

dr Justyna Polit

## **AUTOREFERAT**

Katedra Cytofizjologii  
Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 30 czerwca 2012r.

**1. Imię i nazwisko:** Justyna Polit

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

- 23 czerwca 1995r. - Dyplom ukończenia stacjonarnych 5-letnich studiów wyższych na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego w zakresie fizjologii (z tytułem magistra)
- 25 styczeń 2000r. - Dyplom Doktora Nauk Biologicznych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- 09.04.1999r. – 30.09.1999r. - Starszy referent biolog ½ etatu. Katedra Cytofizjologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego
- 01.10.1999r. – 29.02.2000r. - Asystent. Katedra Cytofizjologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego
- 01.03.2000r. – do dzisiaj. - Adiunkt. Katedra Cytofizjologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi / przemianowany w 2001r. na Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

**4. Osiągnięcie naukowe wynikające z art.16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

**A) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

„Zmiany dostępności cukrów i fosforylacji białek, a dynamika przejść G1-S i G2-M w cyklu komórkowym u *Vicia faba*”

**B) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:**

- [1] **Polit J.T., Maszewski J., Rosiak M., 2004.** IAA and BAP affect protein phosphorylation-dependent processes during sucrose-mediated G1 to S and G2 to M transitions in root meristem cells of *Vicia faba*. Acta Soc. Bot. Pol. 73: 17-22.

**IF – 0.221, Pkt MNiSW – 13,**

*Indywidualny wkład - 75%; koncepcja badawcza, przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań, analiza i opracowanie uzyskanych wyników, współudział w opracowaniu szaty graficznej i w redagowaniu publikacji.*

- [2] **Polit J.T., Kaźmierczak A., 2007.** Okadaic acid (1 $\mu$ M) accelerates S phase and mitosis but inhibits heterochromatin replication and metaphase-anaphase transition in *Vicia faba* meristem cells. J. Exp. Bot. 58: 2785-2797.

**IF – 3.917, Pkt MNiSW – 32,**

*Indywidualny wkład - 90%; koncepcja badawcza, przygotowanie materiału do badań, sprowadzenie aparatu do pomiarów aktywności enzymatycznej kinaz, samodzielne wykonanie większości prac eksperymentalnych i współudział w oznaczaniu aktywności kinaz, samodzielnie przeprowadzona analiza, interpretacja i opracowanie uzyskanych wyników badań, przygotowanie szaty graficznej i napisanie/zredagowanie publikacji, autor korespondencyjny pracy.*

- [3] **Polit J.T., 2008.** An improved method for the cell cycle synchronization of *Vicia faba* root meristem cells. Acta Physiol. Plant. 30: 315-324.

**IF – 0.807, Pkt MNiSW – 27,**

- [4] **Polit J.T., 2009.** Protein phosphorylation in *Vicia faba* root meristem cells during the first steps of leaving principal control points after sucrose application. Plant Cell Rep. 28: 165-173.

**IF – 2.301, Pkt MNiSW – 32,**

- [5] **Polit J.T., Ciereszko I., 2009.** *In situ* activities of hexokinase and fructokinase in relation to phosphorylation status of root meristem cells of *Vicia faba* during reactivation from sugar starvation. Physiol. Plant. 135: 342-350.

**IF – 2.708, Pkt MNiSW – 32,**

*Indywidualny wkład - 80%; nawiązanie współpracy w celu wzbogacenia warsztatu metodycznego, koncepcja badawcza – adaptacja zaproponowanej metody oznaczania aktywności enzymów *In situ*, przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań, analiza, interpretacja i opracowanie uzyskanych wyników badań, przygotowanie szaty graficznej, napisanie manuskryptu i współudział w jego zredagowaniu, autor korespondencyjny pracy.*

- [6] **Polit J.T., Kaźmierczak A., Walczak-Drzewiecka A., 2012.** Cell cycle-dependent phosphorylation of pRb-like protein in root meristem cells of *Vicia faba*. Protoplasma 249: 131-137.

**IF – 1.922, Pkt MNiSW – 27,**

*Indywidualny wkład - 70%; koncepcja badawcza, nawiązanie współpracy w celu opanowania techniki Western blot, przygotowanie materiału do badań, współudział w przygotowaniu ekstraktu białkowego, współudział w wykonaniu eksperymentu metodą Western blot, samodzielne wykonanie kolejnych badań metodą Western blot, samodzielna analiza, interpretacja i opracowanie uzyskanych wyników badań, przygotowanie szaty graficznej i napisanie/zredagowanie publikacji, autor korespondencyjny pracy.*

- [7] **Polit J.T., Ciereszko I., 2012.** Sucrose synthase activity and carbohydrates content in relation to phosphorylation status of *Vicia faba* root meristems during reactivation from sugar depletion. J. Plant Physiol. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.04.017.

**IF – 2.791, Pkt MNiSW – 32,**

*Indywidualny wkład - 70%; nawiązanie współpracy w celu wzbogacenia warsztatu metodycznego, koncepcja badawcza – adaptacja zaproponowanej metody oznaczania aktywności enzymów In situ, przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań, analiza, interpretacja i opracowanie uzyskanych wyników badań, przygotowanie szaty graficznej, napisanie manuskryptu i współudział w jego zredagowaniu, autor korespondencyjny pracy.*

**Sumaryczny Impact Factor wymienionych publikacji wynosi – 14.667,**

Wartości IF dla pozycji 1-5 podano zgodnie z rokiem opublikowania natomiast dla pozycji 6 i 7 podano ostatni dostępny IF z roku 2011.

**Sumaryczna liczba punktów MNiSW wynosi – 195.**

Punktacja MNiSW pochodzi z 2010r.

Wymienione powyżej prace, wchodzące w skład Rozprawy Habilitacyjnej, cytowane są [w opisie zawartym w punkcie C) – poniżej] zgodnie z nadaną im numeracją [1-7]. Cytowana w tekście literatura uzupełniająca opatrzona jest numeracją [8-54]. Alfabetyczny wykaz literatury uzupełniającej zamieszczony jest na końcu rozdziału C).

### C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników:

U roślin przyrost liczby komórek odbywa się w regionach merystematycznych podczas cyklu komórkowego złożonego z faz G1, S, G2 i M. Genomy roślin, podobnie jak genomy innych organizmów eukariotycznych, kodują liczne białka, które w obecności innych cząsteczek regulatorowych w określonym czasie i miejscu zapewniają prawidłowe ukończenie jednego etapu cyklu przed rozpoczęciem kolejnego [43, 46, 51]. Wśród nich są czynniki promujące fazę S (*S-phase promoting factor*, SPF) i M (*M-phase promoting factor*, MPF), które są kompleksami serynowo/treoninowych kinaz cyklino-zależnych CDK i cyklin [9, 17, 18, 27, 28, 35, 41, 53]. Kompleksy te są wysoko specyficzne, a ich ekspresja oraz aktywność są ściśle kontrolowane między innymi przez endogenne inhibitory kinaz cyklino-zależnych [15, 54], różnorodne fosfatazy białkowe (PPs, cdc25 [8, 21, 29, 31, 33, 34, 50]), oraz innego typu kinazy (kinazy tyrozynowe, kinazy MAP [25, 34, 48]). Ponadto, podlegają one autokontroli w reakcjach sprzężenia zwrotnego, w odpowiedzi na różnorodne sygnały wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe [8, 25, 33, 43, 49, 51]. Molekularne mechanizmy, które kontrolują przebieg cyklu komórkowego są w znacznym stopniu oparte o liczne reakcje fosforylacji i defosforylacji białek enzymatycznych, strukturalnych i regulatorowych. Aktywne kompleksy SPF i MPF poprzez sekwencyjną fosforylację substratów (np. kompleksu pRb/E2F przed replikacją [19, 47] i lamin lub histonów przed mitozą [10]) aktywują proces przechodzenia komórek przez kolejne etapy cyklu. Mimo, że znaczna liczba tych białek została już wykryta u roślin, nadal nieznanym jest kompletny mechanizm ich regulacji, wzajemnych oddziaływań oraz precyzyjna funkcja, a cykl komórkowy w dużym stopniu opisywany jest na zasadzie porównań z lepiej poznanym cyklem komórkowym u drożdży czy zwierząt. Białka wykryte u roślin często określa się mianem „-like proteins”, np. Rb-like [32] czy lamin-like [10], a więc podobne do białek Rb czy lamin opisanych w komórkach zwierzęcych czy ludzkich.

Komórki merystematyczne roślin są ponadto wyposażone w skomplikowaną sieć mechanizmów, które w odpowiedzi na warunki zewnętrzne koordynują podziałową funkcję tkanki merystematycznej z procesami metabolicznymi [22, 23, 45]. Wiedza na temat powiązania szlaków metabolicznych ze szlakami sterującymi cyklem komórkowym jest fragmentaryczna. Jednym z możliwych mediatorów powyżej wspomnianych wydarzeń jest sacharoza, główny transportowy produkt fotosyntezy, który w tkankach nefotosyntezujących jest magazynowany w wakuolach i zużywany w procesach oddychania komórkowego lub zamieniany na strukturalne i zapasowe polisacharydy oraz różne pochodne cukrowców [13, 14, 30, 42, 44]. Sacharoza jest również cząsteczką regulatorową i sygnałową, ponieważ może ona wpływać na procesy komórkowe np. poprzez indukcję/represję ekspresji genów [11, 24, 36, 42].

Ograniczona dostępność sacharozy (wywołana przez izolację merystemów korzeniowych od liścieni i ich 3-dobową hodowlę w pożywce White'a bez cukru) prowadzi

do indukcji endogennych głównych punktów kontrolnych (*Principal Control Points* PCP1 i PCP2), które blokują cykl komórkowy odpowiednio w fazie G1 i G2 [52]. Blokowanie cyklu komórkowego jest procesem odwracalnym, ponieważ wzbogacenie pożywki w sacharozę uruchamia ponownie aktywność replikacyjną i mitotyczną, jednak z około 12-godzinnym opóźnieniem [37, 38]. Czas, po którym komórki wznawiają cykl może być modulowany przy pomocy regulatorów wzrostu. Fitohormony, podane jednocześnie z sacharozą, komórkom zablokowanym w PCPs przyspieszają (np. cytokinina - BAP) lub opóźniają (np. auksyna - IAA) wznowienie replikacji i mitozy [39]. W okresie od podania sacharozy do momentu wznowienia cyklu mają miejsce liczne reakcje fosforylacji i defosforylacji białek, odbywające się zarówno w obrębie szlaków metabolicznych, jak i sieci sygnalizacyjnej regulującej przebiegiem cyklu komórkowego. W początkowym okresie regeneracji w obecności sacharozy, komórki merystematyczne wykazują wysoką wrażliwość na działanie inhibitorów serynowo/treoninowych kinaz białkowych [37] oraz fosfataz białkowych (PP1/2A) [38]. Wrażliwość wyraża się znacznym przedłużeniem okresu regeneracji, jak również mniejszą liczbą komórek wznawiających cykl. Wrażliwość ta maleje wraz z upływem czasu regeneracji i jest najmniejsza wtedy, gdy inhibitory znajdują się w ostatnim etapie regeneracji komórek, czyli podczas trzech godzin przed wznowieniem replikacji i mitozy. Powyżej przedstawione problemy były przedmiotem pracy doktorskiej.

**Otrzymane w ramach wykonywania pracy doktorskiej wyniki stały się podstawą dla przeprowadzenia badań mających na celu:**

- I. Wyjaśnienie przyczyn zróżnicowanej wrażliwości komórek na stosowane inhibitory podczas początkowego i końcowego etapu przejścia PCP1-S i PCP2-M;**
- II. Analizę wpływu inhibitorów na przejścia G1-S i G2-M w komórkach, w których punkty kontrolne nie uległy ekspresji.**

**Badania przeprowadzono na dwóch modelach eksperymentalnych, w których merystemy korzeniowe *Vicia faba ssp. minor* poddano:**

- I. Głodzeniu węglowodanowemu, blokującemu cykl komórkowy w dwóch punktach kontrolnych (PCP), a następnie regeneracji w obecności cukru - model służył badaniom przejścia PCP1-S i PCP2-M [1, 4, 5, 7];**
- II. Synchronizacji komórek w cyklu przy pomocy hydroksymocznika, a następnie synchronicznemu kontynuowaniu cyklu - model służył badaniom przejścia G1-S i G2-M z pominięciem ekspresji PCP [2, 3, 6].**

### **W badaniach regulacji cyklu komórkowego stosowano:**

- regulatory wzrostu: - cytokininę – 6-benzyloaminopurynę (BAP) w stężeniu 0,56  $\mu\text{M}$  [1]  
- auksynę – kwas indolilo-3-octowy (IAA) w stężeniu 5,4  $\mu\text{M}$  [1]
- inhibitor kinaz białkowych Ser/Thr – 6-dimetyloaminopurynę (6-DMAP) w stężeniu 3 mM [4, 5, 7]
- inhibitor fosfataz białkowych PP1/2A – kwas okadejowy (OA) w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  [2, 4, 5, 7]
- sacharozę w stężeniu 2% [1, 4, 5, 7]
- glukozę w stężeniu 1% [5, 7]

Stężenia użytych związków zostały wybrane w oparciu o badania wstępne.

Badania prowadzono na poziomie mikroskopii świetlnej, fluorescencyjnej i elektronowej z wykorzystaniem technik autoradiografii, cytochemii, immunocytochemii. Stosowano również metody cytofotometryczne, luminescencyjne i technikę Western blot.

Realizacja głównych celów badań odbywała się poprzez realizację celów etapowych. Pierwszym z nich była:

**Analiza poziomu fosforylacji białek podczas przejść PCP1-S i PCP2-M w obecności hormonów roślinnych, a więc odpowiedź na pytanie czy i jak regulatory wzrostu modyfikują poziom fosforylacji białek i czy te modyfikacje korelują z indukowanymi przez nie zmianami czasu obydwu przejść [1].**

Podczas realizacji postawionego celu zastosowano przeciwciała rozpoznające w białkach ufosforylowaną formę treoniny. Zaobserwowano, że komórki zablokowane w PCP1 i PCP2 charakteryzują się niskim poziomem ufosforylowanych białek natomiast te, które pod wpływem sacharozy opuściły punkty kontrolne i dotarły do etapu, w którym rozpoczyna replikację i mitozę posiadają zwiększony poziom fosfoepitopów. Zawierają one również niezidentyfikowane ogniska silnej fosforylacji białek w cytoplazmie. Pojawiają się one jako małe i nieliczne jasno fluoryzujące punkty otaczające jądro komórkowe po pierwszych 3 godz. regeneracji w sacharozie, a osiągają maksymalne rozmiary po 12 godz. inkubacji. Otrzymane wyniki sugerowały, że obniżona aktywność kinaz może być mechanizmem odpowiedzi na brak substancji odżywczych, a wzrost aktywności kinaz towarzyszy wznowieniu cyklu komórkowego.

Niestety regulatory wzrostu, które w początkowym etapie regeneracji w sacharozie słabiej, a później silniej modyfikowały poziom fosforylacji białek w komórkach, bez względu na to czy przyspieszały, czy opóźniały wznowienie aktywności replikacyjnej i mitotycznej, doprowadziły ostatecznie po 12 godz. hodowli do znacznego spadku poziomu fosforylacji zarówno na terenie jąderka, jądra, jak i cytoplazmy komórek w fazie G1 i G2.

**Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że:**

- a.** Regulatory wzrostu znacznie modyfikują poziom fosforylacji białek podczas przejścia PCP1-S i PCP2-M, jednak przyczyna wcześniejszego (w przypadku BAP) lub późniejszego (w przypadku IAA) rozpoczęcia replikacji i mitozy nie manifestuje się w ogólnej zmianie poziomu ufosforylowanych białek;
- b.** Zmiany fosforylacji białek wywołane regulatorami wzrostu należy badać stosując przeciwciała skierowane przeciw ufosforylowanej formie konkretnych białek.

W związku z pojawieniem się w cytoplazmie komórek regenerowanych przez 3 godz. w sacharozie niezidentyfikowanych obszarów, w których odbywa się silna fosforylacja białek, celem kolejnego etapu pracy była:

**Analiza, czy i jak inhibitory kinaz i fosfataz (6-DMAP i OA) modyfikują poziom fosforylacji białek w pierwszym etapie przejścia PCP1-S i PCP2-M oraz identyfikacja ognisk silnej fosforylacji [4].**

Badania z zastosowaniem poprzednio użytych przeciwciał wykazały, że intensywne blokowanie wznowienia cyklu komórkowego, wywołane działaniem OA w pierwszym etapie regeneracji komórek, związane było z niewielkim wzrostem ogólnego poziomu fosfoepitopów w jąderkach i jądrach komórek w fazie G1 oraz w jądrach komórek w fazie G2, jak również z brakiem ufosforylowanych ognisk w cytoplazmie.

Z kolei hamowanie wznowienia cyklu pod wpływem 6-DMAP korelowało paradoksalnie z silnym wzrostem fosforylacji w obrębie całych komórek. Intensywność fluorescencji emitowanej z całej powierzchni cytoplazmy była równa lub wyższa od tej emitowanej z immunopozytywnych ognisk w komórkach kontrolnych, maskowała więc ewentualne zmiany, które mogły w nich wystąpić pod wpływem 6-DMAP.

W celu identyfikacji immunopozytywnych ognisk zastosowano metodę wysrebrzania Ag-NOR, która służy do identyfikacji obszarów jąderek. Srebrochłonność jąderek związana jest między innymi z obecnością silnie ufosforylowanych białek [26]. W wyniku przeprowadzonej reakcji, cytoplazmatyczne obszary silnej fosforylacji zostały ujawnione w mikroskopie świetlnym. Następnie stosując metodę detekcji aktywnych dehydrogenaz mitochondrialnych (bazującą na przekształceniu rozpuszczalnej soli tetrazolowej – MTT w nierozpuszczalny barwny formazan [20]) wykazano, że badane obszary nie są mitochondriami. Świadczyła o tym ich ilość, wielkość i rozmieszczenie. Z kolei metoda wykorzystująca JwKJ (płyn Lugola) ujawniła, że są nimi plastydy gromadzące ziarna skrobi. Ich ilość, wielkość i rozmieszczenie korespondowały z silnie ufosforylowanymi obszarami. Ziarna skrobi podobnie jak immunopozytywne ogniska nie występowały w komórkach



traktowanych OA. Pojawiały się natomiast w mniejszej liczbie i rozmiarach w komórkach traktowanych 6-DMAP.

Otrzymane wyniki potwierdzono badaniami ultrastrukturalnymi, które ujawniły w komórkach kontrolnych (*in planta*) wokół-jądrową lokalizację bogatych w skrobię plastydów, oraz ich brak w komórkach głodzonych węglowodanowo. Komórki głodzone węglowodanowo były silnie zwakuolizowane, a plastydy nie zawierające ziaren skrobi były spychane w obszary peryferyczne. Po 3 godz. regeneracji w sacharozie nieregularne, często wydłużonych kształtów plastydy wracały w pobliże jądra, wykazywały one wtedy obecność nowo syntetyzowanych drobnych ziaren skrobi, które po 12 godz. regeneracji obficie wypełniały całą powierzchnię plastydów.

W ciągu pierwszych 3 godz. regeneracji komórek w sacharozie OA silnie hamował proces syntezy nowych ziaren skrobi. Nawet po usunięciu inhibitora i dalszej regeneracji w sacharozie (do 12 godz.) komórki nie były w stanie odbudować zużytych zapasów skrobi. 6-DMAP miała dużo słabszy wpływ i komórki po jej usunięciu, po 12 godz. inkubacji odbudowywały zapasy energetyczne.

**Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że:**

- a. Białkowe kinazy Ser/Thr są prawdopodobnie odpowiedzialne za aktywację fosfatyzacji w odpowiedzi na pojawienie się sacharozy, ponieważ 6-DMAP wywołuje akumulację fosfoepitopów w komórce;
- b. Struktury, w których występuje silna fosforylacja białek są plastydami, a ich wokół-jądrowa lokalizacja może być związana z nierozszyfrowanym jeszcze zjawiskiem sygnalizacji pomiędzy plastydami a jądrem;
- c. Transdukcja sygnału pochodzącego od sacharozy, którego efektem jest fosforylacja białek w plastydzie i resynteza skrobi, jest kontrolowana przez fosfatazy PP1/2A.

W związku z uzyskanymi wynikami ujawniającymi, że fosforylacja białek w obrębie plastydów jest skorelowana z syntezą skrobi, a synteza skrobi odbywa się na bazie produktów hydrolizy podanej komórkom sacharozy, celem kolejnego etapu badań była:

**Analiza *in situ* czy zjawisko fosforylacji białek w plastydach jest skorelowane z aktywnością enzymów uczestniczących w metabolizmie sacharozy. Podjęto analizę aktywności heksokinazy i fruktokinazy [5].**

Aby sacharoza mogła wejść w szlaki metaboliczne i posłużyć między innymi do syntezy skrobi musi ulec hydrolizie do glukozy i fruktozy przy udziale inwertazy (Inv) lub UDP-glukozy i fruktozy przy udziale syntazy sacharozy (Susy). Produkty (glukoza i fruktoza)

są następnie fosforylowane przy udziale heksokinazy (HK) i fruktokinazy (FK) i ulegają dalszym przekształceniom pod kontrolą kolejnych enzymów [12, 40].

Badania wykazały, że aktywność HK jest w merystemach korzeniowych znacznie wyższa niż FK. FK jest natomiast bardziej aktywna w merystemach pędu. W komórkach głodzonych węglowodanowo aktywność obydwu enzymów znacząco spadła, natomiast pod wpływem sacharozy stopniowo wzrastała i lokalizowała się głównie w okolicach organelli komórkowych (m.in. plastydów, mitochondriów). Dla porównania glukoza nie była tak efektywnym stymulatorem aktywności enzymów, jak sacharoza. W obecności glukozy zarówno reaktywacja cyklu komórkowego, jak i synteza skrobi były również opóźnione.

Inhibitory kinaz i fosfataz białkowych hamowały aktywność HK głównie na początku okresu regeneracji komórek w sacharozie (0-3godz.). Obszary występowania aktywności HK, silnej fosforylacji białek i syntezy skrobi korespondowały ze sobą. Wszystkie wymienione reakcje były silnie hamowane przez OA.

#### **Wyniki uzyskane na tym etapie badań prowadzą do następujących wniosków:**

- a. Intensywna fosforylacja białek w obrębie plastydów jest skorelowana z aktywnością HK. Zarówno fosforylacja białek jak i aktywność HK jest kontrolowana przez PP1/2A, gdyż OA hamuje obydwie reakcje. Obecnie trudno powiedzieć czy fosforylacja dotyczy samej HK czy innego białka aktywującego HK;
- b. 6-DMAP hamując aktywność HK i FK mogła bezpośrednio wpływać na kinazy białkowe dokonujące ich aktywacji biorąc jednak pod uwagę, że była przyczyną wzrostu poziomu fosfoepitopów w komórce mogła również hamować kinazy aktywujące fosfatazy;
- c. Glukoza, mimo iż jest bezpośrednim substratem dla HK, nie stanowi sygnału bezpośrednio aktywującego HK. Sygnałem takim jest sacharoza lub reakcja jej hydrolizy.

W związku z tym, że stosowane w badaniach inhibitory wywierały wpływ na aktywność HK i FK, w kolejnym etapie pracy celem była:

**Analiza *in situ* - czy w wyniku działania inhibitorów zaburzona została również aktywność inwertazy i syntazy sacharozy – enzymów, które jako pierwsze uczestniczą w szlaku hydrolizy sacharozy [7].**

W merystemach korzeni kontrolnych (*in planta*) aktywność Inv, była związana z komórkami skórki i warstwą komórek leżących bezpośrednio pod nią. W merystemach głodzonych aktywność enzymu zanikała i nie pojawiała się podczas 12-godz. okresu regeneracji. Pomimo braku aktywności Inv w komórkach merystematycznych poddanych regeneracji po głodzeniu węglowodanowym wykryto obecność glukozy. Najmniejszą jej zawartość posiadały komórki traktowane OA w pierwszych 3 godz. regeneracji.

Aktywność Susy, podobnie jak aktywność HK i FK spadła w wyniku głodzenia węglowodanowego komórek, jednak była silnie wzbudzana przez sacharozę po 3 godz. inkubacji. Glukoza nie wywierała tak szybkiego i silnego efektu. Aktywność Susy (na poziomie podobnym do tego, jaki został wywołany działaniem sacharozy) pojawiła się dopiero po 12 godz. inkubacji w glukozie. Stosowane w badaniach inhibitory (szczególnie OA) znacznie hamowały aktywność Susy w pierwszym okresie regeneracji.

Zawartość polisacharydów wykrytych w reakcji PAS, w tym skrobi wykrytej JwKJ, w każdej serii eksperymentalnej korespondowała z aktywnością Susy, tzn. była niska w komórkach, w których aktywność Susy była niska i wysoka w komórkach, w których aktywność Susy była wysoka.

Badania ultrastrukturalne wykazały, że równoległe z hamowaniem syntezy skrobi komórki traktowane inhibitorami, głównie OA, miały zablokowaną produkcję polisacharydów w aparatach Golgiego. Polisacharydy budujące ścianę widoczne były natomiast wyraźnie w pęcherzykach Ap. Golgiego w komórkach kontrolnych *in planta* oraz komórkach regenerowanych w sacharozie przez 12 godz.

**Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że:**

- a. Metabolizm produktów uwalnianych przez inwertazę wymaga większej ilości ATP niż szlak metaboliczny z udziałem Susy, stąd wyłączenie aktywności inwertazy w komórkach głodzonych węglowodanowo może być mechanizmem adaptacyjnym służącym oszczędzaniu energii. Komórki preferują szlak metaboliczny sacharozy z udziałem Susy w okresie regeneracji, gdyż aktywność inwertazy nie powraca w tym czasie.
- b. Opóźnienie czasu wznowienia cyklu komórkowego wywołane przez inhibitory nie wynika z oddziaływania inhibitorów na aktywność inwertazy (pozostała ona wyłączona w odpowiedzi na głodzenie węglowodanowe), wynika natomiast z poważnie ograniczonej aktywności Susy, a w konsekwencji utrudnień w odbudowie polisacharydów.
- c. Glukoza nie jest sygnałem bezpośrednio włączającym aktywność Susy. Aktywność enzymu wznawiana jest z opóźnieniem, prawdopodobnie po uprzedniej syntezie sacharozy w komórce. Może to stanowić przyczynę późniejszej reaktywacji cyklu przez glukozę.

W związku z tym, że inhibitory kinaz i fosfataz białkowych hamowały wznowienie cyklu w komórkach głodzonych węglowodanowo, interesującym stało się pytanie: jaki będzie ich wpływ na komórki, które nie mają problemu z brakiem cukrów? Problemem w tego typu porównaniu jest asynchroniczność podziałów w merystemach kontrolnych *in planta*. Działając inhibitorami na merystemy *in planta* nie mamy pewności, w którym etapie cyklu działaliśmy na komórki, które następnie po okresie inkubacji chcemy oceniać, dlatego celem kolejnego etapu pracy było:

**Opracowanie metody wysokiej synchronizacji komórek *in planta*, aby stworzyć model dogodny do badań wpływu inhibitorów na cykl, w którym punkty kontrolne nie uległy aktywacji [3].**

W oparciu o opisane w literaturze sposoby synchronizacji komórek, do opracowania dogodnego modelu badań, wybrano bogatą mineralną pożywkę Hoagland'a [16] oraz podwójne hamowanie cyklu komórkowego przy pomocy hydroksymocznika (HU), który użyto w dwóch stężeniach. HU będąc inhibitorem reduktazy rybonukleotydowej, katalizującej przekształcanie rybonukleotydów w deoksyrybonukleotydy hamuje produkcję składników do syntezy DNA, a tym samym spowalnia, stosunkowo długo trwającą w cyklu, fazę S nie wpływając jednocześnie na czas trwania pozostałych etapów. Zatem komórki, które ukończyły fazę S mogą w normalnym tempie dotrzeć do kolejnej rundy replikacji zanim te, które tkwią jeszcze w fazie S ją opuszczą. W związku z powyższym, podczas pierwszej inkubacji w roztworze HU, komórki merystematyczne zostały zsynchronizowane w fazie S. Ponieważ, jedne z nich mogły znajdować się na początku fazy S, a inne na końcu, w skrajnym przypadku, mógł je różnić dystans nawet ok. 9 godz. Dlatego po odpowiednio dobranym okresie postinkubacji (bez HU), komórki poddano ponownemu blokowaniu w roztworze HU, który tym razem przyczynił się do zsynchronizowania komórek w początkowym okresie fazy S.

Po przeprowadzeniu kilku testów uwzględniających różne stężenia i czasy inkubacji badania wykazały, że HU w stężeniu 2,5 mM bardzo skutecznie synchronizował komórki w przebiegu cyklu już w wyniku pierwszego blokowania, jednak był przyczyną powstania wyraźnych aberracji chromosomowych. Z kolei HU w stężeniu 1,25 mM przyniósł wysoki stopień synchronizacji po podwójnym blokowaniu komórek i nie przyczynił się do powstawania uszkodzeń w ciągłości chromosomów. Zatem do opracowania modelu wybrano niższe stężenie HU, który stosowano w dwóch inkubacjach (18 i 12 godz.) rozdzielonych okresem 6 godz. inkubacji bez HU.

Po uwolnieniu komórek z podwójnego bloku wywołanego 1,25 mM HU, w kolejnych godzinach postinkubacji określono indeksy znakowania komórek w fazie S (wzbogacone o indeksy wzorów znakowania określające etap replikacji), indeksy mitotyczne (wzbogacone w indeksy fazowe określające etap mitozy), określono również liczbę komórek w fazie G2 i G1.

### **Podsumowując:**

Uzyskano w ten sposób model eksperymentalny, w którym w kolejnych określonych godzinach postinkubacji dysponowano znaczną liczbą komórek znajdujących się w precyzyjnie określonych fazach cyklu komórkowego:

- 2 godz. postinkubacji – ponad 90% komórek w fazie S,
- 5 godz. postinkubacji – ponad 50% komórek kończy fazę S replikuje heterochromatynę,
- 7 godz. postinkubacji – ponad 70% komórek w fazie G2,

- 8 godz. postinkubacji – około 70% komórek w profazie,
- 10 godz. postinkubacji – około 85% komórek w mitozie,
- 11 godz. postinkubacji – ponad 70% komórek w fazie G1,
- 12 godz. postinkubacji – ponad 50% komórek rozpoczyna replikację.

Powyższy model posłużył do realizacji kolejnego etapu badań, którego celem była:

### **Analiza dynamiki przejść G1-S i G2-M w obecności OA - inhibitora fosfataz białkowych PP1/2A [2].**

Wykonano 5 układów eksperymentalnych, w których OA podano w kolejnych precyzyjnie wybranych etapach cyklu komórkowego.

W I serii eksperymentalnej, w której OA podano przed rozpoczęciem replikacji heterochromatyny nastąpiło znaczne obniżenie indeksu znakowania na skutek spadku liczby komórek replikujących heterochromatynę. W tym czasie pojawiły się również pierwsze komórki z profazową kondensacją chromosomów. Badania immunocytochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw ufosforylowanej formie treoniny ujawniły wysoki poziom fosforylacji białek w okolicy otoczki jądrowej, co mogło wskazywać na fosforylację i rozpad białek laminopodobnych.

W II serii eksperymentalnej, w której OA podano w czasie, gdy większość komórek rozpoczęła replikację heterochromatyny nie obserwowano blokady jej replikacji. Zaobserwowano natomiast znaczne skrócenie fazy G2 i około godzinę wcześniej rozpoczętą prawidłową mitozę. Wydarzenia te korespondowały ze wzrostem aktywności kinaz w stosunku do histonu H1, a więc kinaz cyklino-zależnych typu MPF. Jednak komórki najbardziej opóźnione w cyklu wykazywały nieprawidłowości w budowie chromosomów polegające na występowaniu silnie skondensowanych obszarów, wspólnych dla obydwu chromatyd. Prawdopodobnie były to komórki, które jako ostatnie wchodziły w replikację heterochromatyny, w czasie w którym w środowisku znajdował się OA. Weszły one w mitozę bez zreplikowanej heterochromatyny.

OA podany w III serii eksperymentalnej na początku fazy G2, podobnie jak w poprzednim przypadku znacznie ją zredukował, przyczyniając się do szybkiego rozpoczęcia mitozy. Natomiast komórki, które były najbardziej przodującymi w cyklu bez wyraźnie zaznaczonej fazy G1 rozpoczynały kolejną replikację.

OA podany w IV serii, gdy większość komórek była w drugiej połowie mitozy (po metafazie) wyraźnie skrócił fazę G1 i przyczynił się do szybkiego rozpoczęcia replikacji. Zaobserwowano wtedy wzrost aktywności kinazy w stosunku do histonu H1 oraz wzrost fosforylacji białka typu Rb, które w silnie ufosforylowanej postaci pojawiło się już w post-telofazowych komórkach. Komórki najbardziej opóźnione w mitozie, które podczas inkubacji

w OA mogły być w pierwszej połowie mitozy wykazywały obecność zmienionych silnie skondensowanych płytek metafazowych.

W V serii eksperymentalnej, w której OA został podany na początku fazy S nie obserwowano blokowania replikacji chromatyny.

**Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że:**

- a. Regulacja przejścia G1-S i G2-M u *V. faba* odbywa się przy udziale PP1/2A. Fosfatazy PP1/2A są odpowiedzialne za utrzymanie komórek w G1 i G2;
- b. Komórki pod wpływem OA rozpoczynają wcześniej fazę S i M, gdyż fazy G1 i G2 ulegają skróceniu na skutek wzmożonej aktywności kinaz typu SPF, MPF;
- c. Wcześniejsze rozpoczęcie replikacji wynika ze wzmożonej fosforylacji białka typu Rb;
- d. Blokowanie inicjacji replikacji heterochromatyny może mieć związek z dokonaną przez MPF fosforylacją i rozpadem białek laminopodobnych, stanowiących prawdopodobnie rusztowanie dla montażu aparatu replikacyjnego;
- e. Komórki wymagają blokady aktywności PP1/2A, aby wejść w mitozę, a następnie aktywacji PP1/2A podczas przejścia metafaza-anafaza, aby wyjść z mitozy.

**W związku z tym, że podczas prowadzenia wyżej opisanych badań, zmiany fosforylacji białka typu Rb w obrębie badanej domeny, w cyklu komórkowym kontrolnych merystemów roślin, nie były opisane w literaturze, celem jednocześnie prowadzonych badań była taka analiza [6].**

Specyficzność przeciwciał skierowanych przeciwko ufosforylowanej formie białka typu Rb wykazano metodą Western blot, która ujawniła obecność jednego prążka na wysokości około 72 kDa. Prążek nie ujawniał się w przypadku, gdy ekstrakt poddano wcześniej działaniu fosfatazy. Ponadto specyficzność została potwierdzona metodą immunocytochemiczną z zastosowaniem nieimmunizowanej surowicy w miejsce przeciwciał I-rzędowych.

Przeprowadzona analiza wykazała, że w komórkach merystemów kontrolnych białko typu Rb ulegało stopniowo fosforylacji na terenie jądra komórkowego, poczynając od etapu cytokinezy, poprzez fazę G1, S i G2 kolejnego podziału. W profazie obserwowano pozostałości immunopozytywnych ognisk widoczne pomiędzy kondensującymi chromosomami, a w kolejnych etapach mitozy do wczesnej telofazy włącznie, fosforylacja białka typu Rb w badanej domenie zanikała. Analiza obszaru jądra wybarwionego zarówno przeciwciałami anty Rb (Ser807/811) sprzęgniętymi z FITC, jak i DAPI wykazała, że ufosforylowane białko typu Rb lokalizowało się w okolicach występowania chromatyny luźnej.



**Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że:**

- a.** Białko typu Rb u roślin, podobnie jak w komórkach ssaków, ulega zależnej od fazy cyklu komórkowego fosforylacji (S807/811). Możliwość fosforylacji i defosforylacji aminokwasu w badanej domenie sugeruje możliwość wiązania się białka typu Rb z innym białkiem regulatorowym;
- b.** Ufosforylowane białko typu Rb zlokalizowane jest w jądrze w obszarach chromatyny zdekondensowanej, co sugeruje związek z transkrypcją genów, których produkty są niezbędne dla przejścia fazy S;
- c.** Mniejsza masa cząsteczkowa białka typu Rb, w stosunku do Rb ssaków może sugerować modyfikacje mające miejsce w toku ewolucji.

**Reasumując wszystkie otrzymane wyniki można stwierdzić, że:**

- I.** W komórkach głodzonych węglowodanowo, a następnie regenerowanych w sacharozie reakcje sensoryczne, związane z odpowiedzią komórki na pojawienie się sacharozy oraz reakcje związane z jej metabolizmem i rekonstrukcją polisacharydów są najsilniejsze w pierwszych etapach regeneracji, następnie stabilizują się na pewnym poziomie i nie przebiegają już tak intensywnie w ostatnim etapie, tuż przed wznowieniem aktywności replikacyjnej i mitotycznej. Są one kontrolowane lub sterowane za pośrednictwem serynowo/treoninowych kinaz białkowych i fosfataz PP1/2A.

Większa wrażliwość komórek merystemów korzeniowych na inhibitory kinaz i fosfataz białkowych podczas pierwszego etapu przejścia PCP1-S i PCP2-M związana jest przede wszystkim z ingerencją użytych inhibitorów w indukcję szlaku metabolicznego podanej komórkom sacharozy, ale również z ingerencją w okres jego nasilonej działalności. Komórki mimo obecności sacharozy w pożywce nie są w stanie (częściowo w przypadku działania 6-DMAP lub całkowicie w przypadku działania OA) wykorzystać jej w celu odbudowy zużytych zapasów skrobi w plastydach oraz produkcji polisacharydów do budowy ściany pierwotnej. Komórki mimo obecności cukru są więc nadal w stanie głodu węglowodanowego. Prawdopodobnym jest, że inhibitory podczas pierwszego etapu regeneracji mogły oddziaływać nie tylko na aktywność badanych białek poprzez ingerencję w szlak modyfikacji potranslacyjnych, ale również ingerować w szlak rozpoczynający się od ekspresji genów a prowadzący do produkcji białek.

Dużo słabsze hamowanie wznowienia aktywności replikacyjnej i mitotycznej wywołane inhibitorami w ostatnim etapie regeneracji jest wynikiem sprawnie rozpoczętej i w znacznym stopniu przeprowadzonej już odbudowy frakcji polisacharydów. A więc czas działania inhibitorów zbiega się z czasem wyciszania w komórkach szlaku wrażliwego na ich działanie [1, 4, 5, 7].

**II.** Komórki, w których główne punkty kontrolne nie uległy ekspresji znajdują się w innej, lepszej kondycji metabolicznej. W związku z brakiem ograniczeń odżywczych, nie są w nich uruchamiane dodatkowe, wrażliwe na stosowane inhibitory szlaki metaboliczne. Szlaki regulatorowe odpowiedzialne za przebieg cyklu komórkowego nie otrzymują więc z sieci kontroli metabolicznej negatywnych sygnałów ograniczających przebieg cyklu. Komórki znajdują się zatem w stanie gotowości do kontynuowania cyklu komórkowego. Zastosowany w tym przypadku OA oddziałuje bezpośrednio na mechanizmy odpowiedzialne za rozpoczęcie aktywności replikacyjnej i mitotycznej. Na tym etapie kontroli OA jest pozytywnym regulatorem cyklu przyspieszającym jego przebieg [2, 3, 6].

### **Literatura uzupełniająca.**

- [8] Bollen M, Beullens M. 2002. Signaling by protein phosphatases in the nucleus. *Trends in Cell Cycle* 12, 138-145.
- [9] Borgne A, Ostvold AC, Flament S, Meijer L. 1999. Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem* 274, 11977–11986.
- [10] Boruc J, Zhou X, Meier I. 2012. Dynamics of the plant nuclear envelope and nuclear pore. *Plant Physiol* 158, 78-86.
- [11] Cho YH, Yoo SD, Sheen J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase 1 complex in glucose signaling. *Cell* 127, 579-589.
- [12] Ciereszko I. 2006. Sucrose metabolism control in plants as response to changes of environmental conditions. *Kosmos* 55, 229-241.
- [13] Ciereszko I. 2009. Sucrose metabolism in plant tissues under stress conditions: key enzymes, localization and function. In: Maksymiec W, editor. *Compartmentation of Responses to Stresses in Higher Plants, True or False*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp193-218.
- [14] Ciereszko I, Kleczkowski LA. 2002. Effects of phosphate deficiency and sugars on expression of rab18 in *Arabidopsis*: hexokinase-dependent and okadaic acid-sensitive transduction of the sugar signal. *Biochim Biophys Acta* 1579, 43-9.
- [15] De Veylder L, Beeckman T, Beemster GTS, Krols L, Terras F, Landrieu I, Van Der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inzé D. 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1653–1668.
- [16] Doležel J, Číhalíková J, Weiserová J, Lucretti S. 1999. Cell cycle synchronization in plant root meristems. *Methods Cell Sci* 21, 95-107.
- [17] Doree M, Labbe JC, Picard A. 1989. M phase-promoting factor: its identification as the M phase-specific H1 histone kinase and its activation by dephosphorylation. *J Cell Sci Supplement* 12, 39-51.
- [18] Dutta A, Stillmann B. 1992. cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DANN replication factor, RPA, and activate DNA replication. *EMBO J* 11, 2189-2199.
- [19] Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & Development* 12, 2245-2262.
- [20] Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. 1999. Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl Environ Microbiol* 65, 1811-1812.



- [21] Fordham-Skelton AP, Skipsey M, Eveans IM, Edwards R, Gatehouse JA. 1999. Higher plant tyrosine-specific protein phosphatases (PTPs) contain novel amino-terminal domains: expression during embryogenesis. *Plant Mol Biol* 39, 593-605.
- [22] Francis D, Halford NG. 2006. Nutrient sensing in plant meristems. *Plant Mol Biol* 60, 981-993.
- [23] Gout E, Bligny R, Douce R, Boisson A-M, Rivasseau C. 2011. Early response of plant cell to carbon deprivation: *in vivo* 31P-NMR spectroscopy shows a quasi-instantaneous disruption on cytosolic sugars, phosphorylated intermediates of energy metabolism, phosphatase partitioning, and intracellular pHs. *New Phytologist* 189, 135-147.
- [24] Gupta AK, Kaur N. 2005. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci* 30, 761-776.
- [25] Heberle-Bors E. 2001. Cyclin-dependent protein kinases, mitogen-activated protein kinases and the plant cell cycle. *Current Sci* 80, 225-232.
- [26] Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer method. *Experientia* 36, 1014.
- [27] Jacobs T. 1992. Control of the cell cycle. *Develop Biol* 153, 1-15.
- [28] Joubès J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin JP. 2000. CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* 43, 607-620.
- [29] Khadaroo B, Robbens S, Ferraz C, Derelle E, Eychenie S, Cooke R, Peaucellier G, Delseny M, Demaille J, Van de Peer Y, Picard A, Moreau H. 2004. The First Green Lineage *cdc25* Dual-Specificity Phosphatase. *Cell Cycle* 3, 513-518.
- [30] Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 7, 235-46.
- [31] Landrieu I, da Costa M, De Veylder L, Dewitte F, Vandepoele K, Hassan S, Wieruszkeski J-M, Corellou F, Faure J-D, Van Montagu M, Inzé D, Lippens G. 2004. A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci USA* 101, 13380-13385.
- [32] Lendvai Á, Pettkó-Szandtner A, Csordás-Tóth É, Miskolczi P, Horváth GV, Györgyey J, Dudits D. 2007. Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot* 58, 1663-1675.
- [33] Lin Q, Li J, Smith RD, Walker JC. 1998. Molecular cloning and chromosomal mapping of type one serine/threonine protein phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 37, 471-481.
- [34] Luan S. 1998. Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. *Trends Plant Sci* 3, 271-275.
- [35] Menges M, Murray JAH. 2002. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J* 30, 203-212.
- [36] Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300, 332-336.
- [37] Polit J, Maszewski J. 2004. Protein phosphorylation during the transitions from G1 arrest point to S and G2 arrest point to M in *Vicia faba* root meristem. *Biol Plant* 48, 351-9.
- [38] Polit J, Maszewski J. 2005. Effect of OA – inhibitor of protein phosphatases PP1 and PP2A – on initiation of DNA replication and mitosis in *Vicia faba* root meristems. *Acta Physiol Plant* 27, 303-11.
- [39] Polit J, Maszewski J, Kaźmierczak A. 2003. Effect of BAP and IAA on the expression of G1 and G2 control points and the G1-S and G2-M transitions in root meristem cells of *Vicia faba*. *Cell Biol Int* 27, 559-66.

- [40] Quick W, Schaffer AA. 1996. Sucrose metabolism in sources and sinks. In: Zamski E, Schaffer AA. Eds. Photoassimilate Distribution in Plants and Crops. Sucrose-sink Relationship. Marcel Dekker Inc., New York, pp 115-156.
- [41] Renaudin, JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inze D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrell DA, Sundaresan V, Murray JA. 1996. Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* 32, 1003–1018.
- [42] Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol* 20, 4513-21.
- [43] Robbens S, Khadaroo B, Camasses A, Derelle E, Ferraz C, Inzé D, Van de Peer Y, Moreau H. 2005. Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in the Unicellular Green Alga *Ostreococcus tauri*. *Mol Biol Evolution* 22, 589-597.
- [44] Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Ann Rev Plant Biol* 57, 675-709.
- [45] Rose TL, Bonneau L, Der Ch, Marty-Mazars D, Marty F. 2006. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biol Cell* 98, 53-67.
- [46] Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Miklos GLG, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LSB, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJM, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Vossball LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Zhong F, Zhong W, Gibbs R, Venter JC, Adams MD, Lewis S. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204–2215.
- [47] Shen WH. 2002. The plant E2F-Rb pathway and epigenetic control. *Trends Plant Sci* 7, 505–511.
- [48] Soyano T, Nishihama R, Morikiyo K, Ishikawa M, Machida Y. 2003. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes & Develop* 17, 1055-1067.
- [49] Stals H, Inzé D. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci* 6, 359-364.
- [50] Suh MC, Cho HS, Kim YS, Liu JR, Lee H-S. 1998. Multiple genes encoding serine/threonine protein phosphatases and their differential expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 36, 315-322.
- [51] Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inze D. 2002. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 903–916.
- [52] Van't Hof J. 1985. Control points within the cell cycle. In: Bryant JA, Francis D, editor. *The Cell Division Cycle in Plants*. Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, pp 1-13.
- [53] Zhang K, Letham DS, John PC. 1996. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200, 2–12.
- [54] Zhou Y, Fowke LC, Wang H. 2002. Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Rep* 20, 967–975.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### Początki pracy naukowej do uzyskania tytułu magistra

Działalność naukową rozpoczęłam w ramach pracowni magisterskiej w 1993 roku, będąc studentką IV roku Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego. Badania wykonywane w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin pod kierunkiem prof. dr hab. Henryka Urbanka polegały na mikropropagacji roślin truskawki, aklimatyzacji ich do warunków *in vivo*, a następnie indukcji w nich reakcji obronnych.

Reakcje odpornościowe mogą być wywoływane u roślin poprzez traktowanie ich elicytorami np. kwasem salicylowym (SA). Egzogenne zastosowanie SA może uodpornić rośliny na infekcję wywołaną grzybami. Po potraktowaniu roślin truskawki zarodnikami *Botrytis cinerea* i 5 mM roztworem kwasu salicylowego (SA) badano zmiany zawartości rodników ponadtlenkowych i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Wykazano, że reakcje roślin na SA są szybsze i wyraźniejsze niż reakcje na działanie patogenem, a elicytacja roślin później zakażanych przyczynia się do osłabienia reakcji na zakażenie.

Badania zaowocowały pracą magisterską pt. „Wpływ kwasu salicylowego i zakażenia *Botrytis cinerea* na zawartość rodników ponadtlenkowych i aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w liściach truskawki *Fragaria ananasa* odmiany Dallas namnażanych techniką *in vitro*”, którą obroniłam 23 czerwca 1995 roku z wynikiem bardzo dobrym. Część wyników pracy magisterskiej dotycząca reakcji obronnych roślin została opublikowana w czasopiśmie naukowym *Acta Agrobotanica* (Polit i wsp. 1994; Zał. 3, pkt. A.I. 1.).

### Kontynuacja pracy naukowej do uzyskania stopnia doktora

Po uzyskaniu tytułu magistra zostałam przyjęta na Stacjonarne Studium Doktoranckie Fizjologiczno-Mikrobiologiczne przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, kierowane przez prof. dr hab. Marię Kwiatkowską. Jako doktorantka, rozpoczęłam badania w październiku 1995 roku w Katedrze Cytofizjologii pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Maszewskiego nad rolą kinaz i fosfataz białkowych w procesach regulacji cyklu komórkowego, w merystemach korzeni *Vicia faba* głodzonych węglowodanowo i regenerowanych w obecności sacharozy.

U organizmów eukariotycznych przechodzenie przez cykl komórkowy jest możliwe dzięki funkcjonowaniu punktów kontrolnych, które zapewniają ukończenie jednego etapu cyklu przed rozpoczęciem następnego. Kontrola taka gwarantuje, sukcesywny przebieg faz G1, S, G2 i M oraz zapewnia wierną replikację genomu i jego precyzyjny rozdział do dwóch komórek potomnych. Eksperymenty z izolowanymi, głodzonymi węglowodanowo korzeniami roślin wykazały, że komórki merystematyczne, które uprzednio dzieliły się asynchronicznie ulegają zablokowaniu w fazie G1 i G2.

Powtarzalność tego zjawiska stała się podstawą do sformułowania w 1972r. przez Van't Hof'a i Kovacs'a hipotezy o istnieniu głównych punktów kontrolnych (Principal Control Points, PCP). Pierwszy punkt kontrolny w fazie G1 określony został jako PCP1, a drugi w fazie G2 jako PCP2. Procesy fosforylacji i defosforylacji białek, katalizowane odpowiednio przez kinazy i fosfatazy białkowe są kluczowymi dla głównego mechanizmu, dzięki któremu przebieg cyklu komórkowego jest regulowany przede wszystkim w punktach kontrolnych.

Głodzone węglowodanowo merystemy korzeniowe *Vicia faba ssp. minor* zostały zaadoptowane jako system modelowy dla eksperymentów mających na celu określenie zależności pomiędzy przechodzeniem komórek z głównych punktów kontrolnych w kierunku fazy S i M (PCP1-S i PCP2-M), a procesami fosforylacji i defosforylacji, dokonywanymi przez kluczowe enzymy zaangażowane w przebieg cyklu.

#### Główne pytania postawione w pracy były następujące:

- ✓ Jak komórki merystematyczne *V. faba* aktywują swoje główne punkty kontrolne działające w fazie G1 (PCP1) i G2 (PCP2) w odciętych, głodzonych węglowodanowo korzeniach? Jakie zmiany w kondensacji chromatyny jądrowej są związane z ekspresją PCP1 i PCP2? Jaka jest zawartość kluczowego białka cyklu komórkowego (p34<sup>cdc2</sup>) w komórkach zablokowanych w fazie G1 i G2?
- ✓ Jaki okres czasu jest potrzebny, aby komórki zablokowane w PCP1 weszły w fazę S, a te zablokowane w PCP2 weszły w mitozę, w izolowanych merystemach korzeniowych po dodaniu do pożywki egzogennej sacharozy?
- ✓ Jak pulsowe inkubacje z 6-dimetyloaminopuryną (6-DMAP, inhibitorem serynowo/tryptofanowych kinaz białkowych) i kwasem okadejowym (OA, inhibitorem fosfataz białkowych 1 i 2A) wpływają na przebieg drogi PCP1 - S i PCP2 - M?
- ✓ Jak fitohormony, 6-benzyloaminopuryna (BAP) i kwas indolilooctowy (IAA) modyfikują tempo przechodzenia PCP1-S i PCP2-M.

#### Blokowanie komórek w głównych punktach kontrolnych.

Zgodnie z hipotezą głównych punktów kontrolnych, populacja komórek merystematycznych w izolowanych korzeniach *V. faba* ulegała blokowaniu w fazie G1 (PCP1) lub w fazie G2 (PCP2). Brak zarówno komórek mitotycznych, jak i włączających <sup>3</sup>H-tymidynę sugeruje, że głodzenie węglowodanowe merystemów korzeniowych powoduje całkowite zaprzestanie proliferacji komórek i jest przyczyną powstania merystemów stacjonarnych. Proporcję komórek zablokowanych w G1 : G2 oszacowano na 1,5 : 1.

Niezależnie od fazy cyklu komórkowego (G1 lub G2) w głodzonych węglowodanowo komórkach izolowanych merystemów korzeniowych, liniowe profile gęstości optycznej jąder, wybarwionych w reakcji Feulgena, odzwierciedlały znacznie wyższy stopień zagęszczenia chromatyny, w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Podjmując półilościowe pomiary wyznakowania komórek przeciwciałami skierowanymi przeciwko motywowi PSTAIRE (p34<sup>cdc2</sup>), i sprzęgniętymi z fluoresceiną (FITC) stwierdzono brak wyraźnych różnic w intensywności fluorescencji, zarówno pomiędzy komórkami w G1 i G2, jak i pomiędzy komórkami kontrolnymi i głodzonymi węglowodanowo, zablokowanymi w obydwu punktach kontrolnych.

#### Wyjście komórek z PCP: wznowienie aktywności replikacyjnej i mitotycznej

Komórki zatrzymane w fazie G1 i G2 po dostarczeniu egzogennej sacharozy (2%), były uwalniane z PCP1 i PCP2. Wznowienie aktywności replikacyjnej i mitotycznej nie było jednak natychmiastowe. Mijał okres około 12 godz., zanim pojawiły się pierwsze komórki włączające <sup>3</sup>H-tymidynę oraz komórki mitotyczne.

Dostarczenie 2% sacharozy powodowało również stopniową dekondensację chromatyny w jądrach komórek zatrzymanych w fazach G1 i G2. Istniała pewna zasadnicza różnica między dynamiką dyspersji chromatyny towarzyszącej przejściu PCP1-S i PCP2-M. Ilościowe pomiary zagęszczenia chromatyny w czasie przechodzenia w kierunku fazy S wykazały krótki okres zwiększonej kondensacji chromatyny (w 12-tej godz. regeneracji), a następnie jej dekondensację prowadzącą do wejścia w replikację DNA.

#### Wyjście komórek z PCP w obecności inhibitorów: 6-DMAP i OA

Podczas okresu jaki upłynął od podania komórkom sacharozy, do momentu pojawienia się pierwszych komórek replikujących i mitotycznych wykonano cztery, 3-godz. inkubacje z 6-DMAP (3 mM) lub OA (1 μM). Wywołane zmiany w długości okresów potrzebnych dla przebycia drogi PCP1-S i PCP2-M określano na podstawie analizy indeksów znakowania komórek replikujących i indeksów mitotycznych w kolejnych godzinach postinkubacji.

Badania ujawniły zarówno, zmiany w długości przejścia PCP1-S jak i PCP2-M w zależności od przedziału czasowego, w którym merystemy korzeniowe były traktowane inhibitorami. Zarówno rozpoczęcie replikacji DNA jak i mitozy zostało najsilniej odsunięte w czasie wtedy, gdy traktowanie inhibitorami zbiegło się z początkowymi okresami odżywiania komórek w sacharozie, wskazując na skomplikowane role odgrywane przez kinazy i fosfatazy białkowe w tych etapach. W 3-godzinnym okresie, bezpośrednio poprzedzającym wznowienie replikacji i mitozy w komórkach kontrolnych zaobserwowano najsłabsze oddziaływanie obydwu inhibitorów. Ponadto komórki wykazywały większą wrażliwość na działanie OA niż 6-DMAP.

Łącznie, uzyskane wyniki sugerują, że procesy leżące u podstaw przejścia PCP1-S i PCP2-M obejmują specyficzne sekwencje reakcji fosforylacji i defosforylacji białek, co objawia się odmienną, zależną od czasu odpowiedzią na inhibitory kinaz i fosfataz białkowych.

### Wpływ BAP i IAA na indukcję replikacji i mitozy.

BAP i IAA obecne w pożywce regeneracyjnej z sacharozą wywołały przeciwstawne efekty. Ciągła inkubacja izolowanych korzeni w obecności BAP (0,56  $\mu\text{M}$ ) przyspieszała wznowienie aktywności replikacyjnej i mitotycznej, podczas gdy ciągła inkubacja w obecności IAA (5,4  $\mu\text{M}$ ) stała się przyczyną znacznego opóźnienia obydwu procesów.

Stwierdzono zatem, że komórki roślin integrują informację hormonalną nie tylko w punkcie kontrolnym w fazie G2, wtedy gdy obserwuje się wzrost endogennych hormonów w komórkach kontrolnych, ale również w punkcie kontrolnym w fazie G1. Główne punkty kontrolne cyklu komórkowego pełnić mogą więc rolę integratorów układu enzymatycznego odpowiedzialnego za fosforylacje i defosforylacje białek, z hormonalnym układem sygnalizacyjnym.

Po przeprowadzeniu przeze mnie znacznej części wyżej opisanych badań Rada Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi otworzyła przewód doktorski w dniu 27 maja 1997 roku, a projekt badawczy obejmujący wspomnianą tematykę zgłoszony w 1998 r. do Komitetu Badań Naukowych został zakwalifikowany do finansowania jako „grant promotorski” (**KBN nr 6P04C 025 16**). Realizując badania przewidziane w ramach doktoratu wdrożyłam nie stosowaną w danym czasie w Katedrze Cytofizjologii metodę immunocytochemicznej identyfikacji komórek replikujących i potranslacyjnych modyfikacji białek enzymatycznych. Uzyskane w trakcie wykonywania pracy wyniki prezentowałam w formie 4 komunikatów zjazdowych (**Zał. 3, pkt. B.I. 1-4.**) na 3 konferencjach (2 krajowych i 1 międzynarodowej; **Zał. 4, pkt. I.F.**).

W trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej powstały jednocześnie dwie publikacje: współautorska praca przeglądowa, w której opublikowano fragmenty wstępu (**Maszewski i Polit 1998; Zał. 3, pkt. A.I. 5.**) oraz samodzielna praca, w której opublikowano jeden z rozdziałów wyników dotyczący zawartości białka p34<sup>cdc2</sup> w komórkach głodzonych węglowodanowo (**Polit 1999; Zał. 3, pkt. A.I. 4.**).

Obrona rozprawy doktorskiej pt.: „Wpływ inhibitorów kinaz i fosfataz białkowych na inicjację replikacji DNA i mitozy w merystemach korzeni *Vicia faba subsp. minor.*”, odbyła się 18 stycznia 2000 roku. Komisja Fizjologiczno-Mikrobiologiczna ds. przewodów doktorskich Rady Wydziału BNZ jednomyślnie przyjęła wniosek obydwu Recenzentów o wyróżnienie mojej rozprawy doktorskiej. Stopień doktora nauk biologicznych został zatwierdzony 25 stycznia 2000 roku, a w 2003r. otrzymałam indywidualną nagrodę JM Rektora UŁ za cykl opublikowanych artykułów naukowych związanych z tematyką rozprawy doktorskiej.

W czasie II i III roku studiów doktoranckich równolegle z wykonywaniem zadań w ramach pracy doktorskiej prof. dr hab. Janusz Maszewski zaproponował mi współudział w realizacji końcowych etapów realizowanego przez Niego projektu badawczego pt.: „Aktywność biologiczna, funkcje morfogenetyczne i mechanizm działania plemniowego czynnika kondensacji chromatyny” (**KBN; PB 0267/P2/94/06**). Doświadczenia, w których

uczestniczyłam, prowadzone były zarówno z wykorzystaniem materiału roślinnego, jak też ludzkich komórek nowotworowych hodowanych *in vitro*, a ich cele znacznie odbiegały od głównego nurtu moich badań. Prace te zaowocowały dwoma publikacjami (**Maszewski i wsp. 1998, 1999; Zał. 3, pkt. A.I. 2-3.**). Uczestnictwo w realizacji powyższych badań oraz współautorstwo w artykułach dotyczących „Morfogenetycznych funkcji i mechanizmów działania nisko-cząsteczkowego czynnika kondensacji chromatyny, izolowanego z anterydiostanów *Chara tomentosa*” wyróżnione zostało w 1999r. zespołową nagrodą naukową JM Rektora UŁ, przyznaną za cykl publikacji.

Od 1997 do 1999 roku brałam również udział w realizacji corocznych projektów finansowanych z funduszu Uniwersytetu Łódzkiego na realizację badań własnych i statutowych (**Zał. 4, pkt. I.A.**). W kwietniu 1999r. będąc jeszcze doktorantką zostałam zatrudniona w Katedrze Cytofizjologii UŁ na stanowisku starszego referenta w wymiarze ½ etatu, a w październiku 1999r. uzyskałam etat asystenta, finansowany z grantu **KBN nr 6PO4C 026 17** (tytuł projektu badawczego: „Rola fosforylacji i defosforylacji białek w regulacji cyklu komórkowego i endoreduplikacji DNA u roślin”), w którym byłam głównym wykonawcą.

### **Kontynuacja pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora**

Po przeprowadzeniu postępowania konkursowego, od 1 marca 2000 roku, zostałam zatrudniona w Katedrze Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego na stanowisku adiunkta. Początkowo, w latach 2000 – 2002, kontynuowałam pracę naukową pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Maszewskiego współrealizując zadania przewidziane w harmonogramie powyżej wspomnianego projektu badawczego. Badania dotyczyły między innymi wpływu inhibitorów kinaz cyklicznych CDK (2-aminopuryny, olomoucyny, 6-dimetyloaminopuryny i staurosporyny) oraz inhibitora fosfataz białkowych typu cdc25 (wanadanu sodu) na proces endoreduplikacji w różnicujących się komórkach korzeni zarodkowych *Pisum sativum*.

Wykorzystując metody cytofotometrycznego pomiaru zawartości jądrowego DNA oraz metody autoradiograficznego znakowania komórek replikujących <sup>3</sup>H-tymidyną wykazano, że co najmniej jedna dodatkowa runda replikacji DNA występuje w komórkach traktowanych inhibitorami. Ponadto skutki wywołane przez łączne zastosowanie staurosporyny i wanadanu sodu okazały się znacznie silniejsze, niż te wywołane przez każdy z inhibitorów oddzielnie. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że zaangażowanie się komórek w proces endoreduplikacji DNA może pojawić się nie tylko w konsekwencji bezpośredniego hamowania aktywności CDK, ale także pośrednio poprzez obniżenie aktywności fosfatazy białkowej typu cdc25 - enzymu niezbędnego, do przełączenia kompleksu CDK/cykлина B w stan aktywny.

Poprzez mikrospektrofotometryczną analizę profili jąder wybarwionych metodą Feulgena, ujawniono w komórkach endopoliploidalnych specyficzne, zależne od

fosforylacji zmiany w kondensacji chromatyny, co sugeruje, że nabycie pewnego krytycznego poziomu kondensacji stanowi warunek wstępny dla dodatkowych rund syntezy DNA u roślin.

Ponadto w ramach projektu analizowano odpowiedź wewnętrznych punktów kontrolnych fazy S na hamowanie replikacji DNA (wywołane działaniem hydroksymocznika - HU), w merystemach korzeni *Pisum sativum* i *Vicia faba*. Uzyskane wyniki sugerują, że molekularny sygnał, który aktywuje mechanizmy umożliwiające komórkom przełamanie S-M zależnego systemu kontroli i wywołuje przedwczesną kondensację chromosomów (PCC) może być generowany przez kofeinę (CF) oraz szereg alternatywnych, wcześniej stosowanych związków, będących zarówno inhibitorami kinaz, jak i fosfataz białkowych (benzyl-6-aminopurynę, 2-aminopurynę, 6-dimetyloaminopurynę, wanadan sodu). Wiele nieprawidłowych podziałów mitotycznych, odbywających się w komórkach z zahamowaną syntezą DNA, charakteryzowało się pęknięciami i ubytkami w ciągłości chromatyd, pogubieniami chromosomów, występowaniem mostków chromosomowych oraz mikrojąder.

Wykazana badaniami zdolność kofeiny do tłumienia mechanizmu zapobiegającego rozpoczęciu mitozy w komórkach merystemów korzeni traktowanych HU u obydwu gatunków zdecydowanie potwierdza tezę, że rozbudowane aspekty regulacyjne cyklu komórkowego są porównywalnie konserwatywne u drożdży, zwierząt i roślin.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie komunikatów zjazdowych (**Zał. 3, pkt. B.II. 1, 7.**) na dwóch konferencjach krajowych oraz opublikowane w trzech pracach eksperymentalnych (**Rosiak i wsp. 2002a, b; Rybaczek i wsp. 2002; Zał.3, pkt. A.II.2-4.**).

Podczas realizacji badań związanych z wyżej omówionym projektem badawczym podjęłam również badania samodzielne, które miały składać się na cykl monotematycznych prac stanowiących treść rozprawy habilitacyjnej. Opierając się na zweryfikowanej eksperymentalnie koncepcji głównych punktów kontrolnych (PCP1 i PCP2), skoncentrowałam swoje zadania eksperymentalne na zależnościach między metabolizmem węglowodanowym (głównie rolą sacharozy i glukozy jako cząsteczek sygnałowych), a mechanizmami fosforylacji i defosforylacji białek enzymatycznych, które odpowiedzialne są za kontrolę przejść G1-S i G2-M. Cele badawcze, jakie wyznaczyłam swojej pracy naukowej, integrowały istotne problemy współczesnej biologii komórki umiejscowione na styku fizjologii roślin, cytogenetyki oraz biochemii czynników regulacyjnych cyklu komórkowego.

W latach 2005-2008, badania własne nad ultrastrukturą, poziomem frakcji cukrowych oraz aktywnością kinaz białkowych w komórkach zablokowanych głodzeniem węglowodanowym, finansowane były z funduszu Uniwersytetu Łódzkiego na realizację prac habilitacyjnych. Były to cztery indywidualne kierowane przeze mnie projekty (**Zał. 4, pkt. I.A. 8.**) Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie 9 komunikatów zjazdowych (**Zał. 3, pkt. B.II. 2-3, 5, 9-12, 14, 17.**) na 5 konferencjach (4 krajowych i 1 międzynarodowej).



Część uzyskanych wyników została opublikowana w 2007r. w renomowanym czasopiśmie naukowym - *Journal of Experimental Botany* (**Polit i Kaźmierczak 2007; Zał. 3, pkt. A.II. 19.**). Pojawiające się w trakcie realizacji celów pracy habilitacyjnej problemy techniczne (metodyczne) rozwiązywałam nawiązując kontakty i współprace ze specjalistami w danej dziedzinie, zarówno w rodzimym ośrodku badawczym, jak i innych placówkach naukowych. Wyrazem tego typu współpracy jest pięć prac współautorskich (**Polit i wsp. 2004; Polit i Kaźmierczak 2007; Polit i Ciereszko 2009, 2012; Polit i wsp. 2012; Zał. 3, pkt. A.II. 18, 19, 22-24.**). Podsumowaniem moich badań prowadzonych w ramach pracy habilitacyjnej była prezentacja zarówno koncepcji pracy jak i uzyskanych wyników na posiedzeniu Rady Instytutu Fizjologii, Cytologii i Cytogenetyki UŁ w dniu 15 maja 2012 roku. Tezy prezentowanej pracy zostały jednomyślnie przyjęte przez Radę Instytutu w głosowaniu jawnym, co upoważniło mnie do ubiegania się o wszczęcie procedury habilitacyjnej.

W 2006r. odbyłam szkolenie w zakresie pracy z lumenometrem, organizowane przez firmę Symbios ze Straszyna, a następnie ukończyłam kurs „Podstawy hodowli komórek zwierzęcych i ludzkich” organizowany przez Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie (**Zał. 4, pkt. I.C.**). Realizując samodzielne badania łącznie wdrożyłam siedem nie stosowanych wcześniej w Katedrze Cytofizjologii metod badawczych (metodę określania aktywności kinaz białkowych jak również aktywności proteasomów z użyciem luminometru, metodę identyfikacji aktywności enzymów hydrolizy sacharozy *in situ*, metodę identyfikacji zawartości glukozy i sacharozy *in situ*, metodę mikroautoradiografii, metodę elektroforetycznego rozdziału białek oraz metodę Western blot), którymi obecnie posługują się inni pracownicy Katedry.

W 2008r. włączyłam się w dwa nurty badań prowadzone w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Marię Kwiatkowską. Pierwszy z nich dotyczył spermiogenezy u glonu *Chara vulgaris*. Powierzone mi zadanie polegało na wykonaniu analiz z zastosowaniem metody Western blot (**Popłońska i wsp. 2009; Zał. 3, pkt. A.II. 8.**).

Badania ujawniły między innymi, że podczas spermiogenezy u *Chara*, retikulum endoplazmatyczne jest miejscem syntezy białek protamino-podobnych, które następnie transportowane są do jądra poprzez kanały ER związane z otoczką jądrową w celu zastąpienia białek histonowych. W pracy opublikowanej w 2009r. postawiono też śmiałą hipotezę zakładającą, że wewnętrzna membrana otoczki jądrowej ulega inwaginacji do jądra razem z protamino-podobnymi białkami, które następnie oddzielane są od niej aby dostać się do chromatyny.

Drugi kierunek badań był znacznie bardziej obszerny i jest nadal realizowany w ramach Sieci Mechanizmy Ruchów Komórkowych MOBILITAS oraz zadań projektu badawczego (MNiSW nr N N303 359035, pt. „Rola kul lipidowych i mikrotubul w syntezie lipidów”) w którym jestem jednym z głównych wykonawców. Obiektem prowadzonych badań są

lipotubuloidy – struktury, którym nazwę nadała prof. dr hab. Maria Kwiatkowska, a które u wielu gatunków roślin zostały błędnie nazwane elajoplastami.

Elajoplasty są plastydami produkującymi tłuszcz otoczonymi podwójną dwuwarstwą fosfolipidową. Lipotubuloidy natomiast, jak wykazała prof. dr hab. Maria Kwiatkowska w badaniach ultrastrukturalnych epidermy *Ornitogalum umbellatum*, są domenami cytoplazmy, które nie są otoczone własną błoną lecz tonoplastem, gdyż wpuklają się w głąb wakuoli. Są wypełnione osmofilnymi granulami (zidentyfikowanymi jako lipid bodies), otoczonymi monosłojem fosfolipidowym, pomiędzy którymi występuje system krzyżujących się ze sobą i biegnących w różnych kierunkach mikrotubul. Oprócz lipid bodies i mikrotubul w domenie tej występują liczne rybosomy, cysterny i pęcherzyki ER oraz pojedyncze mitochondria, mikrociała, struktury Golgiego, a w późniejszych stadiach rozwoju również wakuole autolityczne (**Kwiatkowska i wsp. 2012; Zał. 3, pkt. A.II. 16.**).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że struktury wcześniej obserwowane i opisane u *Haemanthus albiflos*, *Vanilla planifolia*, *Funkia Sieboldiana* i *Althaea rosea* nie są elajoplastami, lecz lipotubuloidami. Posiadają one w porównaniu z lipotubuloidami *O. umbellatum* mniej trwałe mikrotubule, co przysparzało problemów w ich utrwalaniu. Ostatecznie jednak opracowano procedury ich identyfikacji w mikroskopie elektronowym (**Kwiatkowska i wsp. 2010, 2011; Zał. 3, pkt. A.II. 9, 11-12.**). Na modelu lipotubuloidów *O. umbellatum* wykazano, że lipid bodies powstają przy udziale retikulum endoplazmatycznego w wyniku akumulacji lipidów w dwuwarstwie fosfolipidowej. Tworzące się lipid bodies pojawiają się najpierw w postaci szczeliny, a następnie soczewkowatej osmofilnej struktury, która powiększa się. Dojrzałe lipid bodies nie są związane z ER bezpośrednio, lecz za pośrednictwem mikrotubul, które jednym końcem łączą się z ER a drugim z lipid bodies (**Kwiatkowska i wsp. 2012; Zał. 3, pkt. A.II. 14.**). Badania z zastosowaniem techniki immunogold ujawniły, że enzymy DGAT1 i DGAT2 (diacylglicerol acyltransferazy 1 i 2) występują w specyficznych regionach ER i są syntetyzowane na rybosomach związanych z ER, a następnie znajdują się w zewnętrznej strefie dojrzałych lipid bodies (**Kwiatkowska i wsp. 2011; Zał. 3, pkt. A.II. 13.**). W komórkach roślinnych nie wykazano dotychczas obecności DGAT w lipid bodies metodą immunogold. Istnieje więc możliwość zachodzenia w dojrzałych lipid bodies ostatniego etapu syntezy lipidów – przekształcenia DAG (diacyloglicerolu) w TAG (triacyloglicerol). W przypadku lipotubuloidów *O. umbellatum* bezpośrednim dowodem świadczącym o tym, że synteza lipidów rzeczywiście zachodzi w zewnętrznej strefie dojrzałych lipid bodies, są wyniki badań autoradiograficznych z zastosowaniem <sup>3</sup>H-kwasu palmitynowego na poziomie ultrastrukturalnym. Ostatnie badania wykazały, że blisko powierzchni lipid bodies znajduje się również lipaza (**Kwiatkowska i wsp. 2011; Zał. 3, pkt. A.II. 13.**). Efektem działania lipazy jest przypuszczalnie zanikanie wybiórczego wyznakowania lipotubuloidów inkubowanych w <sup>3</sup>H-kwasie palmitynowym, które następnie poddano

postinkubacji w środowisku nieradioaktywnym. Dojrzałe lipid bodies dzięki utrzymywaniu równowagi dynamicznej między syntezą tłuszczów i lipolizą zachowują, mimo aktywnej syntezy lipidów, w przybliżeniu stałe rozmiary podczas rozwoju zalążni, zwiększa się natomiast ich liczba w lipotubuloidach, których rozmiary znacznie się powiększają. Wynika z tego, że brak wzrostu objętości lipid bodies nie może stanowić jednoznacznego dowodu niezachodzenia w nich syntezy lipidów.

Jak ujawniła już wcześniej prof. dr hab. Maria Kwiatkowska lipotubuloidy wykazują bardzo dynamiczny ruch rotacyjny i postępowy. Ruch postępowy zależny jest od cyklozy, zamiera on po zablokowaniu ruchu cytoplazmy. Ruch rotacyjny jest autonomiczny wywoływany działalnością mikrotubul występujących w lipotubuloidzie. Podjęto więc próbę określenia, czy dynamiczne mikrotubule uczestniczą w syntezie lipidów. Badania ujawniły, że po krótkiej inkubacji z  $^3\text{H}$ -kwasem palmitynowym najpierw znakują się mikrotubule, a dopiero po pewnym czasie lipid bodies. Podobną kolejność znakowania wykazały badania z zastosowaniem techniki immunogold, która ujawniła migrację DGAT1/2 i fosfolipazy D. Mikrotubule wychwytyją więc prekursorzy lipidów oraz enzymy i transmitują je do miejsca inkorporacji. Hipoteza została potwierdzona badaniami z zastosowaniem propyzamidu, indukującego rozpad mikrotubul, który zablokował syntezę nowych lipidów, przejawiającą się zahamowaniem włączania  $^3\text{H}$ -kwasu palmitynowego do lipotubuloidów. W końcowych stadiach rozwoju lipotubuloidów, przed ich rozpadem na pojedyncze lipid bodies, poprzedzonym zanikiem mikrotubul, pojawiają się w nich wakuole autolityczne. Badania z zastosowaniem reakcji immunogold ujawniły w nich obecność lipazy (Kwiatkowska i wsp. 2012; Zał. 3, pkt. A.II. 14).

Ostatnio uwaga zespołu badawczego koncentruje się na związku lipotubuloidów z syntezą kutikuli. Wiadomo, że kutikula jest produkowana przez komórki epidermy, które przeznaczają na ten cel większość zawartych w nich metabolitów. Celem naszych dociekań jest odpowiedź na pytanie, czy przemiany lipidów zawartych w lipotubuloidach, w składniki kutikuli dokonują się na terenie lipotubuloidów, czy w innych miejscach komórki, a tłuszcze lipotubuloidów stanowią jedynie materiał budulcowy.

Uzyskane wyniki badań, w których uczestniczyłam, zaprezentowane zostały w formie komunikatów zjazdowych (Zał. 3, pkt. B.II. 13, 16, 18.) na 3 konferencjach (1 krajowej i 2 międzynarodowych) oraz zawarte zostały w 7 pracach już opublikowanych (Zał. 3, pkt. A.II. 9, 11, 12-14, 17-17.) i 2 wysłanych do druku. Badania dotyczące syntezy kutikuli prowadzone są we współpracy z zespołem Profesora Antonio Heredia z Uniwersytetu w Maladze w Hiszpanii a wspólnie przygotowana praca została już wysłana do druku. Obecnie wraz z Zespołem prof. dr hab. Marii Kwiatkowskiej oczekujemy na rozstrzygnięcie konkursu, na który został zgłoszony kolejny projekt grantu pt. "Lipotubuloids – structure and function in synthesis of lipids and formation of cuticle on aerial epidermis".

W 2008r. podjęłam również współpracę z JM Rektorem Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, prof. dr hab. Grzegorzem Skrzypczakiem z Katedry Agronomii Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii w Poznaniu koncentrującą się wokół problemów związanych z wpływem nowej klasy herbicydów (herbicydów w postaci cieczy jonowych) na kiełkowanie i wzrost roślin (**Zał. 4, pkt. I.E.**). W szeroko zakrojony projekt badawczy zaangażowane są również dwa inne ośrodki badawcze: Instytut Ochrony Roślin-PIB w Poznaniu reprezentowany przez prof. dr hab. Tadeusza Praczyka oraz Wydział Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej reprezentowany przez prof. dr hab. Juliusza Pernaka. W wyniku wspólnie przeprowadzonych badań powstała praca eksperymentalna "Inhibition of germination and early growth of rape seed (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) by herbicidal ionic liquids with MCPA in anion" obecnie wysłana do druku.

Nowatorskie w tego typu badaniach było zarówno użycie środków chwastobójczych w postaci cieczy jonowych (HILs), jak i analiza ich aktywności w komórkach roślin. Specyficzny mechanizm działania HILs nie jest znany. Celem badań było więc określenie wpływu nowych formułacji HILs na kiełkowanie i rozwój siewek rzepaku. W bieżącej literaturze nie ma podobnych badań. W pracy opisano syntezę HILs, ich fizykochemiczne właściwości, jak również biologiczną aktywność. Po raz pierwszy również porównano wpływ HILs oraz tradycyjnej auksyny syntetycznej, takiej jak kwas fenoksykarboksylowy (MCPA) na kiełkowanie nasion i rozwój korzeni zarodkowych.

Nasze wyniki są istotne dla obszaru ochrony roślin. Potencjał cieczy jonowych, które spełniają wymagania ochrony środowiska naturalnego jest niezwykle. Na całym świecie, wzrasta świadomość wpływu sztucznych substancji chemicznych na środowisko, co w konsekwencji przyczynia się do zaostrzania przepisów i wprowadzania ograniczeń. Świadome projektowanie substancji chemicznych mające na uwadze ich strukturę i aktywność stanowi niezbędne narzędzie dostarczające bezpieczniejszych preparatów o zwiększonej wydajności technicznej. Nasze badania pozwolą na wprowadzenie innowacyjnych połączeń herbicydów, w celu sprostania, pojawiającym się przed rolnikami, wyzwaniom kontroli zwalczania chwastów.

Podczas realizacji zarówno moich indywidualnych badań, jak również badań w zespole prof. dr hab. Marii Kwiatkowskiej i prof. dr hab. Grzegorza Skrzypczaka od 2010 roku zostałam włączona jako główny wykonawca w prace prowadzone w zespole prof. dr hab. Janusza Maszewskiego w ramach projektu badawczego **MNiSW nr N N303 503038** pt. „Asynchroniczność przejścia G2-M w warunkach stresu replikacyjnego. Spolaryzowany przebieg kondensacji chromatyny w komórkach korzeni *Allium cepa*”. Projekt poświęcony jest badaniom przyczyn asynchronicznego przechodzenia komórek poliploidalnych przez etapy cyklu komórkowego.

Badania wykazały, że przemienne inkubacje korzeni *Allium cepa* w roztworach hydroksymocznika (HU – inhibitora reduktazy rybonukleotydowej odpowiedzialnej za zapewnienie puli trifosforanów nukleozydów podczas syntezy DNA) i kofeiny

(inhibitora tworzenia fragmoplastu), prowadzą do powstania poliploidalnych, bardzo dużych i silnie wydłużonych komórek wielojądrowych lub komórek jednojądrowych ze zwielokrotnioną liczbą chromosomów. W komórkach tych pojawiają się nietypowe obrazy podziałów mitotycznych charakteryzujące się asynchronicnością występującą pomiędzy jądrami oraz nieznanym typem międzychromosomowej asynchronicności, obserwowanym podczas przejścia z metafazy do anafazy. Za tego typu zjawisko odpowiedzialny jest prawdopodobnie nierównomierny dostęp chromatyny jądrowej do endogennych induktorów mitozy znajdujących się w cytoplazmie. Jądra zlokalizowane na przeciwległych biegunach wydłużonych komórek mają kontakt z większą powierzchnią cytoplazmy i szybciej inicjują mitozę niż te, które znajdują się w centralnym obszarze komórki. Inny rodzaj asynchronicności, który nie może wyłącznie zależeć od zwiększonej długości komórek, zaobserwowano po długotrwałej inkubacji korzeni w HU. Taki rodzaj inkubacji ujawnił zarówno jądra komórkowe wchodzące przedwcześnie w mitozę jak również, po raz pierwszy, niespotykaną wcześniej formę nieprawidłowości mitotycznej manifestującą się gradientową kondensacją chromatyny od interfazy do prometafazy w obrębie jednego jądra, a nawet jednego chromosomu. Proces stopniowej przebudowy chromatyny, dokonującej się podczas kolejnych etapów transformacji interfaza-mitoza w obszarze pojedynczego jądra komórkowego, tworzy model badawczy o wyjątkowym potencjale poznawczym.

Głównymi celami projektu jest znalezienie odpowiedzi na pytania:

- 1) Jak – na poziomie organizacji strukturalnej i funkcjonalnej – przebiega stopniowa przebudowa chromatyny (jądra komórkowego) podczas kolejnych stadiów transformacji interfaza-mitoza?
- 2) Które spośród głównych czynników cyklu komórkowego tworzą, skorelowane ze zmianami struktury, gradienty różnicujące molekularne środowisko cytoplazmy i chromatyny?
- 3) Czy, i w jakim stopniu topologiczna specyfika organizacji wierzchołkowej strefy korzenia i spolaryzowane oddziaływania morfogenetyczne endogennych fitohormonów wywierają wpływ na indukcję asynchronicznej transformacji interfaza-mitoza?

W pierwszym etapie badań wykonano immunocytochemiczne analizy z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko cyklinie B – białku które tworząc kompleks z kinazami typu CDK uczestniczy w promowaniu mitozy. Półilościowe pomiary intensywności fluorescencji w komórkach kontrolnych wykazały, że poziom białek typu cyklina B osiąga najwyższą wartość poczynając od fazy G2 do metafazy, a następnie ulega redukcji podczas następnych etapów mitozy. Po długotrwałej inkubacji korzeni w niskich dawkach HU poziom białek typu cyklina B znacznie wzrasta, a znaczna liczba wydłużonych komórek wykazuje gradient tych białek rozprzestrzeniający się wzdłuż kolejnych regionów wokółjądrowej cytoplazmy. Sugeruje się, że może istnieć bezpośredni związek pomiędzy skutkami spowolnienia faz S i G2, wywołanymi HU, a podwyższonym stężeniem białka typu cyklina B. W konsekwencji aktywacja kompleksów cyklina B-CDK prowadzi do nieprawidłowego

wzoru przedwczesnej kondensacji chromosomów z dwufazową strukturą jądra mającego jedną część chromatyny zdekondensowaną, a drugą skondensowaną. Ponadto wykonano immunocytochemiczne badania komórek wielojądrowych z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko  $\beta$ -tubulinie. Wykazały one poważne zaburzenia układu mikrotubul formujących wiązkę preprofazową w badanych komórkach.

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań zostały zaprezentowane w formie komunikatu (**Zal. 3, pkt. B.II. 15.**) na międzynarodowej konferencji w Pradze oraz opublikowane w artykule eksperymentalnym (**Żabka i wsp. 2010; Zal. 3, pkt. A.II. 10.**), a kolejne badania są w toku.

Po uzyskaniu stopnia doktora obok realizacji przedstawionych powyżej trzech głównych projektów badawczych finansowanych z funduszu KBN/MNiSW oraz 4 projektów związanych z pracą habilitacyjną brałam również udział w corocznych (łącznie sześciu) projektach finansowanych z funduszu Uniwersytetu Łódzkiego na realizację tzw. badań własnych (**Zal. 4, pkt. I.A. 4-7, 9-10.**).

W 2012r. zostałam promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Konrada Winnickiego ze Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej UŁ, którego otwarcie nastąpiło 16 kwietnia 2012r. Doktorant wykonuje pracę pt. „Wpływ stresu replikacyjnego na aktywność transkrypcyjną oraz funkcje punktów kontrolnych cyklu komórkowego w merystemach korzeni *Vicia faba*. Udział szlaku kinaz MAP” (**Zal. 4, pkt. II. D.**).

Przeprowadzone dotychczas przez Doktoranta badania opublikowane we wspólnej pracy (**Winnicki i wsp. 2012; Zal. 3, pkt. A.II. 15.**) wykazały między innymi, że w merystemach korzeniowych *Vicia faba* hydroksymocznik nie tylko wywołuje blokadę cyklu komórkowego na granicy faz G1/S, ale również aktywację transkrypcji w regionie jądra i jąderka. Wysokiemu poziomowi transkrypcji towarzyszy wzrost zawartości dużej podjednostki polimerazy RNA II. Zmiany w aktywacji transkrypcji i zawartości dużej podjednostki polimerazy RNA II korelują z potranslacyjnymi modyfikacjami histonów, które odgrywają istotną rolę w udostępnianiu chromatyny dla procesu transkrypcji. Wzrost poziomu acetylacji histonu H4 (w pozycji lizyny 5) wskazuje, że aktywacja transkrypcji po działaniu hydroksymocznika zależy od modyfikacji histonów.

W latach 2000-2011 byłam opiekunem naukowym łącznie 22 studentów wykonujących pracę magisterską. Byłam również opiekunem dwójki studentów odbywających w Katedrze Cytofizjologii praktyki zawodowe. Od 2009r. prowadzę wykład na temat „Wybrane problemy biologii eksperymentalnej” dla studentów III roku biologii na studiach niestacjonarnych – zaocznych, specjalność - biologia stosowana i molekularna. W ramach pracy dydaktycznej prowadzę również zajęcia na studiach dziennych, wieczorowych jak i zaocznych na kierunku biologia, mikrobiologia i biotechnologia. Prowadzone przeze mnie przedmioty to: ćwiczenia z

botaniki ogólnej, anatomii roślin, biologii komórki, reakcji roślin na stres, metod biologii komórki i cytogenetyki, pracownie specjalistyczne i magisterskie (**Zal. 4, pkt. II. A-C.**).

W ramach pracy organizacyjnej w 2000r. byłam Członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej. W latach 2000-2001 pełniłam czterokrotnie funkcję Sekretarza Komisji Przetargowych do spraw zakupu aparatury naukowej. W 2005r. zostałam Przewodniczącym Biura Konferencyjnego IX Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki organizowanej w Łodzi. Dwukrotnie w latach 2005 i 2006 uczestniczyłam w organizacji V i VI Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki w Łodzi. W latach 2005-2012 zostałam pełnomocnikiem Kierownika Katedry Cytofizjologii odpowiedzialnym za dostosowanie projektów pomieszczeń nowego Pawilonu Biologii Molekularnej dla potrzeb naszej Katedry, wykonanie projektów pełnego jej wyposażenia oraz nadzór nad etapem zagospodarowania wszystkich pomieszczeń. Byłam również Elektorem w Kolegium Elektorów UŁ wydziału BiOŚ na kadencję 2008-2012 (**Zal. 4, pkt. III. A-G.**).

**Reasumując na cały mój dorobek naukowy składa się:**

- 29 prac o łącznym IF = 34,350 i 579 pkt MNiSW, oraz
- 22 doniesienia zjazdowe prezentowane w formie komunikatów na 14 krajowych i 4 międzynarodowych konferencjach. 6 doniesień zostało opublikowanych w czasopiśmie dających IF = 3,833 i 78 pkt MNiSW.

Suma cytowań na podstawie Web of Knowledge – 64

h-index (Index Hirsch'a) Scopus, ISI Web of Knowledge – 5

**Na okres przed doktoratem złożyło się:**

- 5 prac o łącznym IF = 2,005 i 49 pkt MNiSW, oraz
- 4 doniesienia zjazdowe prezentowane w formie komunikatów na 2 krajowych i 1 międzynarodowej konferencji. 1 doniesienie opublikowane w czasopiśmie dającym IF = 0 i 13 pkt MNiSW

Suma cytowań na podstawie Web of Knowledge – 8

h-index (Index Hirsch'a) Scopus, ISI Web of Knowledge – 1

**Okres po doktoracie zaowocował:**

- 24 pracami o łącznym IF = 32,345 i 530 pkt MNiSW, z czego 7 stanowi pracę habilitacyjną o łącznym IF = 14,667 i 195 pkt MNiSW, a 17 składa się na pozostały dorobek o łącznym IF = 17,678 i 335 pkt MNiSW, oraz
- 18 doniesieniami prezentowanymi w formie komunikatów na 12 krajowych i 3 międzynarodowych konferencjach. 5 doniesień opublikowano w czasopiśmie dających IF = 3,833 i 65 pkt MNiSW.

Suma cytowań na podstawie Web of Knowledge – 56

h-index (Index Hirsch'a) Scopus, ISI Web of Knowledge – 4

Łódź, dnia ...30 czerwca 2012 roku....

Podpis ..... 