

AUTOREFERAT

Informacje o dorobku i osiągnięciach naukowych

Metabolizm Substancji Zapasowych Podczas Rozmnażania Płciowego oraz Wczesnych Etapów Rozwoju Oliwki Europejskiej (*Olea europaea* L.)

dr Agnieszka Zienkiewicz

Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
ul. Wileńska 4
87-100 Toruń



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

1. Imię i nazwisko

Agnieszka Zienkiewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

13.06.2002: Dyplom magistra biologii uzyskany na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika (Toruń), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi¹. Praca magisterska pt. „Badania nad aktywnością florigeniczną, składem biochemicznym oraz metodami uzyskiwania eksudatu floemowego *Pharbitis nil*” wykonana w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin². Promotor: Prof. dr hab. Jan Kopcewicz.

01.06.2007: Dyplom doktora nauk biologicznych uzyskany na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika (Toruń), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rola białka Zeitlupe i Fototropiny u rośliny dnia krótkiego *Pharbitis nil*” wykonana w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin². Promotor: Prof. dr hab. Jan Kopcewicz. Recenzenci: prof. dr hab. Franciszek Dubert, prof. dr hab. Stefan Malepszy.

¹Obecna nazwa Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

²Obecna nazwa Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1.07. 2017–obecnie: Adiunkt w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń (urlup bezpłatny w związku z zagranicznym stażem podoktorskim).

15.05.2016–obecnie: Staż podoktorski w Zakładzie Biochemii Roślin, Uniwersytet w Getyndze, Niemcy (Department of Plant Biochemistry, University of Göttingen).

15.05.2014-14.05.2016: Staż podoktorski w Department of Biochemistry and Molecular Biology, Great Lakes Bioenergy Research Center, Michigan State University, East Lansing, Stany Zjednoczone.

1.01.2014-14.05.2014: Staż podoktorski w Zakładzie Biologii Reprodukcyjnej Roślin, Estación Experimental del Zaidín, Spanish National Research Council. Grenada, Hiszpania.

1.01.2011-31.12.2013: Stypendysta w ramach programu JAE Doc w podoktorski w Zakładzie Biologii Reprodukcyjnej Roślin, Estación Experimental del Zaidín, Spanish National Research Council, Grenada, Hiszpania.

1.11.2008-31.12.2010: Staż podoktorski w Zakładzie Biologii Reprodukcyjnej Roślin, Estación Experimental del Zaidín, Spanish National Research Council. Grenada, Hiszpania.

1.10.2008-30.06.2016: Adiunkt w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin¹, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń (urlup bezpłatny w związku z zagranicznym stażem podoktorskim).

2003-30.09.2008: Asystent w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin¹ Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.

¹Obecna nazwa Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Cykl publikacji z lat 2010-2016, pod wspólnym tytułem:

„Metabolizm Substancji Zapasowych Podczas Rozmnażania Płciowego oraz Wczesnych Etapów Rozwoju Oliwki Europejskiej (*Olea europaea* L.)“.

4.2. Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (Impact Factor (IF) roku wydania wg bazy Journal Citation Reports, liczba cytowań wg bazy Web of Science, punkty wg MNiSW)

4.2.1. Jiménez-López JC*, **Zienkiewicz A***, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI. (2016) Biogenesis of protein bodies during legumin accumulation in developing olive (*Olea europaea* L.). *Protoplasma* 253: 517-530. (IF₂₀₁₆=2.870; punktacja MNiSW=30).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1) współudziale w tworzeniu koncepcji pracy oraz zaplanowaniu doświadczeń; 2) wykonaniu doświadczeń polegających na: przygotowaniu i analizie prób przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego oraz mikroskopu świetlnego, izolacji białek, SDS-PAGE oraz wykonaniu Western-blottingu; [wyniki tych badań zostały zamieszczone na rycinach: 1, 2, 3, oraz 5]; 3) współudziale w interpretacji wyników; 4) współudziale w napisaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz w korekcie pracy. **Mój udział procentowy szacuję na 35%** (* równy wkład w powstanie pracy).

4.2.2. **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Rejón JD, Alché JD, Castro AJ, Rodríguez-García MI. (2014a) Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *Journal of Experimental Botany* 65: 103-115. (IF₂₀₁₄=5.526; punktacja MNiSW=45).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1) opracowaniu koncepcji pracy oraz zaplanowaniu doświadczeń; 2) wykonaniu następujących eksperymentów: wykrywanie aktywności enzymatycznych w żelach poliakrylamidowych, izolacja białek, SDS-PAGE oraz wykonanie Western-blottingu, qRT-PCR, analiza aktywności enzymatycznych przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego; [wyniki tych badań zostały zamieszczone na rycinach:

1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, S2, S4] 3) napisaniu w całości tekstu oraz korekcie manuskryptu po recenzjach. **Mój udział procentowy szacuję na 65%.**

4.2.3. Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rodríguez-García MI. (2014b) Storage lipids in developing and germinating pollen grain of flowering plants. W: Ramawat KG, Sukhadia ML, Merillon JM, Shivanna KR. Reproductive Biology of Plants. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, FL (USA). ISBN: 9781482201321, str. 133-146. (IF₂₀₁₄=0; punktacja MNiSW=5).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1) opracowaniu koncepcji pracy; 2) opracowaniu graficznym wyników i schematów [rycina 3, 4 oraz 5]; 3) napisaniu trzech podrozdziałów tekstu oraz korekcie manuskryptu po recenzjach. **Mój udział procentowy szacuję na 80%.**

4.2.4. Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rejón JD, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2013) New insights into early steps of oil body mobilization during pollen germination. *Journal of Experimental Botany* 64: 293-302. (IF₂₀₁₃=5.794; punktacja MNiSW=45).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1) opracowaniu koncepcji pracy oraz zaplanowaniu doświadczeń, 2) wykonaniu następujących eksperymentów: wykrywanie aktywności enzymatycznych w żelach poliakrylamidowych, izolacja białek, SDS-PAGE oraz wykonanie Western-blottingu, analiza aktywności enzymatycznych przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego, analiza statystyczna; [wyniki tych badań zostały zamieszczone na rycinach: 1, 2, 3, 5, 6, 7, S1, S2, S3, S6, S7, S8, S9]; 3) napisaniu całości tekstu oraz korekcie manuskryptu po recenzjach. **Mój udział procentowy szacuję na 65%.**

4.2.5. Rejón JD, Zienkiewicz A, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2012) Profiling and functional classification of esterases in olive (*Olea europaea*) pollen during germination. *Annals of Botany* 110: 1035-1045. (IF₂₀₁₂=3.449; punktacja MNiSW=40).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1) współudziale w tworzeniu koncepcji pracy oraz zaplanowaniu doświadczeń; 2) wykonaniu doświadczeń polegających na: wykrywaniu aktywności enzymatycznych w żelach poliakrylamidowych; [wyniki tych badań zostały zamieszczone na rycinach: 3 oraz 5]; 3) równym współudziale w pisaniu wstępnej wersji manuskryptu z pierwszym autorem, 4) współudziale przy korekcie pracy. **Mój udział procentowy szacuję na 35%.**

4.2.6. Zienkiewicz A*, Jiménez-López JC*, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI. (2011a) Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* seed germination and seedling growth. *Protoplasma* 248: 751-765. (IF₂₀₁₁=1,922; MNiSW=20).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1) współdziałanie w tworzeniu koncepcji pracy oraz zaplanowaniu doświadczeń, 2) wykonaniu doświadczeń polegających na: izolacji białek, SDS-PAGE oraz wykonaniu Western-blottingu, immunofluorescencji, barwieniach histochemicznych, [wyniki tych badań zostały zamieszczone na rycinach: 2, 4, 5, 6]; 3) równym współdziałaniem przy pisaniu wstępnej wersji manuskryptu; 4) równym współdziałaniem przy korekcie pracy. **Mój udział procentowy szacuję na 40%** (* równy wkład w powstanie pracy).

4.2.7. Zienkiewicz K, **Zienkiewicz A**, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2011b) Characterization of a caleosin expressed during olive (*Olea europaea* L.) pollen ontogeny. BMC Plant Biology 11: 122. (IF₂₀₁₁=3.447; punktacja MNiSW=40).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1) współdziałanie w tworzeniu koncepcji pracy oraz zaplanowaniu doświadczeń; 2) wykonaniu doświadczeń polegających na: izolacji białek, SDS-PAGE oraz wykonaniu Western-blottingu; [wyniki tych badań zostały zamieszczone na rycinach: 2, 6, 8]; 3) współdziałanie przy pisaniu wstępnej wersji manuskryptu ;4) współdziałanie przy korekcie pracy. **Mój udział procentowy szacuję na 35%**.

4.2.8. Zienkiewicz K, Castro AJ, Alché JD, **Zienkiewicz A**, Suárez C, Rodríguez-García MI. (2010) Identification and localization of a caleosin in olive (*Olea europaea* L.) pollen during *in vitro* germination. *Journal of Experimental Botany* 61: 1537-1546. (IF₂₀₁₀=4.818; punktacja MNiSW=32).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: 1) współdziałanie w tworzeniu koncepcji pracy oraz zaplanowaniu doświadczeń; 2) wykonaniu doświadczeń polegających na: izolacji białek, SDS-PAGE oraz wykonaniu Western-blottingu, analizie statystycznej; [wyniki tych badań zostały zamieszczone na rycinach: 1, 2, 4]; 3) współdziałanie przy pisaniu wstępnej wersji manuskryptu; 4) współdziałanie przy korekcie pracy. **Mój udział procentowy szacuję na 15%**.

Sumaryczny Impact Factor (IF – dla roku opublikowania) prac wchodzących w skład osiągnięcia wynosi: **27,826**

Suma punktów MNiSW w pracach wchodzących w skład osiągnięcia wynosi: **257**

Łączna liczba cytowań według: Web of Science: **58**, Google Scholar: **123**

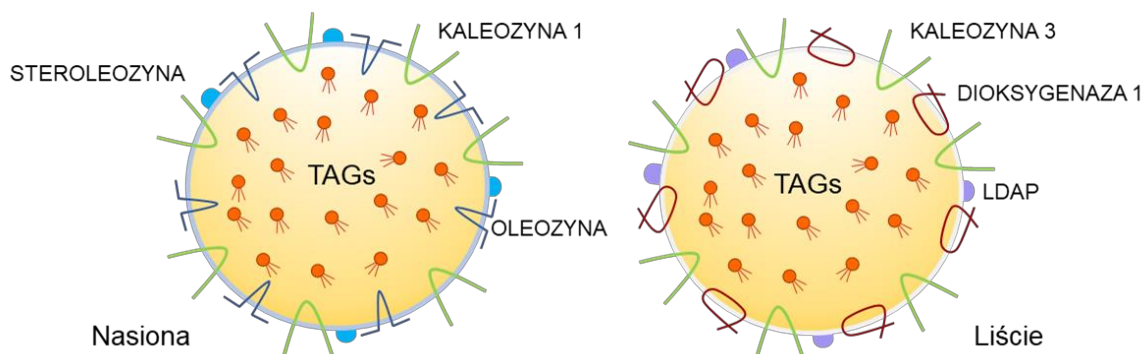
4.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych w latach 2010-2016 w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports oraz w jednym rozdziale książkowym. Sumaryczny Impact Factor (zgodny z rokiem opublikowania) tych pozycji wynosi 27,826 a sumaryczna liczba punktów MNiSW to 257.

4.3.1. Wstęp

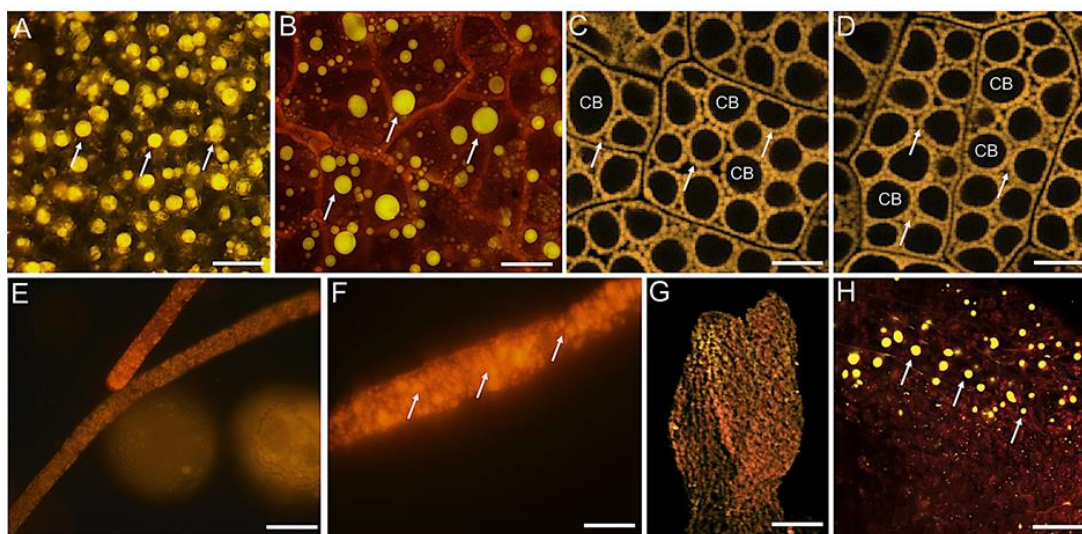
Substancje zapasowe gromadzone w roślinnych tkankach spichrzowych zużywane są na różnych etapach wyrostu i rozwoju roślin, np. w czasie kiełkowania nasion, wzrostu łagiewki pyłkowej czy w odpowiedzi na niekorzystne dla roślin warunki środowiska (Bewley i Black, 1994). Do najważniejszych substancji zapasowych magazynowanych w komórkach roślinnych należą: cukry (min. skrobia magazynowana w postaci charakterystycznych ziaren), białka zapasowe (magazynowane min. w postaci ciał białkowych) oraz tłuszcze (magazynowane min. w postaci ciał olejowych) (Herman i Larkins, 1999, Ball i Morell, 2003, Zienkiewicz i wsp., 2011a, Zienkiewicz i wsp., 2013, Zienkiewicz i wsp., 2014a, Zienkiewicz i wsp., 2014b). Substancje zapasowe odgrywają istotną rolę w życiu roślin stanowiąc materiał energetyczny oraz budulcowy wykorzystywany podczas okresów wzmożonej aktywności metabolicznej (Bewley i Black, 1994, Murphy 2012). Przeważająca liczba organizmów eukariotycznych gromadzi tłuszcze jako główny materiał zapasowy. Jednym z miejsc gromadzenia się tłuszczu zapasowego, a także jego mobilizowania w komórce są sferyczne organelle zwane ciałami olejowymi (ang. *oil bodies*) lub kroplami tłuszczowymi (ang. *lipid droplets*) (Murphy 2012). Organelle te gromadzone są min. w organach i tkankach roślin oleistych takich jak nasiona, owoce (Baud i Lepiniec, 2010, Zienkiewicz i wsp., 2011a), ziarna pyłku oraz łagiewka pyłkowa (Rodríguez-García i wsp., 2003, Jiang i wsp., 2009, Zienkiewicz i wsp., 2010). Wnętrze ciał olejowych składa się z rdzenia złożonego z triacylogliceroli (TAG), otoczonego pojedynczą warstwą fosfolipidową w której zakotwiczone są białka pełniące funkcje strukturalne (Huang, 1994) (Ryc. 1). Ciała olejowe izolowane z nasion oleistych charakteryzują się obecnością białek strukturalnych należących do trzech rodzin: kaleozyn (kaleozyna 1), oleozyn oraz steroleozyn (Huang, 2008) (Ryc. 1). Z kolei ciała olejowe syntetyzowane w komórkach starzejących się liści posiadają w swej budowie odmienny zestaw białek strukturalnych do których zaliczamy: kaleozynę 3, białko związane z ciałami

olejowymi (ang. *lipid droplet-associated protein*, LDAP), oraz α -dioksygenazę (DOX1) (Ryc. 1) (Shimada i wsp., 2015).



Rycina 1. Schemat ilustrujący strukturę ciał olejowych w nasionach oraz liściach *A. thaliana*. Powierzchnie ciał olejowych tworzy pojedyncza warstwa fosfolipidowa otaczająca hydrofobowy rdzeń zawierający tłuszcze obojętne głównie triacyloglicerole (TAGs). W skład ciał olejowych nasion pozostających w stanie spoczynku wchodzi trzy białka strukturalne – kaleozyna 1, oleozyna oraz steroleozyna. Ciała olejowe liści charakteryzują się obecnością trzech głównych białek strukturalnych do których należy - kaleozyna 3, LDAP, oraz α -dioksygenaza.

Do niedawna ciała olejowe traktowane były jako bierne organelle komórkowe magazynujące tłuszcze wykorzystywane następnie jako źródło energii. Dopiero badania z ostatnich lat wykazały, że ciała olejowe są wysoce dynamicznymi strukturami komórkowymi, aktywnie zaangażowanymi w tworzenie błon biologicznych jak również w kontrolowanie metabolizmu tłuszczu na poziomie komórkowym (Barbosa i Siniosoglou, 2017). Z uwagi na fakt, iż nasiona roślin oleistych gromadzą głównie tłuszcze jako materiał zapasowy i posiadają liczne i prominentne ciała olejowe w swoich komórkach, to właśnie te organy były pierwszym modelem w badaniach nad biologią, metabolizmem i strukturą ciał olejowych u roślin (Tzen i Huang, 1992, Chen i wsp., 1998, Miquel i wsp., 2014). Pomimo licznych badań prowadzonych na ciałach oleistych wciąż wiele zagadnień dotyczących ich roli oraz metabolizmu zarówno w nasionach jak również w innych organach i tkankach pozostaje bez odpowiedzi. W publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe zostały przedstawione nowe wyniki badań nad regulacją metabolizmu tłuszczu zapasowego w komórkach roślinnych. Obiektem badawczym wykorzystanym w niniejszych pracach były nasiona i ziarna pyłku oliwki europejskiej (*Olea europaea* L.) – gatunku powszechnie uprawianego w krajach Europy południowej (Hiszpania, Portugalia, Grecja). Oliwka europejska zaliczana jest do grupy roślin oleistych, których nasiona oraz owoce zawierają od 20 do 70% tłuszczu, magazynowanego w formie ciał olejowych, (Ryc. 2), dlatego też są jednym z głównych surowców wykorzystywanych do produkcji olejów roślinnych.



Rycina. 2. Lokalizacja ciał olejowych w różnych komórkach oliwki europejskiej (*Olea europaea* L.). Tłuszcze zapasowe (strzałki) zostały wybarwione przy użyciu Czerwieni Nilu. A) mezokarp, B) łupina nasienna, C) bielmo, D) zarodek, E) łagiewki pyłkowe, F) fragment łagiewki pyłkowej, G) słupek, H) znamię słupka, CB- ciała białkowe (dane nie publikowane)

Większość badań mających na celu poznanie roli i funkcji białek biorących udział w formowaniu oraz degradacji ciał olejowych jest prowadzonych z wykorzystaniem modelowej rośliny oleistej *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity). Dużym ułatwieniem w tych badaniach jest fakt, iż T-DNA mutanty *A. thaliana* są powszechnie dostępne co umożliwia funkcjonalną analizę białek regulujących metabolizm ciał olejowych. Niestety pomimo możliwości wykorzystywania mutantów *A. thaliana* brak jest danych na temat biologii tych organelli szczególnie w trakcie rozwoju ziarna pyłkowego oraz wzrostu łagiewki pyłkowej. Może to wynikać z faktu iż kwiaty *A. thaliana*, a co za tym idzie również ziarna pyłku, charakteryzują się nie wielkim rozmiarem, co znacznie utrudnia przeprowadzenie wielu doświadczeń. Dlatego też wykorzystanie kwiatów oliwki europejskiej po raz pierwszy umożliwiło szczegółową analizę ekspresji i lokalizacji białek zaangażowanych w metabolizm ciał olejowych podczas rozwoju ziarna pyłkowego oraz wzrostu łagiewki pyłkowej. Ponadto stosując szeroki zakres technik mikroskopowych oraz biochemicznych przeprowadziłam także kompleksową analizę zmian zachodzących na poziomie komórkowym podczas rozwoju i kielkowania nasienia oraz wzrostu siewki oliwki europejskiej. Wyniki moich badań wchodzących w skład 7 publikacji naukowych oraz jednej monografii w języku angielskim przedstawiłam poniżej w postaci dwóch mini rozdziałów. W pierwszej części opisałam metabolizm substancji zapasowych podczas rozwoju ziarna pyłku oraz wzrostu łagiewki

pyłkowej oliwki europejskiej. W drugiej części zaprezentowałam natomiast wyniki doświadczeń dotyczących metabolizmu substancji zapasowych w trakcie rozwoju i kiełkowania nasienia oraz wzrostu siewki oliwki europejskiej.

Metabolizm Substancji Zapasowych Podczas Rozwoju Ziarna Pyłku oraz Wzrostu Łagiewki Pyłkowej Oliwki Europejskiej (*Olea europaea* L.)

Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rodríguez-García MI. (2014b) Storage lipids in developing and germinating pollen grain of flowering plants. W: Ramawat KG, Sukhadia ML, Merillon JM, Shivanna KR. Reproductive Biology of Plants. CRC Press Taylor & Francids, Boca Raton, FI (USA). ISBN: 9781482201321, str. 133-146.

Zienkiewicz K, Castro AJ, Alché JD, **Zienkiewicz A**, Suárez C, Rodríguez-García MI. (2010) Identification and localization of a caleosin in olive (*Olea europaea* L.) pollen during in vitro germination. *Journal of Experimental Botany* 61: 1537-1546.

Zienkiewicz K, **Zienkiewicz A**, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2011b) Characterization of a caleosin expressed during olive (*Olea europaea* L.) pollen ontogeny. *BMC Plant Biology* 11: 122.

Rozwój oraz kiełkowanie ziaren pyłku i wzrost łagiewki pyłkowej są procesami o kluczowym znaczeniu podczas płciowego rozmnażania roślin okrytozalążkowych. Wzrost łagiewki pyłkowej jest procesem wymagającym dużego nakładu energii, która jest uzyskiwana min., podczas mobilizacji substancji zapasowych (Zienkiewicz i wsp., 2011b, Zienkiewicz i wsp., 2014b). Substancje zapasowe gromadzone są w trakcie rozwoju ziarna pyłku obejmującego mikrosporogenezę oraz gametogenezę (McCormick, 1993, Zienkiewicz i wsp., 2014b), a ich synteza odbywa się głównie na terenie cytoplazmy komórki wegetatywnej rozwijającego się ziarna pyłku (Bednarska, 1988, McCormick, 1993, Zienkiewicz i wsp., 2011b). Podczas rozwoju ziarna pyłku oliwki europejskiej główny materiał zapasowy jakim są tłuszcze (triacyloglicerole) magazynowany jest w formie ciał olejowych, których liczba wzrasta liniowo osiągając najwyższy poziom w dojrzałym ziarnie pyłku (Zienkiewicz i wsp., 2011b, Zienkiewicz i wsp., 2014b). Obecność ciał olejowych w dojrzałym ziarnie pyłku potwierdzono również dla takich gatunków jak *Brassica napus*, *Tradescantia bracteata*, *Gossypium hirsutum*, *Lilium longiflorum* czy *Arabidopsis thaliana* (Mephram i Lane, 1970, Charzyńska i wsp., 1989, Wetzel i Jensen, 1992, Van Aelst i wsp., 1993, Jiang i wsp., 2007). Z kolei podczas kiełkowania ziarna pyłku obserwuje się znaczny spadek liczby tych struktur

związany z ich mobilizacją w trakcie wzrostu łagiewki pyłkowej (Zienkiewicz i wsp., 2010, Zienkiewicz i wsp., 2014b). Na podstawie opisanego wzorca liczebności ciał olejowych w różnicującym się i kielkującym pyłku oliwki założono, iż ciała olejowe stanowią główne źródło energii potrzebnej do szybkiego wzrostu łagiewki pyłkowej.

Wcześniejsze badania prowadzone na ciałach olejowych izolowanych z nasion roślin oleistych wykazały obecność trzech białek strukturalnych związanych z tymi organellami: oleozyny, kaleozyny oraz steroleozyny (Frandsen i wsp., 1996, Lin i Tzen, 2004). Analiza struktury ciał olejowych izolowanych z ziaren pyłku lillii (*Lilium longiflorum*) wykazała, obecność jedynie dwóch białek strukturalnych: oleozyny oraz kaleozyny (Jiang i wsp., 2008). Porównanie sekwencji białkowej kaleozyny zidentyfikowanej w ciałach olejowych izolowanych z ziaren pyłku lillii z sekwencjami białkowymi kaleozyn zdeponowanych w banku genów (www.ncbi.nlm.nih.gov) wykazało wysoki stopień homologii pomiędzy sekwencją tego białka a sekwencją kaleozyny 3 zidentyfikowanej u rzodkiewnika pospolitego. Interesujący wydaje się fakt, że u *A. thaliana* kaleozyna 3 jest białkiem strukturalnym związanym z ciałami olejowymi gromadzącymi się w starzejących się liściach (Shimada i wsp., 2015). W genomie rzodkiewnika pospolitego zidentyfikowano osiem genów kodujących kaleozynę (Shen i wsp., 2014). Grupa ta obejmuje osiem kaleozyn (1-8) o masie molekularnej od 25 kDa do 35 kDa, które posiadają trzy wysoce konserwowane domeny - pojedynczy centralny region hydrofobowy, który kotwiczy białko w błonie i w rdzeniu ciała olejowego oraz dwie amfipatyczne, C- i N-końcowe domeny o charakterze hydrofilnym skierowane do cytozolu (Naested i wsp., 2000). Charakterystyczną cechą N-końca kaleozyny jest obecność pojedynczego motywu typu „EF-hand”, odpowiedzialnego za wiązanie jonów wapnia (Ca^{2+}) (Naested i wsp., 2000). W celu określenia, czy kaleozyna również wchodzi w skład ciał olejowych izolowanych z ziaren pyłku oliwki europejskiej zastosowano metodę immunoprecypitacji w której wykorzystano przeciwciało pierwszorzędowe skierowane przeciwko kaleozynie 3 z *A. thaliana* (Zienkiewicz i wsp., 2010). W rezultacie otrzymano pasmo białkowe o masie około 30 kDa, które następnie poddano analizie za pomocą techniki spektrometrii mas. Na podstawie uzyskanych danych potwierdzono, iż białko to wykazuje podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasowej do kaleozyny zidentyfikowanej w ciałach olejowych izolowanych z ziaren pyłku lillii (Zienkiewicz i wsp., 2010). Ponieważ wykorzystane w powyższych doświadczeniach przeciwciało pierwotne okazało się specyficzne względem kaleozyny w ziarnach pyłku oliwki europejskiej zdecydowałam się wykonać również analizę poziomu ekspresji tego białka w trakcie rozwoju ziarna pyłku

(Zienkiewicz i wsp., 2011b) oraz podczas wzrostu łagiewki pyłkowej *in vitro* (Zienkiewicz i wsp., 2010) stosując technikę Western-blottingu. W doświadczeniach tych obserwowano stopniowy wzrost poziomu kaleozyny w trakcie rozwoju ziarna pyłkowego (Zienkiewicz i wsp., 2011b) oraz jego spadek w trakcie wzrostu łagiewki pyłkowej w warunkach *in vitro* (Zienkiewicz i wsp., 2010). Uzyskane wyniki potwierdzają, iż akumulacja oraz spadek poziomu kaleozyny jest ściśle skorelowany z, odpowiednio, syntezą ciał olejowych, podczas rozwoju ziarna pyłku oraz ich degradacją w trakcie kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej. W celu określenia lokalizacji komórkowej kaleozyny wykonano detekcję powyższego białka przy użyciu wspomnianego już przeciwciała pierwotnego, zarówno na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego jak i mikroskopu elektronowego (Zienkiewicz i wsp., 2010, 2011b). Podczas rozwoju ziarna pyłku oliwki europejskiej kaleozynę lokalizowano zarówno w komórkach tapetum oraz na terenie ściany komórkowej i cytoplazmy rozwijającej się mikrospory. Wykorzystanie mikroskopu elektronowego potwierdziło obecność ziaren koloidalnego złota świadczących o obecności kaleozyny w dojrzałym ziarnie pyłku zarówno w obszarze ściany komórkowej i cytoplazmy oraz na powierzchni ciał olejowych (Zienkiewicz i wsp., 2010). Wysoki poziom fluorescencji świadczący o obecności kaleozyny wykazano również na obszarze ciał olejowych oraz w pojedynczej błonie (tonoplast) wakuoli w trakcie kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej *in vitro* (Zienkiewicz i wsp., 2011b). Dodatkowo stosując metodę immunolokalizacji z wykorzystaniem oczyszczonych ciał olejowych izolowanych z dojrzałego oraz kiełkującego ziarna pyłkowego potwierdzono kolokalizację kaleozyny z tymi organellami, które identyfikowano za pomocą barwienia Czerwienią Nilu (ang. *Nile Red*). Czerwień Nilu należy do grupy związków powszechnie stosowanych do wykrywania struktur bogatych w tłuszcze zarówno w tkankach roślinnych oraz zwierzęcych (Greenspan i wsp., 1985, Siloto i wsp., 2006). Opisane wyniki dotyczące ekspresji oraz lokalizacji kaleozyny dostarczyły pierwszych informacji na temat przypuszczalnej roli tego białka podczas rozwoju ziarna pyłku oraz wzrostu łagiewki pyłkowej. Lokalizacja kaleozyny na terenie ściany komórkowej ziarna pyłku może świadczyć o istotnej roli tego białka podczas kiełkowania ziarna pyłku na znamieniu słupka. Ponadto fakt lokalizacji kaleozyny na terenie tonoplastu może wskazywać na jej udział w interakcjach pomiędzy ciałami olejowymi oraz wakuolą. Istotnie, w badaniach na kiełkujących nasionach *A. thaliana* wykazano, że kaleozyna jest odpowiedzialna za interakcję pomiędzy ciałami olejowymi oraz wakuolą oraz bierze udział w ich degradacji na terenie wakuoli (Poxleitner i wsp., 2006).

Jak wspomniano powyżej kaleozyny posiadają pojedynczy motyw typu „EF-hand” odpowiedzialny za wiązanie jonów wapnia (Ca^{2+}). Większość białek wiążących Ca^{2+} charakteryzuje się występowaniem dwóch motywów typu „EF-hand” odpowiedzialnych za wiązanie dwóch jonów wapnia w tzw. hydrofobowej kieszeni (Ikura, 1996). Dlatego też w przypadku kaleozyny zaproponowano odmienny model wiązania jonów wapnia. Proponowana hipoteza zakłada iż wiązanie Ca^{2+} zachodzi pomiędzy motywem typu „EF-hand” dwóch cząsteczek kaleozyny w obrębie tego samego ciała olejowego lub też poprzez połączenie dwóch kaleozyn pochodzących z różnych ciał olejowych (Naested i wsp., 2000, Purktova i wsp., 2008). Wykazano również, że związanie Ca^{2+} nie ma wpływu na drugorzędową strukturę kaleozyny ale znacznie wpływa na jej strukturę trzeciorzędową (Purktova i wsp., 2007). W związku z tym kaleozyny ze związonym jonem wapniowym migrują szybciej w żelach poliakrylamidowych, najprawdopodobniej w wyniku zmiany struktury cząsteczkowej na bardziej kompaktową po związaniu Ca^{2+} (Purktova i wsp., 2007). W celu potwierdzenia wiązania Ca^{2+} przez kaleozynę z pyłku oliwki europejskiej, frakcja białkowa izolowana z ciał olejowych ziaren pyłku oraz frakcja białkowa izolowana z samego płaszczka pyłkowego będącego częścią ściany komórkowej pyłku była inkubowana w pierwszym etapie z EGTA w celu wyeliminowania wewnętrznej puli jonów wapnia. Następnie próby inkubowano z jonami Ca^{2+} , Ca^{2+} z EGTA lub wyłącznie z EGTA (Zienkiewicz i wsp., 2010). Frakcje białkowe rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym a następnie wykonano Western-blotting z wykorzystaniem pierwotnych przeciwciał skierowanych przeciwko kaleozynie 3 z rzodkiewnika pospolitego. W doświadczeniu tym obserwowano szybszą migrację w żelu poliakrylamidowym kaleozyny związanej z jonami Ca^{2+} w porównaniu do kaleozyny wykrywanej we frakcji białkowej traktowanej EGTA. Uzyskane wyniki potwierdziły, iż kaleozyna izolowana z ciał olejowych ziaren pyłku oraz z płaszczka pyłkowego podobnie jak wcześniej opisane kaleozyny posiada zdolność wiązania Ca^{2+} (Zienkiewicz i wsp., 2010).

Porównanie sekwencji aminokwasowej kaleozyn zidentyfikowanych u różnych gatunków roślin wykazało obecność pojedynczej cysteiny na końcu C wszystkich analizowanych białek (Chen i wsp., 1999, Naested i wsp., 2000). Fakt ten wykorzystano w celu sprawdzenia czy koniec C kaleozyny związanej z ciałami olejowymi ziarna pyłku oliwki jest również skierowany do cytozolu. W tym celu wykonano doświadczenie w którym zastosowano glikol polietylenowy (PEG) modyfikowany resztą meleimidową (PEG-MAL). Połączenie PEG-MAL z grupą sulfhydrylową (-SH) cysteiny skutkuje zwiększeniem masy cząsteczkowej białka o 5

kDa. Dlatego też liczba pasm białkowych otrzymanych po rozdzielaniu elektroforetycznym w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS koresponduje do ilości dostępnych cystein w danym białku. Ciała olejowe izolowane z ziaren pyłku oliwki inkubowano zatem z PEG-MAL, a następnie rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym po czym wykrywano kaleozyne metodą Western-blottingu z wykorzystaniem pierwotnych przeciwciał skierowanych przeciwko kaleozynie 3 z rzodkiewnika pospolitego. W doświadczeniu tym wykazano obecność tylko jednego dodatkowego pasma białkowego o wyższej masie molekularnej, co świadczy o tym iż tylko jedna cysteina została związana z PEG-MAL. Na podstawie uzyskanych wyników założono, że podobnie jak w przypadku kaleozyny związanej z ciałami olejowymi nasion *A. thaliana*, końce C oraz N kaleozyny izolowanej z ciał olejowych ziaren pyłku oliwki są skierowane do cytozolu (Zienkiewicz i wsp., 2010).

Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rejón JD, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2013) New insights into early steps of oil body mobilization during pollen germination. *Journal of Experimental Botany* 64: 293-302.

Rejón JD, **Zienkiewicz A**, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2012) Profiling and functional classification of esterases in olive (*Olea europaea*) pollen during germination. *Annals of Botany* 110: 1035-1045.

Na podstawie powyżej scharakteryzowanych prac wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia założono, iż ciała olejowe pełnią bardzo istotną funkcję jako źródło energii potrzebnej do szybkiego wzrostu łagiewki pyłkowej oliwki. W celu potwierdzenia tej hipotezy analizowano liczbę ciał olejowych podczas wzrostu łagiewki pyłkowej *in vitro* na pożywce zawierającej sacharozę (źródło energii) oraz na pożywce pozbawionej sacharozy. Usunięcie źródła energii (sacharoza) z pożywki podczas wzrostu łagiewki pyłkowej *in vitro* nie wpłynęło w znaczący sposób na wydajność kiełkowania ziarna pyłku oraz szybkość wzrostu łagiewki pyłkowej co sugeruje, iż kwasy tłuszczowe zgromadzone w ciałach olejowych pyłku oliwki są wystarczającym źródłem węgla podczas wczesnych etapów tych procesów (Zienkiewicz i wsp., 2013). Jednakże, analiza liczby ciał olejowych w trakcie wzrostu łagiewki pyłkowej wykazała iż mobilizacja ciał olejowych zachodzi szybciej na pożywce nie zawierającej sacharozy. Uzyskane wyniki wskazują zatem, że ciała olejowe istotnie są podstawowym

źródłem energii niezbędnym do prawidłowego wzrostu łagiewki pyłkowej (Zienkiewicz i wsp., 2013).

Dotychczasowe badania mające na celu poznanie mechanizmu odpowiedzialnego za degradację ciał olejowych prowadzono głównie w trakcie kiełkowania nasion i wzrostu siewki (Kelly i wsp., 2011, 2013). W nasionach mobilizacja tłuszczu zapasowego zachodzi głównie pod wpływem lipazy triacyloglicerolowej (Kelly i wsp., 2011). **Lipaza** ta katalizuje hydrolizę triacylogliceroli w ciałach olejowych w wyniku której zostają uwolnione kwasy tłuszczowe, diacyloglicerole, monoglicerole oraz glicerol (Graham 2008, Kelly i wsp., 2011). Glicerol jest po fosforylacji i utlenianiu włączany do szlaku katabolicznego węglowodanów (glikoliza) z kolei wolne kwasy tłuszczowe podlegają w peroksysomach (glioksysomach) degradacji do acetyl-koenzymu A w procesie β -oksydacji (Eastmond i Graham, 2001). Pomimo istotnej funkcji ciał olejowych podczas kiełkowania ziarna pyłku oraz wzrostu łagiewki pyłkowej wiedza na temat mobilizacji tłuszczu zapasowego w tych strukturach biologicznych jest stosunkowo nie wielka. Dlatego też moje dalsze badania koncentrowały się na poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za rozkład triacylogliceroli zmagazynowanych ciałach olejowych podczas kiełkowania ziarna pyłku i wzrostu łagiewki pyłkowej *in vitro* u oliwki europejskiej.

W pierwszym etapie tych badań zbadalam aktywność enzymatyczną lipazy w żelu poliakrylamidowym. W tym celu żele poliakrylamidowe inkubowano w roztworze zawierającym α -naphthyl palmitate, który pełni funkcję substratu dla lipaz (Zienkiewicz i wsp., 2013). W związku z tym, iż α -naphthyl palmitate jest substratem powszechnie używanym do detekcji zarówno lipaz aktywnych w środowisku kwaśnym oraz neutralnym, zastosowanie tej metody pozwoliło na wykrycie szerokiej puli lipaz, aktywnych w ekstraktach białkowych izolowanych z różnego materiału roślinnego (Rejón i wsp., 2012, Zienkiewicz i wsp., 2013). Analiza aktywności lipazy w całkowitym ekstrakcie białkowym izolowanym z dojrzałego ziarna pyłkowego ujawniła obecność sześciu pasm białkowych o różnej masie molekularnej widocznych na żelu poliakrylamidowym (Rejón i wsp., 2012). Podjęłam także próbę detekcji aktywności lipazy w ekstrakcie białkowym uzyskanym z ciał olejowych izolowanych z dojrzałego oraz kiełkującego ziarna pyłku. Analiza uzyskanego zymogramu wykazała obecność jednego pasma białkowego (44.6 kDa) o aktywności lipazy we frakcji białkowej izolowanej z ciał olejowych dojrzałego ziarna pyłku oraz jednego pasma białkowego (43.1 kDa) o aktywności lipazy we frakcji białkowej izolowanej z ciał olejowych kiełkującego ziarna

pyłku. W celu zbadania czy usunięcie źródła energii (sacharozy) wpłynie na aktywność lipaz w całkowitym ekstrakcie białkowym, białka izolowano zarówno z łagiewek pyłkowych rosnących *in vitro* na pożywce z sacharozą jak bez sacharozy. Uzyskane wyniki wykazały, że wyższy poziom aktywności lipazowej obserwowano w całkowitym ekstrakcie białkowym izolowanym z łagiewek pyłkowych rosnących *in vitro* na pożywce pozbawionej sacharozy aniżeli w ekstrakcie białkowym izolowanym z łagiewek pyłkowych rosnących *in vitro* na pożywce zawierającej sacharozę. Wyniki te sugerują, że lipazy odgrywają kluczową rolę w mobilizacji ciał olejowych podczas kiełkowania łagiewki pyłkowej. Co więcej, wzrost aktywności lipazowej był pozytywnie skorelowany ze wzmożonym uruchamianiem tłuszczu zapasowych w odpowiedzi na deficyt cukru w trakcie wzrostu łagiewek pyłkowych *in vitro*. Zależność tą potwierdzono także w badaniach wpływu Ebelaktonu B, zaliczanego do substancji hamującej aktywność enzymatyczną lipaz, na kiełkowanie oraz wzrost łagiewki pyłkowej. Dodanie Ebelaktonu B do pożywki objawiało się radykalnym zahamowaniem kiełkowania ziarna pyłkowego oraz wzrostu łagiewki pyłkowej czemu towarzyszyło także nagromadzenie się ciał olejowych tuż przy aperturze ziarna pyłku (Zienkiewicz i wsp., 2013). W celu lokalizacji *in situ* specyficznej aktywności lipazowej względem triacyloglicerolu zastosowano syntetyczny substrat o nazwie 1,2-O-dilauryl-rac-3-glycero-glutaric acid-rezorufin ester (Gupta i wsp., 2003). W wyniku reakcji lipazy z tym substratem dochodzi do uwolnienia rezorufiny, która wzbudzana światłem o emisji fali 544 nm emituje czerwoną fluorescencję widoczną na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego. Wysoki poziom tej fluorescencji wykazano zarówno w aperturze ziarna pyłkowego jak i w cytoplazmie łagiewki pyłkowej, gdzie przyjmował on postać licznych, regularnych skupisk. Opisana metoda została również wykorzystana do detekcji aktywności lipazowej na powierzchni ciał olejowych. W tym celu reakcje enzymatyczną przeprowadzono na ciałach olejowych izolowanych z dojrzałego oraz kiełkującego ziarna pyłkowego. Co ciekawe, w odróżnieniu od metody z wykorzystaniem α -naphthyl palmitate, w tym przypadku sygnał świadczący o aktywności lipazy triacyloglicerolowej widoczny był wyłącznie na powierzchni ciał olejowych izolowanych z kiełkującego ziarna pyłku a nie z dojrzałego pyłku. Wyniki te mogą wskazywać, iż lipaza związana z powierzchnią ciał olejowych w pyłku oliwki posiada kilka typów aktywności lipazowej. Jeden z nich (niespecyficzny) jest aktywny zarówno w dojrzałym jak i kiełkującym ziarnie pyłku, natomiast ten specyficzny względem triacyloglicerolu byłby aktywowany chwili uwodnienia pyłku i rozpoczęcia procesu kiełkowania. Możliwe, że ten odmienny profil aktywności opisywanej lipazy jest związany z różnicami w konformacji tego białka pomiędzy dojrzałym i kiełkującym ziarnem pyłku, które z kolei mogłyby zachodzić w odpowiedzi na

uwodnienie pyłku i związaną z nim aktywację określonych szlaków sygnalowania komórkowego.

W ostatnich latach zaproponowano nowy model procesu uruchamiania tłuszczu zapasowych w nasionach roślin oleistych (Rudolph i wsp., 2011). Zakłada on, iż przed lipolizą, specyficzna lipooksygenaza katalizuje utlenianie nienasyconych kwasów związanych estrowo w tłuszczach a ponadto fosfolipaza A zawierająca patatyno-podobną domenę odpowiedzialna jest za trawienie błony fosfolipidowej ciał olejowych. W wyniku tego procesu zawartość ciał olejowych staje się dostępna dla lipazy oraz lipooksygenazy co w konsekwencji prowadzi do uruchomienia hydrolizy triacylogliceroli (Rudolph i wsp., 2011). Moje kolejne badania miały zatem na celu sprawdzenie czy opisany model funkcjonuje także w ziarnie pyłkowym i rosnącej łagiewce pyłkowej oliwki.

Lipooksygenazy należą do grupy enzymów katalizujących utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i estrów o układzie cis,cis-1,4-pentadienu. Głównymi produktami tej reakcji są sprzężone nienasycone kwasy tłuszczowe i wodorotlenki. W warunkach fizjologicznych substratami dla LOX u roślin są kwasy linolowy (C18:2) i linolenowy (C18:3). U *A. thaliana* stwierdzono występowanie 6 aktywności lipooksygenazowych określonych mianem AtLOX. Substratami dla AtLOX1 oraz AtLOX5, których produktem działania są głównie 9-hydroksynadtlenki (9-LOX) są kwas linolowy oraz linolenowy. Z kolei dla AtLOX2, AtLOX3, AtLOX4 i AtLOX6, które są odpowiedzialne za powstawanie 13-hydroksynadtlenków (13-LOX), substratem jest tylko kwas linolenowy (Bannenberg i wsp., 2009). W celu detekcji aktywności enzymatycznej lipooksygenazy w ciałach olejowych dojrzałego i kielkującego pyłku oliwki żele poliakrylamidowe po rozdziale białek izolowanych z tych organelli inkubowano w roztworze zawierającym kwas α -linolenowy będący substratem dla 9-LOX oraz 13-LOX lub też w roztworze zawierającym kwas α -linolenowy oraz cyjanek sodu. Cyjanek sodu został zastosowany w celu wyeliminowania detekcji aktywności enzymatycznej dodatkowych białek zawierających w swej strukturze hem, które również mogą wykorzystywać kwas α -linolenowy jako substrat. W doświadczeniu tym wykazano obecność jednego pasma białkowego (99 kDa) o aktywności lipooksygenazy tylko we frakcji białkowej izolowanej z ciał olejowych kielkującego ziarna pyłkowego. Dodatkowo obecność lipooksygenazy o masie 99 kDa we frakcji białkowej izolowanej z ciał olejowych kielkującego ziarna pyłkowego potwierdzono stosując metodę Western-blottingu. W tym celu wykorzystano przeciwciało pierwotne skierowane przeciwko lipooksygenazie z soi

zwyczajnej (*Glycine max*). Specyficzność powyższego przeciwciała została potwierdzona stosując metodę immunoprecypitacji oraz analizę uzyskanego pasma białkowego za pomocą techniki spektrometrii mas (Zienkiewicz i wsp., 2013). W ramach tych badań analizowałam również aktywność lipooksygenazową w całkowitej frakcji białkowej izolowanej z łagiewek pyłkowych rosnących *in vitro* przez 3 godziny na pożywce zawierającej sacharozę lub bez sacharozy. W tym przypadku wykazano obecność trzech pasm białkowych o aktywności lipooksygenazowej o masie cząsteczkowej 99, 90 oraz 63 kDa. Dodatkowo dla wszystkich trzech zidentyfikowanych aktywności intensywność była wyższa we frakcji białkowej izolowanej z łagiewek rosnących *in vitro* na pożywce nie zawierającej sacharozy aniżeli w przypadku łagiewek rosnących na pożywce zawierającej ten cukier. Na podstawie uzyskanych wyników założono iż oddziaływanie pojedynczej lipooksygenazy (99 kDa) z ciałami olejowymi zachodzi podczas pierwszych etapów kiełkowania ziarna pyłku. Fakt iż pasmo to wykrywano również w całkowitym ekstrakcie białkowym świadczy o występowaniu cytoplazmatycznej puli powyższego białka. Masa pasm białkowych 99 oraz 90 kDa wykrywanych na żelu poliakrylamidowym jest zgodna z zakresem mas cząsteczkowych opisanych dla lipooksygenaz scharakteryzowanych u innych gatunków roślin (Andreou i Feussner, 2009). Obecność trzeciego pasma białkowego o masie 63 kDa może świadczyć o proteolizie jednego z dwóch większych pasm białkowych (99 lub 90 kDa) co zostało opisane we wcześniejszych pracach dotyczących lipooksygenazy (Maccarone i wsp., 2001). Badania lokalizacji lipooksygenazy w rosnącej łagiewce pyłkowej oliwki z wykorzystaniem specyficznego przeciwciała wykazały wysoki poziom fluorescencji na terenie cytoplazmy łagiewki rosnącej 1 godzinę w hodowli *in vitro*. Po 3 godzinach wzrostu sygnał o wysokim natężeniu obserwowano w cytoplazmie łagiewki w postaci charakterystycznej, punktowej fluorescencji. Stosując jednocześnie barwienie ciał olejowych czerwienią Nilu wykazano kolokalizację lipooksygenazy z ciałami olejowymi. Interakcja ta została także potwierdzona w doświadczeniach w których przeprowadzono immunolokalizację badanego białka na oczyszczonych ciałach olejowych. Podobnie jak w przypadku aktywności lipazowej, fluorescencją, świadczącą o obecności lipooksygenazy wykrywano tylko na terenie ciał olejowych izolowanych z kiełkującego a nie z dojrzałego ziarna pyłku. Obecność lipooksygenazy na terenie ciał olejowych potwierdzono również na poziomie ultrastrukturalnym przy użyciu mikroskopu elektronowego. Obecność lipooksygenazy we frakcji ciał olejowych potwierdzona w moich badaniach jest zgodna z wcześniejszymi wynikami w których potwierdzono występowanie oraz aktywność 13-LOX we frakcji ciał olejowych izolowanych z liścieni ogórka siewnego (*Cucumis sativus*) (Rudolph i wsp., 2011).

Istotę funkcjonalnego związku pomiędzy lipoxygenazą i ciałami olejowymi ostatecznie potwierdziło doświadczenie w którym zastosowano inhibitor lipooksygenazy – kwas ferulowy. Dodanie tego związku do pożywki objawiało się całkowitym zahamowaniem kiełkowania ziarna pyłku oraz nagromadzeniem ciał olejowych w aperturze ziarna pyłkowego. Wyniki te jednoznacznie wskazują na kluczową rolę lipooksygenazy w metabolizmie ciał olejowych, a w konsekwencji także w procesie wzrostu i rozwoju łagiewki pyłkowej.

Poprzednie badania wykazały także istotną rolę fosfolipazy A w procesie mobilizacji tłuszczu zapasowych podczas kiełkowania nasion (Rudolph i wsp., 2011). **Fosfolipazy** tworzą dużą grupę enzymów, które katalizują hydrolizę fosfolipidów. Głównymi substratami tych enzymów są glicerolofosfolipidy wchodzące w skład błon biologicznych. Fosfolipazy A1 oraz A2 należą do acylohydrolaz rozkładających wiązania estrowe, odpowiednio, w pozycji sn-1 oraz sn-2 fosfolipidów. Lokalizację fosfolipazy A podczas wzrostu łagiewki pyłkowej oliwki *in vitro* analizowano stosując fluorescencyjnie znakowane fosfolipidy (4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Undecanoyl)-sn-Glycero-3-Phosphocholine, BODIPY® FL C11-PC) powszechnie stosowane do monitorowania aktywności fosfolipaz A. Wysoki poziom fluorescencji świadczący o aktywności fosfolipazy A w komórkach eukariotycznych obserwowano na terenie cytoplazmy rosnącej łagiewki pyłkowej gdzie wykazano jej kolokalizację z opisaną wcześniej aktywnością lipazy. Interesujący wydaje się fakt, iż analizując aktywność fosfolipazy A w frakcji oczyszczonych ciał olejowych wykazano sygnał o wysokim natężeniu zarówno na powierzchni ciał olejowych izolowanych z dojrzałego jak również kiełkującego ziarna pyłku.

Prowadzone przeze mnie badania w dużym stopniu przyczyniły się do poznania mechanizmów odpowiedzialnych za mobilizację ciał olejowych podczas kiełkowania ziarna pyłku oraz wzrostu *in vitro* łagiewki pyłkowej oliwki europejskiej. W trakcie mojej pracy badawczej wykazałam że:

- 🚦 Pyłkowo specyficzna kaleozyna jest syntetyzowana w pylniku i rozwijających się ziarnach pyłkowych oliwki a jej poziom jest pozytywnie skorelowany z ilością ciał olejowych podczas rozwoju i kiełkowania pyłku
- 🚦 Zidentyfikowana kaleozyna uczestniczy najprawdopodobniej w mobilizacji ciał olejowych oraz reorganizacji błony tych organelli podczas wzrostu łagiewki pyłkowej *in vitro*

🚧 Lipaza, lipooksygenaza oraz fosfolipazy A są zaangażowane w uwalnianie oraz degradację triacylogliceroli zmagazynowanych w ciałach olejowych obecnych w rosnącej łagiewce pyłkowej oliwki

Mobilizacja Substancji Zapasowych w Rozwijającym i Kiełkującym Nasieniu oraz Podczas Wzrostu Siewki Oliwki Europejskiej (*Olea europaea* L.)

W dalszej części mojego autoreferatu przedstawię wyniki doświadczeń prowadzonych na nasionach oliwki europejskiej (*Olea europaea* L.) podczas rozwoju oraz kiełkowania nasienia jak również podczas pierwszych etapów wzrostu i rozwoju siewki. Wyniki tych badań zostały opublikowane w trzech publikacjach naukowych opisanych poniżej.

Jiménez-López JC, **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI. (2016) Biogenesis of protein bodies during legumin accumulation in developing olive (*Olea europaea* L.). *Protoplasma* 253: 517-530.

Dojrzałe nasiona oliwki europejskiej (*Olea europaea* L.) składają się z trzech zasadniczych części: dwuliściennego zarodka, tkanki spichrzowej (bielmo) oraz łupiny nasiennej (Zienkiewicz i wsp., 2011a). Podczas embriogenezy roślin jedno- i dwuliściennych zapoczątkowanej powstaniem zygoty, w komórkach nasienia zachodzą różnorodne przemiany morfologiczne i biochemiczne, w tym magazynowanie substancji zapasowych (Liu i wsp., 2017, Zhao i wsp. 2018). U oliwki europejskiej rolę organów spichrzowych pełnią zarówno liścienie jak i bielmo. W celu prześledzenia zmian metabolicznych zachodzących w trakcie rozwoju nasienia zastosowałam szereg metod mikroskopowych umożliwiających zarówno komórkową lokalizację tłuszczu jak i białek. Do badań wykorzystałam nasiona oliwki europejskiej (*Olea europaea* L.) w różnych stadiach rozwojowych. We wczesnym stadium rozwojowym (20 dni po otwarciu kwiatu) kiedy nie można rozróżnić komórek zarodka od bielma większość komórek charakteryzowała się centralną wakuolą, przyściennie rozmieszczonym jądrem komórkowym oraz nielicznymi ciałami tłuszczowymi. Po 60 dniach od otwarciu kwiatu, kiedy możliwe jest rozróżnienie komórek bielma od komórek liścieni wykonano szczegółową analizę lokalizacji komórkowej tłuszczu oraz białek zapasowych w tych dwóch typach tkanek. Do detekcji tłuszczu zapasowych zastosowano barwienie Czerwienią Nilu, natomiast całkowitą pulę białek wykrywano stosując barwienie błękitem

Coomassie Brilliant Blue (CCB). CCB, jako powszechnie używany roztwór do barwienia białek na żelach poliakrylamidowych, jest również z powodzeniem stosowany do detekcji tych molekuł w materiale roślinnym *in situ* (Liu i wsp., 2017). Zastosowane techniki badawcze wykazały, że w trakcie rozwoju nasienia zarówno w komórkach bielma jak i liścienia ma miejsce stopniowy wzrost liczby ciał olejowych co potwierdzono również na poziomie mikroskopu elektronowego. Co ciekawe, 60 dni po otwarciu kwiatu obserwowano większą liczbę ciał olejowych na terenie komórek bielma aniżeli w komórkach liścienia. W początkowych stadiach rozwoju nasienia zarówno w komórkach bielma oraz liścienia, białka magazynowane są na terenie centralnej wakuoli. W komórkach roślinnych zidentyfikowano dwa typy wakuoli: **wakuole lityczne** charakterystyczne dla komórek wegetatywnych oraz **wakuole magazynujące białka** (ang. *protein storage vacuole*). Podczas rozwoju zarodka wakuole lityczne zostają zastąpione przez wakuole magazynujące białka, które odkładają białka zapasowe potrzebne dla rozwoju zarodka. W trakcie rozwoju nasienia oliwki europejskiej zaobserwowano iż wspomniane wakuole magazynujące białka ulegają podziałowi na kilka mniejszych struktur wypełnionych białkami zapasowymi które u oliwki europejskiej nazwano ciałami białkowymi (ang. *protein bodies* – PBs). Ponadto w komórkach liścienia potwierdzono współwystępowanie licznych ciał białkowych o dużych i małych rozmiarach podczas gdy w komórkach bielma liczne ciała białkowe charakteryzowały się zbliżonym rozmiarem i kształtem. Jednocześnie w dojrzałym nasieniu zarówno w komórkach bielma oraz liścienia ciała olejowe obserwowano wokół ciał białkowych oraz wzdłuż ściany komórkowej. Szczegółową analizę struktury komórkowej bielma oraz liścienia wykonano także przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. W badaniach tych potwierdzono przestrzenne rozmieszczenie ciał olejowych w analizowanych tkankach zaobserwowane uprzednio na poziomie mikroskopu elektronowego. Dodatkowo w celu detekcji kolejnej, po tłuszczach i białkach, substancji zapasowej – polisacharydów, wykonano reakcje PAS stosowaną powszechnie do wykrywania wielocukrów w preparatach histochemicznych i opartej na zastosowaniu kwasu nadjodowego oraz odczynnika Schiffa. Metoda ta pozwoliła głównie na detekcję polisacharydów będących elementem strukturalnym ściany komórkowej zarówno w komórkach bielma oraz liścienia oliwki. Na podstawie uzyskanych wyników założono iż głównymi materiałami zapasowymi w nasionach oliwki europejskie są tłuszcze oraz białka zapasowe. Ponadto ustalono, że akumulacja ciał olejowych oraz białek zapasowych odbywa się później w komórkach liścienia niż ma to miejsce w przypadku komórek bielma. Co więcej wyraźne różnice w czasowo-przestrzennej

organizacji ciał białkowych pomiędzy komórkami bielma oraz liścieni odzwierciedlają najprawdopodobniej różnice w aktywności metabolicznej analizowanych tkanek.

Białka zapasowe magazynowane w nasionach różnych gatunków roślin zostały podzielone na cztery grupy ze względu na różnice w ich rozpuszczalności: **albuminy** – rozpuszczalne w wodzie, **globuliny** – rozpuszczalne w roztworach soli, **prolaminy** – rozpuszczalne w alkoholach oraz **gluteliny** – rozpuszczalne w roztworach zasadowych lub kwaśnych. Najbardziej rozpowszechnionymi białkami zapasowymi w roślinach są globuliny (Chmielnicka i wsp., 2017). Globuliny ze względu na stałą sedimentacji (S) podzielono na dwie grupy: 7S wiciliny i konwiciliny oraz 11S leguminy (Shewry i wsp., 1995). Globuliny są syntetyzowane jako propolipeptydy o różnych masach cząsteczkowych, których proteolityczna obróbka następuje w wakuolach magazynujących białka. Wcześniejsze badania potwierdziły, iż komórki liścieni oliwki europejskiej magazynują białka zapasowe głównie w postaci globulin (Alché i wsp., 2006). Autorzy tych badań stosując specyficzne przeciwciało anti-11S wykazali, iż 11S legumina jest głównym białkiem zapasowym nasion oliwki europejskiej. Przeciwciało pierwotne anti-S11 rozpoznaje dwa polipeptydy o masie 41 oraz 47.5 kDa, nazywane łańcuchami α (podjednostka kwaśna) oraz β (podjednostka zasadowa) które połączone są mostkiem dwusiarczkowym (Alché i wsp., 2006). Ponadto w warunkach denaturujących oraz redukujących powyższe polipeptydy (41 oraz 47.5 kDa) ulegają rozpadowi odpowiednio na dwie oraz trzy podjednostki rozpoznawane przez przeciwciało anti-S11 i opisane w pracy Alché i wsp., (2006) jako p1-p5. Korzystając z możliwości zastosowania wyżej wymienionego przeciwciała wykonano detekcję 11S globuliny w trakcie rozwoju nasienia oliwki europejskiej zarówno w ekstrakcie białkowym izolowanym z komórek bielma jak i liścienia. W wyniku zastosowania warunków denaturujących oraz redukujących wykrywano pięć podjednostek tych białek o różnej masie cząsteczkowej (p1-20.5, p2-21.5, p3-25.5, p4-27.5, p5-30.0). Należy zaznaczyć, że wyższy poziom podjednostek p1-p5 obserwowano w ekstrakcie białkowym izolowanym z komórek bielma 60 dni po otwarciu kwiatu niż w ekstrakcie białkowym izolowanym z komórek liścieni. Wyniki te pozostają w zgodzie z danymi uzyskanymi podczas obserwacji formowania ciał białkowych na poziomie mikroskopowym. W celu uzyskania szerszej wiedzy na temat biosyntezy globuliny w trakcie rozwoju nasienia wykonano także jej immunolokalizację, zarówno na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego oraz elektronowego. Sygnał o wysokiej intensywności świadczący o obecności 11S leguminy obserwowano na terenie centralnej wakuoli w komórkach zarówno bielma jak i liścieni we wczesnych stadiach rozwojowych

nasienia. Najwyższy poziom fluorescencji oraz liczne ziarna koloidalnego złota wykazano w uformowanych już ciałach białkowych widocznych w późniejszych stadiach rozwojowych nasienia.

Zienkiewicz A, Jiménez-López JC, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI. (2011a) Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* seed germination and seedling growth. *Protoplasma* 248: 751-765.

Rośliny w trakcie rozwoju nasion odkładają substancje zapasowe w zarodku oraz tkance spichrzowej aby zapewnić rezerwy węgla, azotu oraz siarki potrzebne do późniejszego wzrostu i rozwoju. Nasiona oliwki zaliczamy do nasion oleistych magazynujących tłuszcze jako główny materiał zapasowy celem ich późniejszego wykorzystywania jako substratu energetycznego podczas procesu kiełkowania nasienia i wzrostu siewki. Jednakże poza tłuszczami zapasowymi, białka zapasowe magazynowane w ciałach białkowych stanowią drugą grupę głównych substancji zapasowych w rozwijającym się nasieniu oliwki europejskiej (Jiménez-López i wsp., 2016). Badania mobilizacji substancji zapasowych na poziomie komórkowym prowadzono na liścieniach izolowanych z zarodków dojrzałych i spęczniałych nasion oliwki oraz z zarodków kiełkujących *in vitro* na stałej pożywce mineralnej. Analiza cytochemiczna oraz ultrastrukturalna komórek liścieni dojrzałych nasion oliwki potwierdziła, iż komórki te magazynują białka zapasowe na terenie ciał białkowych a tłuszcze zapasowe w ciałach olejowych. W trakcie kiełkowania zarodków oraz wzrostu siewek obserwowano zmniejszenie liczby ciał białkowych oraz widoczny spadek ogólnej puli białek zapasowych w komórkach liścieni. Redukcja liczby ciał białkowych związana jest zapewne ze stopniowym procesem łączenia się tych organelli w jedną centralną wakuolę. Podczas tego procesu dochodzi do mobilizacji białek zapasowych, które wykorzystywane są w trakcie kiełkowania jako źródło aminokwasów. W momencie uwolnienia białek zapasowych centralna wakuola nabiera cech wakuoli litycznej, która stopniowo zwiększając swoją objętość wspomaga wzrost i ekspansję komórek liścienia. Dodatkowo, w trakcie procesu kiełkowania nasienia i wzrostu siewek oliwki wykazano spadek poziomu 11S leguminy metodą Western-blottingu, w której wykorzystano specyficzne przeciwciało anti-11S. Wyraźny spadek poziomu dwóch polipeptydów o masie 41 oraz 47.5 kDa odpowiadających podjednostce kwaśnej oraz zasadowej 11S leguminy obserwowano w trakcie kiełkowania zarodka *in vitro* aż do ich całkowitego zaniku w liścieniach 25 dniowych siewek. Ponadto, stosując metodę immunolokalizacji wykazano, że najwyższy poziom fluorescencji świadczący o obecności

białka 11S wykrywano w ciałach białkowych liścieni izolowanych z dojrzałych i spęczniałych nasion. Podczas dalszych etapów kiełkowania zarodków obserwowano stopniowy spadek sygnału na terenie zlewających się ciał białkowych i jego jednoczesny wzrost na terenie cytoplazmy. Uzyskane wyniki sugerują przemieszczanie się badanego białka z ciał białkowych do cytoplazmy. Sygnał korespondujący do białka 11S, jednakże o najniższym natężeniu wykazano także na terenie formującej się wakuoli co świadczy o intensywnej mobilizacji tego białka w trakcie wzrostu siewek. Badania te potwierdzają wcześniejsze założenie, iż białka zapasowe gromadzone podczas dojrzewania nasienia ulegają mobilizacji/hydrolizie w komórkach liścieni co pozostaje w zgodzie z rezultatami badań prowadzonych na innych gatunkach roślin (Müntz i wsp., 2001, Otegui i wsp., 2006). Wysoka specyficzność użytego w powyższych badaniach przeciwciała anti-11S jak również opracowanie specyficznej metody lokalizacji białka 11S na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego pozwoliło na jego wykorzystanie jako specyficznego markera ciał białkowych u oliwki (Jiménez-López i wsp., 2016, Jiménez-López i Hernandez-Soriano, 2014).

W komórkach liścieni zarodków kiełkujących 3 dni, na obszarze ciał białkowych wykazano obecność regularnego kształtu obszarów pozbawionych sygnału świadczącego o obecności białka S11. Analiza na poziomie mikroskopu elektronowego wykazała, że struktury te charakteryzują się znacznie większą gęstością elektronową i średnicą rzędu od 1 do 3 μm . Interesujący wydaje się fakt, iż na terenie wyżej opisywanych struktur stwierdzono obecność fluorescencji oraz ziaren koloidalnego złota świadczących o obecności peroksydazy. **Peroksydazy** należą do grupy enzymów zaliczanych do klasy oksydoreduktaz katalizujących utlenianie nadtlenkiem wodoru różnorodnych substratów. Enzymy te mogą również wykorzystywać wodoronadtlenki kwasów tłuszczowych jako donory tlenu do wewnątrzcząsteczkowych oraz międzycząsteczkowych reakcji epoksydacji wiązań podwójnych (Almagro i wsp., 2009). Obecność peroksydaz w ciałach białkowych jest zaskakująca i trudna do interpretacji również z powodu braku danych literaturowych. Jednakże, nowe światło na przedstawione wyniki rzuciła praca Zienkiewicz i wsp., (2014a), która zostanie omówiona w dalszej części autoreferatu. Analiza dystrybucji ciał olejowych w komórkach liścieni prowadzona była przy użyciu czerwieni Nilu. Stosując nowoczesne techniki mikroskopii konfokalnej wykazano, iż w komórkach liścieni izolowanych z dojrzałych nasion ciała olejowe akumulują się wokół ciał białkowych oraz w przyściennych warstwach

cytoplazmy. Podczas kiełkowania zarodków oraz wzrostu siewek obserwowano zarówno spadek liczby jak i wielkości ciał olejowych co jest zgodne z założeniem że organelle te gromadzone podczas dojrzewania nasienia są wykorzystywane w licznych procesach katabolicznych (min. jako źródło energii) podczas jego kiełkowania. Na uwagę zasługuje fakt iż ciała olejowe pozostawały zwykle w bliskim kontakcie z błoną ciał białkowych co może sugerować występowanie interakcji pomiędzy tymi organellami.

Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rejón JD, Alché JD, Castro AJ, Rodríguez-García MI. (2014a) Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *Journal of Experimental Botany* 65: 103-115.

Liczne badania prowadzone głównie na *A. thaliana* umożliwiły przynajmniej częściowo poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za degradację triacylogliceroli magazynowanych w ciałach olejowych podczas kiełkowania nasienia oraz wzrostu i rozwoju siewki (Eastmond 2006, Kelly i wsp., 2011 i 2013). Jak wspomniano w pierwszej części autoreferatu w hydrolizę tłuszczu zapasowego zaangażowane są trzy główne enzymy: lipaza, lipooksygenaza oraz fosfolipazy A (Kelly i wsp., 2011, Rudolph i wsp., 2011). Wzrost aktywności lipazy obserwowano w trakcie kiełkowania nasion *A. thaliana* aż do momentu całkowitego zaniku ciał olejowych (Lin i Huang, 1983). W ostatnich latach zidentyfikowano ponadto specyficzną lipazę triacyloglicerolową odpowiedzialną za mobilizację ciał olejowych w nasionach *A. thaliana*. Lipaza ta posiada domenę patatynową charakterystyczną dla fosfolipaz z grupy A (Eastmond, 2006, Kelly i wsp., 2011). W celu zbadania aktywności lipazy w liścieniach oliwki europejskiej przeprowadzono reakcję enzymatyczną w żelu poliakrylamidowym. Po rozdiale elektroforetycznym żele inkubowano w roztworze zawierającym α -naphthyl palmitate, który pełni funkcję substratu dla lipaz. Analiza uzyskanego zymogramu wykazała obecność siedmiu pasm o aktywności lipolitycznej. Pasma o masie molekularnej 53 kDa wykrywano zarówno we frakcji białek cytoplazmatycznych jak również we frakcji białek izolowanych z oczyszczonych ciał białkowych. Brak aktywności enzymatycznej obserwowano w przypadku frakcji białek izolowanych z ciał olejowych. W celu uzupełnienia powyższych badań wykonano jednocześnie lokalizację tłuszczu zapasowego oraz aktywności lipolitycznej na poziomie mikroskopu świetlnego. Zastosowanie Sudanu czarnego B pozwoliło na wykrycie tłuszczu zapasowego zarówno w ciałach olejowych jak również na terenie ciał białkowych podczas gdy sygnał świadczący o aktywności lipazy obserwowano tylko na terenie ciał

białkowych. Podobnie jak w przypadku rosnącej *in vitro* łagiewki pyłkowej w celu lokalizacji *in situ* specyficznej lipazy triacyloglicerydowej zastosowano syntetyczny substrat 1,2-O-dilauryl-rac-3-glycero-glutaric acid-rezorufin ester. W żywych komórkach liścieni izolowanych z zarodków dojrzałych nasion oliwki sygnał świadczący o aktywności lipazy (czerwona fluorescencja) obserwowano wyłącznie na terenie ciał białkowych. Brak aktywności lipazy na terenie ciał olejowych potwierdzono również inkubując oczyszczone ciała olejowe z powyższym substratem. W komórkach liścieni izolowanych z zarodków spęczniałych nasion aktywność lipazy widoczna była zarówno na terenie ciał białkowych oraz ciał olejowych. Aktywność lipazy w postaci czerwonej fluorescencji wykrywano także na powierzchni oczyszczonych ciał olejowych. Na podstawie uzyskanych wyników założono, iż w trakcie kiełkowania zarodków dochodzi do mobilizacji ciał olejowych na terenie cytoplazmy jak również do przemieszczania się części tłuszczu zapasowych na teren ciał białkowych, gdzie prawdopodobnie ulegają hydrolizie przy udziale zarówno lipazy triacyloglicerolowej oraz lipaz wykrywanych za pomocą α -naphthyl palmitate. Istotnie, wcześniejsze badania potwierdziły możliwość występowania lipazy na terenie ciał białkowych (Fernandez i Staehelin, 1987, Bhatla i wsp., 2009). Ostatnie badania wykazały ponadto, iż nowa lipaza zidentyfikowana u *A. thaliana* – AtOBL1 (ang. *oil body lipase 1*) odpowiedzialna jest przynajmniej częściowo za hydrolizę triacylogliceroli w ciałach olejowych podczas kiełkowania nasienia (Müller i Ischebeck, 2018). Ponadto lipaza ta wykazuje aktywność w środowisku kwaśnym oraz lokalizuje się zarówno na terenie ciał białkowych oraz ciał olejowych (Müller i Ischebeck, 2018). Odmienna lokalizacja aktywności lipazowej w zależności od zastosowanego substratu sugeruje iż w liścieniach oliwki europejskiej jedynie lipaza triacyloglicerolowa jest zaangażowana w mobilizację ciał olejowych na terenie cytoplazmy. Przedstawione wyniki świadczą również o wielofunkcyjności ciał białkowych oraz ich zaangażowaniu w mobilizację tłuszczu zapasowych.

W celu analizy aktywności lipooksygenazowej podczas kiełkowania nasion oraz we wczesnych fazach wzrostu i rozwoju siewki oliwki zastosowano kwas linolenowy jako substrat. Po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej w żelu poliakrylamidowym wykazano obecność trzech pasm o aktywności lipooksygenazowej o masach molekularnych 100 kDa, 98 kDa i 96 kDa charakterystycznych dla roślinnych lipooksygenaz. Ponadto wykazano, że aktywność wykrywanych lipooksygenaz wzrasta w początkowych fazach kiełkowania zarodków oliwki a następnie spada w trakcie wzrostu siewki. Ten wzorzec aktywności

lipooksygenaz jest pozytywnie skorelowany ze spadkiem liczby ciał olejowych w komórkach liścieni oliwki. Analizując zmiany poziomu mRNA oraz aktywności enzymatycznej lipooksygenaz sformułowano hipotezę iż w komórkach liścieni oliwki intensyfikacja procesu mobilizacji tłuszczu zapasowego ma miejsce już od pierwszych etapów kiełkowania zarodków. Stosując metodę immunolokalizacji na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego oraz elektronowego wykazano, iż lipooksygenazy lokalizują się zarówno na terenie ciał białkowych jak i olejowych. Najwyższy poziom fluorescencji obserwowano w ciałach białkowych w 6 godzinie kiełkowania zarodków. W kolejnych godzinach kiełkowania wykazano spadek poziomu lipooksygenazy na terenie ciał białkowych przy jednoczesnym wzroście sygnału na terenie cytoplazmy oraz ciał olejowych. Podobne wyniki uzyskano analizując aktywność lipooksygenaz *in situ* na poziomie mikroskopu świetlnego. Wysoki poziom aktywności lipooksygenazowej wykrywano zarówno na terenie ciał białkowych oraz olejowych w pierwszych fazach kiełkowania zarodków. Uzyskane wyniki sugerują możliwość syntezy lipooksygenaz na terenie ciał białkowych oraz ich przemieszczania się z ciał białkowych do cytoplazmy, gdzie wchodzi one w interakcje z ciałami olejowymi umożliwiając mobilizację tłuszczu zapasowego. W celu potwierdzenia czasowej interakcji lipooksygenazy z ciałami tłuszczowymi inkubowano oczyszczone ciała olejowe z komórek liścieni nasion pozostających w spoczynku oraz z nasion spęczniałych przeciwciałem pierwotnym anti-LOX i analizowano obecność sygnału za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. W przypadku ciał olejowych izolowanych z nasion pozostających w spoczynku nie stwierdzono obecności sygnału wskazującego lipooksygenazy. Z kolei ciała olejowe izolowane z nasion spęczniałych charakteryzowały się obecnością fluorescencji korespondującej do lipooksygenazy na ich powierzchni. Wyniki te pozostają w zgodzie z wcześniejszymi badaniami prowadzonymi na kiełkujących nasionach ogórka, które wykazały istnienie specyficznej lipooksygenazy związanej z ciałami olejowymi, która wiążąc tlen do zestryfikowanych kwasów tłuszczowych odpowiedzialna jest za uwalnianie kwasów tłuszczowych do cytoplazmy (Rudolph i wsp., 2011). Na uwagę zasługuje fakt, że podczas analizy lokalizacji komórkowej lipooksygenazy wykazano silny poziom fluorescencji na terenie wspomnianych wcześniej kulistych obszarów zlokalizowanych w obrębie ciał białkowych w komórkach liścieni zarodków kiełkujących 3 dni, gdzie wykazano również obecność peroksydazy (Zienkiewicz i wsp., 2011a). Co więcej w badaniach z wykorzystaniem Sudanu czarnego B potwierdzono obecność tłuszczu w formie kulistych struktur na terenie ciał białkowych w tym samym stadium rozwojowym. Na podstawie opisanych wyników zaproponowano model, w którym kolokalizacja lipooksygenazy oraz

peroksydazy wskazuje na możliwość zaangażowania tych dwóch enzymów w rozkład tłuszczy wykrywanych na terenie opisywanych struktur w ciałach białkowych. Wcześniejsze doniesienia naukowe wykazały, że wodorotlenki lipidowe powstałe przy udziale lipooksygenaz mogą być wykorzystane jako bezpośredni substrat dla peroksydazy (Kolijak i wsp., 1997, Brash, 1999).

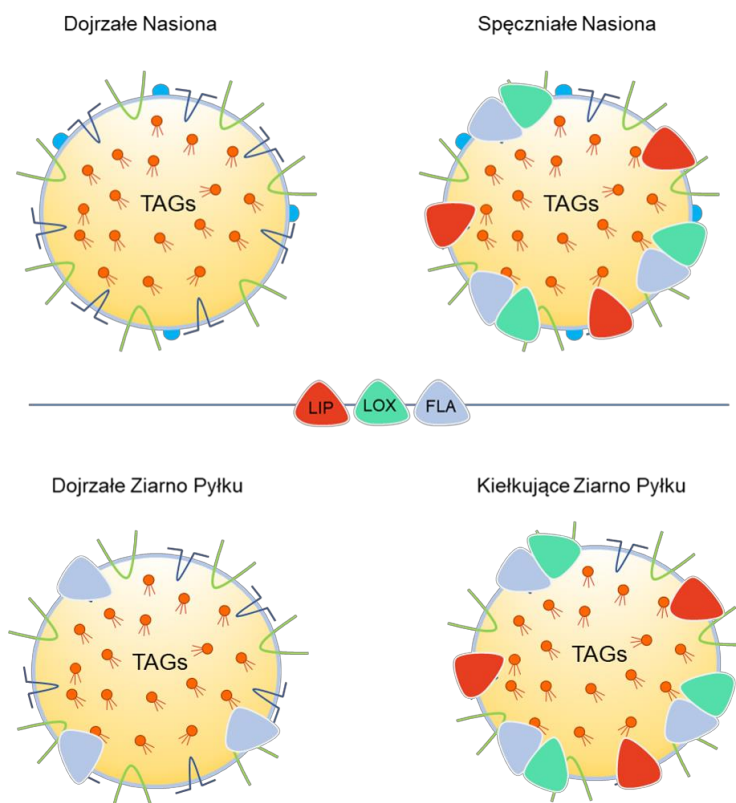
W dalszym etapie moich badań podjęłam również próbę lokalizacji fosfolipazy A w żywych komórkach liścieni oliwki stosując wspomniane już fluorescencyjnie znakowane fosfolipidy (4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Undecanoyl)-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine, BODIPY® FL C₁₁-PC) stosowane do monitorowania aktywności fosfolipaz A. W przypadku oliwki aktywność fosfolipazy A wykrywano tylko na terenie ciał białkowych komórek liścieni izolowanych z nasion pozostających w stanie spoczynku. W komórkach liścieni izolowanych z nasion spęczniałych badaną aktywność enzymatyczną obserwowano wyłącznie na powierzchni ciał olejowych. Powyższe wyniki potwierdzono również w badaniach z zastosowaniem oczyszczonych ciał olejowych. Omówione wyniki są pierwszymi danymi literaturowymi potwierdzającymi obecność fosfolipazy A na terenie ciał białkowych i jako pierwsze wskazują na możliwość przemieszczania się tego enzymu w trakcie kiełkowania nasion z ciał białkowych na powierzchnie ciał olejowych.

Wyniki, które uzyskałam podczas moich badań przyczyniły się nie tylko do poznania mechanizmu odpowiedzialnego za mobilizację ciał olejowych podczas kiełkowania nasienia oraz wzrostu *in vitro* siewki oliwki europejskiej, ale również rzuciły nowe światło na rolę ciał białkowych w tym procesie. Podsumowując, moje badania na rozwijającym się i kiełkującym nasieniu oliwki wykazały, że:

- 📌 Zarówno tłuszcze jak i białka zapasowe są syntetyzowane oraz magazynowane w trakcie rozwoju bielma i zarodka
- 📌 Kiełkowaniu nasienia oraz wzrostowi siewki towarzyszy mobilizacja tłuszczy oraz białek zapasowych w komórkach liścieni
- 📌 Lipaza, lipooksygenaza oraz fosfolipazy A są zaangażowane w uwalnianie oraz degradację triacylogliceroli zmagazynowanych w ciałach olejowych lokalizowanych na terenie komórek liścieni
- 📌 Ciała białkowe zaangażowane są nie tylko w magazynowanie białek zapasowych ale również enzymów odpowiedzialnych za degradację tłuszczy zapasowych na terenie ciał olejowych oraz ciał białkowych.

Podsumowanie

Wyniki uzyskane w ramach niniejszego osiągnięcia podsumowano w formie schematu który przedstawia molekularną organizację maszynerii mobilizacji lipidów zapasowych podczas kiełkowania ziarna pyłku i wzrostu *in vitro* łagiewki pyłkowej oraz podczas kiełkowania zarodka i rozwoju siewki oliwki europejskiej (Ryc. 3).



Rycina 3. Schemat ilustrujący mobilizację ciał olejowych w podczas kiełkowania ziarna pyłku i wzrostu *in vitro* łagiewki pyłkowej oraz kiełkowania zarodka i rozwoju siewki oliwki europejskiej. LIP – lipaza, LOX – lipooksygenaza, FLA – fosfolipaza A.

Interesujący wydaje się fakt, iż fosfolipaza A była wykrywana na terenie ciał olejowych w dojrzałym ziarnie pyłku podczas gdy w nasieniu enzym ten obserwowano wyłącznie na powierzchni ciał izolowanych ze spęczniałych nasion. Z danych literaturowych oraz z moich badań wiadomo, że wzrost łagiewki pyłkowej jest procesem zachodzącym bardzo szybko dlatego też lokalizacja enzymów na powierzchni ciał olejowych w dojrzałym ziarnie pyłku może świadczyć o potrzebie niezwłocznego rozpoczęcia mobilizacji tłuszczu zapasowego w momencie kiełkowania ziarna pyłku. A zatem różnice w czasowej oraz przestrzennej

lokalizacji enzymów odpowiedzialnych za mobilizację tłuszczu zapasowego pomiędzy ziarnem pyłku a zarodkiem wynikają najprawdopodobniej z odmiennego zapotrzebowania energetycznego badanych struktur ściśle związanego z biologicznymi aspektami ich funkcjonowania. Podsumowując, uważam, iż otrzymane przeze mnie wyniki stanowią bardzo ważną bazę informacyjną, dla dalszych badań mających na celu pogłębienie naszej wiedzy na temat mechanizmów i szlaków sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za metabolizm substancji zapasowych, a zwłaszcza tłuszczu podczas wzrostu i rozwoju roślin.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

5.1. Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją działalność naukowo-badawczą rozpoczęłam w roku 2000 w trakcie realizacji mojej pracy magisterskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Kopcewicza w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin (obecnie Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii), Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Celem niniejszej pracy było zbadanie aktywności florigenicznej oraz składu biochemicznego eksudatu floemowego uzyskiwanego z liścieni *Pharbitis nil* (*Ipomoea nil*: wilec wielkokwiatowy). Podczas realizacji mojej pracy magisterskiej opanowałam między innymi różnorodne techniki z zakresu hodowli roślinnych kultur *in vitro* jak również zainteresowałam się tematyką naukową związaną z fizjologią kwitnienia u roślin wyższych.

W 2002 roku rozpoczęłam realizację rozprawy doktorskiej również pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Kopcewicza, której celem było poznanie roli dwóch fotoreceptorów światła niebieskiego: ZEITLUPE (ZTL) oraz fototropiny 1 (NPH1-NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL1) w procesach wzrostowo-rozwojowych u rośliny dnia krótkiego *Pharbitis nil* (*Ipomoea nil*). W trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej zastosowałam różnorodne techniki biologii molekularnej, które umożliwiły mi zarówno identyfikację jak również poznanie poziomu ekspresji genu oraz białka ZTL w roślinach *Pharbitis nil* (*Ipomoea nil*) rosnących w różnych warunkach świetlnych. Ponadto, stosując różnorodne techniki mikroskopowe takie jak fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* czy immunolokalizacja białek na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego i elektronowego określiłam komórkową lokalizację zarówno mRNA genu oraz białka ZTL w różnych tkankach *Pharbitis nil*. Wcześniejsze badania prowadzone na roślinie dnia długiego *A. thaliana* wykazały iż białko ZTL jest zaangażowane w przekazywanie sygnału świetlnego do wewnętrznego oscylatora będącego kluczowym

elementem roślinnego zegara biologicznego (Sommers i wsp., 2000). Dlatego też w mojej pracy doktorskiej wykonałam analizę zarówno poziomu mRNA genu oraz białka ZTL w liścieniach siewek rosnących w warunkach dnia krótkiego a następnie wystawionych na działanie ciągłej ciemności lub ciągłego światła. Uzyskane wyniki potwierdziły występowanie oscylacji w poziomie transkryptu genu *InZTL* w warunkach światła ciągłego co świadczy, iż ekspresja badanego genu pozostaje pod kontrolą zegara biologicznego. Ponieważ nadekspresja białka ZTL u *A. thaliana* opóźnia kwitnienie w warunkach dnia długiego (Sommers i wsp., 2004) postanowiłam zbadać czy białko ZTL bierze udział w regulacji indukcji kwitnienia *Pharbitis nil*. W tym celu 16 godzinna noc indukcyjna została przerwana światłem czerwonym, które w przypadku roślin dnia krótkiego hamuje kwitnienie. Traktowanie roślin światłem czerwonym nie wpłynęło znacząco zarówno na poziom badanego transkryptu ani na poziom białka w liścieniach siewek *Pharbitis nil* co sugeruje, iż białko ZTL nie jest bezpośrednio zaangażowane w kontrolę kwitnienia u *Pharbitis nil*. Ponadto podjęłam również próbę przybliżenia roli drugiego fotoreceptora światła niebieskiego - fototropiny 1 (NPH1) u tej modelowej rośliny. W tym celu wykorzystałam przeciwciała anty-NPH1, które zastosowałam do określenia tkankowej oraz komórkowej lokalizacji fototropiny 1 w siewkach wilca wielkokwiatowego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że światło wpływa na wewnątrzkomórkową lokalizację białka NPH1 w komórkach liścieni *P. nil*, co objawiało się zmianą wzorca rozmieszczenia sygnału fluorescencyjnego obserwowanego na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego. Badania, które wykonałam w ramach mojej pracy doktorskiej były pierwszymi przybliżającymi rolę ZTL oraz NPH1 w wzroście i rozwoju roślin dnia krótkiego.

Wyniki wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w formie 2 oryginalnych prac badawczych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz 2 prac przeglądowych w czasopiśmie o zasięgu krajowym. Publikacja prac przeglądowych miała miejsce przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych (2007), z kolei oryginalne prace badawcze ukazały się po obronie mojej pracy doktorskiej.

- **Zienkiewicz A**, Kozłowska E, Kopcewicz J. (2006) Regulacja kwitnienia przez światło. *Postępy Biologii Komórki* 33: 493-507.
- **Zienkiewicz A**, Tretyn A, Kopcewicz J. (2004) Molekularne i fizjologiczne podstawy funkcjonowania roślinnego zegara okołodobowego. *Postępy Biologii Komórki* 31, 607-623.

- **Zienkiewicz A**, Smoliński DJ, Zienkiewicz K, Glazińska P, Wojciechowski W, Kopcewicz J. (2009) Molecular and cytological characterization of ZTL in *Ipomoea nil*. *Biologia Plantarum* 53: 435-443.
- **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Kopcewicz J. (2008) Intracellular distribution of phototropin 1 protein in the short-day plant *Ipomoea nil*. *Protoplasma* 233: 141-147.

W trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej byłam również zaangażowana w szereg projektów nie związanych z tematyką mojej rozprawy doktorskiej. W ramach projektu dotyczącego określenia roli cząsteczek miRNA oraz cykazy guanylanowej w regulacji procesów wzrostowo-rozwojowych u *Ipomoea nil* współpracowałam między innymi z dr Pauliną Glazińską (Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika) oraz dr hab. Adrianą Szmidt-Jaworską, prof. UMK z tej samej jednostki. Moim zadaniem w pierwszym projekcie było wykonanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego w celu analizy lokalizacji komórkowej mRNA genu *InAP2-like* oraz *InARF8* w komórkach różnych organów *Ipomoea nil*. Z kolei w badaniach dotyczących roli cykazy guanylanowej stosując metodę immunolokalizacji przedstawiłam dowody na komórkową lokalizację tego białka w komórkach liścieni siewek *Ipomoea nil*. Wyniki badań uzyskane w ramach powyższych projektów zostały opublikowane w formie 3 oryginalnych prac badawczych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

- Glazińska P, **Zienkiewicz A**, Wojciechowski W, Kopcewicz J. (2009) The putative mir172 target gene *InAPETALA-like* is involved in the photoperiodic flower induction of *Ipomoea nil*. *Journal of Plant Physiology* 166: 1801-1813.
- Glazińska P, Wojciechowski W, Wilmowicz E, **Zienkiewicz A**, Frankowski K, Kopcewicz J. (2014) The involvement of *InMIR167* in the regulation of expression of its target gene *InARF8*, and their participation in the vegetative and generative development of *Ipomoea nil* plants. *Journal of Plant Physiology* 15: 225-234.
- Szmidt-Jaworska A, Jaworski K, **Zienkiewicz A**, Lenartowska M, Kopcewicz J. (2009) Guanylyl cyclase activity during photoperiodic flower induction in *Pharbitis nil*. *Plant Growth Regulation* 57: 173-184.

Podjęłam również współpracę z dr hab. Dariuszem Smolińskim, prof. UMK (Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika). Badania te miały na celu poznanie zależności pomiędzy ekspresją białek Sm, formowaniem się ciał

cytoplazmatycznych, zawierających poszczególne komponenty snRNP a powstawaniem *de novo* jądrowych ciał Cajala w trakcie różnicowania się mikrospory modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill). W badaniach tych podjęłam się określenia specyficzności przeciwciał pierwotnych, które następnie zostały wykorzystane do detekcji białek Sm. Stosując metodę immunoprecypitacji oraz Western-blottingu potwierdziłam specyficzność użytych przeciwciał pierwotnych anty-SmD oraz Y12, co umożliwiło ich późniejsze zastosowanie do lokalizacji białek Sm na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego oraz elektronowego. Wyniki tych badań zostały opublikowane w formie 1 oryginalnej pracy badawczej w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

- Smoliński DJ, Wróbel B, Noble A, **Zienkiewicz A**, Górski-Bryl A. (2011) Periodic expression of Sm proteins parallels formation of nuclear Cajal bodies and cytoplasmatic snRNP-rich bodies. *Histochemistry and Cell Biology* 136: 527-541.

W trakcie mojej pracy na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika zaangażowana byłam również w projekt mający na celu poznanie organizacji systemu splicingowego podczas różnicowania i kiełkowania ziarna pyłku hiacynta wschodniego (*Hyacinthus orientalis* L.) realizowany przez dr Krzysztofa Zienkiewicza w Zakładzie Biologii Komórki UMK w Toruniu (obecnie zatrudnionego w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii, UMK). Współpraca ta zaowocowała czterema oryginalnymi pracami badawczymi w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

- Zienkiewicz K, **Zienkiewicz A**, Smoliński DJ, Rafińska K, Świdziński M, Bednarska E. (2008a) Transcriptional state and distribution of poly (A) RNA and RNA polymerase II in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains. *Sexual Plant Reproduction* 21: 233-245.
- Zienkiewicz K, **Zienkiewicz A**, Rodríguez-García MI, Smoliński DJ, Świdziński M, Bednarska E. (2008b) Transcriptional activity and distribution of splicing machinery elements during *Hyacinthus orientalis* pollen tube growth. *Protoplasma* 233: 129-139.
- Zienkiewicz K, **Zienkiewicz A**, Smoliński DJ, Świdziński M, Bednarska E. (2008c) Intracellular organization of the pre-mRNA splicing machinery during *Hyacinthus orientalis* L. pollen development. *Sexual Plant Reproduction* 21: 217-231.

- Zienkiewicz K, Suwińska A, Niedojadło K, **Zienkiewicz A**, Bednarska E. (2011) Nuclear activity of sperm cells during *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro* pollen tube growth. *Journal of Experimental Botany* 62: 1255-1269.

W ramach badań opisanych w wyżej wymienionych publikacjach moja praca polegała na: 1) zbadaniu poziomu dwóch form białka polimerazy IIA w różnych tkankach *Hyacinthus orientalis* za pomocą techniki Western-blott (Zienkiewicz i wsp., 2008a), 2) określeniu specyficzności przeciwciał pierwotnych anti-SC35 za pomocą metody immunoprecypitacji oraz Western-blottingu (Zienkiewicz i wsp., 2008b), 3) analizie specyficzności przeciwciała anti-Y12 w ekstrakcie białkowym izolowanym z ziarna pyłku *Hyacinthus orientalis* (Zienkiewicz i wsp., 2008c), oraz 4) sprawdzeniu zmian poziomu całkowitego RNA oraz białek podczas wzrostu łagiewki pyłkowej *Hyacinthus orientalis* (Zienkiewicz i wsp., 2011).

5.2. Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

W 2008 rozpoczęłam mój pierwszy staż podoktorski w zakładzie Biologii Reproduktywnej Roślin kierowanym przez prof. Maria Isabel Rodríguez-García w Estación Experimental del Zaidín należącej do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) w Grenadzie (Hiszpania). W trakcie mojego pobytu zainteresowałam się tematyką badawczą związaną z zagadnieniem mechanizmu mobilizacji materiałów zapasowych głównie tłuszczu oraz białek podczas kiełkowania nasion oraz ziaren pyłku oliwki europejskiej (*Olea europaea* L). Wyniki tych badań stanowią omawiane osiągnięcie i zostały szczegółowo scharakteryzowane w pierwszej części niniejszego autoreferatu. Dodatkowo metoda wykrywania aktywności lipazy na żelach poliakrylamidowych którą wykorzystano w publikacjach: Rejón i wsp. 2012, Zienkiewicz i wsp., 2013 oraz Zienkiewicz i wsp., 2014a została opublikowana w formie osobnego protokołu w czasopiśmie Bio-protocol.

- **Zienkiewicz A**, Rejón JD, Zienkiewicz A, Castro A, Rodríguez-García MI. (2015) In gel detection of lipase activity in crude plant extracts *Olea europaea*. *Bio-protocol* 5.

Podczas pracy z materiałem roślinnym zawierającym wysoką zawartość tłuszczu zapasowych zaobserwowałam iż zarówno w przypadku elektroforezy SDS-PAGE oraz elektroforezy dwuwymiarowej w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE) bardzo ważny jest wybór odpowiedniej metody izolacji i oczyszczania białek. Ekstrakty białkowe izolowane z

tkanek roślinnych mogą mieć w swoim składzie stosunkowo wysoką zawartość substancji interferujących takich jak: tłuszcze, polisacharydy, barwniki czy polifenole, które w istotny sposób wpływają na jakość rozdziału białek. Elektroforeza dwuwymiarowa jest powszechnie stosowaną metodą rozdziału białek. Połączenie techniki ogniskowania izoelektrycznego (IEF) oraz standardowej elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) zapewnia wyjątkowo dobry rozdział mieszaniny białek oraz wysoką powtarzalność analiz. Przygotowanie prób białkowych to etap krytyczny analiz proteomicznych wymagający stosowania precyzyjnych i niezawodnych procedur, które muszą być zarówno wydajne jak i niezwykle powtarzalne. Dlatego też w trakcie moich badań zoptymalizowałam metodę izolacji białek, która z powodzeniem może być wykorzystana podczas eksperymentów mających na celu otrzymanie ekstraktów białkowych z materiału roślinnego bogatego w tłuszcze zapasowe. Metoda ta została opublikowana w formie protokołu będącego częścią obszernej monografii w ramach renomowanej serii Springer Protocols.

- **Zienkiewicz A**, Rejón JD, Alché JD, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2014) A protocol for protein extraction from lipid-rich plant tissues suitable for electrophoresis. *Plant Proteomics, Methods in Molecular Biology* 1072: 85-91.

Moje bogate doświadczenie w zakresie elektroforetycznych technik analizy białek wykorzystałam również w badaniach mających na celu opracowanie wydajnej metody identyfikacji alergenów obecnych w ziarnach pyłku oliwki europejskiej (*Olea europaea* L.). Pyłek oliwki europejskiej jest jednym z czynników alergicznych w obszarach śródziemnomorskich oraz niektórych regionach obu Ameryk i Australii. Standaryzacja ekstraktów białkowych wykorzystywanych w diagnostyce reakcji alergicznych jest podstawowym warunkiem efektywnej analizy reaktywności oraz identyfikacji poszczególnych alergenów w warunkach klinicznych. Celem niniejszych badań było zbadanie potencjalnych korzyści z wykorzystania zautomatyzowanego systemu elektroforezy kapilarnej celem szybkiej, precyzyjnej i wydajnej metody diagnostyki pacjentów z reakcją alergiczną na pyłek oliwki. Zastosowanie elektroforezy kapilarnej pozwoliło na szybkie i specyficzne określenie profilu białkowego ekstraktów uzyskanych z pyłku oliwki europejskiej oraz detekcje badanych alergenów w oparciu o dostępne ekstrakty standardowe. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane w formie oryginalnej publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

- **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Florido F, Marco FM, Romero PJ, Castro AJ, Alché JD. (2014) Chip-based capillary electrophoresis profiling of olive pollen extracts used for allergy diagnosis and immunotherapy. *Electrophoresis* 35: 2681-2685.

Powyższe badania były kontynuowane w ramach projektu, w którym zastosowano elektroforezę dwuwymiarową w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE) w celu identyfikacji licznych izoform badanych alergenów. Opisany w niniejszej pracy system pozwala na szybką i wydajną metodę jednoczesnej detekcji trzech głównych alergenów pyłku oliwki – Ole e 1, Ole e 2 i Ole e 5. Mój udział w tym projekcie polegał na wykonaniu standardowego Western-blottingu, którego wyniki zostały porównane z analizą prowadzoną z wykorzystaniem elektroforezy dwuwymiarowej oraz detekcji białek za pomocą techniki Western-blottingu typu multipleks. Szczegółowy opis przedstawionych metod oraz uzyskanych wyników został opisany w pracy badawczej wymienionej poniżej.

- Zienkiewicz K, Alché JD, **Zienkiewicz A**, Tormo A, Castro AJ. (2015) Identification of olive pollen allergens using a fluorescence-based 2D multiples method. *Electrophoresis* 36: 1043-1050.

Uczestniczyłam również w projekcie, którego celem była kompleksowa analiza ekspresji pektyn i białek arabinogalaktanowych (AGP) podczas rozwoju słupka oraz kiełkowania ziarna pyłkowego i wzrostu łagiewki pyłkowej *Olea europaea* L. Pektyny i białka AGP stanowią podstawowy element strukturalny ściany komórkowej roślin i odpowiadają za jej fizyczne właściwości podczas procesów wzrostu i różnicowania komórek. Komponenty ściany komórkowej słupka biorą udział w kluczowych dla procesu rozmnażania zjawiskach, takich jak rozpoznawanie komórek w interakcjach pyłek-słupek, odżywianie łagiewki pyłkowej oraz regulacja jej wzrostu. Dzięki użyciu kompleksowego zestawu przeciwciał rozpoznających różne klasy pektyn (JIM7, JIM5, LM5 oraz LM6) oraz białka AGP (JIM 13) dokonano szczegółowej analizy lokalizacji powyższych molekuł w tkankach rozwijającego się słupka. Najwyższy poziom pektyn zarówno estryfikowanych jak i de-estryfikowanych obserwowano podczas zapylenia słupka oliwki europejskiej. Podobnie pektyny bogate w arabinozę (arabiniany) oraz białka AGP wykrywano głównie w eksudacie obecnym na znamieniu słupka, w ścianach komórek sekrecyjnych znamienia oraz w szlaku transmisyjnym słupka podczas okresu zapylenia. Z kolei w trakcie kiełkowania ziarna pyłkowego oliwki *in vitro* wykazano iż (1 → 4)-β-d-galaktany lokalizują się w ścianie komórkowej łagiewki pyłkowej, z

charakterystyczną akumulacją w regionie wierzchołkowym łagiewki. Z kolei (1 → 5)- α -L-arabiniany były głównie deponowane w postaci regularnych pierścieni otaczających strefę pod wierzchołkową łagiewki pyłkowej. Uzyskane wyniki potwierdziły syntezę de novo pektyn i białek AGP podczas kiełkowania *in vitro* ziarna pyłkowego. Obecność galaktanów w kiełkującym pyłku oliwki sugeruje, iż mogą one pełnić rolę strukturalną wzmacniając regiony łagiewki szczególnie narażone na rozciąganie (połączenie łagiewki i ziarna pyłkowego) oraz uszkodzenia mechaniczne (wierzchołek łagiewki). Wyniki tych badań są częścią następujących publikacji naukowych:

- Castro AJ, Suárez C, Zienkiewicz K, Alché JD, **Zienkiewicz A**, Rodríguez-García MI. (2013) Electrophoretic profiling and immunocytochemical detection of pectins and arabinogalactan proteins in olive pollen during germination and pollen tube growth. *Annals of Botany* 112: 503-513.
- Suárez C, **Zienkiewicz A**, Castro AJ, Zienkiewicz K, Majewska-Sawka A, Rodríguez-García MI. (2013) Cellular localization and levels of pectins and arabinogalactan proteins in olive (*Olea europaea* L.) pistil tissues during development: *Planta* 237: 305-319.

Współpracowałam również z dr Agatą Kućko (Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, UMK), która odbywała swój staż doktorski w Estación Experimental del Zaidín (Hiszpania) w ramach The International Agrifood Doctorate School finansowanej przez konsorcjum eidA3-ceiA3. Projekt ten dotyczył zagadnień związanych z formowaniem się warstwy odcinającej kwiatów łubinu żółtego (*Lupinus luteus*). Mój udział w tym projekcie skupiał się głównie na pomocy przy przygotowaniu materiału roślinnego do badań prowadzonych na poziomie mikroskopu fluorescencyjnego oraz elektronowego jak również analizie aktywności enzymatycznej lipooksygenazy oraz lipazy na żelach poliakrylamidowych. Część wyników uzyskana w ramach tego projektu została opublikowana w następujących pracach:

- Frankowski K, Kućko A, **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Alché JD, Kopcewicz J, Wilmowicz E. (2017) Ethylene-dependent effects on generative organ abscission of *Lupinus luteus*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 86: 1-11.
- Frankowski K, Wilmowicz E, Kucko A, **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Kopcewicz J. (2015) Molecular cloning of the BLADE-ON-PETIOLE gene and expression analyses during nodule development in *Lupinus luteus*. *Journal of Plant Physiology* 1: 35-39.

- Frankowski K, Wilmowicz E, Kucko A, **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Kopcewicz J. (2015) Profiling the BLADE-ON-PETIOLE gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 220.

W 2014 roku rozpoczęłam mój drugi podoktorski staż na Uniwersytecie Stanowym Michigan (MSU, Stany Zjednoczone) w prestiżowej grupie badawczej prof. Christopha Benninga. W latach 2014-2016 byłam zatrudniona w ramach Great Lakes Bioenergy Research Center (GLBRC) którego częścią jest grupa prof. Christopha Benninga. W tym czasie pogłębiłam moją wiedzę na temat biosyntezy kwasów tłuszczowych oraz triacyloglicerolu u roślin jak również opanowałam różnorodne techniki izolacji oraz analizy tłuszczu w tkankach roślinnych. Ponadto zapoznałam się z metodami inżynierii genetycznej mającymi na celu uzyskanie roślin transgenicznych o podwyższonej zawartości tłuszczu zapasowych, które w przyszłości mogą być wykorzystane do produkcji biopaliw. Nabyte umiejętności wykorzystałam następnie w badaniach nad modelową rośliną jednoliścienną *Brachypodium distachyon*. Głównym celem moich badań było uzyskanie transgenicznych linii *B. distachyon* z podwyższonym poziomem tłuszczu zapasowych w organach wegetatywnych takich jak łodyga oraz liście. W tym celu transformowałam *B. distachyon* konstruktem składającym się z dwóch funkcjonalnych elementów: genu kodującego czynnik transkrypcyjny *WRINKLED1* (*WRI1*) oraz genu kodującego acyltransferazę diacylglicerolu (*DGAT1*). W wyniku transformacji roślin *B. distachyon* obserwowano wzrost poziomu akumulowanego tłuszczu zarówno w komórkach liści jak i łodygi. Wzrost zawartości triacylglicerolu był również pozytywnie skorelowany ze wzrostem liczby ciał olejowych wykrywanych w analizowanych tkankach. Badania ostatnich lat wykazały, iż nie tylko rośliny wyższe mogą służyć jako źródło energii odnawialnej ale także mikroalgi z powodzeniem mogą być wykorzystywane do produkcji biopaliw. Dlatego też jednym z moich projektów realizowanych w laboratorium Prof. Christopha Benninga była analiza transkryptomu mikroalgi *Nannochloropsis oceanica*, ze szczególnym uwzględnieniem genów kodujących białka zaangażowane w syntezę oraz degradację triacylglicerolu. Wykonana przeze mnie analiza przyczyniła się do wyselekcjonowania kilku genów których nadekspresja może posłużyć w przyszłości do uzyskania transgenicznych mikroalg charakteryzujących się dużą zawartością tłuszczu. Mój pobyt w grupie prof. Christopha Benninga zaowocował przygotowaniem dwóch manuskryptów, których jestem pierwszym autorem, a które aktualnie są przez niego edytowane a także udziałem w czterech konferencjach na których prezentowałam swoje wyniki (szczegóły w załączniku 4).

Dodatkowo byłam zaangażowana w liczne projekty zarówno we współpracy z członkami zespołu prof. Christopha Benninga jak również z innymi grupami badawczymi takimi jak grupa kierowana przez dr Gregory Bonito (Department of Plant, Soil and Microbial Sciences, MSU), dr Eva Farre (Department of Plant Biology, MSU), dr Curtis Wilkerson (Department of Plant Biology, MSU) oraz dr Federica Brandizzi (Department of Plant Biology, MSU). Współpraca ta przełożyła się na publikacje 10 manuskryptów naukowych w prestiżowych czasopismach takich jak: *Plant Cell* czy *Plant Physiology* których wyniki zostały opisane poniżej.

Prace opublikowane przez Wang i współpracowników (2018, 2017) przedstawiają charakterystykę trzech białek należących do jednej grupy chloroplastowych lipaz (PLIP1-PLIP3) u *Arabidopsis thaliana*. Mój udział w tym projekcie obejmował detekcję rekombinowanych białek z GFP na poziomie komórkowym przy użyciu mikroskopu konfokalnego zarówno w liniach transgenicznym *Arabidopsis thaliana* jak również w liściach tytoniu (*Nicotiana benthamiana*). Wyniki tych badań opublikowano w następujących pracach:

- Wang K, Guo Q, Froehlich JE, Hersh HL, **Zienkiewicz A**, Howe GA, Benning C. (2018) Two abscisic acid-responsive plastid lipase genes involved in jasmonic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 30:1006-1022.
- Wang K, Froehlich JE, **Zienkiewicz A**, Hersh HL, Benning C. (2017) A Plastid Phosphatidylglycerol lipase contributes to the export of acyl groups from plastids for seed oil biosynthesis. *Plant Cell* 29:1678-1696.

Zaangażowana byłam również we współpracę z dr Yang Yang, która zapoczątkowała badania nad metabolizmem tłuszczu w jednoliściennej roślinie *Brachypodium distachyon* w grupie prof. Christopha Benninga (MSU). W ramach tych badań wykonałam analizę lokalizacji ciał olejowych na poziomie mikroskopu konfokalnego w nasionach *Brachypodium distachyon* oraz analizę ultrastruktury komórkowej nasion *Arabidopsis thaliana* a uzyskane przeze mnie wyniki tych badań opublikowano w następujących pracach:

- Yang Y, Munz J, Cass C, **Zienkiewicz A**, Kong Q, Ma W, Sanjaya S, Sedbrook JC, Benning C. (2015) Ectopic expression of WRI1 affects fatty acid homeostasis in *Brachypodium distachyon* vegetative tissues. *Plant Physiology* 169:1836-47.

- Yang Y, **Zienkiewicz A**, Lavell A, Benning C. (2017) Coevolution of Domain Interactions in the Chloroplast TGD1, 2, 3 Lipid Transfer Complex Specific to Brassicaceae and Poaceae Plants. *Plant Cell* 29:1500-1515.

W trakcie mojego pobytu na MSU brałam także udział w wielu badaniach dotyczących metabolizmu tłuszczu zarówno u grzybów (*Mortierella elongata*) jak i glonów jednokomórkowych (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Nannochloropsis oceanica*). W dwóch publikacjach naukowych (Du i wsp., 2018a, Uehling i wsp., 2017) przedstawiłam analizę genomu *Mortierella elongata* ze szczególnym uwzględnieniem genów i białek będących częścią szlaków odpowiedzialnych za syntezę kwasów tłuszczowych oraz tłuszczu zapasowych. Z kolei w badaniach naukowych przedstawionych w pracach: Du i wsp., 2018b, Zienkiewicz i wsp., 2017, Poliner i wsp., 2015 - przygotowałam analizę morfologii chloroplastu *Chlamydomonas reinhardtii* na poziomie mikroskopu konfokalnego (Du i wsp., 2018b), oraz stworzyłam konstrukty zawierające geny kodujące białka DGAT z *Nannochloropsis oceanica*, które wykorzystałam następnie do transformacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* typu dzikiego i mutantów H1266 charakteryzujących się brakiem zdolności do syntezy tłuszczu zapasowych (Zienkiewicz i wsp., 2017). Dodatkowo w pracy Poliner i wsp., 2015 wykonałam także lokalizację jąder komórkowych u *Nannochloropsis oceanica*. Kompletną listę wymienionych prac przedstawiono poniżej.

- Du ZY, Alvaro J, Hyden B, Zienkiewicz K, Benning N, **Zienkiewicz A**, Bonito G, Benning C. (2018a) Enhancing oil production and harvest by combining the marine alga *Nannochloropsis oceanica* and the oleaginous fungus *Mortierella elongata*. *Biotechnology for Biofuels* 11:174.
- Du ZY, Lucker BF, Zienkiewicz K, Miller TE, **Zienkiewicz A**, Sears BB, Kramer DM, Benning C. (2018b) Galactoglycerolipid lipase PGD1 is involved in thylakoid membrane remodeling in response to adverse environmental conditions in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 30:447-465.
- Uehling J, Gryganskyi A, Hameed K, Tschaplinski T, Misztal PK, Wu S, Desirò A, Vande Pol N, Du Z, **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Morin E, Tisserant E, Splivallo R, Hainaut M, Henrissat B, Ohm R, Kuo A, Yan J, Lipzen A, Nolan M, LaButti K, Barry K, Goldstein AH, Labbé J, Schadt C, Tuskan G, Grigoriev I, Martin F, Vilgalys R, Bonito G. (2017) Comparative genomics of *Mortierella elongata* and its bacterial endosymbiont *Mycoavidus cysteinexigens*. *Environmental Microbiology* 19:2964-2983.

- Zienkiewicz K, **Zienkiewicz A**, Poliner E, Du ZY, Vollheyde K, Herrfurth C, Marmon S, Farré EM, Feussner I, Benning C. (2017) Nannochloropsis, a rich source of diacylglycerol acyltransferases for engineering of triacylglycerol content in different hosts. *Biotechnology for Biofuels* 10:8.
- Poliner E, Panchy N, Newton L, Wu G, Lapinsky A, Bullard B, **Zienkiewicz A**, Benning C, Shiu SH, Farré EM. (2015) Transcriptional coordination of physiological responses in *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 under light/dark cycles. *Plant Journal* 83:1097-113.

W 2016 roku nawiązałam współpracę z prof. Ivo Feussnerem co zaowocowało możliwością odbycia stażu podoktorskiego w jego grupie w Zakładzie Biochemii Roślin na Uniwersytecie w Getyndze (Niemcy). Podczas mojego pobytu w tej jednostce dostałam szansę na poszerzenie mojej wiedzy z zakresu nowoczesnych technologii analizy tłuszczu (lipidomika). Aktualnie zaangażowana jestem w dwa projekty naukowe mające na celu zbadanie roli sfingolipidów we wzroście i rozwoju *Arabidopsis thaliana* oraz poznanie roli autofagi w metabolizmie ciał olejowych w nasionach *Arabidopsis thaliana*. Sfingolipidy jako jeden z elementów błon komórkowych wchodzi w skład tak zwanych tratw lipidowych (ang. *lipid rafts*). Tratwy lipidowe są to wyraźnie oddzielone domeny błony komórkowej które ze względu na różnicę upakowania lipidów oraz ich nasycenia i długości ogonów hydrofobowych stanowią fazę uporządkowaną (faza LO) błony. Z kolei otaczające tratwy lipidowe pozostałe molekuły wchodzi w skład tak zwanej fazy nieuporządkowanej (LD lub L α) lipidów błonowych. Z powodu niewielkich rozmiarów obserwacja tratw lipidowych jest trudna chociaż nie niemożliwa. W moich badaniach, aby uwidocznić tratwy lipidowe użyłam fluorescencyjnej sondy di-4-ANEPPDHQ który w zależności od miejsca związania z błoną komórkową emituje fluorescencję różnej długości fali świetlnej zależnie od stopnia uporządkowania danego obszaru błony. Próby analizowałam z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego a wyniki które uzyskałam stosując powyższą metodę lokalizacji tratw lipidowych zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Science*.

- Lenarčič T, Albert I, Böhm H, Hodnik V, Pirc K, Zavec AB, Podobnik M, Pahovnik D, Žagar E, Pruitt R, Greimel P, Yamaji-Hasegawa A, Kobayashi T, **Zienkiewicz A**, Gömann J, Mortimer JC, Fang L, Mamode-Cassim A, Deleu M, Lins L, Oecking C, Feussner I, Mongrand S, Anderluh G, Nürnberger T. (2017) Eudicot plant-specific

sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science* 15:1431-1434.

Poza prowadzeniem badań naukowych uczestniczyłam także w przygotowaniu kilku rozdziałów do Encyklopedii Lipidomiki (która jest aktualnie przygotowywana do druku) wymienionych poniżej:

- **Zienkiewicz A.** (2017) Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) in Plants: Functional Diversity of. W: Wenk M. (eds) *Encyclopedia of Lipidomics*. Springer, Dordrecht, doi: 10.1007/978-94-007-7864-1_142-1, ISBN: 978-94-007-7864-1.
- **Zienkiewicz A.** (2017) Phosphatidylcholine in Plants: Functional Diversity of. In: Wenk M. (eds) *Encyclopedia of Lipidomics*. Springer, Dordrecht, doi: 10.1007/978-94-007-7864-1_142-1). ISBN: 978-94-007-7864-1.
- **Zienkiewicz A.** (2016) Lipid Composition of *Oryza sativa*. In: Wenk M. (eds) *Encyclopedia of Lipidomics*. Springer, Dordrecht, doi: 10.1007/978-94-007-7864-1_142-1). ISBN: 978-94-007-7864-1.

6. Plany przyszłych badań

Celem mojej kariery naukowej w ostatnich kilku latach było zdobycie doświadczenia w zakresie zarówno biologii molekularnej (np. CRISPR/Cas9 system), biochemii (np. analiza składu i poziomu tłuszczu roślinnych) jak również nawiązanie współpracy z wiodącymi jednostkami badawczymi prowadzącymi badania z zakresu metabolizmu tłuszczu w komórkach roślinnych. Wszystkie moje działania nakierowane były na doskonalenie mojej wiedzy i umiejętności co mam nadzieję pozwoli mi w przyszłości wrócić do mojego kraju rodzinnego (Polski) i stworzyć tutaj moją własną prężną grupę badawczą, w celu kontynuowania moich badań z zakresu metabolizmu tłuszczu roślinnych. Chciałabym skupić się głównie na zagadnieniach związanych z rolą lipaz oraz autofagii w degradacji tłuszczu zapasowych w komórkach starzejących się liści. Poznanie tych mechanizmów pozwoli nie tylko zrozumieć ich rolę w metabolizmie tłuszczu ale również otworzy nowe możliwości uzyskania roślin transgeniczných z podwyższoną zawartością tłuszczu zapasowych w tkankach wegetatywnych. Planuje również kontynuować moją współpracę z grupą prof. Benninga oraz prof. Feussnera, co również pozwoli mi na ubieganie się o międzynarodowe

źródła finansowania w ramach akcji Synergy Grants przyznawanych przez Europejską Radę ds. Badań Naukowych (*ERC- European Research Council*) czy Niemieckiej Fundacji ds. Badań (DFG – *Deutsche Forschungsgemeinschaft*). W najbliższej przyszłości planuję również ubiegać się o finansowanie moich badań z funduszy Narodowego Centrum Nauki (NCN) oraz Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP).

7. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Podczas mojej pracy w Zakładzie Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin (2002-2008, obecnie Katedra Fizjologii i Roślin i Biotechnologii) na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) UMK w Toruniu prowadziłam zajęcia dydaktyczne z przedmiotów: botanika ogólna, fizjologia roślin, fizjologia wzrostu i rozwoju roślin na kierunku Biologia. Sprawowałam również opiekę nad 4 pracami magisterskimi i jedną pracą licencjacką.

W ramach działalności dydaktycznej w latach 2008-2014 podczas mojego pobytu w Estación Experimental del Zaidín (Hiszpania) prowadziłam w każdym roku akademickim zajęcia dla studentów i doktorantów Uniwersytetu w Grenadzie (Hiszpania), zarówno w języku angielskim jak również w hiszpańskim. Zajęcia te prowadziłam w ramach następujących kursów: 1) *Higher Plants Reproduction Biology, Agronomic and Biotechnologic Implications* (przedmiot do wyboru dla studentów Uniwersytetu w Grenadzie, Hiszpania), język: hiszpański, 2) *Technical Training Courses ceiA3 - Agrifood International Doctorate School* (kurs dla doktorantów hiszpańskich uczelni wyższych i jednostek badawczych), Grenada, Hiszpania; język: hiszpański, 3) *UNESCO Course: Soil Science, Soil Fertility and Plant Biology* (międzynarodowy kurs dla studentów uczelni wyższych i pracowników jednostek naukowo-badawczych w Hiszpanii), Grenada, Hiszpania; język: angielski. Zaangażowana byłam także w zajęcia promocyjne mające na celu popularyzację nauki w środowisku szkolnym. Prowadziłam zajęcia w ramach programu: PIIISA dla uczniów szkół średnich Regionu Autonomicznego Andaluzji (Hiszpania) biorących udział w międzynarodowym konkursie (*Concurso Internacional Ciencia en Acción 13*) organizowanym przez Unię Europejską. Ponadto prowadziłam warsztaty: Nowoczesne laboratorium w twoich rękach - Tydzień dla Nauki (*Un Laboratorio Moderno en tus Manos - Semana de la Ciencia*) dla uczniów szkół podstawowych Regionu Autonomicznego Andaluzji (Hiszpania),

organizowanych przez Autonomiczny Rząd Andaluzji. Byłam również promotorem jednej pracy magisterskiej finansowanej przez Międzynarodową Radę ds. Oliwy (*International Olive Council*), realizowanej na Uniwersytecie w Kordobie oraz w Estación Experimental del Zaidín w Grenadzie (Hiszpania). W ramach działalności organizacyjnej brałam także czynny udział w przygotowaniu konferencji: 30 lat mikroskopii w Estación Experimental del Zaidín (Hiszpania). W okresie 2014-2016 brałam czynny udział w opiece nad studentami odbywającymi 3 miesięczny staż w grupie Prof. Benninga (MSU) w ramach programu edukacyjnego Centrum Badawczego Bioenergii Wielkich Jezior (Great Lakes Bioenergy Research Center). Z kolei w trakcie mojego pobytu w Zakładzie Biochemii Roślin na Uniwersytecie w Getyndze (Niemcy) sprawowałam bezpośrednią opiekę nad realizacją jednej pracy licencjackiej, jednej pracy magisterskiej oraz 2 studentami rotacyjnymi podczas ich 3 miesięcznego stażu w grupie prof. Feussnera.

7. Informacje bibliometryczne

Liczba prac opublikowanych w czasopismach z Impact Factor (IF)	34
Sumaryczny Impact Factor (IF)*	169.438
Suma punktów MNiSW	1186.000
Liczba wszystkich cytowań	292 (WoS**) 517 (GS***)
Indeks Hirsha	11 (WoS**) 15 (GS***)

*IF dla roku opublikowania,

**Zródło: Web of Science (bez autocytowań),

***Zródło: Google Scholar

8. Literatura

1. Alché JD, Jimenez-Lopez JC, Wang W, Castro AJ, Rodríguez-García MI (2006) Biochemical characterization and cellular localization of 11S type storage protein in olive (*Olea europaea* L.) seeds. *J Agric Food Chem* 54: 5562-5570.
2. Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Barceló AR, Pedrenño MA. (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *J. Exp Bot* 60: 377–390.
3. Andreou A, Feussner I. (2009) Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*. 2009 70: 1504-1510.
4. Ball SG, Morell MK. (2003) From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* 54:207-33.
5. Barbosa AD, Siniosoglou S. (2017) Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864:1459-1468.
6. Bhatla SC, Vandana S, Kaushik V. (2009) Recent development in the oil body-associated signaling molecules during lipolysis in oil seeds. *Plant Signaling and Behavior* 4: 176–182.
7. Baud S, Lepiniec L. (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research* 49: 235-249.
8. Bannenberg G, Martínez M, Hamberg M, Castresana C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* 44:85-95.
9. Bednarska E. (1988) Ultrastructural transformations in the cytoplasm of differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen cells. *Acta Bot Pol* 57: 235–245:
10. Bewley JD, Black M. (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. Plenum, London.
11. Brash AR. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry* 274: 23679–23682.
12. Charzyńska M, Murgia M, Cresti M. (1989) Ultrastructure of the vegetative cell of *Brassica napus* pollen with particular reference to microbodies. *Protoplasma* 152: 22–28:
13. Chen JC, Tsai CC, Tzen JT. (1999) Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol* 40: 1079-1086.
14. Chen EC, Tai SS, Peng CC, Tzen JT. (1998) Identification of three novel unique proteins in seed oil bodies of sesame. *Plant Cell Physiol* 39: 935-41.
15. Chmielnicka A, Żabka A, Winnicki K, Polit JT. (2017) Białka zapasowe roślin – główny surowiec odżywczy – droga od biosyntezy do wewnątrzkomórkowych struktur spichrzowych. *Postepy Hig Med Dosw* 71: 530-540.
16. Eastmond PJ, Graham IA. (2001) Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseed. *Trends in Plant Science* 6: 72-77.
17. Eastmond PJ. (2006) SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 18: 665-75.
18. Fernandez DE, Staehelin LA. (1987) Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells. *Plant Physiol* 85: 487–496.
19. Frandsen G, Müller-Uri F, Nielsen M, Mundy J, Skriver K. (1996) Novel plant Ca(2+)-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J Biol Chem* 271: 343-8.
20. Graham IA. (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* 59: 115-42.
21. Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100: 965-73.
22. Gupta A, Sadeghipour HR, Bhatla SC. (2003) Subcellular detection of lipase activity in plant protoplasts using fluorescence microscopy. *Plant Growth Regul* 41: 259–264.
23. Herman EM, Larkins BA (1999) Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11: 601-613.
24. Huang AHC. (1994) Structure of plant seed oil bodies. *Curr Opin Struct Biol* 4: 493-498.
25. Huang AHC. (2008) Plant Lipid Droplets and Their Associated Proteins: Potential for Rapid Advances. *Plant Physiol* 176:1894-1918.
26. Ikura M. (1996) Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 21: 14-7.
27. Jiang PL, Wang CS, Hsu CM, Yauh GY, Tzen JT. (2007). Stable oil bodies sheltered by a unique oleosin in lily pollen. *Plant Cell Physiol* 48: 812–821.
28. Jiang PL, Jauh GY, Wang CS, Tzen JT. (2008) A unique caleosin in oil bodies of lily pollen. *Plant Cell Physiol* 49: 1390-1395.
29. Jiang PL, Chen JC, Chiu ST, Tzen JT. (2009) Stable oil bodies sheltered by unique caleosin in cycad megagametophytes. *Plant Physiol Bioch* 47: 1009-1010.

30. Jiménez-López JC, **Zienkiewicz A**, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI. (2016) Biogenesis of protein bodies during legumin accumulation in developing olive (*Olea europaea* L.). *Protoplasma* 253: 517-530.
31. Jiménez-López JC, Hernandez-Soriano MC. (2014) Functional differences of storage proteins are reflected in their mobilization patterns from protein bodies in cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) seed germination. *Commun Agric Appl Biol Sci* 7:187-92.
32. Kelly AA, Shaw E, Powers SJ, Kurup S, Eastmond PJ. (2013) Suppression of the SUGAR-DEPENDENT1 triacylglycerol lipase family during seed development enhances oil yield in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Biotechnol J* 11: 355-61.
33. Kelly AA, Quettier AL, Shaw E, Eastmond PJ. (2011) Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in Arabidopsis. *Plant Physiol* 157: 866-75.
34. Kolijak R, Boutaud O, Shieh BH, Samel N, Brash AR. (1997). Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein. *Science* 26: 1994-1996.
35. Lin YH, Huang AH. (1983) Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. *Arch Biochem Biophys* 225: 360-9.
36. Lin LJ, Tzen JTC. (2004) Two distinct steroleosins are present in seed oil bodies. *Plant Physiol Bioch* 42: 601-608.
37. Liu H, Wang X, Ren K, Li K, Wei M, Wang W, Sheng X. (2017) Light Deprivation-Induced Inhibition of Chloroplast Biogenesis Does Not Arrest Embryo Morphogenesis But Strongly Reduces the Accumulation of Storage Reserves during Embryo Maturation in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 8: 1287.
38. Maccarrone M, Salucci ML, van Zadelhoff G, Malatesta F, Veldink G, Vliegthart JF, Finazzi-Agrò A. (2001) Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry*. 40: 6819-6827.
39. McCormick S. (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
40. Mephram RH, Lane GR. (1970) Observation on the fine structures of developing microspores of *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* 70: 1-20.
41. Miquel M, Trigui G, d'Andréa S, Kelemen Z, Baud S, Berger A, Deruyffelaere C, Trubuil A, Lepiniec L, Dubreucq B. (2014) Specialization of oleosins in oil body dynamics during seed development in Arabidopsis seeds. *Plant Physiol* 164:1866-78.
42. Murphy DJ (2012) The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249: 1279-1287.
43. Müller AO, Ischebeck T. (2018) Characterization of the enzymatic activity and physiological function of the lipid droplet-associated triacylglycerol lipase AtOBL1. *New Phytol* 217:1062-1076.
44. Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J. (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot* 52: 1741-1752.
45. Naested H, Frandsen GI, Jauh GY, Hernandez-Pinzon I, Nielsen HB, Murphy DJ, Rogers JC, Mundy J. (2000) Caleosins: Ca²⁺-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol Biol* 44: 463-76.
46. Otegui MS, Herder R, Schulze J, Jung R, Staehelin LA. (2006) The proteolytic processing of seed storage proteins in Arabidopsis embryo cells starts in the multivesicular bodies. *Plant Cell*. 18: 2567-2581.
47. Poxleitner M, Rogers SW, Lacey Samuels A, Browse J, Rogers JC. (2006) A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination. *Plant J* 47: 917-33.
48. Purkrtova Z, d'Andrea S, Jolivet P, Lipovova P, Kralova B, Kodicek M, Chardot T. (2007) Structural properties of caleosin: a MS and CD study. *Arch Biochem Biophys* 464: 335-343.
49. Purkrtova Z, Le Bon C, Kralova B, Ropers MH, Anton M, Chardot T. (2008) Caleosin of *Arabidopsis thaliana* : Effect of Calcium on Functional and Structural Properties. *J Agric Food Chem* 56:11217-11224.
50. Rejón JD, **Zienkiewicz A**, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2012) Profiling and functional classification of esterases in olive (*Olea europaea*) pollen during germination. *Annals of Botany* 110: 1035-1045.
51. Rodríguez-García MI, M'rani-Alaoui M, Fernández MC (2003) Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. *Protoplasma* 221: 237-244.
52. Rudolph M, Schlereth A, Körner M, Feussner K, Berndt E, Melzer M, Hornung E, Feussner I. (2011) The lipoxygenase-dependent oxygenation of lipid body membranes is promoted by a patatin-type phospholipase in cucumber cotyledons. *J Exp Bot* 62: 749-60.
53. Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. (1995) Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 945-956.
54. Shen Y, Xie J, Liu RD, Ni XF, Wang XH, Li ZX, Zhang M. (2014) Genomic analysis and expression investigation of caleosin gene family in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* 448: 365-71
55. Shimada TL, Hara-Nishimura I. (2015) Leaf oil bodies are subcellular factories producing antifungal oxylipins. *Curr Opin Plant Biol* 25: 145-150.

56. Siloto RM, Findlay K, Lopez-Villalobos A, Yeung EC, Nykiforuk CL, Moloney MM. (2006) The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1961-74.
57. Somers DE, Kim WY, Geng R. (2004) The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell* 16: 769-82.
58. Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay SA. (2000) ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101: 319-29.
59. Tzen JT, Huang AH. (1992) Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol* 117: 327-35.
60. van Aelst AC, Person ES, Van Went JL, and Cresti M. (1993). Ultrastructural changes of *Arabidopsis thaliana* pollen during final maturation and rehydration. *Zygote* 1: 173-179.
61. Wetzel CLR, Jensen WA. (1992) Studies of pollen maturation in cotton: the storage reserve accumulation phase. *Sex Plant Reprod* 5: 117-127.
62. Zhao M, Zhang H, Yan H, Qiu L, Baskin CC. (2018) Mobilization and Role of Starch, Protein, and Fat Reserves during Seed Germination of Six Wild Grassland Species. *Front Plant Sci* 9: 234.
63. Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rejón JD, Alché JD, Castro AJ, Rodríguez-García MI. (2014a) Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *Journal of Experimental Botany* 65: 103-115.
64. Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rodríguez-García MI. (2014b) Storage lipids in developing and germinating pollen grain of flowering plants. W: Ramawat KG, Sukhadia ML, Merillon JM, Shivanna KR. *Reproductive Biology of Plants*. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, FI (USA). ISBN: 9781482201321, str. 133-146.
65. Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rejón JD, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2013) New insights into early steps of oil body mobilization during pollen germination. *Journal of Experimental Botany* 64: 293-302.
66. Zienkiewicz A, Jiménez-López JC, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI. (2011a) Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* seed germination and seedling growth. *Protoplasma* 248: 751-765.
67. Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Rodríguez-García MI, Castro AJ. (2011b) Characterization of a caleosin expressed during olive (*Olea europaea* L.) pollen ontogeny. *BMC Plant Biology* 11: 122.
68. Zienkiewicz K, Castro AJ, Alché JD, Zienkiewicz A, Suárez C, Rodríguez-García MI. (2010) Identification and localization of a caleosin in olive (*Olea europaea* L.) pollen during *in vitro* germination. *Journal of Experimental Botany* 61: 1537-1546.

14.03.2019

Zienkiewicz