kolumnie heparynowej metodą chromatografii powinowactwa. We frakcjach wiążących się z kolumną identyfikowałem białka oraz alkaloidy metodami spektrometrii mas. Okazało się, że **białkiem wiążącym się z kolumną było białko MLP, a współwystępowało z nim kilka alkaloidów benzylochinolinowych**, które w dużej mierze usuwane są z kolumny na wczesnym etapie wymywania (tzw. *flow-through*). Sugeruje to potencjalny związek pomiędzy białkiem a alkaloidami w poszczególnych frakcjach. Sugestię tę zdają się potwierdzać wstępne wyniki dokowania molekularnego *in silico*, które wskazały na wysoką wydajność dokowania w kieszeni hydrofobowej białka MLP z *C. majus* trzech alkaloidów: berberyny, 8-hydroksychelerytryny i dihydroberberyny.

Obniżenie żywotności komórek linii nowotworowych HeLa i C33A inkubowanych z frakcjami wzbogaconymi w białka nukleolityczne (głównie MLP) i alkaloidy może sugerować, że niskocząsteczkowe związki lateksu mogą działać synergistycznie z białkami. Ponadto dla wybranych frakcji obserwuje się wyższą cytotoksyczność dla linii nowotworowych niż dla kontrolnej linii fibroblastów, co ma duże znaczenie dla potencjalnego wykorzystania tego rodzaju związków roślinnych w terapii antynowotworowej. Wyniki tych badań są obecnie przygotowywane do publikacji.

Równoległe do badań związanych z określeniem właściwości cytotoksycznych białek i ekstraktów z *C. majus* i *C. cava*, prowadziłem badania nad izolacją i charakterystyką poszczególnych białek wchodzących w skład ich ekstraktów. I tak oprócz projektu dotyczącego poznania struktury białek GRP i PR-10 (grant własny MNiSW nr

0872/B/P01/2008/34, 2008-2011), którego wyniki opublikowałem w pracy będącej częścią mojego osiągnięcia habilitacyjnego (Nawrot i in. 2013a), realizowałem także projekt badawczy pt. „**Badania nad właściwościami białek obronnych taumatyno-podobnych/osmotyn (PR-5)**” izolowanych z bulw kokoryczy puste (Corydalis cava) (Grant własny MNiSW, nr projektu: 8074/B/P01/2011/40, 14.06.2011-13.06.2014), mający na celu analizę struktury i funkcji białek taumatyno-podobnych/osmotyn (PR-5) o właściwościach obronnych znajdujących się w bulwach *Corydalis cava*. W ramach badań zidentyfikowałem sekwencję nukleotydową o długości 678 pz, zarejestrowaną w **bazie NCBI GenBank pod numerem KJ513303**, kodującą nowy polipeptyd zbudowany z 225 aminokwasów, zarejestrowany w bazie NCBI Protein pod numerem **AJE25829**. Nowe białko nazwane zostało CcTLP1 (*Corydalis cava* Thaumatin-like protein 1), a jego masa cząsteczkowa wynosi ok. 24 kDa (24234 Da). CcTLP1 wykazuje wysoką identyczność sekwencji z sekwencją aminokwasową białka PR-5 (osmotyny) VVTTL1 z *Vitis vinifera* (AAB61590) (poziom identyczności sekwencji 77.62%). Sekwencja ta pokrywa w całości wysoce zachowawczy rejon stanowiący domenę GH64-TLP-SF (cd08961) i domenę TLP (cd09215) białek taumatyno-podobnych o aktywnościach przeciwgrzybowych (m.in. beta-glukanazy).

W ramach badań dotyczących izolacji i poznania struktury białek z lateksu *C. majus*, prowadziłem badania nad białkiem przenoszącym lipidy (LTP, należące do PR-14). Zakończyły się one przygotowaniem zgłoszenia patentowego **nr WP150/112/1/14 z dnia 21.05.2014 r.** na otrzymywanie białka LTP pt. „Aktywne biologicznie białko CmLTP 9,5 oraz jego zastosowanie”, autorstwa Goździcka-Józefiak A., Nawrot R., Kuźma D. Przedmiotem wynalazku jest aktywne biologicznie białko *Chelidonium majus* CmLTP 9,5 typu nsLTP (*non-specific lipid transfer protein*) izolowane z rośliny *Chelidonium majus* i jego zastosowanie przeciwbakteryjne, a także jego zastosowanie jako środka bakteriobójczego i bakteriostatycznego, w szczególności względem szczepów bakterii Gram dodatnich (*Bacillus* sp.) i Gram ujemnych (*Enterobacteriaceae*, np. *E. coli* TG1). Wynikiem badań jest również praca, która jest aktualnie w recenzji: **Nawrot R., Jozefiak D., Sip A., Kuzma D., Musidlak O., Gozdzicka-Jozefiak A. Isolation and characterization of a novel non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from *Chelidonium majus* L. latex.**

Efektom współpracy naukowej z grupą Prof. dr W. Schulze zawiązanej podczas **miesięcznego stażu w ramach stypendium DAAD w lipcu 2010 roku** oprócz publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego (Nawrot i in. 2014a) była również techniczna praca proteomiczna opublikowana w ***Journal of Proteomics* w 2013 roku** pt. „*Incorrectly*

annotated keratin derived peptide sequences lead to misleading MS/MS data interpretation” (Nawrot i in. 2013b) wskazująca jak ważna jest odpowiednia adnotacja sekwencji umieszczanych w publicznych bazach danych. W pracy tej zwracam uwagę, iż wprowadzenie błędnych danych do bazy może w konsekwencji prowadzić do poważnych błędów w interpretacji wyników identyfikacji białek metodą spektrometrii mas (MS/MS).

Osobnym nurtem badawczym były prace prowadzone we współpracy z Prof. dr hab. med. B. Męczekalskim, kierownikiem Katedry Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w ramach grantów MNiSW i NCN, związane z badaniem czynników mogących mieć związek z niepoznaną jak dotąd etiologią zespołu policystycznych jajników (PCOS) u kobiet w wieku rozrodczym. Prace te zaowocowały publikacją w *Journal of Endocrinological Investigation* w roku 2015 (Męczekalski i in. 2015).

W moim pozostałym dorobku podoktorskim, oprócz prac eksperymentalnych, znajdują się również prace przeglądowe (Musidlak i in. 2014) i rozdziały w monografiach (Goździcka-Józefiak i Nawrot 2014) opisujące wirusy onkogenne oraz mechanizmy obronne roślin. Prace przeglądowe dotyczą popularnego nurtu badań nad białkami i peptydami aktywnymi biologicznie. I tak jedną z moich najlepiej cytowanych prac jest praca przeglądowa omawiająca grupy białek przeciwbakteryjnych u roślin, zwanych **peptydami AMP** (ang. *antimicrobial peptides*) (Nawrot i in. 2014b). W innej pracy opisujemy wraz ze współautorami tzw. **peptydy penetrujące komórkę** (CPP – ang. *cell penetrating peptides*), które umożliwiają transport do wnętrza komórki wielu związków niskocząsteczkowych i farmaceutyków (Durzyńska i in. 2015).

W trakcie mojej kariery naukowej uczestniczyłem w realizacji kilkunastu grantów badawczych MNiSW, NCN i międzyuczelnianych (Załącznik 4), zarówno w charakterze kierownika i głównego wykonawcy (7 projektów), jak i wykonawcy poszczególnych zadań badawczych (8 projektów). W tym drugim przypadku moim zadaniem była najczęściej analiza proteomiczna, np. projekt NCN z Instytutem Ochrony Roślin czy też z Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu. **Aktualnie jestem również opiekunem grantu NCN Preludium nr 2016/21/N/NZ6/00997, którego kierownikiem jest doktorant z Zakładu Wirusologii Molekularnej mgr Oskar Musidlak.**

Warto podkreślić, że moje osiągnięcia naukowe były kilkakrotnie nagradzane **nagrodami zespołowymi II i III stopnia Rektora UAM** (w latach 2008, 2011, 2014, 2015), stypendium młodego doktora (UAM: Unikatowy Absolwent = Możliwości) w roku 2011 oraz stypendium habilitacyjnym (2012-2013). Ponadto w roku 2015 praca magisterska w języku angielskim **Pani mgr Katarzyny Dolaty** pt. „Aktywność cytotoksyczna białek izolowanych z

glistnika jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.) w stosunku do komórek raka szyjki macicy HeLa” wykonana pod moim kierunkiem w latach 2013-2014, została **nagrodzona w XI edycji Konkursu o Nagrodę Miasta Poznania** za wyróżniającą się pracę magisterską.

Bardzo ważnym momentem mojej kariery był **2-miesięczny pobyt na Uniwersytecie Kalifornijskim w Berkeley, USA**, w ramach programu stażowo-szkoleniowego MNiSW pt. „**TOP 500 Innovators**” jesienią 2015 roku. Celem programu było zapoznanie uczestników z procesem komercjalizacji wiedzy w szeroko pojętej Dolinie Krzemowej. Poprzez poznanie podwalin sukcesu tego obszaru w dziedzinie nauki oraz analizy jego przyczyn, staraliśmy się wyciągnąć lekcję dla Polski, w obecnym momencie społeczno-gospodarczym. Efektem wyjazdu jest szeroka sieć kontaktów w całej Polsce, a także USA oraz pomysły dotyczące mojej dalszej kariery naukowej związanej z możliwością komercjalizacji wyników badań naukowych.

2) Przed uzyskaniem stopnia doktora

W latach 2001-2002 w ramach badań do pracy magisterskiej pt. „Charakterystyka wybranych białek wirusa brodawczaka (HPV16) otrzymanych w systemie prokariotycznym i eukariotycznym” prowadziłem badania pod kierunkiem Prof. dr hab. Anny Goździckiej-Józefiak we współpracy z Katedrą Ginekologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu **nad białkami wirusa brodawczaka HPV16 i jego roli w procesie nowotworowym szyjki macicy**. W szczególności zajmowałem się nadekspresją białka E6 HPV16, a następnie jego oczyszczaniem w warunkach natywnych za pomocą chromatografii powinowactwa. Celem tych prac było uzyskanie testu, taniego, szybkiego i prostego, umożliwiającego identyfikację przeciwciał anti-E6 w surowicy kobiet chorych na raka szyjki macicy (o różnym stopniu zaawansowania) HPV dodatnich oraz po szczepieniu przeciw HPV. Powszechnie stosowany immunologiczny test ELISA, dzięki moim wynikom badań, może zostać wykorzystany **do identyfikacji stopnia zaawansowania raka szyjki macicy oraz do oceny stopnia remisji choroby nowotworowej po leczeniu**. Taki test jest stosowany w Katedrze Ginekologii Onkologicznej UM w Poznaniu. Badania te zostały opublikowane w *European Journal of Gynaecological Oncology* w roku 2006 (Kędzia i in. 2006).

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż kończąc studia na kierunku biotechnologia Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, zostałem laureatem prestiżowego **VII**

Konkursu o Nagrodę Procter & Gamble Polska dla Najlepszych Absolwentów Uczelni Wyższych w roku akademickim 2002/2003 (Warszawa, 24.09.2003 r.), a także otrzymałem **medal Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza „za wybitne osiągnięcia w nauce i wyróżniający udział w życiu Uniwersytetu”**, Poznań, 1.10.2003 r.

Rozpoczynając Studium Doktoranckie na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu w październiku 2003 odbyłem miesięczny staż w ramach polsko-francuskiego projektu POLONIUM w laboratorium Prof. Dr Thomas Haertle w **Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)** w Nantes we Francji, gdzie zapoznałem się z metodami badania aktywności przeciwbakteryjnych.

Moje badania do pracy doktorskiej dotyczyły charakterystyki nukleaz izolowanych z soku mlecznego *C. majus* i były realizowane w ramach kilku projektów: KBN, grantu Dziekana Wydziału Biologii UAM oraz grantu międzyuczelnianego UAM/AR. Celem tego ostatniego pt. „Ekstrakcja białek z soku mlecznego *Chelidonium majus* L. w wodnych układach dwufazowych” było opracowanie nowej metody pozyskiwania białek z soku mlecznego *Chelidonium majus* na większą skalę przy pomocy ekstrakcji w wodnych układach dwufazowych. Wyniki badań zostały opublikowane (**Białas i in. 2007**) i służą do otrzymywania ekstraktów roślinnych o zwiększonej zawartości aktywnych biologicznie białek. Główne wyniki mojej pracy doktorskiej wykazały, że aktywność biologiczna soku mlecznego z *C. majus* może być związana z zawartością w nim białek o aktywności nukleolitycznej oraz innych towarzyszących im białek. Wyniki te opublikowałem w **czasopismach *Phytochemistry* oraz *Fitoterapia* w roku 2007 (Nawrot i in. 2007a, b)**. Za przedterminową obronę pracy doktorskiej otrzymałem Nagrodę Rektorską w lipcu 2007 r.

Równoległe z moimi badaniami do pracy doktorskiej realizowałem grant własny MNiI, nr projektu: 2P05E 128 29, dotyczący **identyfikacji bakterii z rodzaju *Leptotrichia* w wymazach z pochwy i szyjki macicy kobiet**. Celem projektu była identyfikacja i ocena częstości występowania bakterii z rodzaju *Leptotrichia* w wymazach z pochwy i szyjki macicy kobiet zainfekowanych ludzkim wirusem brodawczaka, HPV dodatnich i HPV negatywnych. Wynikiem badań było wykrycie współzależności infekcji *L. amnionii* z rozwojem raka szyjki macicy, jednakże bez widocznej korelacji między zakażeniami bakterią *L. amnionii* a wirusem HPV. Wyniki te zostały opublikowane w ***European Journal of Gynaecological Oncology* w roku 2010 (Nawrot i in. 2010b)**.

Literatura

- Agrawal, A.A.; Konno, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **2009**, *40*, 311–331.
- Arora, D.; Sharma, A. A review on phytochemical and pharmacological potential of genus *Chelidonium*. *Pharmacognosy J.*, **2013**, *5*, 184–190.
- Bantignies, B.; Seguin, J.; Muzac, I.; Dedaldechamp, F.; Gulick, P.; Ibrahim, R. Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol. Biol.*, **2000**, *42*, 871e881.
- Barnes, J.; Anderson, L. A.; Phillipson, J. D. *Herbal Medicines*, 3rd ed.; Pharmaceutical Press: London, Grayslake, IL., **2007**.
- Białas, W.; Nawrot, R.; Goździcka-Józefiak, A.; Jankowski, T.; Dembinska, A.; Harajda-Cytacka, E. Thermoseparating of aqueous two-phase systems (ATPS) as an alternative process method for the recovery and purification of the nuclease from *Chelidonium majus*. *Pol. J. Environ. Stud.*, **2007**, *16* (5C), Part I: 32–39.
- Biswas, S. J. *Chelidonium majus* L. - a review on pharmacological activities and clinical effects. *Global J. Res. Med. Plants & Indigen. Med.*, **2013**, *2*, 238–245.
- Brčák, J. Isolates of cucumber mosaic virus from spontaneously infected plants of *Chelidonium majus* and *Impatiens parviflora*. *Biol. Plantarum*, **1979**, *21*(3), 220–223.
- Bufe, A.; Spangfort, M.D.; Kahlert, H.; Schlaak, M.; Becker, W.M. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta*, **1996**, *199*, 413e415.
- Caplan, J.; Padmanabhan, M.; Dinesh-Kumar, S.P. Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe.*, **2008**, *3*(3), 126–135.
- Chadha, P.; Das, R.H. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta*, **2006**, *225*, 213–222.
- Cho, W.K.; Jo, Y.; Chu, H.; Park, S.H.; Kim, K.H. Integration of latex protein sequence data provides comprehensive functional overview of latex proteins. *Mol. Biol. Rep.*, **2014**, *41*(3), 1469–1481.
- Chruszcz, M.; Ciardiello, M.A.; Osinski, T.; Majorek, K.A.; Giangrieco, I.; Font, J.; Breiteneder, H.; Thalassinou, K.; Minor, W. Structural and bioinformatics analysis of the kiwifruit allergen Act d 11, a member of the family of ripening-related proteins. *Mol. Immunol.*, **2013**, *56*, 794e803.
- Colombo, M. L.; Bosisio, E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). *Pharmacol. Res.*, **1996**, *33*, 127–134.
- Decker, G.; Wanner, G.; Zenk, M.H.; Lottspeich, F. Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 3500–3516.
- Dodds, P.N.; Rathjen, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.*, **2010**, *11*(8), 539–548.
- Dong, X. Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2001**, *4*, 309–314.
- Durzyńska, J.; Przysięcka, Ł.; Nawrot, R.; Barylski, J.; Nowicki, G.; Warowicka, A.; Musidlak, O.; Goździcka-Józefiak, A. Viral and other cell penetrating peptides as vectors of therapeutic agents in medicine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2015**, *354*, 32–42.
- Dussourd, D.E.; Eisner, T. Vein-cutting behavior: insect counterploy to the latex defense of plants. *Science*, **1987**, *237*, 898–901.
- Etxenagusia, M. A.; Anda, M.; Gonzalez-Mahave, I.; Fernandez, E.; Fernandez de Corres, L. Contact dermatitis from *Chelidonium majus* (greater celandine). *Contact Dermatitis*, **2000**, *43*, 47.
- Fu, Z.Q.; Dong, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2013**, *64*, 839–863.
- Freeman, B.C.; Beattie, G.A. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*, **2008**, DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01
- Freitas, C.D.; da Cruz, W.T.; Silva, M.Z.; Vasconcelos, I.M.; Moreno, F.B.; Moreira, R.A.; Monteiro-Moreira, A.C.; Alencar, L.M.; Sousa, J.S.; Rocha, B.A.; Ramos, M.V. Proteomic analysis and purification of an unusual germin-like protein with proteolytic activity in the latex of *Thevetia peruviana*. *Planta*, **2016**, *243*(5), 1115–1128.
- Gerenčar, M.; Turecek, P.L.; Kistner, O.; Mitterer, A.; Savidis-Dacho, H.; Barrett, N.P. In vitro and in vivo antiretroviral activity of the substance purified from the aqueous extract of *Chelidonium majus* L. *Antivir. Res.*, **2006**, *72*(2), 153–156.
- Gilca, M.; Gaman, L.; Panait, E.; Stoian, I.; Atanasiu, V. *Chelidonium majus*—an integrative review: traditional knowledge versus modern findings. *Forsch Komplementmed.*, **2010**, *17*(5):241–248.
- Grant, M.; Lamb, C. Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 414–420.

- Goździcka-Józefiak, A.; Nawrot, R. Wirusy onkogenne. W: Anna Goździcka-Józefiak, Henryk Rózański (red.) „Medycyna naturalna w leczeniu i profilaktyce nowotworów.” **2014**, str. 41-50. Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pigoń w Krośnie, Krosno-Wrocław.
- Gururani, M.A.; Venkatesh, J.; Upadhyaya, C.P.; Nookaraju, A.; Pandey, S.K.; Park, S.W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol. Mol. Plant Path.*, **2012**, 78(4), 51-65.
- Hagel, J.M.; Yeung, E.C.; Facchini, P.J. Got milk? The secret life of laticifers. *Trends Plant Sci.*, **2008**, 13(12), 631-639.
- Hrženjak, A.; Ćurković-Perica, M.; Krajacic, M.; Mamula, D. Spontaneous infection of *Chelidonium majus* and *Ligustrum* sp. with cucumber mosaic Cucumovirus (CMV) encapsidating satellite RNA. *Period. Biol.*, **1999**, 101(3), 229-232.
- Hurley, B.; Subramaniam, R.; Guttman, D.S.; Desveaux, D. Proteomics of effector-triggered immunity (ETI) in plants. *Virulence*, **2014**, 5(7), 752-760.
- Huh, S.U.; Paek, K-H. Plant RNA binding proteins for control of RNA virus infection. *Front Physiol.*, **2013**, 4, 397.
- Iakimova, E.T.; Michalczyk, L.; Wolteri Ng, E.J. Hypersensitive cell death in plants – its mechanisms and role in plant defence against pathogens. *J. Fruit Ornament. Plant Res.*, **2005**, 13, 135-158.
- Jakovljevic, Z. D.; Stankovic, S. M.; Topuzovic, D. M. Seasonal variability of *Chelidonium majus* L. secondary metabolites content and antioxidant activity. *EXCLI J.*, **2013**, 12, 260-268.
- Jones, J.D.; Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature*, **2006**, 444, 323-329.
- Jones, J.D.; Vance, R.E.; Dangl, J.L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*, **2016**, 354(6316), pii: aaf6395.
- Kachroo, A.; Robin, G.P. Systemic signaling during plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2013**, 16(4), 527-533.
- Kapoor, L. *Opium Poppy: Botany, Chemistry, and Pharmacology*. CRC Press, **1995**; pp.84.
- Karban, R.; Kuc, J. Induced Resistance Against Pathogens and Herbivores: An Overview. In: Inducible plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, ecology, and agriculture; A. A. Agrawal, S. Tuzun, E. Bent, Ed.; American Phytopathological Society Press: St. Paul, MN (USA), 1999.
- Krstić, G.; Anđelković, B.; Choi, Y.H.; Vajs, V.; Stević, T.; Tešević, V.; Godevac, D. Metabolic changes in *Euphorbia palustris* latex after fungal infection. *Phytochemistry*, **2016**, 131, 17-25.
- Kędzia, W.; Olejnik, A.; Schmidt, M.; Nawrot, R.; Goździcka-Józefiak, A.; Kędzia, H.; Spaczyński, M. The level of antibody against E6 HPV16 oncoprotein in blood sera of women with chronic HPV16 infection and cervical cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **2006**, 27, 65-68.
- Konno, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry*, **2011**, 72(13), 1510-1530.
- Lee, E.J.; Hagel, J.M.; Facchini, P.J. Role of the phloem in the biochemistry and ecophysiology of benzylisoquinoline alkaloid metabolism. *Front. Plant Sci.*, **2013**, 4, 182.
- Lytle, B.L.; Song, J.; de la Cruz, N.B.; Peterson, F.C.; Johnson, K.A.; Bingman, C.A.; Phillips Jr. G.N.; Volkman, B.F. Structures of two *Arabidopsis thaliana* major latex proteins represent novel helix-grip folds. *Proteins*, **2009**, 76, 237e243.
- Maji, A. K.; Banerji, P. *Chelidonium majus* L. (Greater celandine) – A Review on its phytochemical and therapeutic perspectives. *Int. J. Herb. Med.*, **2015**, 3, 10-27.
- Mandadi, K.K.; Scholthof, K.B. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell*, **2013**, 25(5), 1489-1505.
- Męczekalski, B.; Nawrot, R.; Nowak, W.; Czyżyk, A.; Kędzia, H.; Goździcka-Józefiak, A. Study on the zona pellucida 4 (ZP4) gene sequence and its expression in the ovaries of patients with polycystic ovary syndrome. *J. Endocrinol. Invest.*, **2015**, 38, 791-797.
- Michalska, K.; Fernandes, H.; Sikorski, M.M.; Jaskolski, M. Crystal structure of Hyp-1 a St John's wort protein with implication in the biosynthesis of hypericin. *J. Struct. Biol.*, **2010**, 169, 161–171.
- Mithöfer, A.; Boland, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2012**, 63, 431-450.
- Monavari, S. H.; Shahrabadi, M. S.; Keyvani, H.; Bokharaei-Salim, F. Evaluation of in vitro antiviral activity of *Chelidonium majus* L. against herpes simplex virus type-1. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **2012**, 6, 4360-4364.
- Mousavi, A.; Hotta, Y. Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2005**, 120, 169-174.
- Muthamilarasan, M.; Prasad, M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J. Biosci.*, **2013**, 38(2), 433-449.
- Musidlak, O.; Buchwald, W.; Nawrot, R. Plant defense responses against viral and bacterial pathogen infections - focus on RNA binding proteins (RBPs). *Herba Pol.*, **2014**, 60, 60-73.

- Nawrot, R.; Baryliski, J.; Lippmann, R.; Altschmied, L.; Mock, H.P. Combination of transcriptomic and proteomic approaches helps to unravel the protein composition of *Chelidonium majus* L. milky sap. *Planta*, **2016**, *244*, 1055-1064.
- Nawrot, R.; Baryliski, J.; Nowicki, G.; Broniarczyk, J.; Buchwald, W.; Goździcka-Józefiak, A. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* **2014b**, *59*, 181-196.
- Nawrot, R.; Baryliski, J.; Schulze, W.X. Incorrectly annotated keratin derived peptide sequences lead to misleading MS/MS data interpretation. *J. Proteomics*, **2013b**, *91*, 270-273.
- Nawrot, R.; Kalinowski, A.; Goździcka-Józefiak, A. Proteomic analysis of *Chelidonium majus* milky sap using two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, **2007a**, *68*, 1612-1622.
- Nawrot, R.; Kamieniarz, K.; Malinowska, M.; Józefiak, A.; Kędzia, W.; Kwaśniewska, A.; Kuźma, D.; Goździcka-Józefiak, A. The prevalence of *Leptotrichia ammonii* in cervical swabs of HPV positive and negative women. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* **2010b**, *31*, 425-428.
- Nawrot, R.; Lesniewicz, K.; Pienkowska, J.; Goździcka-Józefiak, A. A novel extracellular peroxidase and nucleases from a milky sap of *Chelidonium majus*. *Fitoterapia*, **2007b**, *78*, 496-501.
- Nawrot R. Defense-related proteins from *Chelidonium majus* L. as important components of its latex. *Curr. Prot. Pep. Sci.* **2017a**, *18*, 864-880.
- Nawrot R.; Lippmann R.; Matros A.; Musidlak O.; Nowicki G.; Mock H-P. Proteomic comparison of *Chelidonium majus* L. latex in different phases of plant development. *Plant Physiol. Biochem.*, **2017b**, *112*, 312-325.
- Nawrot, R.; Tomaszewski, L.; Czerwoniec, A.; Goździcka-Józefiak, A. Identification of a coding sequence and structure modeling of glycine-rich RNA-binding protein (CmGRP1) from *Chelidonium majus* L. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **2013a**, *31*, 470-476.
- Nawrot, R.; Wołuń-Cholewa, M.; Białas, W.; Wyrzykowska, D.; Balcerkiewicz, S.; Goździcka-Józefiak, A. Cytotoxic activity of proteins isolated from extracts of *Corydalis cava* tubers in human cervical carcinoma HeLa cells. *BMC Complement. Altern. Med.*, **2010a**, *10*, 78.
- Nawrot, R.; Wołuń-Cholewa, M.; Goździcka-Józefiak, A. Nucleases isolated from *Chelidonium majus* L. milky sap can induce apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells but not in Chinese Hamster Ovary CHO cells. *Folia Histochem. Cytobiol.*, **2008**, *46*, 79-83.
- Nawrot, R.; Zauber, H.; Schulze, W.X. Global proteomic analysis of *Chelidonium majus* and *Corydalis cava* (Papaveraceae) extracts revealed similar defense-related protein compositions. *Fitoterapia*, **2014a**, *94*, 77-87.
- Nessler, C.L. Sequence analysis of two new members of the major latex protein gene family supports the triploid-hybrid origin of the opium poppy. *Gene*, **1994**, *139*(2), 207-209.
- Nomata, T.; Kabeya, Y.; Sato, N. Cloning and characterization of glycine-rich RNA-binding protein cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol.*, **2004**, *45*, 48-56.
- O'Brien, J.A.; Daudi, A.; Butt, V.S.; Bolwell, G.P. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, **2012**, *236*(3), 765-779.
- Onoyovwe, A.; Hagel, J.M.; Chen, X.; Khan, M.F.; Schriemer, D.C.; Facchini, P.J. Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers. *Plant Cell*, **2013**, *25*(10), 4110-4122.
- Park, C.J.; Kim, K.J.; Shin, R.; Park, J.M.; Shin, Y.C.; Paek, K.H. Pathogenesis related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.*, **2004**, *37*, 186e198.
- Pickard, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. *New Phytologist*, **2008**, *177*, 877-888.
- Pospieszny, H.; Borodynko, N.; Jończyk, M. Identification of Cucumber mosaic virus (CMV) from *Chelidonium majus*. *Phytopathol. Pol.*, **2004**, *34*, 93-96.
- Ringli, C.; Keller, B.; Ryser, U. Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*, 1430-1441.
- Sels, J.; Mathys, J.; De Coninck, B.M.; Cammue, B.P.; De Bolle, M.F. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*, **2008**, *46*, 941-950.
- Souza, D.P.; Freitas, C.D.; Pereira, D.A.; Nogueira, F.C.; Silva, F.D.; Salas, C.E.; Ramos, M.V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. *Planta*, **2011**, *234*(1), 183-193.
- Spanò, D.; Pintus, F.; Esposito, F.; Loche, D.; Floris, G.; Medda, R. Euphorbia characias latex: micromorphology of rubber particles and rubber transferase activity. *Plant Physiol. Biochem.*, **2015**, *87*, 26-34.
- Srivastava, A.; Kumar, S.; Jaidi, M.; Raj, S.K. First report of tomato leaf curl New Delhi virus on opium poppy (*Papaver somniferum*) in India. *Plant Dis.*, **2016**, *100*, (1), 232.

- Swoboda, I.; Hoffmann-Sommergruber, K.; O'Riordáin, G.; Scheiner, O.; Heberle-Bors, E.; Vicente, O. Bet V 1 proteins, the major birch pollen allergens and members of a family of conserved pathogenesis-related proteins, show ribonuclease activity in vitro. *Physiol Plant.*, **1996**, *96*, 433–438.
- Sytwala, S.; Günther, F.; Melzig, M.F. Lysozyme- and chitinase activity in latex bearing plants of genus *Euphorbia*--A contribution to plant defense mechanism. *Plant Physiol. Biochem.*, **2015**, *95*, 35-40.
- Tang, J.; Lebas, B.; Liefting, L.; Veerakone, S.; Wei, T.; Ward, L. Opium poppy mosaic virus, a new umbravirus isolated from *Papaver somniferum* in New Zealand. *Arch. Virol.*, **2016**, *161*(1), 197-201.
- Tomè, F.; Colombo, M. L. Distribution of alkaloids in *Chelidonium majus* and factors affecting their accumulation. *Phytochemistry*, **1995**, *40*, 37-39.
- Van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **2006**, *44*, 135-162.
- Wahler, D.; Gronover, C.G.; Richter, C.; Foucu, F.; Twyman, R.M.; Moerschbacher, B.M.; Fischer, R.; Muth, J.; Prüfer, D. Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. *Plant Physiol.*, **2009**, *151*, 334–346.
- Walters, D.; Heil, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **2007**, *71*(1–3), 3-17.
- Wang, X.; Shi, M.; Wang, D.; Chen, Y.; Cai, F.; Zhang, S.; Wang, L.; Tong, Z.; Tian, W.M. Comparative proteomics of primary and secondary luteoids reveals that chitinase and glucanase play a crucial combined role in rubber particle aggregation in *Hevea brasiliensis*. *J. Proteome Res.*, **2013**, *12*(11), 5146-5159.
- de Wit, P.J. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol. Life Sci.*, **2007**, *64*(21), 2726-32.
- Wittstock, U.; Gershenzon, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2002**, *5*(4), 300-307.
- Wu, L.; Chen, H.; Curtis, C.; Fu, Z.Q. Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence*, **2014**, *5*(7), 710-721.
- Van Wyk, B.-E.; Wink, M. *Medicinal plants of the world : an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses*, 1st ed.; Timber Press: Portland, **2004**.
- Zhang, X.; Zhen, J.B.; Li, Z.H.; Kang, D.M.; Yang, Y.M.; Kong, J.; Hua, J.P. Expression profile of early responsive genes under salt stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.*, **2011**, *29*, 626–637.
- Zhou, Y.-F.; Liu, W.-Z. Laticiferous canal formation in fruit of *Decaisnea fargesii*: a programmed cell death process? *Protoplasma*, **2011**, *248*(4), 683-694.
- Zulak, K.G.; Khan, M.F.; Alcantara, J.; Schriemer, D.C.; Facchini, P.J. Plant defense responses in opium poppy cell cultures revealed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry proteomics. *Mol. Cell Proteomics*, **2009**, *8*(1), 86-98.

Robert Nawrot