

Aktywacja mechanizmów kontrolnych cyklu komórkowego oraz zmiany dynamiki transkrypcji indukowane hydroksymocznikiem w merystemach korzeni *Vicia faba*

Konrad Szczepan Winnicki

W toku ewolucji organizmów eukariotycznych wykształcone zostały mechanizmy, które nadzorują przebieg poszczególnych etapów cyklu komórkowego oraz zapewniają odpowiedź na czynniki zagrażające integralności genomów. Kluczową rolę w tych procesach odgrywają heterodimeryczne kompleksy kinaz cyklinozależnych (Cdks, ang. *cyclin-dependent kinases*) oraz cyklin. Aktywność poszczególnych Cdk regulowana jest poprzez potranslacyjne modyfikacje reszt aminokwasowych oraz oddziaływania z inhibitorami kinaz cyklinozależnych (CKI, ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor*).

Działanie czynników fizycznych oraz chemicznych zagrażających integralności genomu prowadzi do aktywacji szlaków metabolicznych organizujących punkty kontrolne cyklu komórkowego. U zwierząt, zatrzymanie widełek replikacyjnych oraz jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA wykrywane są przez kinazy sensoryczne ATM/ATR oraz podległe im kinazy Chk1 i Chk2. Ich aktywność prowadzi do inhibicyjnej fosforylacji fosfataz Cdc25, co w konsekwencji uniemożliwia aktywację białkowych kompleksów Cdk/cyklina. Rolą punktów kontrolnych jest nie tylko zatrzymanie cyklu komórkowego, ale także regulacja ekspresji genów oraz rekrutacja czynników zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA (na drodze rekombinacji homologicznej oraz niehomologicznego łączenia końców).

Badania nad przebiegiem cyklu komórkowego oraz mechanizmami jego regulacji stanowią ważny aspekt poznawczy współczesnej cytofizjologii. Działanie punktów kontrolnych oraz zmiany metabolizmu komórek w odpowiedzi na stres genotoksyczny wciąż są słabo poznane u roślin. Cytologiczne obserwacje wskazujące na zablokowanie cyklu komórkowego w obecności uszkodzeń DNA oraz indukcja aberracyjnych mitoz w wyniku zniesienia funkcji kinaz ATM/ATR wydają się szczególnie interesujące w kontekście: a) braku homologów kinaz Chk1 oraz Chk2 u roślin, b) odmiennej funkcji fosfataz Cdc25, które

w przypadku roślin mogą działać jako reduktaza arsenianowa, c) niepełnej wiedzy o roli fosforylacji Thr14 oraz Tyr15 w roślinnych kinazach Cdk.

Hydroksymocznik (HU) zmniejsza pulę dostępnych deoksyrybonukleotydów poprzez inhibicyjny wpływ na funkcję reduktazy rybonukleotydowej. Deficyt prekursorów syntezy DNA prowadzi do zatrzymania widełek replikacyjnych w fazie S, a w efekcie do powstawania jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA. W obecności HU generowane są także reaktywne formy tlenu uszkadzające strukturę DNA również w pozostałych fazach interfazy.

Zasadniczym celem prowadzonych badań było wyjaśnienie czy uszkodzenia DNA indukowane przez HU wpływają na aktywność transkrypcyjną w merystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba*, a jeśli tak, czy kinazy sensoryczne ATM/ATR biorą udział w jej regulacji. W odpowiedzi komórek zwierzęcych na stres genotoksyczny kinazy te dokonują aktywacji białka p38. Ponieważ u roślin wykazano metodami immunocytochemicznymi obecność ufosforylowanego (w motywie TGY) homologa kinazy p38 (określanego jako „p38-like”), celem mojej pracy było ustalenie czy białko to jest zaangażowane w regulację aktywności transkrypcyjnej oraz funkcję punktów kontrolnych w komórkach *V. faba*.

W celu weryfikacji przedstawionych tez dokonano oceny dynamiki transkrypcji w komórkach siewek kontrolnych oraz traktowanych HU, jak również zmierzono względną zawartość cząsteczek histonu H4 acetylowanego na Lys5 oraz cząsteczek kinaz Cdk ufosforylowanych na Tyr15 w komórkach roślin: a) kontrolnych, b) traktowanych HU, c) inkubowanych w mieszaninie HU i kofeiny (CF, inhibitora kinaz ATM/ATR), oraz d) w mieszaninie HU i SB202190 (inhibitora kinazy p38). Określono także wpływ SB202190 na przebieg indukowanej CF przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC, ang. *premature chromosome condensation*).

Aktywność transkrypcyjna komórek oceniana była półilościową metodą polegającą na włączaniu do pierwotnych transkryptów 5-etynylourydyny (5-EU), lokalizowanej za pomocą reakcji cykloaddycji z fluorochromem oraz pomiarach poziomu intensywności fluorescencji. Wykazano, że w merystematycznych komórkach korzeni *V. faba* HU zwiększa dynamikę transkrypcji, zarówno w obszarach jąderka, jak i pozostałych regionach nukleoplazmy. Wzrost intensywności fluorescencji obserwowano nie tylko w fazie S, ale także w fazie G1 oraz w fazie G2. Otrzymane wyniki dowodzą zatem, że odpowiedź komórek na uszkodzenia DNA jest procesem złożonym, prawdopodobnie prowadzącym nie tylko do ekspresji genów

odpowiedzialnych za naprawę DNA i regulację cyklu komórkowego, ale także powodującym ogólne zmiany metabolizmu w obrębie komórki, przejawiające się m.in. zwiększonym zapotrzebowaniem na rRNA [1].

W celu weryfikacji otrzymanych wyników, dalsze badania obejmowały immunodetekcję dużej podjednostki polimerazy RNA II (POLR2A) oraz histonu H4 acetylowanego na Lys5 - potranslacyjnej modyfikacji związanej z obszarami aktywnymi transkrypcyjnie (inne epigenetyczne modyfikacje zostały szerzej omówione w przeglądowym artykule [4]). W obu przypadkach zaobserwowano zwiększoną immunofluorescencję w jądrach komórek pochodzących z siewek inkubowanych w roztworze HU. Wynik ten wskazuje, że w odpowiedzi na uszkodzenia DNA indukowane przez HU następuje akumulacja dużej podjednostki polimerazy RNA II oraz wzrost zawartości cząsteczek histonu H4 acetylowanych na Lys5 [1].

Dalsze badania miały na celu ustalenie szlaku metabolicznego odpowiedzialnego za regulację aktywności transkrypcyjnej w warunkach stresu genotoksycznego. W pierwszym etapie sprawdzono, czy zmiany w poziomie biosyntezy RNA wywołane działaniem HU związane są z katalitycznymi funkcjami kinaz sensorycznych ATM/ATR. W tym celu porównano względną zawartość cząsteczek histonów H4 acetylowanych na Lys5 w komórkach siewek inkubowanych w HU oraz w mieszaninie HU i CF, inhibitora kinaz ATM/ATR. Otrzymane wyniki ujawniły, że obecność CF obniża indukowaną przez HU intensywność fluorescencji, co wskazuje na zmniejszenie wewnątrzjądrowej zawartości acetylowanych cząsteczek histonów H4. Wydaje się zatem prawdopodobne, że kinazy sensoryczne ATM/ATR zaangażowane są w zmiany aktywności transkrypcyjnej, będące odpowiedzią komórek na stres genotoksyczny [2].

Ponieważ u zwierząt kinaza p38 odpowiedzialna jest za aktywację genów indukowanych stresem i odgrywa rolę w regulacji funkcji punktów kontrolnych, założono, że jej homolog (p38-like) może także pełnić podobną funkcję u roślin. W celu weryfikacji tej hipotezy porównano jądrową zawartość histonu H4 acetylowanego na Lys5 w merystematycznych komórkach siewek inkubowanych: a) w roztworze HU oraz b) w mieszaninie HU oraz SB202190, inhibitora kinazy p38. Ujawniono, że obecność SB202190 (podobnie jak CF) ogranicza intensywność immunofluorescencji indukowanej przez HU. Otrzymane wyniki pośrednio dowodzą, że homolog zwierzęcej kinazy p38 może być białkiem efektorowym

regulującym aktywność transkrypcyjną w odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórkach *V. faba* [2].

Kolejny etap badań miał na celu ustalenie czy SB202190 wpływa na regulację cyklu komórkowego w trakcie stresu genotoksycznego indukowanego przez HU. Badania cytologiczne oraz analizy rozkładów populacyjnych komórek w poszczególnych fazach cyklu wykazały, że - w przeciwieństwie do kofeiny - SB202190 nie znosi funkcji punktów kontrolnych aktywowanych stresem genotoksycznym, nie zaobserwowano bowiem wzrostu podziałów mitotycznych w merystemach korzeniowych pochodzących z siewek inkubowanych w mieszaninie HU i SB202190. Obecność SB202190 w warunkach stresu replikacyjnego prowadzi jednak do zwiększenia liczebności komórek w środkowych podokresach fazy S oraz liczby komórek interfazowych z mikrojądrami oraz aneuploidalnymi jądrami. Obserwacje te skłoniły do dalszych badań mających na celu ustalenie, czy SB202190 wpływa na przebieg przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC), indukowanej przez CF. Cytologicznym obrazem PCC są aberracyjne mitozy z pęknięciami chromosomów, zagubionymi fragmentami oraz mostkami chromosomowymi [2].

Przeprowadzone analizy ujawniły, że SB202190 zwiększa stopień dezintegracji materiału genetycznego w trakcie indukowanej kofeiną PCC, co w efekcie przejawia się wzrostem liczby aberracyjnych mitoz oraz komórek interfazowych z mikrojądrami. Analizy cyklu komórkowego za pomocą cytometru przepływowego wykazały, że obecność inhibitora kinazy p38 w czasie indukcji PCC wpływa także na zmianę liczebności komórek w poszczególnych fazach cyklu [2].

Dalsze badania miały na celu ustalenie, czy fosforylacja Tyr15 w kinazach Cdk, będąca kluczowym mechanizmem blokującym ich aktywność w odpowiedzi na uszkodzenia DNA u zwierząt, odgrywa podobną rolę w regulacji cyklu komórkowego u roślin. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej formie kinazy Cdk1 ufosforylowanej na Tyr15. Badania biochemiczne oraz immunocytochemiczne wykazały brak tej fosforylacji w trakcie niezakłóconego cyklu komórkowego. Inhibicyjną fosforylację kinaz Cdk zaobserwowano jednak w komórkach pochodzących z siewek traktowanych HU, co wskazuje na jej zaangażowanie w regulację cyklu komórkowego w warunkach stresu genotoksycznego. Ograniczenie poziomu fosforylacji w wyniku inkubacji roślin w mieszaninie HU i CF wskazuje ponadto na ATM/ATR-zależny mechanizm

potranslacyjnej modyfikacji kinaz Cdk. Podobnego efektu nie zaobserwowano w przypadku siewek traktowanych mieszaniną HU i SB202190. Analizy immunofluorescencyjne ujawniły ponadto, że po działaniu HU, bądź mieszaniny HU i SB202190, największym wskaźnikiem wyznakowania charakteryzowały się populacje komórek w fazach G1 i S, przy stosunkowo niskim udziale immunopozytywnych komórek w fazie G2 [3].

Przeprowadzone badania wskazują na zaangażowanie fosforylacji Tyr15 w tych procesach regulacji cyklu komórkowego, które stanowią odpowiedź na uszkodzenia DNA. Wydaje się jednak, że modyfikacja ta odgrywa znaczącą rolę głównie w fazach G1 oraz S. Otrzymane wyniki skłaniają ponadto do wniosku, że homolog kinazy p38 nie uczestniczy w modyfikacji przebiegu cyklu komórkowego w odpowiedzi merystematycznych komórek korzeni *V. faba* na stres genotoksyczny. Zwiększona dezintegracja materiału genetycznego w obecności SB202190 podczas indukcji PCC jest prawdopodobnie efektem wpływu tego inhibitora na regulację ekspresji genów odpowiedzialnych za naprawę DNA.

Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej wskazują, że odpowiedź komórek merystematycznych na stres genotoksyczny wywołany działaniem hydroksymocznika, jest procesem złożonym. Otrzymane wyniki skłaniają do następujących wniosków:

1. Hydroksymocznik powoduje intensyfikację transkrypcji we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Tak więc, zmiany aktywności transkrypcyjnej wydają się być raczej wynikiem odpowiedzi komórek na uszkodzenia DNA (efekt działania reaktywnych form tlenu generowanych w obecności HU), niż zablokowania procesu replikacji na skutek niewystarczającej ilości dostępnych deoksyrybonukleotydów [1].
2. Wzrost dynamiki transkrypcji dotyczy zarówno jąder, jak i obszarów nukleoplazmy pozająderekowej, wskazując, że intensyfikacja transkrypcji nie wynika jedynie z aktywacji genów odpowiedzialnych za naprawę DNA, ale jest przejawem daleko idących zmian metabolicznych w obrębie komórki [1].
3. Zmianom aktywności transkrypcyjnej towarzyszy wzrost zawartości dużej podjednostki polimerazy RNA II w jądrze komórkowym [1].
4. Wzrost aktywności transkrypcyjnej związany jest z acetylacją Lys5 w histonie H4 [1].
5. W regulację aktywności transkrypcyjnej w odpowiedzi na stres genotoksyczny wydaje się być zaangażowany szlak kinaz ATM/ATR oraz szlak kinaz MAP. Hipotetyczny model

- zakłada nadrzędną rolę kinaz ATM/ATR w stosunku do kinazy p38, jednak pozostałe elementy szlaku metabolicznego pozostają nadal do ustalenia. Biorąc pod uwagę wyniki analiz genomu *Arabidopsis thaliana* wykluczające obecność charakterystycznego dla kinazy p38 motywu TGY podlegającego fosforylacji, konieczne wydają się dalsze badania zmierzające do ustalenia, czy u roślin występuje homolog zwierzęcej kinazy p38, a jeśli tak, czy SB202190 jest jego inhibitorem [2].
6. Zatrzymanie cyklu komórkowego w odpowiedzi na działanie HU związane jest z ATM/ATR-zależną inhibitorową fosforylacją Tyr15 w kinazach Cdk. Wydaje się jednak, że fosforylacja Tyr15 odgrywa kluczową rolę głównie w fazie G1 oraz S. Redukcja liczby komórek wykazujących obecność ufosforylowanej Tyr15 w fazie G2 może wskazywać, że podczas przejścia G2-M aktywność kinaz Cdk regulowana jest w znacznej mierze przez inne mechanizmy, np. białkowe inhibitory kinaz Cdk (CKI) [3].
 7. SB202190, inhibitor kinazy p38, nie znosi funkcji punktów kontrolnych, chociaż jego obecność zwiększa dezintegrację materiału genetycznego w trakcie przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC), indukowanej pod wpływem kofeiny. Zjawisko to jest najprawdopodobniej efektem zaburzenia procesów naprawy DNA w obecności SB202190 [2].

Przedstawione badania rzucają nowe światło na metabolizm komórek w trakcie stresu genotoksycznego u roślin. Ponieważ układy doświadczalne opierały się na użyciu inhibitorów poszczególnych enzymów cyklu komórkowego, konieczne wydaje się podjęcie dalszych badań ukierunkowanych bezpośrednio na aktywność poszczególnych białek szlaku punktów kontrolnych oraz kinaz MAP.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Prace badawcze

[1] Winnicki K., Polit J.T., Maszewski J. (2013) *Increased transcription in hydroxyurea-treated root meristem cells of Vicia faba*. Protoplasma, 250: 251-259

[2] Winnicki K., Maszewski J. (2012) *SB202190 affects cell response to hydroxyurea-induced genotoxic stress in root meristems of Vicia faba*. Plant Physiol Biochem, 60: 129-136

[3] **Winnicki K.** (2013) *ATM/ATR-dependent Tyr15 phosphorylation of cyclin dependent kinases in response to hydroxyurea in Vicia faba root meristem cells*. Protoplasma, doi: 10.1007/s00709-013-0490-2

Prace przeglądowe

[4] **Winnicki K.** (2009) *Drugi kod, czyli co determinuje regiony aktywności transkrypcyjnej oraz miejsca inicjacji replikacji*. Postępy Hig Med Dosw 63: 169-175

Hydroxyurea-induced activation of cell cycle control mechanisms and changes in the dynamics of transcription in root meristems of *Vicia faba*

Konrad Szczepan Winnicki

In the course of evolution eukaryotic cells have developed mechanisms that both regulate the progression throughout successive phases of the cell cycle and maintain the integrity of their genomes. Heterodimeric complexes of Cdks (*cyclin-dependent kinases*) and cyclins play prominent role in those processes. The activity of Cdks is regulated by posttranslational modification of amino acid residues and interactions with cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs).

Physical factors and chemical agents that imperil the integrity of the genome, lead to activation of the cell cycle checkpoints. In animals, DNA damage or stalled replication forks are detected by ATM/ATR kinases and their downstream factors, Chk1 and Chk2 kinases. The activity of the latter proteins triggers inhibitory phosphorylation of Cdc25 phosphatases, preserving Cdk/cyclin complexes inactive. Checkpoint signaling pathways not only arrest the cell cycle but also control gene expression and recruit repair factors to the sites of DNA damage.

Functioning of the cell cycle checkpoints and the metabolic state of cells under genotoxic stress are still poorly understood in plants. Cell cycle arrest in response to DNA damage, as well as the induction of aberrant mitoses caused by the inhibition of ATM/ATR kinases are especially intriguing in the context of data pointing to: a) the lack of Chk1 and Chk2 kinases in plants, b) the different role of Cdc25 phosphatases which may act as arsenate reductase, and c) the largely unknown role of Thr14 and Tyr15 phosphorylation of Cdks in plants.

Hydroxyurea (HU), the agent used in this study, is a well-known inhibitor of ribonucleotide reductase, an enzyme responsible for providing balanced quantities of deoxyribonucleotides. Shortage of DNA synthesis precursors stalls replication forks, leading finally to the formation of single- and double-strand DNA breaks. Moreover, reactive oxygen species created in the presence of HU may damage DNA also in other phases of interphase.

The study carried out on root meristem cells of *Vicia faba* was aimed at investigating whether HU-induced DNA damage triggers changes in the dynamics of transcription, and if so, whether ATM/ATR sensor kinases are necessary for the regulation of transcription in response to genotoxic stress. In animals DNA damage induces ATM/ATR-dependent phosphorylation of p38 kinase, which affects the expression of stress-activated genes. Since the variant of p38 kinase (termed as p38-like) phosphorylated in TGY motif was immunodetected in plants, the aim of this study was also to check whether a homolog of p38 kinase is involved both in the regulation of transcription and the functioning of cell cycle checkpoints.

In order to verify the above hypothesis, the dynamics of transcription was evaluated for the control and HU-treated seedlings. Additionally, both the nuclear content of histone H4 molecules acetylated at Lys5 and the relative amount of Cdk molecules phosphorylated at Tyr15 were determined in cells from the control plants and from seedlings treated with HU, the mixture of HU and caffeine (CF, an ATM/ATR kinase inhibitor), as well as the mixture of HU and SB202190 (a p38 kinase inhibitor). Furthermore, an impact of SB202190 (if any) on the CF-induced premature chromosome condensation (PCC) was also tested.

Transcription activity was determined with the use of a semi-quantitative method based on the incorporation of 5-ethynyl uridine (5-EU) to nascent transcripts, localized by cycloaddition reaction with the fluorochrome and the analyses of fluorescence intensity. HU enhances transcription both in the nucleoli and the non-nucleolar regions. The increase in the fluorescence intensity was observed both during replication and in G1 and G2 phase. The obtained results indicate that cells' response to DNA damage is complex. It leads not only to the cell cycle arrest and activation of genes responsible for DNA repair, but probably to overall changes in the cellular metabolism [1].

To verify the obtained data, further analyses comprised immunodetection of the largest subunit of RNA polymerase II (POLR2A) and a posttranslational modification confined to actively transcribed regions, i.e. histone H4 molecules acetylated at Lys5 (other epigenetic modifications are discussed in the review [4]). In both cases, the fluorescence intensity was found enhanced upon HU treatment, indicating nuclear accumulation of the largest subunit of RNA polymerase II and acetylated histone H4 molecules (Lys5) in response to HU-induced DNA damage [1].

The next studies were aimed at investigating which signaling pathway is responsible for the regulation of transcription under genotoxic stress in *V. faba*. Since DNA damage triggers activation of ATM/ATR kinases, then the hypothesis pointing to their involvement seemed very probable. In order to verify this, intranuclear content of histone H4 molecules acetylated at Lys5 was compared between two experimental series, i.e. in seedlings incubated either with HU or with the mixture of HU and caffeine (CF). It was revealed that during HU treatment, the addition of CF triggers the decrease of immunofluorescence intensity, thus indicating the involvement of ATM/ATR signaling pathway in the regulation of histone H4 acetylation at Lys5 under genotoxic stress [2].

Since in animals p38 kinase is responsible for the activation of the stress-induced genes and takes part in the regulation of the cell cycle checkpoints, it was assumed that a homolog of p38 kinase may play similar role in plants. To verify this, the level of Lys5 acetylation was compared in seedlings treated with HU and the HU/SB202190 mixture. The obtained results show that, similar to CF, SB202190 reduces Lys5 acetylation of histone H4 molecules. Indirectly, this may indicate an involvement of p38-like kinase in the regulation of transcription in response of plant cells to DNA damage [2].

Another goal of the present study was to determine whether SB202190 affects the cell cycle arrest, established in the response to HU treatment. Cytological analyses and flow cytometry assay revealed that, in contrary to caffeine, SB202190 does not alleviate cell cycle checkpoints. No increase in mitotic index evaluated for root meristems incubated in the HU/SB202190 mixture was observed. Notably, the presence of SB202190 triggers the increase in the percentage of middle-S phase cells, and in the number of cells with micronuclei and aneuploid nuclei. This observation stimulated further research aimed at resolving whether SB202190 exerts an effect on premature chromosome condensation (PCC). Cytological symptoms of ongoing or past PCC comprise aberrant mitoses revealing: (a) chromosome fragmentation, (b) lost and lagged chromosomes, (c) chromosomal bridges or interphase cells with micronuclei and aneuploid nuclei. Presented data indicate that SB202190 enhances disintegration of genetic material, especially during CF-induced PCC. Moreover, flow cytometry analyses show that p38 kinase inhibitor induces changes in the number of cells in some phases of the cell cycle [2].

Further studies were aimed to investigate whether Cdks phosphorylation at Tyr15, which is one of the mechanisms blocking the activity of these kinases in animals, plays similar function during the regulation of the cell cycle upon DNA damage in plants. Analyses were performed with the use of antibodies directed against human Cdk1 phosphorylated at Tyr15. Biochemical and immunocytochemical experiments revealed lack of Tyr15 phosphorylation in the course of an unperturbed cell cycle. However, inhibitory phosphorylation of Cdk was observed in cells from seedlings treated with HU. Furthermore, the decrease of Tyr15 phosphorylation in roots treated with the HU/CF mixture points to ATM/ATR-dependent phosphorylation of Cdks in response to genotoxic stress. This effect was not observed in seedlings treated with the HU/SB202190 mixture. Immunofluorescence analyses of Tyr15 labeling indices in successive phases of the cell cycle revealed that during treatment of seedlings either only with HU or jointly with HU and SB202190, the highest percent of labeled cells was observed in G1 and S phase, in contrary to low labeling index estimated for cells in G2 phase. It seems very probable that Tyr15 phosphorylation plays a prominent role only in G1 and S phase. Moreover, presented data indicate that p38 kinase homolog does not participate in the cell cycle blockage in response to genotoxic stress. Thus, during CF-induced PCC, the increase in DNA disintegration upon SB202190 administration may result from its effect on the regulation of expression of these genes, which are responsible for DNA repair [3].

The obtained results indicate that cells' response to HU-induced genotoxic stress is complex. Presented data allow to draw the following conclusions:

1. Hydroxyurea induces the increase in transcription in all phases of interphase. Thus, changes of transcription dynamics seem to result from cells' response to HU-induced DNA damage, rather than from replication inhibition caused by the decreased pool of available deoxyribonucleotides [1].
2. Increase in transcription dynamics concerns both the nucleoli and the nucleoplasmic regions, suggesting that changes of transcription activity are not only the result of DNA damage-induced gene activation but they result also from far-reaching changes in cellular metabolism [1].
3. Changes of the transcription activity are correlated with the increase in the intranuclear content of the largest subunit of RNA polymerase II (POLR2A) [1].

4. Increase in transcription dynamics upon HU treatment is correlated with the acetylation of histone H4 molecules at Lys5 [1].
5. Both ATM/ATR and MAPK signaling pathways seem to be implicated in regulation of transcription in response to genotoxic stress. It is very likely that ATM/ATR kinases are upstream factors to MAP kinases also in plants. However, the precise metabolic pathway still needs to be established. Taking into account analyses of *Arabidopsis thaliana* genome that undermine the presence of TGY motif characteristic for p38 kinase, further precise research needs to be done in order to solve whether plants possess homologs of p38 kinase and whether SB202190 is its inhibitor [2].
6. Cell cycle arrest in response to HU results from ATM/ATR-dependent Cdk phosphorylation at Tyr15. However, it seems that this modification plays a prominent role only in G1 and S phase. Decreased Tyr15 labeling indices in G2 phase indicate that during G2/M transition the activity of Cdks may be regulated by other mechanisms, e.g. interaction with Cdk inhibitors (CKI) [3].
7. SB202190, an inhibitor of p38 kinase, does not alleviate cell cycle checkpoints; however, its presence upon CF-induced PCC increases the disintegration of the genetic material. Thus, the observed effect probably results from the disturbance of DNA repair in the presence of SB202190 [2].

Present study sheds new light on metabolic state of plant cells under genotoxic stress. Since inhibitors of enzymes were applied in the experimental procedures, another set of research concentrated directly on the activity of particular proteins needs to be done.

Publications included as a doctoral dissertation

Original papers

[1] Winnicki K., Polit J.T., Maszewski J. (2013) *Increased transcription in hydroxyurea-treated root meristem cells of Vicia faba*. Protoplasma, 250: 251-259

[2] Winnicki K., Maszewski J. (2012) *SB202190 affects cell response to hydroxyurea-induced genotoxic stress in root meristems of Vicia faba*. Plant Physiol Biochem, 60: 129-136

[3] Winnicki K. (2013) *ATM/ATR-dependent Tyr15 phosphorylation of cyclin dependent kinases in response to hydroxyurea in Vicia faba root meristem cells*. Protoplasma, doi: 10.1007/s00709-013-0490-2

Review

[4] **Winnicki K.** (2009) *Second code, or what determines actively transcribed regions and replication origins*. Postepy Hig Med Dosw 63: 169-175