

dr Ewa Sobieszczuk-Nowicka

Autoreferat

Opis osiągnięć i dorobku naukowego

Poznań, maj 2017

1. Imię i nazwisko: Ewa Sobieszczuk-Nowicka**2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

2000-2005 Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Doktor nauk biologicznych, w zakresie biologii – fizjologia roślin, Wydział Biologii

Pracę doktorską zrealizowałam pod kierunkiem Prof. Jolanty Legockiej w Zakładzie Fizjologii Roślin Wydziału Biologii UAM w Poznaniu. Temat pracy: „Udział poliamin w przyspieszonym przez cytokininę procesie różnicowania się chloroplastów w liściach ogórka” (2005).

1995-2000 Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Magister biotechnologii, absolwentka Wydziału Biologii.

Pracę magisterską zrealizowałam pod kierunkiem Prof. Andrzeja Legockiego w Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Temat pracy: „Gospodarka żelazem w układach roślinnych. Ekspresja genów ferrytyn w tkankach motylkowatej rośliny – łubinu żółtego” (2000).

2000-2001 Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

Manager turystyki i hotelarstwa, studia podyplomowe z zakresu Organizacji i Zarządzania Podmiotami Gospodarki Turystycznej i Hotelarstwa, Wydział Turystyki.

Pracę dyplomową zrealizowałam pod kierunkiem dr hab. Beaty Raszki w katedrze Planowania Przestrzennego, Wydziału Turystyki AWF w Poznaniu. Temat pracy: „Wielkopolski Park Narodowy jako obiekt użytkowania turystycznego” (2001).

1998- 2000 Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznań

Studium Pedagogiczne, specjalność: *nauczanie biologii*, Wydział Biologii

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Adiunkt w Zakładzie Fizjologii Roślin Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

– umowa na czas określony od 01.10.2005 do 31.08.2011

– mianowanie na czas określony od 01.10.2011 do 31.08.2017

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

A) *Tytuł osiągnięcia naukowego*

Funkcje poliamin w indukowanym ciemnością starzeniu liści jęczmienia

B) *Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego*

IF zgodny z rokiem opublikowani; punkty MNiSW (wg wykazu z dn. 23 stycznia 2017 r.)

- 1. E. Sobieszczuk-Nowicka, P. Wieczorek, J. Legocka*. Kinetin affects the level of chloroplast polyamines and transglutaminase activity during senescence of barley leaves. Acta Biochim. Pol. 56: 255-259 (2009). IF₂₀₀₉ 1,262; punkty MNiSW 15**
- 2. E. Sobieszczuk-Nowicka*¹, J. Legocka. Plastid-associated polyamines: their role in differentiation, structure, functioning, stress response and senescence. Plant Biol. 16(2):297-305 (2014). IF₂₀₁₄ 2,633; punkty MNiSW 35**
- 3. E. Sobieszczuk-Nowicka*, A. Zmienko, A. Samelak-Czajka, M. Łukacz, M. Pietrowska-Borek, R. Iorio, S. Del Duca, M. Figlerowicz, J. Legocka. Dark-induced senescence of barley leaves involves activation of plastid transglutaminase. Amino Acids 47:825-838 (2015). IF₂₀₁₅ 3,196; punkty MNiSW 30**
- 4. E. Sobieszczuk-Nowicka*, S. Kubala, A. Zmienko, A. Małecka, J. Legocka. From accumulation to degradation: reprogramming polyamine metabolism facilitates dark-induced senescence in barley leaf cells. Front. Plant Sci. 6:1198.doi: 10.3389/fpls.2015.01198 (2016). IF₂₀₁₅ 4,495; punkty MNiSW 40**
- 5. E. Sobieszczuk-Nowicka*. Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. Amino Acids 49:49–56 (2017). IF₂₀₁₅ 3,196; punkty MNiSW 30**

Sumarycznie: **IF = 14,782; punkty MNiSW = 150**

¹ *autor korespondencyjny

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

WPROWADZENIE

Starzenie roślin jest uporządkowanym, zależnym od energii oraz, według hipotezy deterministycznej, genetycznie zaprogramowanym procesem. Może być ono wynikiem realizowania programu rozwojowego (np. przekwitanie kwiatów, starzenie się liści jesienią) jak i indukowane działaniem czynników środowiskowych takich jak ciemność, niedobór substancji odżywczych, susza (Kopcewicz 2012). Podczas tego procesu zasoby węgla i azotu w postaci prostych związków chemicznych zostają przetransportowane z obumierających organów do młodszych części rośliny gdzie mogą być ponownie wykorzystane (Buchanan-Wollaston i in. 2003, Gregersen i in. 2008). Starzenie może dotyczyć całej rośliny i przejawia się przede wszystkim zahamowaniem wzrostu korzenia i pędu, zmniejszeniem zdolności pobierania wody i soli mineralnych przez korzeń, a także transportowania asymilatów i hormonów. Ponadto u roślin obserwuje się utratę wrażliwości fotoperiodycznej. Zanim jednak dojdzie do śmierci całej rośliny starzeniu i obumieraniu podlegają poszczególne jej organy. W literaturze najwięcej uwagi poświęca się obserwacji tego procesu w odniesieniu do liści, zarówno tych izolowanych, jak i pozostających na roślinach, u których starzenie w dużej mierze zależy od korelacyjnej kontroli ze strony innych organów (Kopcewicz 2012).

Sam proces starzenia liści podzielony został na trzy fazy: inicjacji, polegającej na indukcji programu starzenia, degradacji oraz terminacji, w której dochodzi do obumarcia komórek i odcięcia liścia (Yoshida i in. 2002). W stadium inicjacji ma miejsce zmiana profilu ekspresji genów. Represji podlegają między innymi geny kodujące białka zaangażowane w prawidłowy przebieg fotosyntezy. Należą one do tak zwanych genów SDG (z ang. *Senescence Downregulated Genes*). Dużą rolę w zrozumieniu mechanizmów starzenia odegrało jednak zidentyfikowanie i scharakteryzowanie genów, których ekspresja wzrasta w początkowych fazach starzenia. Są to geny SAG (z ang. *Senescence Associated Genes*) (Quirino i in. 2000). Produkty ich ekspresji pełnią różnorodne funkcje: uczestniczą w degradacji białek (proteazy cysteinowe) i lipidów (lipazy, głównie fosfolipaza D), mobilizacji azotu (aminotransferazy) oraz węgla (liaza izocytrynianowa, syntaza jabłczanowa), transporcie, a także biosyntezie fitohormonów (Buchanan-Wollaston i in. 2003). Pierwszym zewnętrznym symptomem świadczącym o postępujących procesach starzeniowych w obrębie liścia jest jego żółknięcie spowodowane utratą chlorofilu i ujawnieniem obecności pozostałych barwników (między innymi karotenów i ksantofili). W obrębie komórek zachodzą istotne zmiany ultrastrukturalne takie jak: zanik cytoszkieletu, fragmentacja siateczki śródplazmatycznej czy degradacja rybosomów. W jądrze widoczna jest kondensacja chromatyny, którą poprzedza fragmentacja jądrowego DNA. Uszkodzenia chromatyny są nieprzypadkowe i zachodzą pomiędzy nukleosomami jako wynik aktywności specyficznych nukleaz (Simeonova i Mostowska 2001). Poziom oraz aktywność enzymów hydrolitycznych (np. proteaz, endonukleaz, kwaśnych fosfataz) wzrasta w komórce wraz

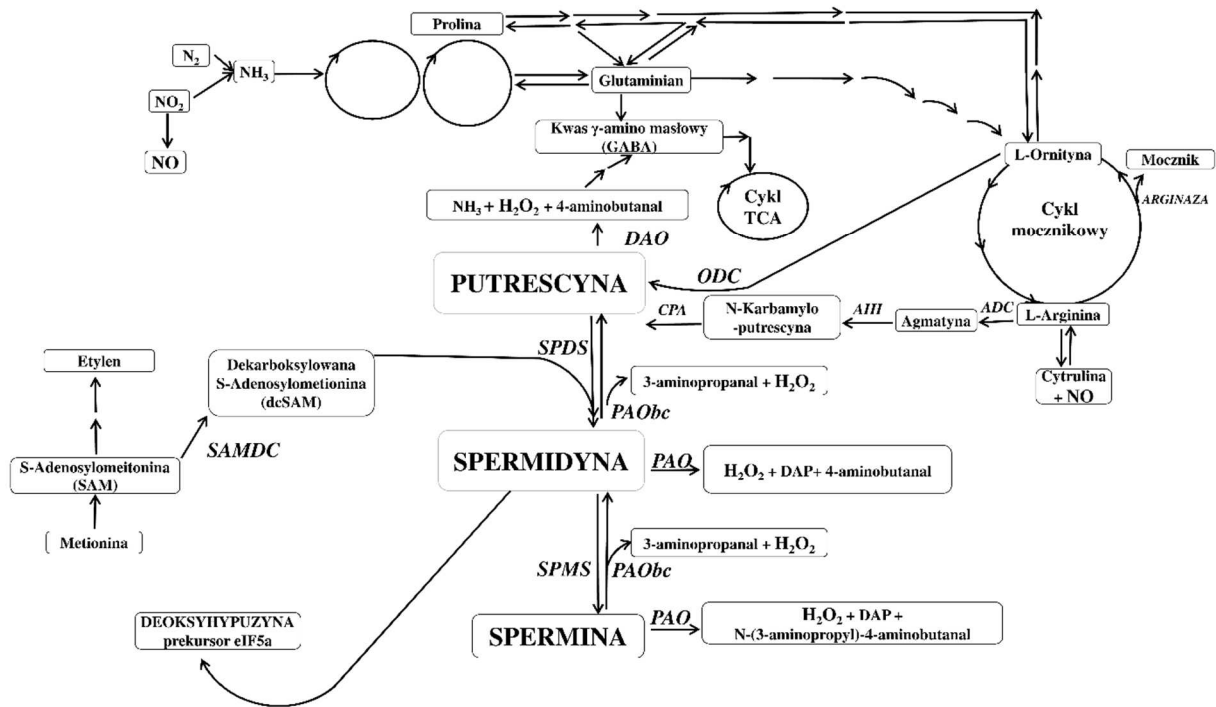
z zaawansowaniem procesu. Enzymy te zaangażowane są w rozkład makromolekuł do prostych związków cukrowych, aminokwasów, związków mineralnych i jonów, które w dalszej kolejności transportowane są do aktywnych metabolicznie części rośliny (Simeonowa i Mostowska 2001). Enzymy hydrolityczne mogą być częściowo deponowane w wakuoli i uwalniane dopiero po zmianie przepuszczalności tonoplastu i przerwaniu jego ciągłości w końcowej fazie obumierania (Wierzchowiecka i in. 2008, Wada i in. 2009, van Doorn i Yoshimoto 2010). Istotnym etapem w procesie starzenia jest zmiana przepuszczalności błony komórkowej. Utrata właściwości błony skutkuje zaburzeniem równowagi jonowej (między innymi w cytoplazmie wzrasta stężenie jonów wapnia), co z kolei wpływa na aktywność enzymów i przebieg wielu szlaków metabolicznych. Wraz z postępowaniem procesu starzenia katabolizm zaczyna przeważać nad anabolizmem. Na skutek degradacji chlorofilu oraz białek anten fotosyntetycznych dochodzi do obniżenia aktywności fotosyntetycznej, a w końcowej fazie starzenia spada również intensywność procesu oddychania komórkowego (Kopcewicz 2012). Dochodzi do nagromadzenia wtórnych metabolitów i związków toksycznych, takich jak kationy amonowe. Skład chemiczny komórki ulega zmianie. W wyniku podwyższonej aktywności enzymów proteolitycznych oraz zahamowania procesów związanych z syntezą białek *de novo* w komórce spada poziom polipeptydów. Maleje również ilość RNA, który w wyniku rozkładu stanowi źródło fosforu (Buchanan-Wollaston i in. 2003).

Zależność pomiędzy starzeniem a programowaną śmiercią komórki (PCD, z ang. *Programmed Cell Death*) nadal pozostaje kwestią sporną wśród badaczy. Część z nich postuluje aby terminu „starzenie” używać w odniesieniu do całych roślin lub ich organów, natomiast pojęcie PCD przypisywać zmianom na poziomie pojedynczej komórki. Inni sugerują całkowite rozgraniczenie obu procesów twierdząc, iż starzenie poprzedza PCD. Dopóki zmiany, które zaszły w obumierającym organie, są w pełni odwracalne możemy mówić o starzeniu. Po przekroczeniu tej granicy mamy do czynienia z PCD (Thomas i in. 2003, van Doorn i Woltering 2004). Starzenie liścia indukowane ciemnością jest, jak wykazaliśmy, również dobrym modelem do badania programowanej śmierci komórki roślinnej. Starzenie indukowane ciemnością to seria transformacji na poziomie molekularnym, biochemicznym oraz cytologicznym opisanych powyżej. Zaawansowane starzenie liścia prowadzi do dezintegracji jądra komórkowego (fragmentacji DNA) i mitochondriów, a kondensacja chromatyny ma miejsce razem z nasileniem ekspresji genów proteaz cysteinowych (SAG12) i symptomów autofagii (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2017, w recenzji).

Proces starzenia jest regulowany poprzez działanie endogennych sygnałów, wśród których opisuje się głównie hormony. Dotyczy to przede wszystkim cytokinin i etylenu. Hormony te w procesie starzenia wykazują antagonistyczne działanie. Wysoki poziom cytokinin hamuje starzenie a etylen przyspiesza ten proces (Trobacher 2009). W badaniach własnych dowiodłam, że regulatorami procesu starzenia są również poliaminy (PA) (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2009, 2014, 2015, 2016, 2017).

Poliaminy są niskocząsteczkowymi organicznymi kationami, należącymi do grupy amin, uczestniczącymi w wielu fizjologicznych i rozwojowych procesach u bakterii, zwierząt i roślin. Najczęściej występującymi w roślinach wyższych PA są putrescyna (Put), spermidyna (Spd) i spermina (Spm) (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka 2007). Biosynteza PA jest dość dobrze poznana i opisana (Rys. 1). PA należą do specyficznej grupy regulatorów wzrostu. W komórce roślinnej występują w stężeniach od mikro- do milimolarnych. Są to stężenia znacznie wyższe od tych charakterystycznych dla hormonów roślinnych (Davies 2006). PA są regulatorami, których sposób działania jest nadal odkrywany. Dzięki występowaniu kationowych grup aminowych i iminowych PA są zdolne do elektrostatycznego wiązania się do grup fosforanowych i karboksylowych takich związków chemicznych jak: kwasy nukleinowe, białka, fosfolipidy i kwaśne polisacharydy. Modyfikują w ten sposób ich konformację i strukturę a co za tym idzie również ich właściwości (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka 2007). PA zlokalizowano w ścianie komórkowej, cytoplazmie, wakuolach, chloroplastach, mitochondriach, jądrze komórkowym i jąderku gdzie mogą występować jako PA wolne, skoniugowane lub kowalentnie związane z białkami struktur komórkowych (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka 2007). Związki te są ściśle związane z przebiegiem wielu procesów fizjologicznych w roślinie. PA są niezbędne dla żywotności komórek z uwagi na ich rolę w fundamentalnych procesach komórkowych, w tym w regulacji transkrypcyjnej i translacyjnej, w integralności strukturalnej i sygnalizacji (Kusano i Suzuki 2015). Co ważne, homeostaza PA jest w komórce ściśle kontrolowana (Moschou i Roubelakis-Angelakis 2013). Wahania stężeń PA w prawidłowo funkcjonującej komórce są mało prawdopodobne.

W latach 1978-2009, pojawiały się pojedyncze doniesienia, szczegółowo posumowane przez mnie w pracy Cai i in. (2015), opisujące antystarzeniowy efekt powodowany przez egzogenną aplikację PA. Molekuły tak istotne dla procesu starzenia wydawały się zatem ciekawym tematem badań, tym bardziej, że wiele pytań dotyczących mechanizmów ich endogenego działania w procesie starzenia pozostawało bez odpowiedzi. Dlatego też **przybliżenie funkcji PA w procesie starzenia stało się tematem moich badań, a publikacje składające się na moje osiągnięcie naukowe koncentrują się wokół problematyki roli PA w regulowaniu procesu starzenia indukowanego ciemnością.**



Rys. 1. Schemat biosyntezy poliamin i interakcja pomiędzy metabolizmem poliamin a innymi ścieżkami metabolicznymi. Synteza poliamin w roślinach rozpoczyna się dekarboksylacją dwóch powszechnie występujących aminokwasów – ornityny i argininy. W wyniku dekarboksylacji argininy powstaje agmatyna, a ta ulega hydrolizie do putrescyny. Putrescyna jest również bezpośrednim skutkiem dekarboksylacji ornityny. Sukcesywne dołączanie grup propylaminowych do putrescyny, kolejno poprzez syntazę spermidyny (SPDS) i dalej syntazę sperminy (SPMS), prowadzi do syntezy spermidyny i sperminy. Biosynteza spermidyny i sperminy związana jest z występowaniem metioniny. Dostarcza ona pośrednio poprzez S-adenosylometioninę (SAM) grupy propylaminowe, a reakcja ta katalizowana jest przez dekarboksylazę S-adenosylometioniny (SAMDC). Oksydazy di- (DAO) i poliaminowe (PAO) katalizują deaminację poliamin. W wyniku działania PAO (PAObc) może również dochodzić do konwersji sperminy do spermidyny i kolejno do putrescyny. ADC, dekarboksylaza argininy; AIH, iminohydrolaza agmatyny; ODC, dekarboksylaza ornityny; CPA, N-karbamiloaminoaminohydrolaza putrescyny; DAP, diaminopropan. (Sobieszczuk-Nowicka i in 2016, publikacja nr 4 osiągnięcia naukowego, zmodyfikowane).

CEL BADAŃ

Badania wchodzące w zakres mojego osiągnięcia naukowego miały na celu sprawdzenie czy w roślinie funkcjonuje określony program przedwczesnego, indukowanego ciemnością, starzenia liścia, w który włączone są poliaminy.

MODEL EKSPERYMENTALNY

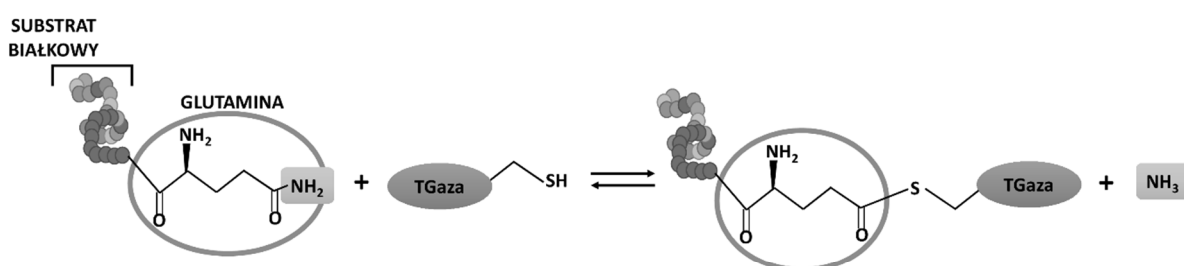
W badaniach wykorzystywano siewki jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L. var Nagradowicki), które uprawiano w glebie, w warunkach laboratoryjnych (fotoperiod 16/8 h, dzień/noc, 23 °C, światło o natężeniu 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, wilgotność 60 %). Proces starzenia liści u 7-dniowych siewek był indukowany ciemnością trwającą od 3 do 12 dni.

OPIS UZYSKANYCH WYNIKÓW

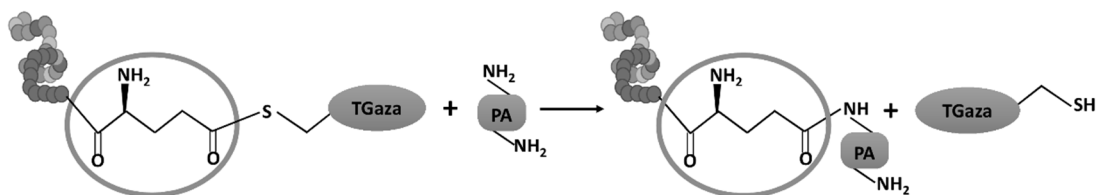
Jak wspomniałam we Wprowadzeniu, homeostaza PA w komórce jest ściśle kontrolowana i wahania stężeń PA w prawidłowo funkcjonującej komórce są mało prawdopodobne. Zmieniająca się pula PA związanych z błonami chloroplastów w starzejących się liściach jęczmienia, opisana w pracy Sobieszczuk-Nowicka i in. (2009, publikacja 1 osiągnięcia naukowego) pt. „Kinetin affects the level of chloroplast polyamines and transglutaminase activity during senescence of barley leaves”, była dla mnie informacją o warunkach, w których metabolizm komórkowy odbiega od warunków homeostazy, co sugerowało, że należy poszukiwać udziału PA w mechanizmach starzenia chloroplastu. Chloroplasty są organellami, w których starzeniowe zmiany pojawiają się najszybciej. Wiemy, że proces obumierania komórki w indukowanym ciemnością starzeniu może być odwracalny, dopóki można przywrócić funkcje chloroplastów (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2017, w recenzji). Zmiany poziomu poliamin związanych z błonami chloroplastów, które zaobserwowałam podczas starzenia się liści jęczmienia wskazywały na sukcesywny wzrost poziomu Put i Spd, podczas gdy ilość związanej Spm malała. Wynik ten sugeruje odmienną rolę układu Put-Spd oraz Spm w starzeniu chloroplastów (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2009, publikacja 1 osiągnięcia naukowego). Spm jest poliaminą związaną w największym stopniu z kompleksem LHCPII i centrum reakcji PSII (Della Mea i in. 2004). W związku z powyższym, rozpad aparatu fotosyntetycznego w wyniku proteolizy i degradacji chlorofilu, pociągających za sobą degradację struktur tylakoidowych, tłumaczy spadek poziomu związanej Spm. Wzrost poziomu Put i Spd wydawał się być zależny od indukowanego ciemnością procesu starzenia (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2009, publikacja 1 osiągnięcia naukowego). Postawiłam hipotezę, że PA mają swój udział w zmianie metabolizmu starzejącego chloroplastu i rearanżacji struktury chloroplastu w gerontoplast, tak jak to ma miejsce w rearanżacji struktury etioplastu w chloroplast w procesie zazieleniania (de-etiolacji) (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka 2014, publikacja 2 osiągnięcia naukowego). Założyłam, że PA wiążą się kowalentnie do białek chloroplastowych (białek błony, stromy i tylakoidów) co zmienia strukturę i/lub funkcję białek. Wiązanie PA do białek to swoista modyfikacja postransalcyjna nazywana dziś poliaminylacją (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka 2014, publikacja 2 osiągnięcia naukowego). Modyfikacja ta jest katalizowana przez transglutaminazy (TGazy, E.C. 2.3.2.13, należące do grupy acylotransferaz) (Rys.2). Udział TGaz w procesie starzenia liścia nie był wcześniej badany. Poprzez zastosowanie specyficznego przeciwciała anti-TGaz w chloroplastach starzejących się komórek mezofilu, wykryłam obecność trzech polipeptydów o masach: 33, 58 i 78kDa (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2009, publikacja 1 osiągnięcia naukowego). Wraz z postępowaniem procesu starzenia po 3 i 7 dni w liściach jęczmienia obniżał się poziom dwóch z nich: 33 i 58 kDa, co pozwala sądzić, że enzymy te zaangażowane są w procesy związane z rozwojem rośliny, prawdopodobnie uczestniczą w formowaniu się gran oraz stabilizacji aparatu fotosyntetycznego podczas jego niezaburzonego funkcjonowania (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2009, publikacja 1 osiągnięcia naukowego). TGaza 78 kDa wydawała się być białkiem zaangażowanym bezpośrednio w proces starzenia. Poziom polipeptydu 78 kDa był niższy w próbach inkubowanych z kinetyną, którą

dodano do układu dla wywołania antystarzeniowego efektu. Kinetyna obniżała również starzeniowo-zależną aktywność enzymu (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2009, publikacja 1 osiągnięcia naukowego). Badane TGazy nie wykazywały aktywności w obecności EGTA (chelator jonów dwuwartościowych), co wskazuje również na ich katalityczną zależność od jonów wapnia (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2009, publikacja 1 osiągnięcia naukowego). Środowisko bogate w Ca^{2+} jest często wymagane do tworzenia wiązań krzyżowych (Sobieszczuk-Nowicka i Legocka 2014, publikacja 2 osiągnięcia naukowego). Tego typu połączenia będą zatem formowane w sytuacji, gdy wapń zostanie uwolniony z wewnątrzkomórkowych rezerwuarów, co ma miejsce w procesie śmierci komórki.

ETAP 1



ETAP 2



Rys. 2. Schemat dwuetapowej reakcji katalizowanej przez transglutaminazy, której wynikiem jest przyłączenie poliaminy (PA) do białka z wolną resztą glutaminy. Pierwszy etap reakcji katalizowanej przez TGazy polega na przyłączeniu enzymu do reszty glutaminy w łańcuchu białkowym (akceptor). Utworzony zostaje kompleks białko–enzym. Jednocześnie następuje odłączenie amoniaku (lub aminy) od grupy γ -karboksamidowej aminokwasu. W drugim etapie wiązanie tioestrowe pomiędzy białkiem a TGazą zostaje rozerwane i w miejsce enzymu do białkowego akceptora przyłącza się kolejny substrat (donor) – pierwszorzędowa grupa aminowa PA i powstaje pochodna mono-(γ -glutamylowa). Opisane wiązanie N,N-bis(γ -glutamyl)aminowe katalizowane przez TGazę może powstawać w obrębie jednego białka lub pomiędzy różnymi białkami dając pochodne bis-(γ -glutamylowe)PA.

Opierając się na wynikach własnych (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2007a i b, 2008, 2009 – publikacja 1 osiągnięcia naukowego) oraz pracach innych zespołów badawczych, w pracy koncepcyjnej Sobieszczuk-Nowicka i Legocka (2014, publikacja 2 osiągnięcia naukowego) – „Plastid-associated polyamines: their role in differentiation, structure, functioning, stress response and senescence” – sformułowaliśmy nowe zadania naukowe i uzasadniłyśmy potrzebę przeprowadzenia badań nad udziałem PA, głównie w funkcjonowaniu starzejącego chloroplastu/organu. W punkcie „Critical Synthesis and Perspectives” w/w artykule przedstawiłam hipotezy badawcze, które zweryfikowałam w kolejnych publikacjach wchodzących w zakres mojego osiągnięcia naukowego.

Publikacja Sobieszczuk-Nowicka i in. (2015, publikacja 3 osiągnięcia naukowego) „Dark-induced senescence of barley leaves involves activation of plastid transglutaminase” uzupełnia naszą wiedzę dotyczącą udziału PA w degradacji chloroplastu o mechanizm regulowany przez chloroplastowe TGazy. W pracy tej proces starzenia badany był w 7-dniowych siewkach jęczmienia, u których proces starzenia analizowano przez kolejne 12 dni. W starzejących liściach mimo znacznej utraty chlorofilu aparat fotosyntetyczny, w 7 dniu inkubacji liści w ciemności, wykazywał maksymalną wydajność kwantową procesów fotochemicznych pomniejszoną o 20% w stosunku do wartości początkowej. Dopiero między 10-12 dniem starzenia wydajność kwantowa PSII spadała o 95%, co może świadczyć o niemal całkowitej degradacji anten fotosyntetycznych. Analiza Real-Time PCR wykazała, że ekspresja genu kodującego *HvPng1-like* TGaz, (jęczmienny homolog *AtPng1P* Arabidopsis zidentyfikowany przez nas w komórkach mezofilu jęczmienia, opisany w pracy Sobieszczuk-Nowicka i in. 2015 – publikacji 3 osiągnięcia naukowego), wzrastała. Krzywa topnienia produktu sugerowała, że powstał jednorodny produkt będący wynikiem ekspresji pojedynczego genu. Gen ten może jednak kodować różne izoformy TGaz (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2009, publikacja 1 osiągnięcia naukowego). Profil ekspresji zidentyfikowanego genu *hvPng1-like* pokazywał jego konstytutywną, niską ekspresję w liściu w czasie niezaburzonego wzrostu (analiza *in silico* na podstawie baz: GeneInvestigator i PLEXdb). Zatem wzrost jego ekspresji po umieszczeniu liści w ciemności wskazywał na starzeniowo-zależną indukcję. Praca Sobieszczuk-Nowicka i in. (2015, publikacja 3 osiągnięcia naukowego) jest uzupełniona o obszerny suplement, w którym po raz pierwszy scharakteryzowano sekwencję jęczmiennej transglutaminazy oraz przedstawiono jej analizę porównawczą (nukleotydową i aminokwasową). W publikacji tej opisano również lokalizację chloroplastowych TGaz *in situ* i ich potencjalny udział w procesach oksydacyjnych zachodzących w starzejącym się chloroplastcie. Diaminopropan (DAP) jest produktem powstającym w wyniku utleniania Spd, Spm i pośrednio Put. Oznaczenie puli DAP, która wzrastała wraz z zaawansowaniem starzenia świadczył o zachodzeniu oksydacji będącej źródłem reaktywnych form tlenu. Powstający w wyniku oksydacji PA H₂O₂ może uruchamiać najpierw w chloroplastach, a później w innych kompartmentach komórki, charakterystyczne dla starzenia liścia procesy lityczne. Dodatkowo pojawianie się DAP w chloroplastach było skorelowane ze spadkiem bis-glutamyłowych pochodnych Put i wzrostem jej pochodnych mono-glutamyłowych, które jak sugeruje się w literaturze są preferowanymi substratami dla oksydaz aminowych (Sobieszczuk-Nowicka i in. publikacja 3 osiągnięcia naukowego). W pracy Sobieszczuk-Nowicka i in. (2015, publikacja 3 osiągnięcia naukowego) zaproponowaliśmy zatem udział TGaz w oksydacyjnej deaminacji PA w starzejącym chloroplastcie. Dodatkowo, weryfikacja proteomiczna - identyfikacja MS/MS białkowych substratów chloroplastowych transglutaminaz, po wcześniejszym wyznakowaniu ich radioaktywną [³H]Put i [³H]Spd, wykazała, że poliaminylacji (modyfikacjom postranslacyjnym z udziałem PA i TGaz) w procesie starzenia liścia indukowanego ciemnością ulegają białka zaangażowane w: i. organizację aparatu fotosyntetycznego, ii. odpowiedź

chloroplastu na stres oraz iii. procesy oksydacyjne (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2015, publikacja 3 osiągnięcia naukowego).

Kolejno weryfikowałam czy w roślinie funkcjonuje określony program przedwczesnego starzenia liścia, w który włączone są poliaminy, w bardziej globalnym, wychodzącym poza chloroplast, ujęciu starzeniowo-zależnych zmian w komórce. W literaturze nie opisano wcześniej tak kompleksowego podejścia do tego zagadnienia. Szukałam odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy anabolizm i/lub katabolizm poliamin połączony jest z sekwencją zmian fizjologicznych obserwowanych w starzejącym organie?
2. Jakie mechanizmy regulują wzrost/spadek puli poliamin uczestniczących w omawianym procesie (synteza *de novo* enzymów uczestniczących w metabolizmie PA, czy zmiany w ich aktywności)?
3. Czy poliaminy są mediatorami starzenia, czy jedynie je kontrolują?
4. Która forma poliamin: wolna, skoniugowana czy związana reguluje ten proces?
5. Czy metabolizm PA wpływa na zmiany w obrębie innych ścieżek metabolicznych kontrolujących starzenie?

Pytania te przeformuowałam w hipotezy i zweryfikowałam eksperymentalnie. Wyniki tych badań zostały omówione w publikacji Sobieszczuk-Nowicka i in. (2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego – „From accumulation to degradation: reprogramming polyamine metabolism facilitates dark-induced senescence in barley leaf cells”). Praca ta została opublikowana w *Frontiers in Plant Science*, research topic „Molecular mechanism underlying polyamines function in plants”, mianowanego do nagrody „First Annual Spotlight Award”. Wyniki konkursu zostaną rozstrzygnięte niebawem.

Po indukcji starzenia wykazałam akumulację wolnych PA, która była wynikiem wzmożonej ekspresji genów szlaków ich biosyntezy, a także podwyższonej aktywności nowosyntetyzowanych enzymów (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego). Starzenie jest procesem wrażliwym na zmiany poziomu hormonów, zwłaszcza cytokinin (Lim i in. 2007). Kinetyna dodana do układu, traktowana jako czynnik opóźniający proces, po ciemnościowej indukcji, blokowała akumulację PA. Na tej podstawie wnioskowałam, że PA, jako takie, nie indukują starzeniowo-zależnych zmian, a ich metabolizm jest regulowany przez inne czynniki ze szlaku sygnalizacji hormonalnej. Na wczesnym etapie starzenia akumulacja wolnych PA może być również odpowiedzią rośliny na pojawiające się w procesach degradacyjnych wolne rodniki. Poliaminy mogą funkcjonować w tym układzie jako ich „wymiatacze”. Funkcja PA w neutralizacji wolnych rodników jest przypisywana ich kationowej naturze oraz stosunkowo łatwej samooksydacji (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego). Wzrost poziomu transkryptów genów enzymów szlaku rozkładu PA i korespondujący

z nimi wzrost aktywności enzymatycznej był kolejnym zdarzeniem zaobserwowanym w procesie starzenia liścia. Z uwagi na obserwowane obniżanie poziomu PA w toku procesu starzenia podjęłam się weryfikacji roli ich katabolizmu. W badaniach wykazałam, że Spd i Spm są produkowane z Put w cytozolu i transportowane do apoplastu. Wynikiem ich oksydacyjnej deaminacji w apoplastie jest produkcja nadtlenu wodoru (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego). W literaturze w reakcji nadwrażliwości opisywana jest sekrecja Spd do apoplastu, która jest katabolizowana przez oksydazę poliaminową do H_2O_2 , który propaguje śmierć komórki (Yoda i in. 2003, 2006). Często opisywany mechanizm poprzedza, albo równolegle wspiera, intensywne syntezy Spd, która ma również miejsce w modelu starzeniowym (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego). Katabolizm Spd i/lub Spm przez oksydazy poliaminowe z uwagi na produkcję wolnych rodników został przeze mnie zaproponowany jako ważne zjawisko sprzyjające starzeniu (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego). Znaczenie katabolizmu PA, w regulowaniu procesu starzenia podkreśliły analizy z użyciem guazatryny, inhibitora aktywności oksydaz poliaminowych (PAO) przy jednoczesnym monitorowaniu stanu fizjologicznego liścia². Zahamowanie aktywności PAO redukowało akumulację Put i podnosiło poziom Spd i Spm, co było efektem spodziewanym, ale był to także efekt, który prowadził do spowolnienia degradacji chlorofilu i ograniczenia produkcji H_2O_2 , spowalniając tym samym proces starzenia. Apoplastyczny poziom Put w starzejącym liściu był marginalny i nieznacznie wzrastał w trakcie procesu. Wykazałam, że Put dominuje w starzeniu jako wolna cytoplazmatyczna amina, która na dalszym etapie procesu tworzyła koniugaty (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego). Koniugatom Put przypisuję rolę metabolitu biorącego udział w remobilizacji azotu i węgla. Fakt, że PA mogą być dla rośliny źródłem organicznego N i uczestniczą w jego obrocie metabolicznym opisał po raz pierwszy Mattoo i in. (2006). Innym, interesującym zdarzeniem metabolicznym, które angażuje PA w procesie starzenia jest udział katabolizmu Put w produkcji kwasu γ -amino masłowego (GABA) (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego) (Rys.1). Profilowanie, na podstawie analizy mikromacierzowej, ekspresji genu dekarboksylazy glutaminianu sugeruje, że synteza GABA z glutaminianu w indukowanym ciemnością starzeniu zostaje zahamowana (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2016, publikacja 4 osiągnięcia habilitacyjnego). Utlenianie Put może stanowić alternatywne źródło GABA. Blokowanie tej ścieżki katabolicznej przyspiesza proces starzenia, a podanie GABA razem z inhibitorem oksydazy diaminowej, aminoguanidyną, przywraca starzeniu kontrolowany bieg. Wynik ten podkreśla jednocześnie rolę GABA jako istotnego metabolitu procesu starzenia. W procesie starzenia równie ważnym elementem regulacji hormonalnej, zależnej od PA, jest synteza etylenu. Jest wiele publikacji, które sugerują, że PA działają antystarzeniowo poprzez inhibicję etylenu. Oba

² Monitorowano proces fotosyntezy poprzez analizę parametrów indukcji fluorescencji chlorofilu *a*, jak również indeksy chl (chlorofil), flv (flawonoidy) oraz NBI (z ang. Nitrogen Balance Index).

metabolity etylen i Spd dzielą ten sam prekursor S-adenozylometioninę (Fig. 1). W pracy Sobieszczuk-Nowicka i in. (2016, publikacja 4 osiągnięcia naukowego) pokazują, że w procesie starzenia synteza obu metabolitów przebiega równolegle.

PODSUMOWANIE

Eksperymentalna weryfikacja koncepcji, które sformowałam na początku swoich badań umożliwiła przedstawienie syntetycznego obrazu udziału PA w indukowanym ciemnością starzeniu liścia. W publikacji Sobieszczuk-Nowicka (2017, publikacja 5 osiągnięcia naukowego) – „Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence” (invited submission) zaproponowałam model działania PA w procesie starzenia liścia. Poniżej wymieniam najważniejsze dane odnoszące się do tego modelu:

1. Zróżnicowany poziom PA związanych z tylakoidami (wzrost poziomów Put i Spd oraz obniżenie poziomu Spm, podczas degradacji chloroplastów) sugeruje odmienne role poszczególnych PA w starzeniu liścia. Wzrost poziomu Put-Spd jest skorelowany ze wzrostem aktywności chloroplastowych TGaz. Obniżanie przez kinetykę puli Put i Spd oraz aktywności TGaz, indukowanych ciemnością, wskazuje na dotąd nie opisany mechanizm działania cytokinin w procesie opóźniania starzenia liści.
2. Starzeniowo-zależne, metaboliczne i strukturalne zmiany w chloroplastach mogą być związane z poliaminową modyfikacją, przy udziale TGaz, białek chloroplastowych. Wzrost poziomu i aktywności TGaz, które znajdują odniesienie we wzroście ekspresji genu *HvPng1-like* (jęczmienny homolog *AtPngIP* TGazy z *Arabidopsis*) regulowany jest z poziomu transkrypcji. Potranslacyjnie modyfikowane przez PA (z udziałem TGaz) białka plastydowe są zaangażowane w odpowiedź komórki na indukowane ciemnością starzenie – włączając odpowiedź na stres, hamowanie fotosyntezy, śmierć komórki.
3. W starzeniu-indukowanym ciemnością obserwowano początkową, intensywną akumulację wolnej formy wszystkich badanych PA (Put, Spd, Spm), po której następował spadek ich miana. Trend ten jest związany z ekspresją genów zarówno biosyntezy jak i katabolizmu PA oraz wzrostem aktywności enzymów uczestniczących w tych dwóch szlakach metabolicznych. Spd i Spm syntetyzowane w cytoplazmie z Put są transportowane do apoplastu i tam utlenianie do H₂O₂ oraz diaminopropanu – metabolitów napędzających procesy degradacyjne. Zahamowanie oksydacji Spd i Spm opóźnia starzenie liści. Poziom samej Put w apoplaste w starzejącym liściu jest niski. Put dominuje w starzeniu jako wolna cytoplazmatyczna amina i formuje koniugaty

kumulowane w starzejącym się organie. Oksydacja wolnej Put, prowadzącą do produkcji GABA, kontroluje tempo przebiegu procesu starzenia. Zastosowanie inhibitora DAO hamującego utlenianie Put przyspiesza starzenie.

WYKORZYSTANIE OTRZYMANYCH WYNIKÓW

Prezentowane badania mają charakter badań podstawowych, które wnoszą nowe informacje na temat udziału poliamin *in vivo* w mechanizmie/mechanizmach indukowanego ciemnością starzenia liścia, a otrzymane wyniki mogą być pomocne w realizacji projektów o bardziej praktycznym zastosowaniu. W ramach programów ulepszania zbóż dla zrównoważonego rolnictwa, czy w programach rozwoju nowych technologii rozważa się już stosowanie poliamin w celu zwiększenia odporności roślin na stresy biotyczne i abiotyczne, co ma przełożyć się na jakość plonu. Pogłębienie wiedzy dotyczącej roli PA w starzeniu powinno doprowadzić do lepszego zrozumienia mechanizmów tego procesu oraz dostarczyć nowej wiedzy na temat ich kontrolowania. Mechanizmy regulujące śmierć komórkową u roślin i zwierząt (włączając w to ludzi), radykalnie różniących się anatomią i fizjologią, ukazują PA jako uniwersalne bioregulatory tego procesu we wszystkich królestwach. Wyniki takich badań mogą przyczynić się nawet do opracowań nowych strategii dotyczących ludzkiego zdrowia.

We współpracy z dr Per L Gregersenem z Aarhus University (Slagelse, Dania) i dr Autarem Matto z United States Department of Agriculture (Maryland, USA) – pracujemy nad projektem “Polyamines cross talk with leaf cell senescence – developing a molecular basis to produce resilient crops for the future” w oparciu o transgeniczne linie jęczmienia z wyciszonymi genami metabolizmu PA. Ponadto, moje dalsze plany naukowe dotyczą weryfikacji hipotezy czy PA w starzeniu liści, które angażuje mechanizmy autofagii, mogą mieć wpływ na „przeprogramowanie” metaboliczne, które prowadzi do śmierci komórki lub jej przeżycia. Stawiam bowiem hipotezę, że PA regulują ścieżki TOR i autofagii. Ścieżka sygnałowa kinazy TOR (z ang. Target of Rapamycin) ma znaczenie w kontrolowaniu poziomu odżywienia komórki eukariotycznej i jej prawidłowego funkcjonowania, a u roślin dodatkowo jej statusu energetycznego (Ren i in. 2012). Kinaza TOR była najpierw poznana jako negatywny regulator autofagii u drożdży i zwierząt (Dann i Tomas 2006). U roślin negatywną regulację autofagii przez kinazę TOR opisali po raz pierwszy Liu and Bassham (2010). W układach zwierzęcych, np. komórkowych liniach nowotworowych, kinazę TOR blokują dodawane do układu PA, które wprowadzają komórki nowotworowe na drogę autofagii (Madeo i in. 2010). Ren i in. (2012) po raz pierwszy zasugerowali również udział PA w regulacji kinazy TOR u roślin. Temat ten nie został jednak rozwinięty, dlatego moje plany badawcze koncentrują się nie tylko wokół poznania

molekularnych mechanizmów kontroli procesu starzenia przy udziale poliamin, ale również wokół tego zagadnienia³.

³ Podjęłam próby pozyskania wsparcia finansowanego na planowane badania: 1. ERA-CAPS Third Joint Call, Project: „Polyamines cross talk with leaf cell senescence. Developing a molecular basis to produce resilient crops for the future”. Ref: SO 1599/1-0, planowany okres realizacji 2018-2021, nie finansowany, leader konsorcjum; 2. NCN Opus NZ3, „Blokowanie szlaków autofagicznych przez poliaminy jako "anty-starzeniowy" mechanizm ich działania w komórkach liścia *Arabidopsis thaliana*”, nr rejestracyjny 2016/23/B/NZ3/00743, planowany okres realizacji 2017-2020, nie finansowany, kierownik; które będą ponowione.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W moim pozostałym dorobku naukowym **znajdują się publikacji również związane z tematyką mojego osiągnięcia habilitacyjnego.** Są to prace: Chojnacka i Sobieszczuk-Nowicka (2009) – „Poliaminy w programowanej śmierci komórki”, Samelak i in. (2010) – „Transglutaminazy i ich biologiczne funkcje”, Zmienko i in. (2015a) – „Selection of reference genes for qPCR- and ddPCR-based analyses of gene expression in senescing barley leaves” oraz Zmienko i in. (2015 b) – „Time course transcriptional profiling of senescing barley leaves” (invited submission), Cai i in. (2015) – „Polyamines are common players in different facets of plant programmed cell death” (invited submission). Publikacje te mają albo charakter przeglądowy (w publikacjach tych omawiane są zagadnienia udziału poliamin w procesach starzenia i programowanej śmierci) albo metodyczny. Dużą wartość stanowi praca Zmienko i in. 2015a bowiem znalezienie właściwych genów referencyjnych do normalizacji eksperymentów qPCR jest sprawą kluczową. Wszelkie obserwowane zmiany w poziomie ekspresji genów, nie wynikające z przyczyn technicznych, a będące odzwierciedleniem rzeczywistych zmian w poziomie ich ekspresji, mogą zafałszować wyniki dla właściwych genów badanych i utrudnić biologiczną interpretację eksperymentu. Badany przez mnie proces (starzenie liści jęczmienia indukowane ciemnością) indukuje procesy degradacji RNA. Kwestia identyfikacji genów o stosunkowo stabilnym poziomie ekspresji była niezwykle istotnym zadaniem, i jak się okazało, o wysokim stopniu trudności. Panuje dość powszechne przekonanie o możliwości uniwersalnego wykorzystania genów 18S RNA oraz genu aktyny jako genów referencyjnych. Jednakże, jak pokazały wyniki naszych doświadczeń geny te nie mogą być wykorzystywane jako geny referencyjne w badaniach na indukowanym ciemnością procesie starzenia. Pierwotnie wyboru genów referencyjnych dokonano na podstawie danych literaturowych. Dodatkowo w pracy rozważano dwa kolejne geny referencyjne: *YLS8* oraz *PP2AA3* sugerowane w publikacjach, w których analizowano procesy starzenia (Zmienko i in. 2015a). Przyczynami odrzucenia powyższych kandydatów na geny referencyjne były: zbyt niska wydajność reakcji qPCR dla genu 18S RNA, zbyt wysoka wydajność reakcji qPCR dla genu aktyny oraz *PP2AA3*. W przypadku genu *YLS8* oczekiwany produkt amplifikacji powstawał w bardzo znikomych ilościach. Ze względu na przedstawione powyżej trudności konieczne okazało się wyszukanie genów referencyjnych dla badanego procesu stosując inne podejście metodyczne. Narzędziem często wykorzystywanym do tego typ zadań jest oprogramowanie RefGenes zintegrowana z bazą danych Genevestigator (<http://www.refgenes.org/rg/>). Program ten pozwala wyszukać geny o możliwie największej stabilności ekspresji w obrębie wybranego zestawu próbek na podstawie danych mikromacierzowych zebranych z 15 różnych gatunków. Niestety, spośród 1625 próbek dostępnych dla jęczmienia w bazie Genevestigator, żadna nie odpowiadała warunkom planowanych przez nas doświadczeń. Dlatego też do sporządzenia własnej listy potencjalnych genów referencyjnych użyto danych uzyskanych z analizy mikromacierzowej. Przebieg eksperymentu mikromacierzowego opisano

w pracy Zmienko i in. (2015b). W ten sposób wyselekcjonowano pięć potencjalnych genów referencyjnych dla badanego procesu. Dla genów tych przeprowadzona została reakcja qPCR, a w późniejszym etapie również ddPCR. Analiza zmian poziomu mRNA dla tych genów w czasie starzenia pokazała, że poziom poszczególnych transkryptów nie jest mocno zmienny i zazwyczaj oscyluje około 1-1,5 krotności. Podobieństwo poziomów ekspresji w poszczególnych próbkach wskazuje na to, że ewentualne zmiany w poziomie produktu w porównaniu z czasem 0 są raczej techniczne. Indywidualne wyjątki od tej reguły (jak gen *Ref05*) uzmysławiają nam, że w biologii uniwersalne geny referencyjne nie istnieją i zastosowanie więcej niż jednego jest jedynym skutecznym zabezpieczeniem przed omyłkowym zafalszowaniem wyników z powodu niespodziewanej zmiany ekspresji genu uznanego za referencyjny.

Obok badań nad rolą PA w przebiegu procesu starzenia liścia zaangażowana byłam w kontynuację badania nad rolą poliamin w stymulowanym przez cytokininę procesie rozwoju chloroplastów w liścieniach ogórka będącego przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

Publikacje Sobieszczuk-Nowicka i in. (2007a) - „Plastid membranes associated polyamines and thylakoid transglutaminases during etioplast-to-chloroplast transformation stimulated by kinetin”, Sobieszczuk-Nowicka i in. (2007b) – „Polyamine metabolism and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression during the cytokinin-stimulated greening process” i Sobieszczuk-Nowicka i in. (2008) – “Transglutaminases and their substrates in kinetin stimulated etioplast-to-chloroplast transformation in cucumber cotyledons”, które powstały we współpracy z Instytutem Genetyki Roślin PAN w Poznaniu oraz Uniwersytetem Bolońskim, przybliżają fizjologiczną rolę PA w procesie zazieleniania. Frakcja wzbogacona w ciało prolamellarne i protylakoidy wyizolowana z etioplastów liścieni ogórka charakteryzowała się wysokim poziomem PA oraz wysokim poziomem i aktywnością TGaz. Zasugerowaliśmy, że PA mogą mieć swój udział w formowaniu się heksagonalnej struktury ciała prolamellarnego. Immunolokalizacja TGazy *in situ* w różnicujących się chloroplastach liścieni ogórka przy użyciu cząsteczek złota koloidalnego pokazała wyznakowane błoniaste struktury ciała prolamellarnego. Etioplasty są organellami, których charakterystyczną cechą jest jedno lub kilka ciał prolamellarnych stanowiących silnie rozbudowaną, przestrzennie parakrystaliczną sieć błoniastych rurek. Ekspozycja etiolowanej siewki na światło prowadzi do reorganizacji błon jednostek tubularnych i tylakoidów pierwotnych w kierunku dojrzałego systemu tylakoidowego z funkcjonalnym aparatem fotosyntetycznym. Ostatecznym rezultatem tej strukturalnej i funkcjonalnej reorganizacji jest ukształtowanie się, w naszym przypadku po około dobie ekspozycji siewki na światło, w pełni dojrzałych chloroplastów identycznych z tymi, jakie mogą się formować z plastydów przedgranowych w zielonych liściach. W omawianych pracach wykazano, że w czasie rozwoju chloroplastów z etioplastów znacząco obniżał się poziom PA. Można było założyć, że PA związane z ciałem prolamellarnym w trakcie procesu transformacji ulegają rozkładowi. Wyrazem tego jest wzrastająca w czasie różnicowania się chloroplastów aktywność oksydaz – DAO i PAO. Utleniane PA mogą być

źródłem azotu w biosyntezie białek chloroplastowych i chlorofilu, gdyż PA są donorami grup aminowych dla α -ketokwasów. Ponadto, grupy aminowe Put mogą być przyłączone do kwasu α -ketoglutazarowego i mogą uczestniczyć w tworzeniu kwasu glutaminowego, który z kolei jest prekursorem chlorofilu. W naszych pracach szczególną uwagę zwróciliśmy na Spd. Wykazaliśmy preferencyjne wiązanie Spd do białek błon tylakoidowych (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2007a). Wynik ten potwierdził nasze założenia o roli Spd jako ważnego komponentu finalnej struktury chloroplastu. Ponieważ tylakoidy są strukturą o znacznym stopniu heterogeniczności strukturalnej i funkcjonalnej, wyizolowaliśmy najobficiej reprezentowany w systemie błon tylakoidowych kompleks PSII α i oznaczyliśmy w nim poziom związanych PA. W wyodrębnionej strukturze poziom Spd i Spm wzrastał w czasie. Na wczesnym etapie różnicowania chloroplastów aktywność i poziom, także *in situ*, chloroplastowej TGazy był znacznie wyższy aniżeli w dojrzałych chloroplastach. Obniżenie poziomu i aktywności enzymu w 24 godz. inkubacji liścieni na świetle sugeruje, że kiedy rozwój chloroplastu jest prawie zakończony również wiązanie się PA do struktur chloroplastu, katalizowane przez TGazę, zostaje wyłączone (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2007a, 2008). Nasze doniesienia były także pierwszymi opisującymi cross-talk cytokininy-poliaminy w regulacji zazieleniania. Postawiono pytanie, na jakim poziomie może cytokinina regulować ten metabolizm? Poprzez analizę wyników hybrydyzacji mRNA typu Northern kluczowego enzymu szlaku biosyntezy Spd - SAMDC oraz analizę aktywności tego enzymu w komórkach liścieni ogórka wykazaliśmy, że kinetyna reguluje ekspresję tego genu. Stwierdziliśmy ponadto, że światło też wpływa na jego ekspresję. Wysoki poziom transkryptu SAMDC stymulowany kinetyną nie był jednak wyrażony wysoką aktywnością tego enzymu w cytoplazmie. Niższa aktywność dekarboksylazy w liścieniach inkubowanych z cytokinina w porównaniu do wariantu kontrolnego była skorelowana z niższą pulą Spd. Zasugerowaliśmy więc stymulowany przez kinetynę transport PA z cytoplazmy do etioplastu/chloroplastu, choć syntezy Spd *de novo* w samym chloroplastie nie możemy wykluczyć (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2007b). Dodatkowo analizy przeprowadzone z wykorzystaniem inhibitorów biosyntezy PA wykazały, że użycie inhibitorów opóźnia/blokuje proces zazieleniania. Użyto antyleukemicznego związku metyloglyksal-bis-guanilu hydrazyny (MGBG), który jest kompetetywnym inhibitorem SAMDC, ale może niespecyficznie obniżać też aktywność ADC i PAO oraz dicykloheksylaminy (DCHA), która jest kompetetywnym i odwracalnym inhibitorem syntazy Spd/Spm (Sobieszczuk-Nowicka i in. 2007b). Powyżej opisane prace oryginalne uzupełniono o publikacje o zbliżonej tematyce, które mają charakter przeglądowy i zostały wydrukowane w Postęпах Biologii Komórki: Legocka i Sobieszczuk-Nowicka (2004) – „Poliaminy w chloroplastach”, Sobieszczuk-Nowicka i in. (2005) – „Roślinne transglutaminazy” i Sobieszczuk-Nowicka i Legocka (2007) – „Nowe podejścia w badaniach nad rolą poliamin w komórce roślinnej”. **W obszarze regulacji procesu zazieleniania, stymulowanego cytokinina, pozostaje również jeszcze jedna praca, w której jestem współautorką, mówiąca o regulacji syntezy chlorofilu i LHCP II przez endogenny poziom wapnia.** Endogenny poziom wapnia wpływa na działanie cytokininy na te

procesy (Legocka i Sobieszczuk-Nowicka 2014 – „Calcium variously mediates the effect of cytokinin on chlorophyll and LHCP II accumulation during greening in barley leaves and cucumber cotyledons”).

Poliaminy, odgrywają także istotną rolę w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. To ujęcie działania PA jest, między innymi, zainteresowaniem naukowym Pani Profesor Jolanty Legockiej. Nasza współpraca w tym temacie zaowocowała oryginalnymi pracami badawczymi: Legocka i Sobieszczuk-Nowicka (2012) – „Sorbitol and NaCl stresses affect free, microsome-associated and thylakoid-associated polyamine content in *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*”), Legocka i in. (2015) – „Lead-stress induced changes in the content of free, thylakoid- and chromatin-bound polyamines, photosynthetic parameters and ultrastructure in greening barley leaves” oraz rodziałem Legocka i Sobieszczuk-Nowicka (2010) „Udział fitohormonów i poliamin w reakcjach komórek roślin na czynniki stresowe” w monografii „Reakcje komórek roślin na czynniki stresowe”, [red] Woźny i Goździcka-Józefiak. W pracach tych opisana jest korelacja pomiędzy endogenną pulą PA a ich ochronną funkcją po zadziałaniu czynnika stresowego (zasolenie, metale ciężkie). W pracy Legocka i Sobieszczuk-Nowicka (2012) opisano PA jako bioindykatory stresu osmotycznego i zasolenia. Zmieniające się miano ich form wolnych i związanych z błonami tylakoidów i mikrosomami w reakcji na stres osmotyczny i solny pokazuje, że gatunki wrażliwe na stres charakteryzują się obniżonym poziomem PA wszystkich frakcji w przeciwieństwie do gatunków odpornych, które utrzymują miano PA na wysokim poziomie. Praca Legocka i in. (2015) opisuje angażujące PA mechanizmy obronne komórek liści, ekspozowane na działanie ołowiu w trakcie procesu rozwojowego (zazieleniania). W badaniach wykazaliśmy ochronny efekt wywierany przez PA, a w szczególności Spm. Suplementacja stresowanych liści jęczmienia Spm powodowała obniżenie zawartości nadtlenu wodoru oraz stopnia peroksydacji związków lipidowych, będącego miarą nasilenia stresu oksydacyjnego. Jednocześnie obserwacje ultrastruktury komórek i analiza zawartości PA związanych z frakcją chromatyny sugerują ochronny udział Spm w jądrze komórkowym na DNA zapobiegający uszkodzeniom oksydacyjnym chromatyny.

Jestem również współautorką prace z zakresu dydaktyki biologii – Rybska, Sobieszczuk-Nowicka (2015) – „Neurobiologia roślin - nauczanie z zastosowaniem debaty oksfordzkiej przy realizacji treści budzących kontrowersje” **oraz z zakresu dydaktyki szczegółowej** realizowanej we współpracy z Wydziałową Pracownią Dydaktyki i Ochrony Przyrody UAM. Praca Rybska i Sobieszczuk-Nowicka (2015) stanowi przykład koncepcyjnego ujęcia tematu w ramy debaty, podczas której uczestnicy wymieniając się argumentami mogą opowiadać się za jednym bądź drugim stanowiskiem. W pozostałych pracach z zakresu dydaktyki biologii moja uwaga skierowana była na możliwości dokonywania zmian koncepcyjnych w wiedzy osobistej uczniów i studentów. Punktem wyjścia do takich zmian jest poznanie błędnych przekonań, jakie istnieją w umysłach uczniów czy studentów i udzielenie odpowiedzi na pytanie: czy istniejące problemy w rozumieniu pojęć i mechanizmów związanych z biologią roślin taksowane u studentów mogą mieć swoje podłoże

w niezweryfikowanych w toku kształcenia przed-akademickiego błędnych mniemaniach. Takie naiwne, zdroworozsądkowe koncepcje (z ang. misconceptions) są niekiedy trwalsze niż wiedza naukowa. Zdarza się, że podręczniki szkolne upraszczając opis zjawisk wspierają istnienie błędnych przekonań w umysłach uczących się. Badania nad problemami w rozumieniu zjawisk pobierania wody przez komórkę roślinną i ruchów roślin są marginalnie traktowane w analizach jakościowych przeprowadzanych przez dydaktyków szczegółowych, dlatego sami podjęliśmy ten temat (Jędrzykowski i in. 2014 – „Diagnoza miskoncepcji z obszaru ruchów roślin wśród studentów biologii”, Malińska i in. 2014 – „Osmoza dotyczy wody, a dyfuzja innych cząsteczek. Czyli błędnie mniemanie studentów o procesach dyfuzji i osmozy”, Malińska i in. 2016 – „Teaching about water relations in plant cells: an uneasy struggle”). Diagnozy opierano na badaniach sondażowych, ilościowo-jakościowych o charakterze eksploracyjnym i przeprowadzano je w dwóch etapach (przed rozpoczęciem i po zakończeniu bloku ćwiczeniowego – kurs fizjologia roślin). Diagnozowaliśmy alternatywne koncepcje z obszaru ruchów roślin i procesów dyfuzji, osmozy i plazmolizy. Badania pozwalają wnioskować, że większość uczniów, opuszczając szkołę średnią, ma tak silnie zakorzenione błędne mniemanie o tych procesach, że w toku edukacji akademickiej nie zostaje ono weryfikowane i najprawdopodobniej stanowi barierę w definiowaniu i rozumieniu tych pojęć w sposób naukowy. Studenci na wcześniejszych etapach edukacji kształtują swoją osobistą wiedzę o biologii roślin błędnie. Jeśli błędy te nie zostaną zdiagnozowane i wyeliminowane będą wywierać niekorzystny wpływ na rozumienie realizowanego materiału. Wynika z tego, że student, który gromadzi na wykładach czy zajęciach laboratoryjnych lub poprzez naukę własną z podręczników merytoryczne informacje, które są obrazowane odpowiednio dobranymi do prezentowanego zjawiska doświadczeniami, nie potrafi poprawnie interpretować badanego zjawiska. Pomimo tego, że student nie zaniedbał swoich obowiązków i nauczył się wymaganej definicji, nie rozumie jej jednak w układzie przyczynowo-skutkowym. Z przeprowadzonych badań wynika przede wszystkim, że wiedza studentów nie jest ustrukturalizowana (obecne w umysłach studentów konstrukty myślowe nie tworzą spójnej reprezentacji omawianych zjawisk, czego efektem jest używanie pełnych pojęć, ale bez rozumienia). Owszem, studenci posiadli jakieś informacje, często po kursie z fizjologii roślin zasób tych informacji jest bogatszy, znają terminy naukowe, ale nie są gotowi używać tych wiadomości w sposób świadomy i przetwarzać ich celem np. rozwiązywania problemów czy nawet rozumienia zjawisk. W przeprowadzonym badaniu widać wyraźnie to, co po raz pierwszy zauważyli Osborne i Wittrock (1983), a mianowicie proste dodawanie informacji do już istniejącej wiedzy nie zmienia istniejących konstruktów myślowych u adresatów procesu edukacyjnego. Studenci mają więc wiedzę fragmentaryczną, nie weryfikują swoich błędnych przekonań, tylko budują nowe. W efekcie, po zajęciach studenci mieli więcej błędnych mniemań niż przed zajęciami. Jeśli się nie zainterweniuje, to zniekształcona definicja pojęć związanych z biologią roślin, która jest w umyśle studenta i powstała wraz z konstruowaną przez niego wiedzą osobistą (jest jego immanentną częścią), stanowi barierę do definiowania i rozumienia omawianych zagadnień w sposób akademicki, co jest równoważne

z brakiem efektu kształcenia. Zdiagnozowane, przykładowe błędne koncepcje z badanego zakresu treści to np.:

- a. dotyczące ruchów roślin: fototaksja, fotonastia i fototropizm to pojęcia tożsame, grawitropizm utrzymuje roślinę w podłożu/ dobrze ją ukorzenia/odżywia ją, fototropizm służy roślinie do pobierania energii słonecznej, fototropizm to ruch chloroplastów;
- b. dotyczące osmozy: osmoza dotyczy wody, a dyfuzja innych cząsteczek, osmoza zachodzi tylko w komórkach zwierzęcych, osmoza zachodzi tylko w komórkach roślinnych.

W moim dorobku znajdują się również publikacje, które są pokłosiem realizacji prac dyplomowych. Publikacje Stróżycki i in. (2002) – “Differential expression and evolutionary analysis of three-member ferritin gene family in legume plant *Lupinus luteus*” i Stróżycki i in. (2003) – “Iron management in legume plant development and nodulation”, to **nurt badań dotyczących gospodarki żelazem w roślinach**. W pracach tych prezentowana jest głównie analiza, na poziomie sekwencji, ekspresji genu i zawartość białka oraz lokalizacji tkankowej trzech zidentyfikowanych klas ferrytyn u łubinu żółtego. Natomiast, publikacja Sobieszczuk i Raszka (2001) – „**Środowisko przyrodnicze Wielkopolskiego Parku Narodowego, jako obiekt użytkowania turystycznego i dydaktycznego**”, charakteryzuje obszar Wielkopolskiego Parku Narodowego w aspekcie przystosowania go do funkcji turystyki krajoznawczej. **W moim dorobku wykazuje także publikację poruszającą zagadnienia popularnonaukowe** takie jak: „**Co rośliny robią zimą?**” – rzecz o fizjologii roślin zimozielonych (Wojtyła i in. 2015).

Poprzez powyższy opis osiągnięcia habilitacyjnego i dorobku naukowego oraz wykaz opublikowanych prac naukowych i wskaźników dokonań naukowych, przedstawionych szczegółowo w załączniku 6, które są podstawą o ubieganie się o stopień doktora habilitowanego, podsumowałam moją aktywność naukową.

Zacytowana literatura:

Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D. The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotech. J.* 1: 3-22 (2003).

Cai G, **Sobieszczuk-Nowicka E**, Aloisi I, Fattorini L, Serafini-Fracassini D, Del Duca S. Polyamines are common players in different facets of plant programmed cell death. *Amino Acids* 47:27-44 (2015).

Chojnacka A, **Sobieszczuk-Nowicka E**. Poliaminy w programowanej śmierci komórki. *Post. Biol. Kom.* 36: 161-169 (2009).

Dann SG, Thomas G. The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 580(12): 2821-2829 (2006).

Davies PJ (red.). *Plant hormones*. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands (2006).

Della Mea M, Caparros-Ruiz D, Claparolos I, Serafini-Fracassini D, Rigau J. AtPng1p: The First Plant Transglutaminase. *Plant Physiol.* 135: 1-9 (2004).

Gregersen PL, Holm P, Krupinska K. Leaf senescence and nutrient remobilization in barley and wheat. *Plant Biol.* 10(1): 37-49 (2008).

Jędrzykowski M, Rybska E, Adamiec M, **Sobieszczuk-Nowicka E**. Diagnoza miskoncepcji z obszaru ruchów roślin wśród studentów biologii. *Edukacja Biol. i Środ.* S1/2014, 99-106 (2014).

Kopcewicz J. Starzenie się roślin [w] Kopcewicz J, Lewak S [red.] *Fizjologia roślin*. Wa-wa, Wyd. Naukowe PWN str. 587-606 (2012).

Kusano T, Suzuki H. Polyamines - an universal molecular nexus for growth, survival and specialized metabolism. Tokyo: Springer (2015).

Legocka J, **Sobieszczuk-Nowicka E**. Poliaminy w chloroplastach. *Post. Biol. Kom.* 31(1): 143-153 (2004).

Legocka J, **Sobieszczuk-Nowicka E**. Udział fitohormonów i poliamin w reakcjach komórek roślin na czynniki stresowe. [w] *Reakcje komórek roślin na czynniki stresowe*. [red] Woźny A, Goździcka-Józefiak A. Wydawnictwo Naukowe UAM, rozdz. 3, str. 255-277 (2010).

Legocka J, **Sobieszczuk-Nowicka E**. Sorbitol and NaCl stresses affect free, microsome-associated and thylakoid-associated polyamine content in *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*. *Acta Physiol. Plant.* 34:1145-1151 (2012).

Legocka J, **Sobieszczuk-Nowicka E**. Calcium variously mediates the effect of cytokinin on chlorophyll and LHCPII accumulation during greening in barley leaves and cucumber cotyledons. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 56(2):1-8 (2014).

Legocka J, **Sobieszczuk-Nowicka E**, Wojtyła Ł, Samardakiewicz S. Lead-stress induced changes in the content of free, thylakoid- and chromatin-bound polyamines, photosynthetic parameters and ultrastructure in greening barley leaves. *J. Plant Physiol.* 186: 15-24 (2015).

Lim P, Nam H. Aging and senescence of the leaf organ. *J. Plant Biol.* 50(3): 291-300 (2007).

Liu Y, Bassham DC. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 5(7): e11883. doi:10.1371/journal.pone.0011883 (2010).

Madeo F, Tavernarakis N, Guido Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nature Cell Biol.* 12: 842-846 (2010).

Malińska L, Rybska E, **Sobieszczuk-Nowicka E**, Adamiec M. Osmoza dotyczy wody, a dyfuzja innych cząsteczek. Czyli błędnie mniemanie studentów o procesach dyfuzji i osmozy. *Edukacja Biol. i Środ.* S1/2014, 81-91 (2014).

Malińska L, Rybska E, **Sobieszczuk-Nowicka E**, Adamiec M. Teaching about Water Relations in Plant Cells: An Uneasy Struggle. *CBE-Life Sci. Educ.* 15:ar78 (2016).

Mattoo AK, Sobolev AP, Neelam A, Goyal RK, Handa AK, Segre AL. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions. *Plant Physiol.* 142:1759-1770 (2006).

Moschou PN, Roubelakis-Angelakis KA. Polyamines and programmed cell death. *J. Exp. Bot.* 3:1061-1066 (2013).

Osborne J, Wittrock M. Learning Science: a generative process. *Science Educ.* 67, 489-508 (1983).

Rybska E, **Sobieszczuk-Nowicka E**. „Neurobiologia roślin” - nauczanie z zastosowaniem debaty oksfordzkiej przy realizacji treści budzących kontrowersje. [w] *Echa ideatorium. Z doświadczenia nauczycieli akademickich, uczestników 2. Konferencji Dydaktyki Akademickiej "Ideatorium" na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.* [red.] Mytnik-Ejsmont J, Głac W, Majcher I. Wyd. Uniwersytet Gdański, str. 147-159 (2015).

Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S, David Logan, Mattoo A, Selvaraj G, Datla R. Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24(12): 4850-4874 (2012).

Samelak A, **Sobieszczuk-Nowicka E**, Legocka J. Transglutaminazy i ich biologiczne funkcje. *Post. Biol. Kom.* 37: 599-613 (2010).

Simeonova E, Mostowska A. Biochemiczne i molekularne aspekty starzenia się liści. *Post. Biol. Kom.* 28: 17-32 (2001).

Sequera-Mutiozabal MI, Erban A, Kopka J, Atanasov KE, Bastida J, Fotopoulos V, Alcázar R, Tiburcio AF. Global metabolic profiling of *Arabidopsis polyamine oxidase 4 (AtPAO4)* loss-of-function mutants exhibiting delayed dark-induced senescence. *Front. Plant Sci.* 7:173, doi: 10.3389/fpls.2016.00173 (2016).

Sobieszczuk-Nowicka E, Solińska M, Legocka J. Roślinne transglutaminazy. *Post. Biol. Kom.* 32(3):463-476 (2005).

Sobieszczuk-Nowicka E, Legocka J. Nowe podejścia w badaniach nad rolą poliamin w komórce roślinnej. *Post. Biol. Kom.* 34: 527-540 (2007).

Sobieszczuk-Nowicka E, Di Sandro A, Del Duca S, Serafini-Fracassini D, Legocka J. Plastid membranes associated polyamines and thylakoid transglutaminases during etioplast-to-chloroplast transformation stimulated by kinetin. *Physiol. Plant.* 130: 590-601 (2007a).

Sobieszczuk-Nowicka E, Rorat T, Legocka J. Polyamine metabolism and S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression during the cytokinin-stimulated greening process. *Acta Physiol. Plant.* 29: 495-502 (2007b).

Sobieszczuk-Nowicka E, Krzesłowska M, Legocka J. Transglutaminases and their substrates in kinetin stimulated etioplast-to-chloroplast transformation in cucumber cotyledons. *Protoplasma* 233: 187-194 (2008).

Sobieszczuk-Nowicka E, Wieczorek P, Legocka J. Kinetin affects the level of chloroplast polyamines and transglutaminase activity during senescence of barley leaves. *Acta Biochim. Pol.* 56:255-259 (2009).

Sobieszczuk-Nowicka E, Legocka J. Plastid-associated polyamines: their role in differentiation, structure, functioning, stress response and senescence. *Plant Biol.* 16:297-305 (2014).

Sobieszczuk-Nowicka E, Zmienko A, Samelak-Czajka A, Łuczak M, Pietrowska-Borek M, Iorio R, Del Duca S, Figlerowicz M, Legocka J. Dark-induced senescence of barley leaves involves activation of plastid transglutaminases. *Amino Acids* 47:825-838 (2015).

Sobieszczuk-Nowicka E, Kubala S, Zmienko A, Małecka A and Legocka J. From accumulation to degradation: reprogramming polyamine metabolism facilitates dark-induced senescence in barley leaf cells. *Front. Plant Sci.* 6:1198,doi: 10.3389/fpls.2015.01198 (2016).

Sobieszczuk-Nowicka E. Polyamine catabolism adds fuel to leaf senescence. *Amino Acids* 49:49-56 (2017).

Sobieszczuk-Nowicka E, Wrześniński T, Bagniewska-Zadworna A, Kubala Sz, Polcyn W, Rucińska-Sobkowiak, Misztal L, Mattoo AK. Defining dark-induced leaf senescence and its reversal phase in the monocot barley: genetic, physiological and cytological analyses (w recenzji).

Stróżycki PM, Skąpska A, Kołaczowska-Szcześniak K, **Sobieszczuk E**, Legocki AB. Iron management in legume plant development and nodulation. [w] Nitrogen fixation, global perspectives. [red.] Finan TM, O'Brian MR, Layzell DB, Vessey KJ, W Newton. CABI Publishing str. 21-28 (2002).

Stróżycki PM, Skąpska A, Kołaczowska-Szcześniak K, **Sobieszczuk E**, Briat JF, Legocki AB. Differential expression and evolutionary analysis of three-member ferritin gene family in legume plant *Lupinus luteus*. *Physiol. Plant.* 118:380-389 (2003).

Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C, Stead AD. Defining senescence and death. *J. Exp. Bot.* 54:1127-1132 (2003).

Trobacher CH. Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany* 87: 757-769 (2009).

Quirino BF, Noh YS, Himbelblau E, Amasino RM. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* 5: 278-282 (2000).

Wojtyła Ł, Adamiec M, **Sobieszczuk-Nowicka E**. Co rośliny robią zimą? *Edukacja Biol. i Środ.* 01/2014 PL [SWF]: 3-11 (2014).

Wada S, Ishida H. Chloroplasts autophagy during senescence of individually darkened leaves. *Plant Signal. Behav.* 4:565-567 (2009).

Wierzchowiecka M, Samardakiewicz S, Woźny A. Programowana śmierć komórki roślinnej – proces o „wielu twarzach”. *Kosmos* 57:43-52 (2008).

Van Doorn WG, Woltering EJ. Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *J. Exp. Bot.* 55: 2147-2153 (2004).

Van Doorn W, Yoshimoto K. Role of chloroplasts and other plastids in ageing and death of plants and animals: A tale of Vishnu and Shiva. *Age. Res. Rev.* 9: 117-130 (2010).

Zmienko A, Samelak-Czajka A, Goralski M, **Sobieszczuk-Nowicka E**, Kozłowski P, Figlerowicz M. Selection of reference genes for qPCR- and ddPCR-based analyses of gene expression in senescing barley leaves. *PLoS ONE* 10(2): e0118226. doi:10.1371/journal.pone.0118226 (2015a).

Zmienko A, Goralski M, Samelak-Czajka A, **Sobieszczuk-Nowicka E**, Figlerowicz M. Time course transcriptional profiling of senescing barley leaves. *Genomics Data* 4: 78-82 (2015b).

Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* 132:1973-1981 (2003).

Yoda H, Hiroi Y, Sano H. Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* 142:193-206 (2006).

Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A. Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29:427-437 (2002).

Ewa Sobieszczuk-Nowicka