

Załącznik nr 2
(dot. wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego)

dr Dariusz Stępiński

AUTOREFERAT

Informacje o dorobku i osiągnięciach naukowych

Tytuł głównego osiągnięcia naukowego:

**Morfologiczna i cytochemiczna analiza jąder w komórkach merystemów
korzeniowych siewek *Glycine max* poddanych działaniu stresu chłodu (10 °C)
oraz podczas przywrócenia optymalnej temperatury wzrostu (25 °C)**

**Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Katedra Cytofizjologii
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź**

Łódź, Luty 2013

1. Imię i nazwisko

Dariusz Stępiński

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Tytuł zawodowy magistra

1992 r. – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Kierunek: Chemia (mgr chemii, specjalność – biochemia).

Stopień doktora

2000 r. – Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Kierunek: Biologia (doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, specjalność – cytofizjologia).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w placówkach naukowych

2001 r.-obecnie – Uniwersytet Łódzki, Katedra Cytofizjologii, adiunkt,

2000 r. (paźdz.)-2000 r. (grudz.) – Uniwersytet Łódzki, Katedra Cytofizjologii, asystent,

1999 r.-2001 r. – Uniwersytet Łódzki, Katedra Cytofizjologii, starszy referent (stanowisko naukowo-techniczne; niepełny wymiar godzin),

1995 r.-2000 r. – Uniwersytet Łódzki, Stacjonarne Studium Doktoranckie Fizjologiczno-Mikrobiologiczne, doktorant.

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Morfologiczna i cytochemiczna analiza jąderek w komórkach merystemów korzeniowych siewek *Glycine max* poddanych działaniu stresu chłodu (10 °C) oraz podczas przywrócenia optymalnej temperatury wzrostu (25 °C)”, cykl publikacji.

4.2. Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

1. Stępiński D (2008) Nucleolar vacuolation in soybean root meristematic cell during recovery after chilling. *Biologia Plantarum* 52 (3): 507-512.
2. Stępiński D (2009) Immunodetection of nucleolar proteins and ultrastructure of nucleoli of soybean root meristematic cells treated with chilling stress and after recovery. *Protoplasma* 235: 77-89.
3. Stępiński D (2010) Organization of the nucleoli of soybean root meristematic cells at different states of their activity. *Micron* 41: 283-288.

4. **Stępiński D** (2012) Immunofluorescent localization of ubiquitin and proteasomes in nucleolar vacuoles of soybean root meristematic cells. *European Journal of Histochemistry* 56: 71-77.
5. **Stępiński D** (2012) Nucleolin level in plant root meristematic cells under chilling stress and recovery. *Micron* 43: 870-875.
6. **Stępiński D** (2012) Levels of DNA methylation and histone methylation and acetylation change in root tip cells of soybean seedlings grown at different temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 61: 9-17.
7. **Stępiński D** (2012) Nucleolar chromatin organization at different activities of soybean root meristematic cell nucleoli. *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-012-0456-9

Tab. 1. Wskaźniki Impact Factor (podano wartości wskaźników IF dla czasopism z roku wydania publikacji, bieżący – z 2011r. oraz 5-letni), **punkty MNiSW** (podano wartości dla czasopism z roku wydania publikacji oraz bieżące – z 2012 r.) **oraz liczba cytowań** (na podstawie bazy Web of Science ze stycznia 2013 r.) **publikacji stanowiących główne osiągnięcie naukowe.**

Nr publikacji	Wskaźnik IF			Punkty MNiSW		Liczba cytowań
	Z roku wydania publikacji	Bieżący	5-letni	Z roku wydania publikacji	Bieżące	
1	1,426	1,974	1,787	20	25	4
2	1,523	1,922	1,757	20	20	2
3	1,649	1,527	1,683	27	20	3
4	1,688	1,688	1,407	15	15	0
5	1,527	1,527	1,683	20	20	0
6	2,838	2,838	3,023	35	35	0
7	1,922	1,922	1,757	20	20	0
Suma	12,573	13,398	13,097	157	155	9

4.3. Omówienie celu naukowego powyższych prac i osiągniętych wyników

Wstęp

Jąderka są największymi i najlepiej widocznymi w mikroskopie świetlnym i elektronowym substrukturami występującymi w jądrach interfazowych prawie wszystkich komórek eukariotycznych. Nie są one ograniczone żadną błoną (Mao i wsp. 2011).

Jąderka powstają na bazie aktywnych genów rybosomalnych, znajdujących się w przewężeniach wtórnych chromosomów jąderkotwórczych, zwanych organizatorami jąderkowymi (Roussel i wsp. 1996) i produktów tych genów, tj. transkryptów wytwarzanych przez polimerazę I RNA, a także czynników transkrypcyjnych oraz elementów biorących udział w dojrzewaniu pre-rybosomalnego RNA, w tym białek jąderkowych (Mélèse i Xue 1995).

Nie wszystkie geny rDNA w genomie są aktywne transkrypcyjnie (Grummt i Pikaard 2003). Część genów rDNA, która nie ulega transkrypcji, pozostaje w stanie nieaktywnym

w postaci chromatyny skondensowanej, najczęściej jako heterochromatyna wokółjąderkowa (perinukleolarna) (Motte i wsp. 1991; Huang i wsp. 2006).

Z morfologicznego punktu widzenia jąderko roślinne zbudowane jest z następujących składników ultrastrukturalnych: 1) centrów włóknistych (FC – **Fibrillar Centre**), zawierających aktywne i nieaktywne geny rDNA oraz czynniki transkrypcyjne, 2) gęstego składnika włóknistego (DFC – **Dense Fibrillar Component**), w którym następuje dojrzewanie pre-rRNA; według wielu badaczy, najprawdopodobniej na granicy tych dwóch składników odbywa się transkrypcja rDNA (De Carcer i Medina 1999); 3) składnika ziarnistego (GC – **Granular Component**), stanowiącego m.in. granule rybonukleoproteinowe w postaci podjednostek rybosomowych oraz 4) wakuol jąderkowych, pojawiających się w jąderkach o zwiększonej aktywności metabolicznej (Risueño i wsp. 1982).

Jąderka są strukturami niezwykle dynamicznymi. Rozpadają się i odtwarzają w cyklu komórkowym (Hernandez-Verdun 2006), reagują na wszelkie zmiany fizjologiczne i środowiskowe (Sato i Yamada 1996; Baranova i wsp. 2011). Ponadto, między jąderkiem a nukleoplazmą pozająderkową następuje intensywne wymiana składników (Lam i wsp. 2007).

Główną funkcją jąderek jest produkcja podjednostek rybosomowych. Na ten proces składają się: transkrypcja rybosomalnego DNA, obróbka pre-rybosomalnego RNA (processing) oraz składanie małej i dużej podjednostki rybosomowej, w skład których wchodzi odpowiednie rodzaje rRNA oraz białka rybosomowe. Gotowe podjednostki rybosomowe zostają wyeksportowane z jąderek, poprzez nukleoplazmę, do cytoplazmy (Leary i Huang 2001; Raška i wsp. 2004). Wydajność biosyntezy rybosomów skorelowana jest z aktywnością proliferacyjną komórek, tempem ich wzrostu i aktywnością metaboliczną (Donati i wsp. 2012).

W ciągu ostatnich lat dowiedziono, że jąderka biorą również udział w wielu innych, ważnych procesach komórkowych takich jak: regulacja cyklu komórkowego (Cockell i Gasser 1999), kontrola starzenia komórkowego (Boisvert i wsp. 2007), regulacja supresji i aktywności nowotworowej (Derenzini i wsp. 1998) oraz reakcja na infekcje wirusowe (Sirri i wsp. 2008). Jąderka stanowią także ośrodki sensoryczne stresów komórkowych i koordynują odpowiedź na stres (Olson 2004; Boulon i wsp. 2010) oraz pełnią inne, dodatkowe funkcje (Pederson 1998; Olson i wsp. 2002).

Wrażliwość jąderek na czynniki biotyczne i abiotyczne objawia się zmianami w ich budowie morfologicznej oraz w zawartości niektórych komponentów jąderkowych, dzięki czemu struktury te mogą stanowić wskaźnik niektórych stanów patologicznych.

Z cytologicznego punktu widzenia, jąderka są strukturami dobrze widocznymi w mikroskopie świetlnym po zastosowaniu prostych metod cytochemicznych, za pomocą których można określić stan funkcjonalny jąderek i komórek. W związku z ważnymi funkcjami pełnionymi przez jąderka, istotne wydaje się prowadzenie badań tych organelli na poziomie różnych dyscyplin biologiczno-medycznych, w tym na poziomie cytologicznym i biochemicznym.

Jednym z zagadnień mojej rozprawy doktorskiej była morfologiczno-fizjologiczna charakterystyka zmian w jąderkach komórek merystematycznych korzeni soi podczas stresu wywołanego chłodem (10 °C). Wyniki tych badań ujawniły wyraźne ultrastrukturalne różnice w jąderkach roślin eksponowanych na chłód, w stosunku do jąderek roślin hodowanych w warunkach optymalnych dla wzrostu i rozwoju soi (25 °C). Wraz ze zmianami morfologicznymi jąderek obserwowano znacznie obniżoną ich aktywność metaboliczną w roślinach traktowanych chłodem, wyrażającą się bardzo zredukowaną intensywnością włączania radioaktywnego prekursora transkrypcji, ³H-urydyny, do komórek, w tym do jąderek, w porównaniu z włączaniem izotopu do komórek roślin kontrolnych (Stępiński i Kwiatkowska 2003; Stępiński 2004).

Uzyskanie interesujących wyników dotyczących jąderek u soi oraz unikatowa rola tych struktur w komórkach eukariotycznych były impulsem do kontynuowania badań tej subdomeny jądrowej w ramach niniejszej rozprawy habilitacyjnej.

Obiekt badawczy

Soja to roślina o wielkim znaczeniu gospodarczym na świecie. Jest ona istotnym źródłem białka i tłuszczu wykorzystywanych przez człowieka jako pożywienie oraz pasza dla zwierząt. Jest to gatunek pochodzący ze strefy klimatu subtropikalnego. Dlatego też, wydają się interesujące badania rośliny wrażliwej na chłód w przedstawionym poniżej układzie eksperymentalnym.

Materiał roślinny do badań stanowiły siewki soi [*Glycine max* (L.) Merr.], odmiana Aldana. Do eksperymentów wykorzystywano wierzchołkowe części korzeni. Analizy prowadzono na komórkach i jąderkach pochodzących ze stref merystematycznych korzeni. Jąderka soi są dogodnym obiektem badań tych struktur, gdyż jądra komórkowe posiadają tylko po jednym, dużym jąderku.

Układ eksperymentalny

Wszystkie badania zostały przeprowadzone w podobnych układach eksperymentalnych z niewielkimi modyfikacjami.

Nasiona soi kiełkowano 3 dni w temperaturze optymalnej dla wzrostu i rozwoju soi, tj. 25 °C. Takie 3-dniowe siewki stanowiły materiał kontrolny. Następnie 3-dniowe siewki przenoszono do temperatury 10 °C na 4 dni. Te siewki stanowiły materiał poddany stresowi chłodu. Po 4-dniowym chłodzeniu, siewki przenoszono z powrotem do temperatury optymalnej, 25 °C, na 24 godz. Takie rośliny określano jako materiał regenerowany.

Skrócony opis wyników

Zaobserwowanie we wcześniejszych badaniach wyraźnych zmian w ultrastrukturze jąderek po działaniu chłodu i po regeneracji siewek soi w porównaniu z jąderkami roślin kontrolnych, zainspirowało mnie do podjęcia precyzyjnej analizy składników morfologicznych jąderek w komórkach merystemów wierzchołkowych korzeni soi w przedstawionym układzie eksperymentalnym. Celem pracy były morfometryczne badania wielkości oraz liczby poszczególnych substruktur jąderkowych, tj. centrów włóknistych (FC) oraz gęstego składnika włóknistego (DFC), w których odbywają się kolejne etapy biosyntezy rybosomów, tj. transkrypcja pre-rRNA oraz jego potranskrypcyjna obróbka (Huang 2002). Analizy prowadziłem na obrazach mikroskopowoelektronowych przekrojów jąderek. Największą liczbę FC oraz liczbę charakterystycznych domen odpowiadających osobnym obszarom DFC obserwowałem w jąderkach roślin regenerowanych, tj. w jąderkach wykazujących najwyższą aktywność transkrypcyjną, mierzoną intensywnością włączania radioaktywnego prekursora transkrypcji, ³H-urydyny, natomiast najmniejszą liczbę tych substruktur – w jąderkach roślin poddanych stresowi chłodu, tj. w jąderkach o najniższej aktywności transkrypcyjnej. Ponadto, największą powierzchnię FC przypadającą na jąderko obserwowałem w roślinach regenerowanych, a najmniejszą – w roślinach chłodzonych. W przypadku DFC sytuacja była odwrotna – największą powierzchnię obserwowałem w jąderkach roślin chłodzonych, a najmniejszą w jąderkach roślin kontrolnych i regenerowanych. Można by się spodziewać, że w jąderkach roślin chłodzonych obszar zajmowany przez DFC będzie najmniejszy, skoro są to jąderka mało aktywne, natomiast w jąderkach roślin regenerowanych – będzie to obszar największy z powodu wysokiej aktywności jąderek. Odwrotne rezultaty wynikają z faktu, iż jąderka roślin poddanych

stresowi chłodu powiększają się, natomiast jąderka roślin regenerowanych posiadają dodatkowo duże wakuole jąderkowe, wpływające na zmniejszenie powierzchni pozostałych składników morfologicznych jąderka.

Według ogólnego poglądu, w aktywnie transkrybujących jąderkach roślinnych występują liczne FC o małych rozmiarach, natomiast w jąderkach mało aktywnych – nieliczne i duże FC (Medina i wsp. 1983; Risueño i wsp. 1982). W przypadku jąderek soi zawsze obserwowałem podobną wielkość FC, bez względu na to, z którego wariantu pochodziły rośliny. Odnotowałem natomiast różnice w liczbie FC w jąderkach z poszczególnych wariantów eksperymentalnych, zgodną z przyjętym poglądem. W literaturze opisano gatunki roślin, które różnią się typem FC odbiegającym od ogólnego schematu, np. u pomidora (Moreno Díaz de la Espina i wsp. 1992), czy buraka cukrowego (Acevedo i wsp. 1998) występuje jeden typ FC, bez względu na aktywność transkrypcyjną jąderek.

Uzyskane wyniki świadczą o dynamicznych zmianach zachodzących w strukturze jąderek i ich subkompartamentów w odpowiedzi na zmiany temperatury hodowli roślin soi. Ponadto, badania te potwierdzają pogląd o występowaniu cech morfologicznych gatunkowo specyficznych. Można również uznać, że liczba FC oraz liczba DFC mogą być wskaźnikiem aktywności transkrypcyjnej jąderek u roślin [p. 4.2. (3)].

Funkcjonowanie jąderek, w tym produkcja rybosomów, wymaga wielu czynników, m.in. charakterystycznych białek jąderkowych. Fibrylaryna, nukleofosmina (białko B23) oraz nukleolina należą do kluczowych białek jąderkowych, biorących udział w różnych etapach biosyntezy rybosomów, w tym transkrypcji genów rRNA i obróbce potranskrypcyjnej pre-rRNA (Savkur i Olson 1998; Shaw i wsp. 1998; Ginisty i wsp. 1999). W związku ze zróżnicowaną aktywnością transkrypcyjną jąderek w odmiennych warunkach temperaturowych niniejszego modelu eksperymentalnego, kolejnym etapem badań było sprawdzenie poziomu tych białek w jąderkach soi.

Metodą mikroskopii fluorescencyjnej, z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających fibrylarynę i nukleofosminę, zbadałem ich lokalizację i pośrednio poziom w jąderkach komórek wierzchołków korzeni soi. Zarówno liczba i sumaryczna wielkość domen wykazujących fluorescencję oraz intensywność fluorescencji mogą być wskaźnikiem względnego poziomu danego białka w jąderku. Sygnały immunofluorescencyjne dla obu badanych białek skupiały się w okrągłych domenach na terenie jąderek. Te okrągłe obszary odpowiadały najprawdopodobniej DFC. W przypadku nukleofosminy obszary te były nieco

większe, niż dla fibrylaryny, jako że nukleofosmina występuje dodatkowo w składniku ziarnistym jąderka (Spector i wsp. 1984), a fibrylaryna jest markerem tylko DFC (Kalmarova i wsp. 2007). Na każde jąderko przypadało po kilka takich domen, rozdzielonych wąskimi obszarami pozbawionymi fluorescencji. Liczba tych domen i intensywność fluorescencji różniły się w poszczególnych wariantach eksperymentalnych. Największą liczbę domen i o najintensywniejszej fluorescencji obserwowałem w jąderkach roślin regenerowanych, najmniejszą liczbę i o najslabszej fluorescencji – w jąderkach roślin poddanych działaniu chłodu. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że największa zawartość zarówno fibrylaryny, jak i nukleofosminy znajdowała się w jąderkach roślin regenerowanych, a najmniejsza – w jąderkach roślin poddanych stresowi chłodu.

Lokalizację i względny poziom nukleoliny zbadałem techniką immunozłota koloidalnego z zastosowaniem mikroskopii elektronowej. Specyficzność użytego przeciwciała względem nukleoliny potwierdziłem metodą Western blot. Największą gęstość wyznakowania, tj. liczbę ziaren złota przypadającą na jednostkę powierzchni, obserwowałem w jąderkach roślin regenerowanych, najmniejszą – w jąderkach roślin chłodzonych. Poszczególne substruktury jąderek były wyznakowane z różną intensywnością. Najintensywniej była wyznakowana granica między FC a DFC, obszar, który uważa się za najbardziej prawdopodobne miejsce transkrypcji rDNA i wczesnej obróbki pre-rRNA (Gonzalez-Melendi i wsp. 2001). Obszarami o coraz słabszym wyznakowaniu były odpowiednio DFC, FC i GC. Należy zwrócić uwagę, że zostały zachowane proporcjonalne różnice w intensywności wyznakowania tych obszarów pomiędzy poszczególnymi wariantami eksperymentalnymi. Największe wyznakowanie tych regionów było w jąderkach roślin regenerowanych, najmniejsze – w jąderkach roślin poddanych stresowi chłodu, adekwatnie do ich aktywności transkrypcyjnej.

Badania prowadzone w innych układach i obiektach eksperymentalnych wskazują na zachowanie zgodności między zawartością białek jąderkowych i aktywnością funkcjonalną jąderek. Ekspozycja komórek drożdży na niską temperaturę powodowała obniżenie poziomu mRNA kodującego fibrylarynę, a w konsekwencji poziomu samego białka (Girard i wsp. 1993). Obniżony poziom fibrylaryny i homologu nukleoliny obserwowano w strefie FC-DFC i DFC jąderek rzeżuchy w warunkach stresu obniżonej grawitacji, co skutkowało upośledzeniem aktywności jąderek (Sobol i wsp. 2006).

Rezultaty niniejszych badań świadczą o tym, że w komórkach soi istnieje pozytywna korelacja między poziomem fibrylaryny, nukleofosminy i nukleoliny a aktywnością

transkrypcyjną jąderek. Prawdopodobnie zawartość tych białek jąderkowych jest raczej regulowana poprzez syntezę *de novo* i degradację, w zależności od potrzeb, tj. aktywności transkrypcyjnej, a nie poprzez przemieszczanie się ich między poszczególnymi obszarami jąderka. Wydaje się, że zawartość badanych białek jąderkowych, w niniejszym przypadku mierzona liczbą domen immunofluorescencyjnych uzyskanych po zastosowaniu przeciwciał skierowanych przeciwko fibrylarynie i nukleofosminie, jak też liczbą ziaren złota sprzężonych z przeciwciałem względem nukleoliny, może również być wskaźnikiem aktywności jąderek [p. 4.2. (2.); p. 4.2. (5.)].

W komórkach eukariotycznych geny rybosomalne (rDNA) występują pod postacią euchromatyny, jako geny aktywne transkrypcyjnie, a nieaktywna część genów rRNA – jako chromatyna skondensowana, zlokalizowana wokół jąderek oraz w centrach włóknistych (Risueño i wsp. 1982; Motte i wsp. 1988). Uważa się, że nie ulegające transkrypcji geny rRNA ulokowane w centrach włóknistych (FC) mogą zostać aktywowane w sytuacji zwiększonej aktywności metabolicznej komórek lub aktywne w danym momencie geny rybosomalne mogą być wyłączone z aktywności transkrypcyjnej w warunkach zmniejszonego zapotrzebowania na rybosomy (Risueño i wsp. 1982). Stąd kolejnym celem pracy było sprawdzenie czy wraz ze zmianą aktywności transkrypcyjnej jąderek zmienia się zawartość skondensowanej chromatyny w jąderkach komórek merystematycznych korzeni soi roślin chłodzonych, regenerowanych oraz kontrolnych, co sugerowałoby możliwość regulacji zawartości chromatyny aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie.

Do zrealizowania tego zadania wykorzystałem metodę NAMA-Ur (sodium hydroxide methylation-acetylation plus uranyl acetate) ujawniającą chromatynę jądrową w mikroskopie elektronowym (Testillano i wsp. 1991). Względną zawartość skondensowanej chromatyny oszacowałem na podstawie pomiarów powierzchni skondensowanej chromatyny widocznej na przekrojach jąderek. Chromatyna ta była głównie zlokalizowana w FC. Pomiarzy wykazały, że chromatyna skondensowana, znajdująca się w jąderkach roślin poddanych stresowi chłodu zajmowała największą sumaryczną powierzchnię, natomiast najmniejszą – w jąderkach roślin regenerowanych.

Zmiany zawartości skondensowanej chromatyny obserwowano także u innych gatunków roślin poddanych różnym czynnikom stresowym. W warunkach niedotlenienia w jąderkach bobiku (Yamada i Sato 1996) oraz podczas inaktywacji jąderek grochu chłodem (Mineur i wsp. 1998) obserwowano tworzenie się skondensowanej chromatyny w FC. Natomiast

wraz ze wzrostem aktywności transkrypcyjnej jąderek obserwowano stopniową dyspersję chromatyny znajdującej się w FC, przechodzącej ze stanu nieaktywnego w stan transkrypcyjnie aktywny (Highet i wsp. 1993). Uważa się, że skondensowana chromatyna rybosomalna zlokalizowana w FC może stanowić rezerwuar genów rRNA aktywowanych podczas zwiększonego zapotrzebowania na rybosomy (Risueño i wsp. 1982).

Uzyskany wynik sugeruje, że również w jąderkach komórek soi zawartość chromatyny skondensowanej może się zmieniać w zależności od ich aktywności transkrypcyjnej. Ponadto, taki rezultat wskazuje, że liczba aktywnych genów rRNA może być regulowana w zależności od zapotrzebowania na maszynę produkującą białka – rybosomy. Mniejsza liczba aktywnych genów rRNA funkcjonowałaby podczas stresu spowodowanego chłodem, gdy metabolizm jest spowolniony, natomiast większa liczba aktywnych genów – podczas regeneracji, gdy organizm dąży do nadrobienia strat spowodowanych stresem [p. 4.2. (7.)].

Ważnym potwierdzeniem wyniku przedstawionego powyżej, wskazującym na to, że zawartość chromatyny luźnej i skondensowanej może się zmieniać w komórkach soi, były badania immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciał rozpoznających markery chromatyny aktywnej transkrypcyjnie - euchromatyny i nieaktywnej - heterochromatyny (Struhl 1998; Lawrence i wsp. 2004; Roudier i wsp. 2009). Do zrealizowania tego celu badawczego użyłem przeciwciał skierowanych przeciwko metylowanej cytozynie w DNA oraz przeciwciał względem odpowiednio zmodyfikowanych histonów. Wykonałem porównawcze pomiary intensywności immunofluorescencji w jądrach komórek wierzchołów korzeni w trzech wariantach eksperymentalnych: podczas stresu chłodu, podczas regeneracji i w roślinach kontrolnych. Ponadto, wykonałem pomiary wielkości chromocentrow, tj. grudek heterochromatynowych w jądrach komórek wierzchołów korzeni soi w powyższym układzie eksperymentalnym.

Najintensywniejszą fluorescencję markerów euchromatyny, tj. H3K4met3 (potrójnie metylowana lizyna 4. w histonie H3), H4K12acetyl (acetylowana lizyna 12. w histonie H4), H3K9acetyl (acetylowana lizyna 9. w histonie H3) oraz najslabszą immunofluorescencję dla metylowanego DNA obserwowałem w jądrach komórek roślin poddanych regeneracji po stresie chłodu, tj. w komórkach o zwiększonej aktywności metabolicznej. Odwrotna zależność występowała w przypadku roślin chłodzonych – tu odnotowałem najniższą wartość intensywności fluorescencji dla tych markerów, natomiast najwyższą wartość - dla metylowanego DNA.

W przypadku markerów nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny, tj. metylowanego DNA oraz H3K9me2 (podwójnie metylowana lizyna 9. w histonie H3), najintensywniejszą immunofluorescencją charakteryzowały się jądra roślin chłodzonych, a najniższą – jądra roślin poddanych regeneracji.

Liczba chromocentrow była identyczna we wszystkich jądrach roślin w trzech wariantach eksperymentalnych, natomiast występowały zmiany ich wielkości. Ogólnie – najmniejsze chromocentry obserwowałem w jądrach komórek roślin regenerowanych, największe – w jądrach roślin chłodzonych.

Ponadto, w celu potwierdzenia wyniku wskazującego na to, że w jądrach komórek soi mogą zachodzić zmiany w modyfikacji DNA oraz histonów, zastosowałem inhibitor metylacji DNA (5-aza-deoksytydynę) oraz inhibitor deacetylacji histonów (maślan sodu, NaBu). Obserwowałem oczekiwane zmiany intensywności fluorescencji jąder w roślinach traktowanych inhibitorami po zastosowaniu przeciwciał do metylowanego DNA oraz do acetylowanych histonów w stosunku do intensywności fluorescencji jąder roślin nie poddanych działaniu inhibitorów. Odpowiednie zmiany intensywności fluorescencji po potraktowaniu siewek powyższymi inhibitorami obserwowałem również w typowym dla moich badań układzie eksperymentalnym, tj. podczas stresu i podczas regeneracji, które dodatkowo wpływały na zmiany intensywności fluorescencji jąder.

Epigenetyczne modyfikacje chromatyny w odpowiedzi na stres obserwowano również u innych gatunków roślin (Boyko i Kovalchuk 2008), w tym modyfikacje histonów i zmiany w poziomie metylacji DNA, jako reakcja na czynniki biotyczne (van den Burg i Takken 2009) oraz abiotyczne (Kravets i wsp. 2010; Granot i wsp. 2009), w tym na chłód w procesie wernalizacji (Sung i Amasino 2004) i aklimatyzacji (Zhu i wsp. 2008). Uważa się, że modyfikacje histonów i zmiany poziomu metylacji DNA przyczyniają się do modulacji aktywności transkrypcyjnej genów poprzez zmiany struktury chromatyny (Johnson i wsp. 2002; Reyes i wsp. 2002), w tym chromatyny rybosomalnej (Ellis i wsp. 1989).

Na podstawie uzyskanych wyników oraz danych literaturowych można potwierdzić wniosek, że chromatyna jądrowa w komórkach soi może ulegać zmianom strukturalnym (remodelingowi) w zależności od warunków fizjologiczno-środowiskowych, co wpływa na zmiany kondensacji chromatyny, tj. na zawartość chromatyny luźnej i zwartej, co w konsekwencji może skutkować aktywacją lub represją genów, w tym genów rRNA [p. 4.2. (6.)].

Interesującym obszarem w jąderkach komórek merystematycznych korzeni soi wydają się być wakuole jąderkowe. Są to domeny charakterystyczne dla roślin, rzadko pojawiają się w jąderkach zwierzęcych. Wakuole te tworzą się w jąderkach aktywnych (Moreno-Diaz de la Espina i wsp. 1980), najprawdopodobniej na skutek intensywnego eksportu podjednostek rybosomowych do cytoplazmy, stąd najwięcej ich obserwowałem w jąderkach roślin poddanych regeneracji po stresie chłodu. Celem badań było prześledzenie powstawania tych domen w jąderkach roślin regenerowanych. Wyniki badań wykazały, że tworzą się one od pierwszych godzin regeneracji, najpierw jako małe wakuole w liczbie od jednej do kilku w jąderku. W miarę upływu czasu regeneracji stopniowo powiększają się i ulegają fuzji. Po 24 godzinach regeneracji w 40% jąderek obserwowałem już tylko pojedyncze, duże, centralnie położone wakuole, podczas gdy w komórkach roślin kontrolnych było ok. 18% zwakuolizowanych jąderek, natomiast w komórkach roślin chłodzonych - tylko 5%. Równolegle, w analogicznym układzie eksperymentalnym, przeprowadziłem badania autoradiograficzne z użyciem radioaktywnego prekursora transkrypcji, ^3H -urydyny, stosując 1) 20-min inkubację w izotopie oraz 2) 80-min post-inkubację w środowisku nieradioaktywnym. Badania wykazały, że podczas postinkubacji, w miarę upływu czasu regeneracji, gdy pojawiało się coraz więcej zwakuolizowanych jąderek z coraz większymi wakuolami, znacznie bardziej wzrastało wyznakowanie cytoplazmy niż jąderek, w porównaniu z wyznakowaniem tych regionów podczas inkubacji w izotopie. Taki wynik świadczy o intensywnym transporcie wyznakowanych podjednostek rybosomowych z jąderka do cytoplazmy.

Funkcja wakuol jąderkowych nie została jednoznacznie określona. Prawdopodobnie odgrywają różne role w zależności od aktualnej sytuacji fizjologicznej komórek (Mineur i wsp. 1998). Sugeruje się, że stanowią one mikrośrodowisko do aktywacji genów rybosomalnych (Deltour i wsp. 1986) oraz ułatwiają wymianę składników, w tym rybonukleoprotein, między jąderkiem a nukleoplazmą (Moreno-Diaz de la Espina i wsp. 1980; Deltour i De Barsy 1985).

Uzyskany wynik zdaje się potwierdzać powyższą hipotezę dotyczącą powstawania wakuol jąderkowych oraz wskazuje, tak jak wcześniej przypuszczano, że nowo powstające wakuole jąderkowe mogą być elementem wzmagającym syntezę i transport rRNA. Częstość występowania zwakuolizowanych jąderek w danej tkance lub organie i wielkość wakuol jąderkowych mogą być dodatkowym wskaźnikiem aktywności metabolicznej jąderek roślinnych. Ponadto, jąderka u soi mogą być doskonałym modelem badawczym wakuol

jąderkowych, ze względu na łatwość ich "otrzymywania" oraz względnie duże rozmiary [p. 4.2. (1.)].

U roślin system ubikwityna-proteasom (UPS) bierze udział w ochronie przed patogenami (Devato i wsp. 2003), stresami abiotycznymi (Belknap i Garbarino 1996), w tym przed szokiem termicznym (Ortiz i Cardemil 2001), uszkodzeniami, jak też w procesach starzenia (Bahrami i Gray 1999). Ponadto, ostatnio sugeruje się, że UPS uczestniczy w prawidłowym funkcjonowaniu jąderek, w tym w biogenezie rybosomów u ssaków (Stavreva i wsp. 2007). W jąderkach zlokalizowano ubikwitynowane czynniki biorące udział w dojrzewaniu pre-rRNA (Shcherbik i Pestov 2010). Ponadto, główne białka jąderkowe, fibrylaryna i nukleofosmina również podlegają ubikwitynacji (Chen i wsp. 2002; Itahana i wsp. 2003). Nie zidentyfikowano natomiast proteasomów w jąderkach w normalnych, fizjologicznych warunkach (Rockel i wsp. 2005).

W świetle tych informacji postanowiłem przeprowadzić immunofluorescencyjne badania lokalizacji ubikwityny i proteasomów w komórkach merystemów wierzchołkowych korzeni siewek soi. Wynik okazał się zaskakujący, nie odnotowany dotychczas, gdyż oprócz zlokalizowania immunosygnaliów w cytoplazmie i jądrze komórkowym, ich obecność stwierdzono na terenie jąderek, a ściślej – tylko w wakuolach jąderkowych. Największy odsetek jąderek z immunosygnalami zanotowałem w roślinach poddanych regeneracji, które charakteryzują się intensywnym powstawaniem zwakuolizowanych jąderek.

Wynik ten sugeruje, że UPS może funkcjonować m.in. w jąderkach roślin regenerowanych po stresie jako mechanizm degradacji białek uszkodzonych podczas stresu, nadmiaru białek jąderkowych wyprodukowanych w jąderkach o zwiększonej aktywności (Lam i wsp. 2007) lub UPS może przyczyniać się do powiększania się wakuol jąderkowych poprzez degradację białek jąderkowych. Z drugiej strony wakuole jąderkowe mogą służyć jako miejsce magazynowania lub sekwestracji niektórych metabolitów czy komponentów (Costanzo i wsp. 2011; Rose i wsp. 1972; Moreno-Diaz de la Espina i wsp. 1980), w tym proteasomów, ubikwityny i ubikwitynowanych białek, uwalnianych i wykorzystywanych w razie potrzeby. Badania te będą kontynuowane z użyciem inhibitorów aktywności proteolitycznej proteasomów w celu weryfikacji uzyskanych wyników. Jak dotąd, elementów systemu UPS nie obserwowano w jąderkach roślinnych [p. 4.2. (4.)].

Podsumowując wyniki ze zrealizowanych celów mojej rozprawy habilitacyjnej, za najważniejsze osiągnięcia uważam:

1. Scharakteryzowanie morfologicznych zmian, jakie zachodzą w jąderkach komórek soi podczas silnie zredukowanej oraz wzmożonej aktywności transkrypcyjnej jąderek, spowodowanych obniżeniem temperatury hodowli roślin (stres chłodu) oraz po przywróceniu temperatury optymalnej wzrostu soi (regeneracja). Wykazanie, że ultrastrukturalne składniki jąderek soi zachowują się odmiennie, niż substruktury jąderkowe innych gatunków roślin w jąderkach o zróżnicowanej aktywności transkrypcyjnej, świadcząc o gatunkowo specyficznych cechach domen jąderkowych. Odmienność ta może wynikać z faktu, iż soja jest rośliną wrażliwą na chłód.
2. Scharakteryzowanie morfologicznych i białkowych czynników jąderkowych, mogących służyć jako parametry do określania aktywności metabolicznej jąderek.
3. Wykazanie, że w jądrach komórek soi zachodzi remodeling chromatyny, jako odpowiedź rośliny na zmienne warunki temperaturowe hodowli, skutkujący zmianą kondensacji chromatyny, co może stanowić czynnik kontrolujący liczbę aktywnych genów, w tym genów rRNA.
4. Opisanie modelu powstawania wakuol jąderkowych w komórkach roślinnych, jako domen pełniących funkcję w magazynowaniu i sekwestracji niektórych metabolitów i czynników, w tym elementów systemu ubikwityna-proteasom.

W mojej opinii przedstawione wyniki stanowią nowatorski wkład do badań podstawowych, dotyczących morfologii i funkcjonowania jąderek roślinnych, nie tylko w odniesieniu do warunków stresowych, ale i fizjologicznych. Zaprezentowany przeze mnie układ eksperymentalny jest oryginalny, doskonale nadający się do badań porównawczych działania wielu czynników w różnych obiektach biologicznych. Ponadto, jak dotąd, jąderka, tym bardziej soi, nie były obiektem badawczym w aspekcie wrażliwości na chłód i fakt taki nie został odnotowany w literaturze, z wyjątkiem opublikowanych wcześniej prac, zawierających wyniki uzyskane w ramach mojej rozprawy doktorskiej.

Powyższe wyniki badań, stanowiące główne osiągnięcie naukowe postępowania habilitacyjnego, przedstawiłem na posiedzeniu Rady Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w dniu 8 stycznia 2013r. Tezy te zostały przyjęte jednomyślnie poprzez głosowanie.

Literatura uzupełniająca

Acevedo R, Fernández-Gómez ME, de la Torre C, Moreno Díaz de la Espina S (1998) Analysis of the nucleus in the development of roots in *Saccharum* sp. (sugarcane). *Electron Microsc* 4: 779-780.

Bahrami AR, Gray JE (1999) Expression of a proteasome α -type subunit gene during tobacco development and senescence. *Plant Mol Biol* 39: 325-333.

Baranova EN, Baranova GB, Kharchenko PN (2011) Effect of weak magnetic field and low positive temperature on chromatin and nucleolus ultrastructure of rye and barley. *Russ Agricult Sci* 37: 453-461.

Belknap WR, Garbarino JE (1996) The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. *Trends Plant Sci* 10: 331-335.

Boisvert FM, van Koningsburggen S, Navascues J, Lamond A (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 574-585.

Boulon SB, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM Lamond AI (2010) The nucleolus under stress. *Mol Cell* 40: 216-227.

Boyko A, Kovalchuk I (2008) Epigenetic control of plant stress response. *Environ Mol Mutagen* 49: 61-72.

Chen M, Rockel T, Steinweger G, Hemmerich P, Risch J, von Mikecz A (2002) Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. *Mol Biol Cell* 13: 3576-3587.

Cockell MM, Gasser SM (1999) Nucleolar space for RENT. *Curr Biol* 9: R575-R576.

Costanzo M, Cisterna B, Zharskaya OO, Zatssepina OV, Biggiogera M (2011) Discrete foci containing RNase A are found in nucleoli of HeLa cells aged in culture. *Eur J Histochem* 55: e15.

De Carcer G, Medina FJ (1999) Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *J Struct Biol* 128: 139-151.

Deltour R, De Barsey T (1985) Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. *J Cell Sci* 76: 67-83.

Deltour R, Mosen H, Bronchart R (1986) Three-dimensional electron microscopy of the internal nucleolus-associated chromatin and of the nucleolar vacuoles during early germination of *Sinapis alba*. *J Cell Sci* 82: 53-71.

Derenzini M, Trere D, Pession A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL (1998) Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol* 152: 1291-1297.

Devato A, Muskett PR, Shirasu K (2003) Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol* 6: 307-311.

Donati G, Montanaro L, Derenzini M (2012) Ribosome biogenesis and control of cell proliferation: p53 is not alone. *Cancer Res* 72: 1602-1607.

- Ellis NTH, Delseny M, Lee D, Burcham KWG (1989) Methylated and undermethylated rDNA repeats are interspersed at random in two higher plant species. *Plant Mol Biol* 14: 73-80.
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P (1999) Structure and function of nucleolin. *J Cell Sci* 112: 761-772.
- Girard JP, Feliu J, Caizerguez-Ferrer M, Lapeyre B (1993) Study of multiple fibrillarin mRNAs reveals that 3' end formation in *Saccharomyces pombe* is sensitive to cold shock. *Nucleic Acids Res* 21: 1881-1887.
- Gonzalez-Melendi P, Wells B, Beven AF, Shaw PJ (2001) Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. *Plant J* 27: 223-233.
- Granot G, Sikron-Persi N, Gaspan O, Florentin A, Talwara S, Paul LK, Morgenstern Y, Granot Y, Grafi G (2009) Histone modifications associated with drought tolerance in the desert plant *Zygophyllum dumosum* Boiss. *Planta* 231: 27-34.
- Grummt I, Pikaard CS (2003) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 641-649.
- Hernandez-Verdun D (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 125: 127-137.
- Highett MI, Rawlins DJ, Shaw PJ (1993) Different patterns of rDNA distribution in *Pisum sativum* nucleoli correlate with different levels of nucleolar activity. *J Cell Sci* 104:843-852.
- Huang S (2002) Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol* 157: 739-741.
- Huang S, Rothblum LI, Chen D (2006) Ribosomal chromatin organization. *Biochem Cell Biol* 84: 444-449.
- Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, Zhang Y (2003) Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 12: 1151-1164.
- Johnson LM, Cao X, Jacobsen SE (2002) Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol* 12: 1360-1367.
- Kalmarova M, Smirnov E, Masata M, Koberna K, Ligasova A, Popov A, Raska I (2007) Positioning of NORs and NOR-binding chromosomes in relation to nucleoli. *J Struct Biol* 160: 49-56.
- Kravets AP, Mousseau TA, Litvinchuk AV, Ostermiller S, Vengzhen GS, Grodzinskiy DM (2010) Wheat plant DNA methylation pattern changes at chronic seed γ irradiation. *Cytol Genet* 44: 276-279.
- Lam YW, Lamond AI, Mann M, Andersen JS (2007) Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr Biol* 17: 749-760.
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS (2004) A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* 13: 599-609.
- Leary DJ, Huang S (2001) Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett* 509: 145-150.
- Mao YS, Zhang B, Spector DL (2011) Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends genet* 27: 295-306.
- Medina FJ, Risueño MC, Moreno Díaz de la Espina S (1983) 3-D reconstruction and morphometry of the fibrillar centres in plant cells in relation to the nucleolar activity. *Biol Cell* 48: 575-586.
- Mélèse T, Xue Z (1995) The nucleolus: an organelle formed by the act of building ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 7: 319-324.

- Mineur P, Jennane A, Thiry M, Deltour R, Goessens G (1998) Ultrastructural distribution of DNA within plant meristematic cell nucleoli during activation and the subsequent inactivation by cold stress. *J Struct Biol* 123:199-210.
- Moreno Díaz de la Espina S, Medina FJ, Risueño MC (1980) Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells. *Eur J Cell Biol* 22: 724-729.
- Moreno Díaz de la Espina S, Minguez A, Vázquez-Nin GH, Echeverría OM (1992) Fine structural organization of non-reticulate plant cell nucleus. An ultracytochemical and immunocytochemical study. *Chromosoma* 101: 311-321.
- Motte P, Deltour R, Mosen H, Bronchart R (1988) Three-dimensional electron microscopy of the nucleolus and nucleolus-associated chromatin (NAC) during early germination of *Zea mays* L. *Biol Cell* 62: 65-81.
- Motte PM, Loppes R, Menager M, Deltour R (1991) Three-dimensional electron microscopy of ribosomal chromatin in two higher plants: a cytochemical, immunocytochemical, and in situ hybridization approach. *J Histochem Cytochem* 39: 1495-1506.
- Olson MOJ (2004) Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE*, issue 224, p. pe 10. DOI: 10.1126/stke.2242004pe10.
- Olson MOJ, Hingorani K, Szebeni A (2002) Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int Rev Cytol* 219: 199-266.
- Ortiz C, Cardemil L (2001) Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J Exp Bot* 52: 1711-1719.
- Pederson T (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26: 3871-3876.
- Raška I, Koberna K, Malinský J, Fidlerová H, Mašata M (2004) The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 96: 579-594.
- Reyes L, Henning W, Gruissem W (2002) Chromatin-remodeling and memory factors: new regulators of plant development. *Plant Physiol* 130: 1090-1101.
- Risueño MC, Medina FJ, Moreno Díaz de la Espina S (1982) Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J Cell Sci* 58: 313-329.
- Rockel TD, Stuhlmann D, von Mikecz A (2005) Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. *J Cell Sci* 118: 5231-5242.
- Rose RJ, Setterfield G, Fowke LC (1972) Activation of nucleoli in tuber slices and the function of nucleolar vacuoles. *Exp Cell Res* 71: 1-16.
- Roudier F, Teixeira FK, Colot V (2009) Chromatin indexing in Arabidopsis: an epigenetic tale of tails and more. *Trends Genet* 25: 511-517.
- Roussel P, Andre C, Comai L, Hernandez-Verdun D (1996) The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J Cell Biol* 133: 235-246.
- Sato S, Yamada M (1996) Effect of hypoxia on nucleoli in excised root tips of *Vicia faba*: an electron microscopy study. *Cytol* 61: 269-276.
- Savkur RS, Olson MO (1998) Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 26: 4508-4515.
- Shaw PJ, Beven AF, Leader DJ, Brown JWS (1998) Localization and processing from a polycistronic precursor of novel snoRNAs in maize. *J Cell Sci* 111: 2121-2128.

- Shcherbik N, Pestov DG (2010) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in the nucleolus: multitasking tools for a ribosome factory. *Genes Cancer* 1: 681-689.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129: 13-31.
- Sobol MA, González-Comacho F, Redriguez-Vilariño V, Kordyum EL, Medina FJ (2006) Subnucleolar location of fibrillarin and NopA64 in *Lipidium sativum* root meristematic cells is changed in altered gravity. *Protoplasma* 228: 209-219.
- Spector DL, Ochs RL, Busch H (1984) Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma* 90: 139-148.
- Stavreva DA, Kawasaki M, Dundr M, Koberna K, Mueller WG, Tsujimura-Takahashi T (2007) Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 26: 5131-5145.
- Stępiński D, Kwiatkowska M (2003) Autoradiographic and ultrastructural studies of the influence of chilling on soybean root meristem nucleoli. *Acta Biol Cracov, Ser Bot* 45/2: 35-42.
- Stępiński D (2004) Ultrastructural and autoradiographic studies of the role of nucleolar vacuoles in soybean root meristem. *Folia Histochem Cytobiol* 42(1): 45-49.
- Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12: 599-606.
- Sung S, Amasino RM (2004) Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr Opin Plant Biol* 7: 4-10.
- Testillano PS, Sanchez-Pina MA, Olmedilla A, Ollacarizqueta MA, Tandler CJ, Risueno MC (1991) A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *J Histochem Cytochem* 39: 1427-1438.
- van den Burg HA, Takken FLW (2009) Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci* 14: 286-294.
- Yamada M, Sato S (1996) Effect of hypoxia on nucleoli in excised root tips of *Vicia faba*: immunoelectron microscopy using anti-DNA antibodies. *Cytologia* 61:403-410.
- Zhu J, Jeong JC, Zhu Y, Sokolchik I, Miyazaki S, Zhu JK, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Shi H, Yun DJ, Bressan RA (2008) Involvement of *Arabidopsis* HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4945-4950.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

(zgodnie z §4 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 r. w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego)

5.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Pomimo, iż jestem absolwentem kierunku chemia na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, to moje zainteresowania skupiały się wokół biologii. Dlatego też, postanowiłem wykonywać pracę magisterską w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi tego samego uniwersytetu pod opieką prof. dr hab. Michała Komoszyńskiego. Tytuł tej pracy brzmiał: „Udział enzymów hydrolitycznych w regulacji poziomu wolnego IAA we wczesnych stadiach rozwojowych kukurydzy”.

Przeprowadzenie badań potwierdzających enzymatycznie regulowany rozpad indolilo-3-acetylo-*mio*-inozytolu (IAInos) wydawało się bardzo ważne z fizjologicznego punktu widzenia, gdyż zarówno kwas indolilo-3-octowy (IAA), jak i inozytol pełnią znaczącą funkcję w metabolizmie komórek. IAA jest hormonem roślinnym, natomiast inozytol występuje jako ważny składnik błon biologicznych. Ponadto, wolny inozytol może być substratem do syntezy fosforanów tego związku, będących ważnymi przekaźnikami informacji w komórce. Dlatego też celem mojej pracy była chemiczna synteza IAA-*mio*-inozytolu oraz zbadanie w jakich częściach roślin i w jakich warunkach zachodzi enzymatyczna hydroliza tego związku. Efektem tej pracy było 1) opracowanie wydajnej i stabilnej metody syntezy IAINos, 2) opracowanie metody ilościowej i jakościowej analizy IAINos i produktów jego hydrolizy z zastosowaniem rozdzielania HPLC w odwróconej fazie, 3) wykazanie, że w kiełkach i korzeniach kukurydzy zachodzi enzymatyczna hydroliza IAINos, natomiast w bielmie i tarczках zarodkowych – nie, 4) wykazanie, że optimum pH hydrolizy IAINos przez ekstrakty z siewek kukurydzy jest zbliżone do obojętnego oraz 5) wykazanie, że w $\text{pH} \geq 8$ zachodzi nieenzymatyczna hydroliza IAINos. Wyniki mojej pracy zostały zaprezentowane na Zjeździe PTBioch [p. 7.2. (1.)].

Zainteresowania biologią eksperymentalną kontynuowałem w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Fizjologiczno-Mikrobiologicznego na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego. W Katedrze Cytofizjologii, pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Kwiatkowskiej, prowadziłem fizjologiczno-morfologiczne badania nad wpływem stresu chłodu na rozwój siewek soi. Moja rozprawa doktorska dotyczyła kilku wątków związanych z tym zagadnieniem i obejmowała: 1) fizjologiczny aspekt kiełkowania nasion soi i wzrost siewek w warunkach optymalnych i w chłodzie, 2) wpływ niskiej temperatury na cykl komórkowy w komórkach merystemów korzeni soi, 3) wpływ chłodu na proces endoreplikacji jądrowego DNA we włośnikach korzeniowych i w komórkach z różnych stref korzenia soi, 4) aspekt tworzenia brodawek korzeniowych w niskiej temperaturze oraz 5) jąderko i produkcję rybosomów w warunkach stresu chłodu. Stąd tytuł mojej rozprawy doktorskiej brzmiał: „Cytofizjologiczne obserwacje zmian spowodowanych działaniem niskiej temperatury w korzeniach soi (*Glycine max* (L.) Merr., odm. Aldana)”.

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych eksperymentów upoważniły mnie do sformułowania następujących, głównych wniosków:

- 1) dynamika syntezy DNA w merystemach wierzchołkowych korzeni soi jest bardziej obniżona w warunkach szoku spowodowanego chłodem (3 godz. w 10 °C), niż po 4-dniowej aklimatyzacji w 10 °C, w wyniku której następuje przystosowanie mechanizmów odpowiedzialnych za replikację DNA do niskiej temperatury,
- 2) ograniczenie rozwoju systemu korzeniowego soi przyczyniające się do zmniejszenia obszaru dostępu dla bakterii symbiotycznych oraz obniżony poziom zróżnicowanej endoreplikacji w jądrach komórek kory korzenia i włóśników pod wpływem niskiej temperatury, może prowadzić do zmniejszenia liczby genów odpowiedzialnych za ekspresję sygnałów warunkujących oddziaływanie symbiotyczne i proces brodawkowania oraz może stanowić jeden z czynników utrudniających rozwój soi w warunkach naszego klimatu,
- 3) 4-dniowy stres chłodu obniża w większym stopniu tempo dojrzewania pre-rRNA i transportu podjednostek rybosomowych do cytoplazmy, niż dynamikę syntezy rRNA, w rezultacie czego następuje gromadzenie się rRNA w jąderku, przejawiające się nietypowym dla jąderek mało aktywnych powiększeniem się tych organelli,
- 4) kumulowanie pre-rRNA w jąderkach roślin chłodzonych może być mechanizmem zabezpieczającym pierwotne transkrypty przed degradacją przez RNazę, której aktywność wzrasta pod wpływem chłodu,
- 5) ultrastrukturalne zmiany jąderek spowodowane działaniem chłodu wskazują, że zmniejszenie szybkości produkcji rybosomów przejawia się zwiększeniem ilości składnika ziarnistego jąderek; specyficzny układ tych ziarnistości, przypominający skondensowane kompleksy transkrypcyjne („Christmas trees”), nasuwa przypuszczenie, że u soi są to rybosomy *in statu nascendi*, podlegające kotranskrypcyjnemu dojrzewaniu w spowolnionym tempie,
- 6) badania autoradiograficzne i ultrastrukturalne dowodzą, że chłód (10 °C) nie powoduje destrukcji aparatu odpowiedzialnego za produkcję rybosomów, gdyż po przywróceniu temp. 25 °C procesy syntezy i dojrzewania pre-rRNA przebiegają nawet z wyższą dynamiką, niż przy stałym utrzymywaniu optymalnych warunków temperatury hodowli soi (kontrola); przeniesienie siewek soi z chłodu do temperatury optymalnej prowadzi równocześnie do redukcji aktywności rybonukleazy do poziomu kontrolnego.

Recenzentami mojej rozprawy doktorskiej byli: prof. dr hab. Krystyna Janas z Uniwersytetu Łódzkiego oraz prof. dr hab. Władysław Golinowski ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Na wniosek recenzenta praca została nominowana i uzyskała wyróżnienie.

5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1. Wykaz prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach polskich i zagranicznych

(poniższy wykaz nie obejmuje prac stanowiących główne osiągnięcie naukowe)

5.2.1.1. Oryginalne prace eksperymentalne

1. **Stępiński D** (2002) Ribonuclease activity in roots of soybean seedlings subjected to chilling stress and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum* 24: 297-301.
2. **Stępiński D**, Kwiatkowska M (2003) Autoradiographic and ultrastructural studies of the influence of chilling on soybean root meristem nucleoli. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 45/2: 35-42.
3. **Stępiński D** (2003/2004) Effect of chilling on DNA endoreplication in root cortex cells and root hairs of soybean seedlings. *Biologia Plantarum* 47(3): 333-339.
4. **Stępiński D** (2003) Effect of short- and long-lasting chilling on pre-rRNA synthesis and transport in root meristematic cells of three soybean cultivars. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72(4): 319-324.
5. **Stępiński D** (2004) Ultrastructural and autoradiographic studies of the role of nucleolar vacuoles in soybean root meristem. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 42(1): 45-49.
6. Popłońska K, Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Gosek A, Wojtczak A (2004) Immunocytochemical localization of ubiquitin and proteasome in spermatids during spermiogenesis of *Chara vulgaris* (Charophyceae). *European Journal of Phycology* 39: 309-315.
7. Kwiatkowska M, Popłońska K, Kaźmierczak A, Wojtczak A, **Stępiński D**, Gosek A, Teodorczyk M (2004) Spermatid differentiation process in *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. *International Research Group on Charophytes (IRGC) News* 15: 8-9.
8. Kaźmierczak A, **Stępiński D** (2005) GA₃ content in young and mature antheridia of *Chara tomentosa* estimated by capillary electrophoresis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 43: 65-67.
9. Kwiatkowska M, Popłońska K, **Stępiński D** (2005). Actin filaments connected with microtubules of lipotubuloids that are cytoplasmic domain rich in lipid bodies and microtubules. *Protoplasma* 226:163-167.

10. Kwiatkowska M, Popłońska K, **Stępiński D**, Hejnowicz Z (2006) Microtubules with different diameter, protofilament number and protofilament spacing in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 44: 13-138.
11. Kwiatkowska M, Popłońska K, Kaźmierczak A, **Stępiński D**, Rogala K, Polewczyk K (2007) Role of DNA endoreduplication, lipotubuloids, and gibberellic acid in epidermal cell growth during fruit development of *Ornithogalum umbellatum*. *Journal of Experimental Botany* 58(8): 2023-2031.
12. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Popłońska K (2009) Diameters of microtubules change during rotation of the lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* stipule epidermis as a result of varying protofilament monomers sizes and distance between them. *Cell Biology International* 33: 1245-1252.
13. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Popłońska K, Wojtczak A, Polit J. (2010) „Elaioplasts” of *Haemanthus albiflos* are true lipotubuloids: cytoplasmic domains reach in lipid bodies entwined by microtubules. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 1189-1196.
14. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Polit JT, Popłońska K, Wojtczak A. (2011) Microtubule heterogeneity of *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermal cells: non-stable cortical microtubules and stable lipotubuloid microtubules. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 49(2): 285-290.
15. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Popłońska K, Wojtczak A, Polit JT (2011) “Elaioplasts” identified as lipotubuloids in *Althaea rosea*, *Funkia Sieboldiana* and *Vanilla planifolia* contain lipid bodies connected with microtubules. EM and immunogold investigations. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 80(3): 211-219.
16. Kwiatkowska M, Popłońska K, Polit JT, Wojtczak A, **Stępiński D**, Paszak KM (2011) Lipid bodies in lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis contain diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) and lipase, incorporate ³H-palmitic acid and are connected with cuticle synthesis. *Trends in Cell and Molecular Biology* 6: 97-108.
17. Kwiatkowska M, Popłońska K, Wojtczak A, **Stępiński D**, Polit JT (2012) Lipid body biogenesis and the role of microtubules in lipid synthesis in *Ornithogalum umbellatum* lipotubuloids. *Cell Biology International* 36: 455-462.
18. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Popłońska K, Wojtczak A, Polit JT (2012) DGAT2 revealed by immunogold technique in *Arabidopsis thaliana* lipid bodies associated with microtubules. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50(3): 427-431.
19. Kwiatkowska M, Polit JT, Popłońska K, **Stępiński D**, Wojtczak A (2013) Immunogold method evidences that kinesin and myosin bind to and couple microtubules and actin filaments in lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis. *Acta Physiologiae Plantarum*. DOI: 10.1007/s11738-013-1235-8.

5.2.1.2. Prace przeglądowe

20. Kwiatkowska M, Popłońska K, **Stępiński D**, Wojtczak A. (2009) Lipotubuloidy – domeny cytoplazmy bogate w kule lipidowe oplecione systemem mikrotubul, aktywne w syntezie lipidów. *Postępy Biologii Komórki* 36: 331-341.

20a. Kwiatkowska M, Popłońska K, **Stępiński D**, Wojtczak A (2009) Lipotubuloids – domains of cytoplasm rich in lipid bodies entwined by microtubule system, active in lipid synthesis. *Advances in Cell Biology* Doi: 10.2478/v10052-009-0001-y.

5.2.1.3. Rozdział w książce

21. Kwiatkowska M, Popłońska K, **Stępiński D**, Wojtczak A, Polit JT, Paszak K (2012) Lipotubuloids - structure and function; in *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*; ed. Montanaro G, Dichio B; Intech pp. 365-388.

Tab. 2. Wskaźniki Impact Factor (podano wartości wskaźników IF dla czasopism z roku wydania publikacji, bieżący – z 2011r. oraz 5-letni), **punkty MNiSW** (podano wartości dla czasopism z roku wydania publikacji oraz bieżące – z 2012 r.) **oraz liczba cytowań** (na podstawie bazy Web of Science ze stycznia 2013 r.) **publikacji wydanych po uzyskaniu stopnia doktora** (wykaz nie obejmuje prac stanowiących główne osiągnięcie naukowe).

Nr publikacji	Wskaźnik IF			Punkty MNiSW		Liczba cytowań
	Z roku wydania publikacji	Bieżący	5-letni	Z roku wydania publikacji	Bieżące	
1	0,446	1,639	1,533	20	25	2
2	0,205	0,565	0,796	13	20	7
3	0,744	1,974	1,787	20	25	0
4	0,338	0,360	0,476	0	15	0
5	0,789	0,807	1,245	10	15	7
6	2,506	1,828	2,193	32	30	2
7	0	0	0	2	2	0
8	0,789	0,807	1,245	10	15	1
9	1,573	1,922	1,757	20	20	7
10	0,897	0,807	1,245	10	15	4
11	3,917	5,364	5,480	24	45	10
12	1,800	1,482	1,610	13	15	4
13	1,344	1,639	1,533	20	25	3
14	0,807	0,807	1,245	13	15	2
15	0,360	0,360	0,476	13	20	1
16	0	0	0	2	2	0
17	1,482	1,482	1,600	15	15	0
18	0,807	0,807	1,245	15	15	0
19	1,639	1,639	1,533	25	25	0
20	0	0,073	0	9	15	0
2a	0	0	0	2	2	0
21	0	0	0	4	4	0
Suma	20,443	24,362	26,999	292	380	50

5.2.1.4. Prace w redakcjach po pierwszych recenzjach

1. Kwiatkowska M, Wojtczak A, Popłońska K, Polit JT, **Stępiński D**, Domínguez D, Heredia A. EM-immunogold research suggests that in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis synthesis of cutin takes place in lipotubuloids and is mediated by cutinsomes. *Planta*.

5.3. Omówienie wyników i osiągnięć naukowych zawartych w powyższych pracach (tematycznie)

Wyniki uzyskane z badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej stanowią cykl publikacji wydanych po uzyskaniu stopnia doktora w czasopismach z listy filadelfijskiej. Wyniki zamieszczone w dwóch z tych publikacji [p. 5.2.1.1. (1.)] i [p. 5.2.1.1. (2.)] zostały w pełni uzyskane podczas wykonywania badań do rozprawy doktorskiej. Pozostałe - uzupełniłem o rezultaty uzyskane z eksperymentów prowadzonych po otrzymaniu stopnia doktora.

Dodatkowe badania autoradiograficzne z użyciem ^3H -urydyny, włączanej do komórek korzeni siewek soi poddanych regeneracji po stresie chłodu w układzie eksperymentalnym obejmującym inkubację w izotopie i postinkubację w środowisku nieradioaktywnym wykonałem w celu sprawdzenia, czy radioaktywne cząstki pojawiają się na terenie wakuol jąderkowych. Obecność ziaren autoradiograficznych nad wakuolami jąderkowymi, głównie podczas postinkubacji, może wskazywać na to, że wakuole jąderkowe mogą intensyfikować transport podjednostek rybosomowych poza jąderko [p. 5.2.1.1. (5.)].

Uzupełniające badania z użyciem radioaktywnego prekursora syntezy DNA, ^3H -tymidyny, przeprowadziłem na włośnikach korzeniowych siewek soi. Brak włączania tego prekursora do włośników w danej fazie ich rozwoju potwierdza wcześniejsze cytofotometryczne badania zawartości DNA wykazujące, że w jądrach komórek włośnikowych mogła zajść zróżnicowana replikacja DNA. Ponadto, analiza liczby i wielkości chromocentrow w komórkach mięksiszowych kory korzeni siewek soi potwierdza obecność w nich jąder poliploidalnych [p. 5.2.1.1. (3.)].

Porównawcze badania autoradiograficzne z użyciem ^3H -urydyny oraz morfometryczne badania wielkości jąderek trzech innych odmian soi poddanych działaniu chłodu wykonałem w celu oceny wrażliwości tych odmian na niską, ale dodatnią temperaturę (10 °C). Uzyskane wyniki wykazały, że wszystkie badane odmiany charakteryzuje podobna wrażliwość na temp. 10 °C, przynajmniej w odniesieniu do procesów odpowiedzialnych za produkcję rybosomów i objawia się znacznie obniżoną intensywnością włączania radioaktywnego prekursora

transkrypcji do komórek merystematycznych korzeni soi oraz znacznie bardziej upośledzonym transportem pre-rybosomów z jąderka do cytoplazmy. Stąd obserwowano wzrost wielkości jąderek w komórkach merystemów korzeniowych również u tych wszystkich badanych odmianach soi w warunkach chłodu [p. 5.2.1.1. (4.)].

Równocześnie uczestniczyłem w zespołowych badaniach, prowadzonych w naszej Katedrze od dwóch dekad, dotyczących procesu spermiogenezy u dwóch gatunków glonów *Chara vulgaris* i *Chara tomentosa* (Kwiatkowska 1996). Badania te były prowadzone m.in. w ramach dwóch grantów KBN (Nr 6PO4C 053 17; Nr 3PO4C 033 25), w których brałem udział jako główny wykonawca. Na podstawie obserwacji mikroskopowo-elektronowych u tych gatunków wyróżniono dziesięć faz w procesie różnicowania spermatyd, podczas których zachodziły ultrastrukturalne zmiany zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze tych komórek (Kwiatkowska i wsp. 2002). Interesującym osiągnięciem tych badań była charakterystyka zmian chromatyny w kolejnych fazach spermiogenezy (Kwiatkowska i Popłońska 2002). Dowiedziono, że w chromatynie w miarę postępowania procesu spermiogenezy zachodzi wymiana białek histonowych na białka typu protamin (Popłońska 2007). Udowodniono, że w procesie tym bierze udział pozalizosomalna degradacja białek, przy udziale systemu ubikwityna-proteasom [p. 5.2.1.1. (6.)]. Ponadto, wykazano, że kwas giberelinowy bierze udział w procesie rozwoju męskich organów płciowych u obu gatunków *Chara* [p. 5.2.1.1. (8.)]. Prace te ujawniły wielkie podobieństwo procesu różnicowania spermatyd u badanych gatunków glonów oraz zwierząt, w tym ludzi (Wojtczak i wsp. 2008) [p. 5.2.1.1. (7.)].

Biorę czynny udział w badaniach lipotubuloidów, specyficznych struktur występujących w komórkach epidermy nadziemnych organów niektórych gatunków roślin. Badania tych struktur zapoczątkowała prof. M. Kwiatkowska (Kwiatkowska 1972a, b). Wraz z zespołem powróciła do nich po 30 latach.

Struktury te wcześniej nazywano elajoplastami. Nowy termin – lipotubuloity – zaproponowano w celu odróżnienia ich od plastydów produkujących tłuszcze. Głównym materiałem do naszych badań tych struktur jest epiderma zalążni i przykwiatków śniedka [*Ornithogalum umbellatum*]. Badania prowadzimy również na innych roślinach zawierających lipotubuloity: *Althaea rosea*, *Funkia sieboldiana*, *Vanilla planifolia* [p. 5.2.1.1. (15.)] oraz *Haemanthus albiflos* [p. 5.2.1.1. (13.)]. U tych gatunków struktury te

wykazują wielkie podobieństwo do lipotubuloidów występujących w komórkach epidermy *O. umbellatum*.

Lipotubuloidy to unikatowe domeny cytoplazmy o wielkości jąder komórkowych, zawierające wielką liczbę kul lipidowych oplecionych systemem mikrotubul. Każda kula lipidowa w lipotubuloidzie ograniczona jest połówką błony elementarnej (half unit membrane). Oprócz tego w lipotubuloidach znajdują się rybosomy, cysterny i pęcherzyki siateczki śródplazmatycznej, mitochondria, struktury Golgiego, mikrociała oraz wakuole autolityczne. Struktury te nie posiadają własnej błony, lecz otoczone są tonoplastem (Kwiatkowska 1971a, b).

Lipotubuloidy są strukturami dynamicznymi - poruszają się w komórce ruchem prostoliniowym oraz obrotowym z różną prędkością i w różnych kierunkach [p. 5.2.1.1. (12.)]. Wykazaliśmy, że obrotowy ruch lipotubuloidów jest niezależny od ruchu cytoplazmy, powodowany mechanizmem motorycznym, mikrotubulami wraz z filamentami aktynowymi, znajdującymi się wewnątrz nich. Te ostatnie struktury cytoszkieletu zidentyfikowaliśmy w lipotubuloidach na podstawie analizy obrazów mikroskopowelektronowych [p. 5.2.1.1. (9.)]. Zaobserwowaliśmy również zmiany średnic mikrotubul podczas ruchu lipotubuloidów. Wykazaliśmy, że średnice protofilamentów budujących mikrotubule oraz odległości między nimi różnią się w mikrotubulach o różnych średnicach widocznych na przekrojach poprzecznych. Zmiany średnicy mikrotubul w lipotubuloidach są prawdopodobnie spowodowane m.in. oddziaływaniem mikrotubul z filamentami aktynowymi, które wywołują ruch obrotowy lipotubuloidów [p. 5.2.1.1. (10.)].

Ponadto, charakterystyczny, autonomiczny obrotowy ruch lipotubuloidów w epidermie *O. umbellatum* jest najprawdopodobniej spowodowany współdziałaniem mikrotubul, filamentów aktynowych i białek motorycznych. Metodą immunozłota koloidalnego i mikroskopii elektronowej wykazaliśmy obecność kinezyny i miozyny w bliskim sąsiedztwie mikrotubul i filamentów aktynowych. Przedstawiliśmy modele rysunkowe współpracy powyższych elementów cytoszkieletu i białek motorycznych [p. 5.2.1.1. (19)].

Wykazaliśmy korelację między wielkością lipotubuloidów, poziomem endoreplikacji w jądrach komórek epidermy załączni *O. umbellatum* oraz dynamiką wzrostu tych komórek. Uzyskane wyniki wskazują na udział lipotubuloidów w regulacji wzrostu komórek epidermy, natomiast hormonalnym czynnikiem wpływającym na kontrolę wzrostu komórek epidermy załączni *O. umbellatum* wydaje się być kwas giberelinowy [p. 5.2.1.1. (11.)].

Badania z użyciem radioaktywnego prekursora syntezy lipidów, kwasu ^3H -palmitynowego, wykazały, że lipotubuloidy *O. umbellatum* są miejscem syntezy tłuszczów (Kwiatkowska 2004). Ponadto, stosując badania autoradiograficzne w mikroskopie świetlnym i elektronowym oraz technikę immunozłota koloidalnego i mikroskopii elektronowej zlokalizowaliśmy ten prekursor oraz enzymy biorące udział w metabolizmie lipidów – diacylogliceracyltransferazy 2 (DGAT2, enzym uczestniczący w transformacji diacylogliceroli, DAG, w triacyloglicerole, TAG) i lipazę na powierzchni kul lipidowych, co wskazuje, że jest to prawdopodobne miejsce syntezy tłuszczów. Ponadto, lipaza, jako enzym trawiący tłuszcze, prawdopodobnie przyczynia się utrzymywania stałej wielkości kul lipidowych w dojrzałych lipotubuloidach. Zmiany lokalizacji wyznakowania radioaktywnych cząstek na terenie lipotubuloиду i cytoplazmy po okresie postinkubacji w środowisku nieradioaktywnym, w stosunku do wyznakowania podczas inkubacji w kwasie ^3H -palmitynowym oraz po ekstrakcji środkami rozpuszczającymi tłuszcze, dowodzi, że znakowane lipidy uległy lipolizie, a produkty ich degradacji zostały włączone do różnych szlaków metabolicznych, co przejawiało się zanikaniem części radioaktywnych cząstek, natomiast substancje nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach tłuszczów prawdopodobnie włączyły się do szlaków związanych z syntezą kutykuli [p. 5.2.1.1. (16.)].

Analiza mikrofotografii lipotubuloidów w komórkach epidermy załązni *O. umbellatum*, w połączeniu z techniką immunozłota koloidalnego i przeciwciał rozpoznających DGAT oraz badania autoradiograficzne z kwasem ^3H -palmitynowym, pozwoliły nam opracować prawdopodobny model biogenezy kul lipidowych oraz syntezy lipidów i udowodnić udział w tym procesie mikrotubul oraz określić rolę wzajemnych relacji między kulami lipidowymi a innymi organellami w lipotubuloidach. Formowanie kul lipidowych rozpoczyna się pomiędzy dwoma listkami białkolipidowej błony siateczki śródplazmatycznej, gdzie gromadzą się substancje lipidowe. Nowopowstające kule lipidowe, otoczone połówką błony elementarnej, powiększają się w miarę gromadzenia tych substancji. Kule te zachowują ciągłość z siateczką śródplazmatyczną, natomiast dojrzałe kule lipidowe kontaktują się z siateczką za pomocą mikrotubul. Enzymy DGAT1 i DGAT2 są prawdopodobnie syntetyzowane na szorstkiej siateczce śródplazmatycznej, skąd są transportowane do powierzchni kul lipidowych, gdzie biorą udział w biosyntezie lipidów. Autoradiograficzne ziarna pochodzące od kwasu ^3H -palmitynowego oraz ziarna złota lokalizujące DGAT na mikrotubulach wskazują na ich udział w syntezie lipidów, jako transportery elementów niezbędnych do biosyntezy tłuszczów. Udział mikrotubul

w biosyntezie lipidów potwierdziliśmy stosując destabilizator mikrotubul – propyzamid. Po inkubacji komórek w tym inhibitorze, włączanie kwasu ^3H -palmitynowego do lipotubuloidów zostało zablokowane [p. 5.2.1.1. (17.)].

Obecność DGAT2 na terenie siateczki śródplazmatycznej oraz w obszarze kul lipidowych ujawniliśmy również w komórkach zarodków i komórkach merystemów korzeniowych *Arabidopsis thaliana* z wykorzystaniem techniki immunozłota koloidalnego i mikroskopii elektronowej. Ponadto, wokół kul lipidowych zidentyfikowaliśmy mikrotubule na przekrojach poprzecznych oraz tubulinę, potwierdzającą obecność mikrotubul. Wyniki te pokazują, że również komórki inne, niż epidermalne, prawdopodobnie mogą wykorzystywać analogiczne mechanizmy syntezy lipidów do tych, jakie zidentyfikowaliśmy w lipotubuloidach *O. umbellatum* [p. 5.2.1.1. (18.)].

Badania immunocytochemiczne oraz elektronowomikroskopowe komórek epidermy załąźni *O. umbellatum* pozwoliły nam ujawnić interesujące zjawisko występowania w nich dwóch rodzajów mikrotubul: stabilne mikrotubule wokół kul lipidowych obecne w lipotubuloidach oraz niestabilne mikrotubule korowe występujące na obrzeżach komórki. Tę heterogenność mikrotubul ujawniliśmy stosując odpowiednie metody utrwalania oraz stabilizator mikrotubul, taxol. Najprawdopodobniej stabilność mikrotubul lipotubuloidowych związana jest z warstwą polisacharydową na nich, która również została przez nas zidentyfikowana, a której brak jest przy mikrotubulach korowych [p. 5.2.1.1. (14.)].

Ostatnim naszym osiągnięciem było zweryfikowanie hipotezy dotyczącej udziału kutinsomów, specyficznych struktur zawierających składniki budulcowe kutykuli (Heredia-Guerrero i wsp. 2008), w tworzeniu tej ochronnej warstwy epidermy i udziału lipotubuloidów w procesie biosyntezy kutykuli w komórkach epidermy załąźni *O. umbellatum*. Badania prowadziliśmy z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających te struktury, tj. skierowanych przeciwko kutinsomom, oraz techniki immunozłota i mikroskopii elektronowej. Eksperymenty te potwierdziły obecność kutinsomów w lipotubuloidach, cytoplazmie i ścianie komórkowej komórek epidermy *O. umbellatum*. Badania te są prowadzone we współpracy z ośrodkiem naukowym w Barcelonie, kierowanym przez prof. A. Heredia [p. 5.2.1.4. (1.)].

Część powyższych badań dotyczących lipotubuloidów, została sfinansowana ze środków MNiSW w ramach grantu nr N N303 359035 „Rola kul lipidowych w syntezie lipidów”, którego byłem kierownikiem. Oprócz wyżej zaprezentowanych oryginalnych prac eksperymentalnych, związanych z tą tematyką, jestem współautorem artykułu przeglądowego

wydanego w j. polskim [p. 5.2.1.2. (20.)] i angielskim [p. 5.2.1.2. (20a.)] oraz współautorem rozdziału do książki [p. 5.2.1.3. (21.)].

Literatura uzupełniająca

Heredia-Guerrero JA, Benitez JJ, Heredia A (2008) Self-assembled polyhydroxy fatty acids vesicles: a mechanism for plant cutin synthesis. *BioEssays* 30: 273-277.

Kwiatkowska M (1971a) Fine structure of lipotubuloids (elaioplasts) in *Ornithogalum umbellatum* L. *Acta Soc Bot Pol* 40: 451-465.

Kwiatkowska M (1971b) Fine structure of lipotubuloids (elaioplasts) in *Ornithogalum umbellatum* in the course of their development. *Acta Soc Bot Pol* 40: 529-537.

Kwiatkowska M (1972a) Changes in the diameter of microtubules connected with the autonomous rotary motion of the lipotubuloids (elaioplasts). *Protoplasma* 75: 345-357.

Kwiatkowska M (1972b) Autoradiographic studies on the incorporation of [³H]palmitic acid into lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* L. *Folia Histochem Cytobiol* 10: 121-124.

Kwiatkowska M (1996) Changes in ultrastructure of cytoplasm and nucleus during spermiogenesis in *Chara vulgaris*. *Folia Histochem Cytobiol* 34: 41-56.

Kwiatkowska M (2004) The incorporation of ³H-palmitic acid into *Ornithogalum umbellatum* lipotubuloids, which are a cytoplasmic domain rich in lipid bodies and microtubules. Light and EM autoradiography. *Acta Soc Bot Pol* 73: 181-186.

Kwiatkowska M, Kaźmierczak A, Popłońska K (2002) Ultrastructural, autoradiographic and electrophoretic examinations of *Chara tomentosa* spermiogenesis. *Acta Soc Bot Pol* 71: 201-209.

Kwiatkowska M, Popłońska K (2002) Further ultrastructural research of *Chara vulgaris* spermiogenesis: endoplasmic reticulum, structure of chromatin, ³H-lysine and ³H-arginine incorporation. *Folia Histochem Cytobiol* 40: 85-97.

Popłońska K, Wojtczak A, Kwiatkowska M, Kaźmierczak A (2007) Ctochemical and immunocytochemical studies of the localization of histones and protamine-type proteins in spermatids of *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. *Folia Histochem Cytobiol* 45: 367-374.

Wojtczak A, Popłońska K, Kwiatkowska M (2008) Phosphorylation of H2AX histone as indirect evidence for double-stranded DNA breaks related to the exchange of nuclear proteins and chromatin remodeling in *Chara vulgaris* spermiogenesis. *Protoplasma* 233: 263-267.

6. Udział w projektach badawczych

6.1. Udział w projektach badawczych MNiSW (lub dawniej KBN)

6.1.1. Kierowanie projektami badawczymi

1. **2008-2012 r., grant MNiSW nr N N303 359035** – „Rola kul lipidowych w syntezie lipidów” – **kierownik.**

6.1.2. Udział w projektach badawczych

1. **1999-2002 r., grant KBN nr 6 PO4C 053 17** – „Cytofizjologiczne badania procesu spermiogenezy *Chara sp*” – **główny wykonawca.**
2. **2003-2007 r., grant KBN nr 3 PO4C 033 25** – „Rola RER w spermiogenezie *Chara vulgaris* i *Chara tomentosa*” – **główny wykonawca.**

6.2. Udział w projektach badawczych, tzw. projektach własnych

6.2.1. Kierowanie projektami własnymi

1. **2001 r., nr 505/690** – „Cytologiczne badania porównawcze komórek merystemów korzeniowych różnych odmian *Glycine max* w warunkach stresu chłodu”.
2. **2002 r., nr 505/466** – „Ultrastrukturalne i autoradiograficzne badania roli wakuol jąderkowych w merystemie korzeni soi – *Glycine max*”.
3. **2004 r., nr 505/433** – „Dalsze badania roli wakuol jąderkowych w merystemie korzeni *Glycine max*”.
4. **2005 r., nr 505/379** – „Wpływ epoksomycyny na ultrastrukturę i wielkość jąderek w komórkach merystematycznych korzeni soi; dobór inhibitora transkrypcji RNA” (grant habilitacyjny - 1).
5. **2006 r., nr 505/379** – „Wpływ inhibitorów transkrypcji RNA na wielkość jąderek, włączanie ³H-urydyny; identyfikacja proteasomów i ubikwityny w jąderkach komórek merystematycznych soi” (grant habilitacyjny - 2).
6. **2007 r., nr 505/393** – „Immunofluorescencyjna identyfikacja nukleofosminy i fibrylaryny w komórkach merystematycznych siewek soi traktowanych chłodem oraz poddanych regeneracji” (grant habilitacyjny - 3).
7. **2009 r., nr 505/0386** – „Identyfikacja UBF metodą immunozłota w jąderkach komórek merystematycznych korzeni soi w warunkach obniżonej i podwyższonej aktywności transkrypcyjnej jąderek” (grant habilitacyjny - 4).

6.2.2. Udział w projektach własnych

1. **2005-2006 r., nr 505/375** – „Rola etylenu w rozwoju anterydiostanów i plechy *C. vulgaris*”.
2. **2008 r., nr 505/390** – „Wpływ inhibitora topoizomerazy II – etopozydu, na przebieg procesu spermiogenezy u *Chara vulgaris*”.
3. **2010 r., nr 505/389** – „Badania ultrastrukturalne spermatyd *Chara vulgaris* poddanych działaniu inhibitora topoizomerazy II – etopozydu”.

7. Udział w konferencjach

7.1. Konferencje międzynarodowe

1. Posmyk MM, **Stępiński D** (1996) *Reakcje nasion trzech gatunków roślin motylkowych na stres chłodu podczas kiełkowania i w początkowej fazie wzrostu: aktywność RNazy i fosfatazy*. Międzynarodowe Sympozjum „Poprawa jakości nasion”. Skierniewice, 15-19 lipca. Materiały zjazdowe, str. 55.
2. **Stępiński D** (1997) *Ribonuclease activity in roots of soybean seedlings exposed to chilling stress*. Międzynarodowa Konferencja “Molecular Biology of Plants under Environmental Stress”. Poznań, 17-19 września. *Biological Bulletin of Poznań* 43: 82 (suppl.).
3. Kwiatkowska M, Popłońska K, Wojtczak A, Kaźmierczak A, **Stępiński D** (2006) *Spremiogenesis of Chara spp. – the results of our ten-year observations*. 14th Meeting of Group of European Charaphytologists (GEC). Barcelona, 19-23 October. Materiały zjazdowe, str. 5-6.
4. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Popłońska K, Wojtczak A, Polit JT (2011) *Biogenesis of Lipid Bodies in Ornithogalum umbellatum lipotubuloids*. Euro Fed Lipid. 5th European Symposium on Plant Lipids. Gdańsk, 10-13 July. Poland. Book of Abstracts, Storage Lipid Accumulation and Metabolism, p. 67.
5. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Popłońska K, Wojtczak A, Polit JT (2011) *Are Ornithogalum umbellatum lipotubuloids territory of cuticle synthesis?* The 5th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology. Experimental Plant Biology in 3P – Past, Present, Perspectives. Wrocław, September 6-9. The Book of Abstracts, 2.2, p. 120.
6. **Stępiński D** (2011) *Levels of DNA methylation and histone methylation and acetylation change in root meristematic cells of soybean grown under different temperature conditions*. The 5th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology. Experimental Plant Biology in 3P – Past, Present, Perspectives. Wrocław, September 6-9. The Book of Abstracts, 6.33, p. 230.

7.2. Konferencje krajowe

1. **Stępiński D**, Komoszyński MA (1992) *Enzymatyczna regulacja poziomu wolnego IAA we wczesnych stadiach rozwojowych kukurydzy*. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Łódź, 16-18 września. Streszczenia referatów i materiałów zjazdowych, str. 396.
2. Romanowska-Duda Z, **Stępiński D**, Knypl JS (1996) *Zmiany aktywności hydrolaz w siewkach dwóch odmian soi (Glycine max (L.) Merr.) poddanych działaniu chłodu*. Ogólnopolska konferencja Naukowa „Strączkowe Rośliny Białkowe” II. Soja. Lublin, 28 listopada. Materiały zjazdowe, str. 186-192.

3. **Stępiński D** (1998) Cytologiczne obserwacje zmian wywołanych niską temperaturą w merystemach korzeni soi. 51 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego. Gdańsk, 15-19 września. Materiały zjazdowe, str. 458.
4. **Stępiński D**, Kwiatkowska M (2001) *Ultrastrukturalne i autoradiograficzne badania jąderek w komórkach merystematycznych korzeni soi podczas stresu chłodu i regeneracji*. 52 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego. Poznań, 24-28 września. Materiały zjazdowe, str. 24.
5. **Stępiński D**, Kwiatkowska M, Popłońska K (2003) *Ultrastrukturalne i autoradiograficzne badania roli wakuol jąderkowych w merystemie korzeni soi*. XXXIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików. Wrocław, 18-20 września. Materiały zjazdowe, str. 42.
6. Kwiatkowska M, Popłońska K, **Stępiński D** (2004) *Motive forces of rotary motion of lipotubuloids of *Ornithogallum umbellatum**. 53 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego. Toruń-Bydgoszcz, 6-11 września 2004. Materiały konferencyjne, str. 13.
7. **Stępiński D** (2007) *Nucleolar vacuolation in soybean root meristematic cells during recovery after chilling*. 3rd Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology (PTBER). Warszawa, 26-30 sierpnia. Materiały zjazdowe, str. 24.
8. Kwiatkowska M, Popłońska K, Kaźmierczak A, **Stępiński D**, Rogala K (2007) *Zależność pomiędzy wzrostem komórek epidermy zalążni i owocu *Ornithogalum umbellatum* a poziomem endoreplikacji DNA, rozmiarem lipotubuloidów oraz zawartością kwasu giberelinowego*. 54 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego. Szczecin, 3-8 września. Materiały zjazdowe, str. 54.
9. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Popłońska K, Wojtczak A, Polit JT (2009) *Microtubules surround lipid bodies forming lipotubuloids as well as those singularly localized in the cytoplasm*. The Proceedings of the Conference on The Challenges of Contemporary Cell Biology; Molecular Genetics, System Biology, Bioinformatics; The Conference to Honour Professor Maria J. Olszewska on Her Jubilee. Łódź, 20-21 kwietnia. Materiały zjazdowe, str. 58.

7.3. Komunikaty zjazdowe opublikowane w czasopismach punktowanych

(Udział w konferencjach nie wymienionych powyżej)

1. Kwiatkowska M, **Stępiński D** (1999) *Changes in nucleoli of soybean root meristem cells under chilling stress*. VII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki. Kraków, 9-11 września. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 37: 62 (suppl).
2. Kwiatkowska M, Popłońska K, Wojtczak A, Gosek A, **Stępiński D** (2002) *Proteasomes, ubiquitin and the effects of epoxomicin, an inhibitor of proteasomal proteolytic activity, on the spermiogenesis of *Chara vulgaris**. VIII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki. Wrocław, 23-25 września. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 58 (suppl).

3. Kwiatkowska M, Popłońska K, **Stępiński D**, Hejnowicz Z (2005) *Changes in microtubule diameter in relation to the number and density of arrangement of protofilaments in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis cells*. IX Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki. Łódź, 15-17 września. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 43: 130 (suppl. 1).
4. Popłońska K, Wojtczak A, **Stępiński D** (2006) *Cytochemical and immunocytochemical identification of histones and protamines during *Chara vulgaris* spermiogenesis*. XXVII Konferencja Embriologiczna. Zakopane, 17-20 maja. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 48: 62 (suppl. 1).
5. Kwiatkowska M, **Stępiński D**, Popłońska K, Wojtczak A, Polit J, Rogala K (2008) *Elajoplasts of *Haemanthus albiflos* are lipotubuloids (cytoplasmic domains rich in lipid droplets and microtubules)*. The Congress of Biochemistry and Cell Biology the 43rd Meeting of the Polish Biochemical Society and the 10th Conference of the Polish Cell Biology Society. Olsztyn, 7-11 września. *Acta Biochimica Polonica* 55: 28 (suppl. 3).

Tab. 3. Wskaźniki Impact Factor (podano wartości wskaźników IF dla czasopism z roku opublikowania komunikatu, bieżący – z 2011r. oraz 5-letni) **oraz punkty MNiSW** (podano wartości dla czasopism z roku opublikowania komunikatu oraz bieżące – z 2012 r.) **komunikatów zjazdowych opublikowanych w punktowanych czasopismach.**

Nr komunikatu	Wskaźnik IF			Punkty MNiSW	
	Z roku opublikowania komunikatu	Bieżący	5-letni	Z roku opublikowania komunikatu	Bieżące
1	0	0,807	1,245	7	15
2	0,651	1,505	1,383	10	15
3	0,789	0,807	1,245	13	15
4	0,213	0,565	0,796	13	20
5	1,448	1,491	1,595	20	15
Suma	3,101	5,175	6,264	63	80

7.4. Referaty na konferencjach

1. Kwiatkowska M, **Stępiński D** (1999) *Changes in nucleoli of soybean root meristem cells under chilling stress*. VII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki. Kraków, 9-11 września. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 37: 62 (suppl).

8. Udział w konsorcjach i sieciach badawczych

1. Członkostwo w Sieci Naukowej – Mechanizmy Ruchów Komórkowych – MOBILITAS z siedzibą w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie, PAN.

9. Otrzymane nagrody

1. Indywidualna Nagroda Rektora UŁ III stopnia za cykl prac nt. „Cytofizjologiczne obserwacje zmian spowodowanych działaniem niskiej temperatury w korzeniach soi (*Glycine max* (L.) Merr., odm. Aldana)”, Łódź, 2005.

10. Informacje bibliometryczne

10.1. Indeks Hirscha

(wg bazy Web of Science ze stycznia 2013 r.)

IH = 4

10.2. Wskaźniki Impact Factor, punkty MNiSW oraz liczba cytowań

(Wartości wskaźników Impact Factor podano dla czasopism z roku wydania publikacji, bieżący – z 2011r. oraz 5-letni, wg Journal Citation Reports, JCR. Wartości punktów MNiSW podano dla czasopism z roku wydania publikacji oraz bieżące – z 2012 r. Liczbę cytowań podano na podstawie bazy Web of Science ze stycznia 2013 r.)

Z roku wydania publikacji	Wskaźniki IF		Punkty MNiSW		Liczba cytowań
	Bieżący	5-letni	Z roku wydania publikacji	Bieżące	

Główne osiągnięcie naukowe

12,573	13,398	13,097	157	155	9
--------	--------	--------	-----	-----	---

Pozostałe publikacje

20,443	24,362	26,999	292	380	50
--------	--------	--------	-----	-----	----

Komunikaty zjazdowe opublikowane w czasopismach punktowanych

3,101	5,175	6,264	63	80	0
-------	-------	-------	----	----	---

Cały dorobek naukowy

36,117	42,935	46,360	512	615	59
--------	--------	--------	-----	-----	----

Łódź, dnia 05 lutego 2013 r.

Dariusz Stępiński
(Podpis habilitanta)