

Załącznik 2a

## **AUTOREFERAT**

**dr Agnieszka Wojtczak**

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

Łódź, 2018

**1. Imię i Nazwisko:**

Agnieszka Wojtczak

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.****1996 – magister biologii, specjalność cytofizjologia**

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Praca magisterska „Wpływ kwasu gibberelowego ( $GA_3$ ) w stężeniu  $10^{-5}M$  na poziom endoreplikacji manubriów oraz komórek główkowatych w anterydiostanach *Chara vulgaris* L.”

Katedra Cytofizjologii UŁ. Promotor: prof. dr hab. Maria Kwiatkowska

**2006 – doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, specjalność biologia komórki**

Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Rozprawa doktorska „Rola wybiórczej proteolizy z udziałem proteasomu i ubikwityny w przebiegu procesu spermatogenezy *Chara vulgaris* L.”

Katedra Cytofizjologii UŁ. Promotor: prof. dr hab. Maria Kwiatkowska

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.**

02.01.1996 – 30.06.1996 – **etat techniczny** (1/2 etatu)

01.07.1996 – 30.10.1997 – **starszy referent biolog** (pełny etat)

01.11.1997 – 27.11.2001 – **asystent doktorant** (pełny etat)

1997/1998 - 2000/2001 – **doktorantka** Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Fizjologiczno-Mikrobiologicznego, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki

28.11.2001 – 30.09.2006 – **asystent** (pełny etat)

01.10.2006 – do chwili obecnej – **adiunkt** (pełny etat) Katedra Cytofizjologii,  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

**4. Wskazanie osiągnięcia naukowego\* 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.):**

\* Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstawanie zostały zamieszczone w Załączniku 5

**4a) Tytuł osiągnięcia naukowego,**

**Spermatogeneza u *Chara* z uwzględnieniem wybranych czynników reorganizacji struktury chromatyny**

**4b) Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe**

Kopie prac stanowiących osiągnięcie naukowe zawiera Załącznik 4.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl sześciu publikacji z lat 2007-2018.

- [1]. Popłońska K, **Wojtczak A**, Kwiatkowska M, Kaźmierczak A. 2007. Cytochemical 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.

IF\* = 0,886 IF<sub>5-letni</sub>: 1,311 pkt. MNiSW\* = 10 pkt MNiSW\*\* = 15 Liczba cytowań = 2

\* **wskaźnik IF i punkty MNiSW** podane zgodnie z rokiem opublikowania

\*\* **Punkty MNiSW** podane zgodnie z aktualnym ujednoczonym wykazem czasopism naukowych za lata 2013-2016 z dnia 26 stycznia 2017.

Liczba cytowań bez autocytowań według bazy Web of Science z dnia 09.07.2018.

Publikacja zrealizowana w ramach projektu badawczego **Grant KBN nr 3 PO4C 033 25** (szczegółowe informacje Zał.3II.I.2.), **główny wykonawca** projektu

- [2]. **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.

IF\* = 1,460 IF<sub>5-letni</sub>: 2,43 pkt. MNiSW\* = 20 pkt MNiSW\*\* = 30 Liczba cytowań = 9

Publikacja zrealizowana w ramach projektu badawczego **Badań własnych UŁ w 2007r. nr 505/390** (szczegółowe informacje Zał.3II.I.3.), **kierownik projektu**

- [3]. Popłońska K, Kwiatkowska M, **Wojtczak A**, Polit J.T. 2009. Immunogold evidence suggests that endoplasmic reticulum is the site of protamine type protein synthesis and participates in translocation of these proteins into the nucleus during *Chara vulgaris* spermiogenesis. Biol. Reprod. 80: 572-580.

IF\* = 3,3 IF<sub>5-letni</sub>: 3,445 pkt. MNiSW\* = 24 pkt MNiSW\*\* = 40 Liczba cytowań = 5

- [4]. **Wojtczak A**. 2014. Etoposide interferes with the process of chromatin condensation during alga *Chara vulgaris* spermiogenesis. Micron 65: 45-50.

IF\* = 1,988 IF<sub>5-letni</sub>: 2,013 pkt. MNiSW\* = 30 pkt MNiSW\*\* = 25 Liczba cytowań = 2

Publikacja zrealizowana w ramach projektów badawczych **Badań własnych UŁ w 2008r. nr 505/390 i 2010r. nr 505/389** (szczegółowe informacje Zał.3II.I.3.), **kierownik projektu**

- [5]. **Wojtczak A**. 2016. Immunocytochemical and immunogold analyses of histone H4 acetylation during *Chara vulgaris* spermiogenesis. Micron 82: 86-93.

IF\* = 1,980 IF<sub>5-letni</sub>: 2,013 pkt. MNiSW\* = 25 pkt MNiSW\*\* = 25 Liczba cytowań = 1

- [6]. **Wojtczak A**. 2018. Brg1 subunit of chromatin remodeling complex is present during alga *Chara vulgaris* (Charophyceae) spermatogenesis. Eur. J. Phycol. doi:10.1080/09670262.2018.1480803.

IF\*<sup>1</sup> = 2,481 IF<sub>5-letni</sub>: 2,471 pkt. MNiSW\*<sup>2</sup> = 30 pkt. MNiSW\*\* = 30 Liczba cytowań = 0

\*<sup>1</sup> IF z roku 2017

\*<sup>2</sup> pkt. MNiSW podane zgodnie z aktualnym ujednoczonym wykazem czasopism naukowych za lata 2013-2016 z dnia 26 stycznia 2017

#### **Podsumowanie bibliometryczne dla publikacji stanowiących osiągnięcie:**

Sumaryczny Impact Factor z roku opublikowania: **12,095**

Sumaryczny 5-letni Impact Factor: **13,683**

Liczba punktów MNiSW z roku opublikowania: **139**

Liczba punktów MNiSW wg wykazu z 2016 r.: **165**

Liczba cytowań wg bazy Web of Science (na dzień 09.07.2018): **29**

Liczba cytowań bez autocytowań wg bazy Web of Science (na dzień 09.07.2018): **19**

#### **4c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego cytowane są poniżej zgodnie z nadaną im numeracją w punkcie (4b) - Publikacja [1 - 6]. Kopie tych prac zawarte są w Załączniku 4. Pozostałe prace habilitanta, nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego przedstawione są w Załączniku 3 i cytowane jako: Zał.3IIA, Zał.3IID. Kopie tych prac zawarte są w Załączniku 7. Cytowana w tekście literatura uzupełniająca zamieszczona została na końcu Autoreferatu. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego zawierają obszerny wykaz literatury przedmiotu.

#### **Wprowadzenie**

Spermatogeneza jest wieloetapowym procesem, o bardziej skomplikowanym przebiegu u zwierząt, niż u roślin, polegającym na wytworzeniu ruchliwych gamet męskich z pierwotnych komórek rozrodczych (Bielańska-Osuchowska i Liwska 1991). Wśród roślin spermatogeneza występuje tylko u niektórych gatunków, u których zapłodnienie odbywa się w wodzie m.in: *Briophyta*, *Pteridophyta* (Reynolds i Wolfe 1978) oraz niektórych nagozalążkowych - sagowców i miłorzębu dwuklapowego (Wolniak i wsp. 2000). Proces ten spotykamy także u przedstawicieli glonów wyższych m.in: *Chara vulgaris* (gatunek jednopienny) i *Chara tomentosa* (gatunek dwupienny) (Pickett-Heaps 1968) należących do klasy Charophyceae (rodzina Characeae). Spermatogeneza u glonu *Chara* przebiega w anterydiostanach, męskich organach generatywnych i składa się z dwóch etapów: 1) fazy proliferacyjnej, 2) spermiogenezy. Komórki inicjalne nici spermatogenicznych, w liczbie od 2 do 5, są generowane przez dzielące się komórki główkowate. W fazie proliferacyjnej, komórki nici spermatogenicznych przechodzą liczne, synchroniczne podziały mitotyczne, prowadzące do powstania 64 i 128 spermatyd w nici. U *Chara* cykl komórkowy pozbawiony jest fazy G<sub>1</sub> (typ S+G<sub>2</sub>+M). W anterydiostanie najliczniej występują jednak nici 64-komórkowe, które mogą przejść już do drugiego etapu spermatogenezy, podczas którego spermatydy, o cechach typowych dla komórek somatycznych, ulegają przekształceniu w wysoce wyspecjalizowane, spiralnie zwinięte spermatozoidy (Olszewska i Godlewski 1972). U *Chara* wyróżniono 10 stadiów spermiogenezy (I-X) na podstawie badań w mikroskopie świetlnym i elektronowym. Podziału na poszczególne stadia

dokonano analizując położenie, kształt i objętość jądra w spermatydach, układ fibryli chromatynowych, proces tworzenia mankietu mikrotubul, ilość cytoplazmy i cystern retikulum endoplazmatycznego (ER) oraz liczbę przekrojów wici (Kwiatkowska i Popłońska 2002). U obu gatunków *Chara* (*C. vulgaris* i *C. tomentosa*) zmiany ultrastrukturalne chromatyny spermatyd przebiegają według tego samego schematu (Kwiatkowska i wsp. 2002). Najistotniejszym procesem podczas spermiogenezy u glonu *Chara*, podobnie jak u zwierząt, jest reorganizacja struktury chromatyny warunkowana m.in. przez wymianę białek jądrowych oraz epigenetyczne modyfikacje histonów, co prowadzi ostatecznie do wysokiego stopnia kondensacji chromatyny spermatozoidów i wyciszenia genów.

Zagadnienia związane z przebudową struktury chromatyny spermatyd podczas procesu spermatogenezy stanowią nadal przedmiot moich zainteresowań naukowych. Moje badania koncentrowały się w znacznej mierze na okresie spermiogenezy.

### **Publikacja [1]**

Celem obecnej pracy było wyjaśnienie, czy u glonów *C. vulgaris* i *C. tomentosa*, których proces różnicowania chromatyny spermatyd nie wykazuje różnic, wymiana białek jądrowych także odbywa się w tym samym czasie. U *Chara* na podstawie badań elektroforetycznych stwierdzono brak białek przejściowych (Kwiatkowska i wsp. 2002), czyli wymiana nukleoprotein dotyczy zastępowania histonów tylko przez protamino-podobne białka, inaczej niż ma to miejsce u ssaków. Protaminy to silnie zasadowe białka zaobserwowane po raz pierwszy w plemnikach ryb. Obecność tych białek stwierdzono także w plemnikach wielu kręgowców i bezkręgowców (Wouters-Tyrou i wsp. 1998). Wstępne badania cytochemiczne dotyczące wspomnianych obu rodzajów białek jądrowych wykazały, że barwna reakcja świadcząca o obecności protamin pojawia się u *C. tomentosa* już w stadium V, natomiast u *C. vulgaris* dopiero w kolejnym (Popłońska 2002). Przypuszczano, że na tę sytuację mógł mieć fakt, że stadium V spermiogenezy trwa tylko około 2 godz. i nie udało się zaobserwować spermatyd w tym etapie. Należało powtórzyć badania na obu gatunkach *Chara* z położeniem szczególnego nacisku na V i VI stadium spermiogenezy. W tym celu przeprowadzono barwienie cytochemiczne histonów stosując metodę Alfert'a i Geschwind'a (1953) w modyfikacji Sandritter'a dla spermatozoidów (Myśliwski 1982). Aby w spermatydach ujawnić protaminy postępowano zgodnie z procedurą Bloch'a i współpracowników (1961). Obserwacje te uzupełniono także bardziej precyzyjnymi badaniami immunocytochemicznymi z zastosowaniem przeciwciał do histonu H3 i protamin. Dokonano wyboru histonu H3, ponieważ na podstawie analiz elektroforetycznych wykazano, że utrzymuje się on najdłużej podczas spermiogenezy (Kwiatkowska i wsp. 2002). Protaminy izolowano natomiast z anterydiostanów *C. tomentosa*, ponieważ, w odróżnieniu od *C. vulgaris*, gatunek ten posiada większe anterydiostany. Przeciwciała do tych białek uzyskano w Katedrze Immunologii, Instytucie Mikrobiologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego.

Przeprowadzone analizy spermatyd z zastosowaniem obu wymienionych powyżej metod badawczych jednoznacznie wykazały, że **zarówno u *C. vulgaris*, jak i *C. tomentosa* w stadiach spermiogenezy I-IV występują tylko histony** [1]. Badania spermiogenezy u myszy, człowieka i *Drosophila*, ujawniły, że ich wczesne stadia (etapy okrągłych spermatyd) charakteryzują się także tylko obecnością białek histonowych (Laberge i Boissonneault 2005a, Rathke i wsp. 2007, Leduc i wsp. 2008). W środkowej spermiogenezie *C. vulgaris* (stadia V-VIII) reakcja świadcząca o obecności histonów wykazuje, w stosunku do wcześniejszych stadiów, mniejszą intensywność rozpoczynając od stadium V i ulega stopniowemu osłabieniu przez trzy kolejne etapy. **Równolegle z zanikaniem histonów od stadium V daje się zauważyć sukcesywne pojawianie się białek typu protamin, które jako jedyne są obecne w jądrze spermatyd do końca spermiogenezy** [1]. Proces zastępowania histonów przez białka typu protamin prowadzi do hamowania transkrypcji, któremu towarzyszy postępująca kondensacja chromatyny. Ponadto badania immunocytochemiczne ujawniły w stadium V silne sygnały w pobliżu jądra, świadczące o obecności protamin. W kolejnych etapach (VI-VIII) immunoreakcję obserwowano zarówno na terenie jądra, jak i cytoplazmy spermatyd. W dwóch ostatnich stadiach spermiogenezy intensywna reakcja występuje na peryferiach jądra, natomiast w jego wnętrzu jest nieznacznie słabsza, co jest spowodowane wysokim stopniem kondensacji chromatyny [1] i jednocześnie zmniejszeniem liczby miejsc dostępnych dla wiązania przeciwciał.

Uzyskane obrazy potwierdzające obecność protamin na terenie cytoplazmy spermatyd w stadium V, przypominają rozbudowany w tym etapie system ER. Powyższe obserwacje w połączeniu z wcześniejszymi, pochodzącymi z badań ultrastrukturalnych obu gatunków *Chara* (Kwiatkowska 1996, Kwiatkowska i Popłońska 2002), które ujawniły granularną substancję zarówno w rozdętych cysternach ER, jak i we wnętrzu otoczki jądrowej, pozwoliły wysunąć przypuszczenie, że miejscem syntezy białek typu protamin jest system ER. Założenie to jest zgodne z obserwacjami spermiogenezy u myszy, u której sugerowano rolę otoczki jądrowej w procesie wymiany białek przejściowych na protaminy (Biggiogera i wsp. 1992).

### **Publikacja [3]**

W celu weryfikacji powyższej hipotezy czy synteza białek typu protamin odbywa się w ER i czy cysterny ER uczestniczą w przemieszczaniu tych białek do jądra spermatyd podjęto kolejne badania [3]. Ilościowe analizy autoradiograficzne z zastosowaniem 4 min inkubacji w mieszaninie  $^3\text{H}$ -argininy i  $^3\text{H}$ -lizyny (stanowiąca kontrolę) wykazały najwyższy poziom włączania tych aminokwasów w spermatydach stadium V, jednak ze znaczną przewagą wyznakowania jądra. Przeprowadzona równocześnie autoradiografia obejmująca, jak poprzednio, 4 min inkubację w mieszaninie aminokwasów i 120 min inkubację w środowisku nieradioaktywnym (postinkubacja) wykazała spadek liczby ziaren autoradiograficznych na terenie jądra w stadium V i prawie trzykrotny wzrost jego wyznakowania w stadiach VI i VII. Sytuacja ta jest związana z różną długością czasu trwania

kolejnych etapów spermiogenezy. Stadia początkowe (I-IV) trwają bardzo długo, około 5 dni, w porównaniu z kolejnymi (V-IX), których czas trwania wynosi zaledwie 5-7 godz., a etapu X około 17 godz. (Kwiatkowska i Popłońska 2002). Uwzględniając czas trwania etapu V (około 2 godz.) należy zwrócić uwagę, że komórki, które były w tym stadium przeszły do kolejnych podczas okresu 120 min postinkubacji, co tłumaczy obserwowany wzrost wyznakowania. Dokonano także analizy całkowitej liczby ziaren autoradiograficznych na terenie jąder pochodzących ze stadiów V-VIII, która wykazała 50% wzrost znakowania po okresie postinkubacji, świadczący o transporcie białek typu protamin z cytoplazmy na teren jądra [3]. Ponadto **analizy Western blot z przeciwciałami przeciwko białkom typu protamin ujawniły u obu gatunków *Chara* występowanie dodatkowej grupy tych białek tylko w lizatach z nici spermatogenicznych w stadium X** [1]. Oprócz białek odpowiadających ujawnionym w badaniach elektroforetycznych protaminom o masach: 9,1; 9,6 i 11,2 kDa (Kwiatkowska i wsp. 2002) wykazano także obecność białek o masach (4,7-5,3 kDa) analogicznych do protamin wykrytych przez Reynolds'a i Wolfe'a (1984). **Wyniki tych analiz stwierdzające występowanie wyłącznie protamin w końcowych stadiach spermiogenezy są zgodne z poprzednimi badaniami cytochemicznymi i immunocytochemicznymi** [1].

Uzupełnienie obserwacji stanowiły badania na poziomie mikroskopu elektronowego z zastosowaniem przeciwciał przeciwko protaminom i drugorzędowych przeciwciał sprzężonych ze złotem koloidalnym (technika immunogold), które wykazały prawie czterokrotny wzrost gęstości znakowania jąder spermatyd w stadium VIII (34,2 ziarna złota/ $\mu\text{m}^2$ ) w stosunku do stadium V (8,6 ziarna/ $\mu\text{m}^2$ ). Ziarna złota występowały na terenie jądra, błon otoczki jądrowej oraz zarówno cystern, jak i pęcherzyków ER. W analizowanych stadiach (V i VIII) procent ziaren złota był zawsze znacznie wyższy na obszarze jądra w stosunku do systemu ER [3]. Powyższe **analizy pozwoliły ustalić drogę przemieszczania się białek typu protamin z miejsca ich syntezy, czyli systemu ER, na teren jądra spermatyd. W transporcie tym uczestniczy otoczka jądrowa połączona z cysternami ER. Translokacja tych białek odbywa się, drogą endocytozy, poprzez wpuklenie wewnętrznej błony otoczki jądrowej, a protaminy przedostają się na teren jądra w pęcherzykach wewnątrzjądrowego retikulum** [3]. Wyniki te potwierdziły wcześniejszą hipotezę [1].

## **Publikacja [2]**

Różnicowanie spermatyd to złożony proces, podczas którego chromatyna podlega licznym modyfikacjom biochemicznym i strukturalnym, a znaczna część nukleosomowych superzwojów DNA ulega eliminacji w dojrzałych spermatozoidach. Przejściowe endogenne dwuniciowe pęknięcia DNA (DNA double-stranded breaks – DNA DSBs), umożliwiają przekształcenie struktury nukleosomowej w fibrylarną z protaminami, a następnie w wysoce skondensowaną (Ward 1994). DNA DSBs stwierdzono w populacjach wydłużonych spermatyd, u gatunków oddalonych od siebie filogenetycznie: myszy, szczura i człowieka (Marcon i Boissonneault 2004, Meyer-Ficca i wsp. 2005,

Leduc i wsp. 2008), *Drosophila* (Rathke i wsp. 2007) i *Eyprepocnemis plorans* (Cabrero i wsp. 2007) w okresie środkowej spermiogenezy, kiedy rozpoczyna się przebudowa struktury chromatyny.

Na podstawie wcześniejszych badań (Kwiatkowska i wsp. 2002, [1]) ustalono dokładny moment, kiedy u *Chara* ma miejsce wymiana białek jądrowych, warunkująca przemiany chromatyny spermatyd. Mając na uwadze wyniki tych analiz należało sprawdzić występowania DNA DSBs podczas spermiogenezy u *C. vulgaris*. Przeprowadzono badania immunocytochemiczne spermatyd z zastosowaniem przeciwciał przeciwko ufosforylowanej, na serynie 139, formie histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX), ponieważ fosforylacja tego białka stanowi pośredni dowód występowania DNA DSBs. W początkowej spermiogenezie (stadia I-IV) nie stwierdzono pozytywnej immunoreakcji. **Obecność histonu  $\gamma$ H2AX ujawniono w jądrach spermatyd w stadiach V-VII [2], czyli w okresie wymiany białek jądrowych [1].** Podobnie jak u *Chara*, kiedy w stadium V równolegle z pojawianiem się pierwszych białek typu protamin obserwowano silną  $\gamma$ H2AX immunoreakcję, również u myszy i *Drosophila* **reakcja ta jest związana z zanikaniem struktury nukleosomowej.** Pęknięcia DNA w stadium V prowadzą do radykalnych zmian w strukturze chromatyny w kolejnym etapie, kiedy obszary skondensowanej i nieskondensowanej chromatyny są poprzepłatane między sobą tworząc charakterystyczną sieć na całej powierzchni jądra. Stadia VI i VII charakteryzowały się licznymi i drobnymi immunofluorescencyjnymi sygnałami, w porównaniu ze stadium V. Intensywność tej reakcji jest związana z dokonującymi się zmianami kształtu jądra i postępującym procesem kondensacji chromatyny. **W ostatnim stadium zanikania nukleosomów (VIII) charakteryzującym się coraz bardziej ścisłym, równoległym układem długich fibryli chromatynowych oraz w końcowych stadiach spermiogenezy (IX, X) nie stwierdzono reakcji immunocytochemicznej dla histonu  $\gamma$ H2AX [2].** Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że **obecność DNA DSBs jest związana z procesem zastępowania nukleohistonów przez nukleoprotaminy.**

#### **Publikacja [4]**

Na podstawie badań spermiogenezy u ssaków stwierdzono, że w powstawaniu DNA DSBs i jednocześnie usuwaniu nukleosomowych superzwojów DNA istotny udział odgrywa jeden z wariantów topoiizomerazy II DNA - topoiizomeraza II DNA beta (TOP2B) (Ward 1994, Bakshi i wsp. 2001, Laberge i Boissonneault 2005a,b, Har-Vardi i wsp. 2007). Ponieważ, jak wiadomo z wcześniejszych badań [1, 2], spermiogeneza u *Chara* i ssaków wykazuje pewne cechy wspólne postanowiono sprawdzić, jaką rolę odgrywa ten enzym w procesie różnicowania spermatyd *C. vulgaris*. W tym celu podjęto analizy, z zastosowaniem inhibitora topoiizomerazy II DNA – etopozydu.

Pierwsze badania dotyczyły wpływu etopozydu na dynamikę przebiegu spermiogenezy. Analizie poddano spermatydy ze stadium przejściowego pomiędzy fazą proliferacji i spermiogenezą (64/sp)



oraz wszystkich stadiów spermiogenezy (I-X) pochodzące z materiału kontrolnego oraz inkubowanego przez 24 i 48 godz. w roztworze etopozydu w dwóch stężeniach: 100  $\mu\text{M}$  i 200  $\mu\text{M}$ . Przeprowadzona **analiza procentowa spermatyd wykazała przedłużenie wczesnych stadiów spermiogenezy: 64/sp-II po 24 godz. oraz 64/sp i III po 48 godz. stosowania etopozydu**. Ponieważ dłuższa inkubacja nie powoduje silniejszego wpływu na wzrost liczebności spermatyd we wczesnych stadiach ich różnicowania, w kolejnych analizach zastosowano materiał inkubowany przez 24 godz. w 200  $\mu\text{M}$  roztworze etopozydu [4].

Wyniki wcześniejszych analiz ujawniły obecność histonu  $\gamma\text{H2AX}$  w okresie środkowej spermiogenezy (stadia V-VII, [2]). W porównaniu z kontrolą, **po inkubacji w roztworze etopozydu słabą immunoreakcję stwierdzono w jądrach tylko w stadium V [4], w którym rozpoczyna się proces wymiany białek jądrowych [1]**. U myszy natomiast reakcja nie występuje pod wpływem działania tego inhibitora (Laberge i Boissonneault 2005a). Wyniki tych badań zachęciły do przeprowadzenia analiz ultrastrukturalnych w celu sprawdzenia czy, i ewentualnie w jakim stopniu, etopozyd wywiera wpływ na strukturę chromatyny spermatyd w przebiegu spermiogenezy. Porównanie mikrofotografii spermatyd kontrolnych z traktowanymi etopozydem nie wykazało zmian w organellach komórkowych, kształcie jądra, wici i mankietu mikrotubul z wyjątkiem układu chromatyny w komórkach pochodzących z etapów VI-VIII. Stadium VI charakteryzowało się nieregularnie rozmieszczoną chromatyną skondensowaną i nieskondensowaną poprzedzianą dużymi, jasnymi obszarami, która w warunkach kontrolnych tworzy formę regularnej sieci. W kolejnych stadiach, zamiast krótkich nieuporządkowanych (stadium VII) i długich ułożonych równolegle fibryli chromatynowych (stadium VIII), tak jak ma to miejsce w kontrolnych spermatydach, obserwowano skupiska fibryli chromatynowych rozproszone na całej powierzchni jądra, rozdzielone jaśniejszymi przestrzeniami pozbawionymi fibryli [4]. W literaturze niewiele jest informacji dotyczących wpływu etopozydu na ultrastrukturę spermatyd. Wykazano jednak, że zmiany w strukturze chromatyny występują także w spermatydach szczura traktowanych etopozydem (Maselli i wsp. 2012). Przedstawione powyżej wyniki badań jednoznacznie wskazują, że **etopozyd uniemożliwia tworzenie DNA DSBs, warunkujących prawidłową reorganizację chromatyny. Inhibitor ten tworzy kompleksy topoizomeraza TOP2B-DNA, które blokują aktywność enzymu jądrowego**. Stosowanie etopozydu wywiera destrukcyjny wpływ na przebieg spermatogenezy u myszy i prowadzi nawet do przejściowej niepłodności (Sukhacheva i wsp. 2003).

Badania, które były tematem mojej rozprawy doktorskiej, dostarczyły informacji o istotnej roli jaką w spermiogenezie odgrywa szlak proteolizy z udziałem systemu ubikwityna/proteasom (Zał.3IIA.2-1). Na podstawie analiz, w których wykazano, że TOP2B ulega degradacji pod wpływem działania etopozydu (Nitiss 2009) wysunięto przypuszczenie, że podobna sytuacja może mieć miejsce także w spermatydach *C. vulgaris*, co wyjaśniałoby brak immunoreakcji  $\gamma\text{H2AX}$  w stadiach VI i VII. Przedstawiono także inną hipotezę, że etopozyd, podobnie jak inhibitory proteasomów, może indukować ekspresję genów kodujących proteasomy (Meiners i wsp. 2003, Zał.3IIA.2-1).

W początkowych stadiach spermiogenezy *C. vulgaris* poza przedłużeniem ich czasu trwania nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości w chromatynie, prawdopodobnie ponieważ tworzone w tym okresie proteasomy usuwają powstałe kompleksy topoizomeraza TOP2B-DNA. Podczas późniejszych etapów spermiogenezy, w których nie zachodzi już synteza proteasomów (ponieważ w tym okresie nie odbywają się już procesy transkrypcji i translacji) powstałe kompleksy nie są degradowane i wywołują zaburzenia kondensacji chromatyny [4].

Przeprowadzone analizy wykazały, że u *C. vulgaris*, podobnie jak u ssaków (Bakshi i wsp. 2001, Laberge i Boissonneault 2005a, b) oraz *Xenopus laevis* (Morse-Gaudio i Risley 1994) **topoizomeraza II odgrywa istotną rolę w prawidłowym przebiegu spermiogenezy** [4].

### Publikacja [5]

Badania procesu spermiogenezy wykazały, że u myszy DNA DSBs pojawiają się w wydłużonych spermatydach i współistnieją z hiperacetylacją histonu H4 (Laberge i Boissonneault 2005a). Epigenetyczne modyfikacje histonów odgrywają ważną rolę w kontroli struktury chromatyny i regulacji spermiogenezy. Jedną z potranslacyjnych modyfikacji histonów rdzeniowych jest acetylacja, która dodatkowo pełni funkcję w regulacji metabolicznej wielu procesów komórkowych (Govin i wsp. 2004, Xu i Zhao 2011). Wymiana białek jądrowych w spermatydach ssaków jest również poprzedzona hiperacetylacją histonu H4, która osłabia wzajemne oddziaływanie pomiędzy histonami i DNA. Prowadzi to do rozluźnienia struktury chromatyny, co umożliwia usuwanie histonów z jądra, oraz ich zastępowanie przez inne białka (Meistrich i wsp. 1992, Sonnack i wsp. 2002). W chromatynie spermatyd nie wszystkie histony są jednak usuwane, a w dojrzałych plemnikach człowieka pozostaje ich nadal około 4% (Hammoud i wsp. 2009). U wielu organizmów podczas spermiogenezy pierwszą pozycją ulegającą acetylacji w histonie H4 jest Lys12 (H4K12ac) i proces ten jest znaczący w montowaniu chromatyny (Kuo i wsp. 1996, Kurtz i wsp. 2007). Ponadto badania spermatogenezy myszy wykazały, że tylko acetylacja H4K12 ograniczona jest do spermatyd, podczas gdy w komórkach z wcześniejszych etapów spermatogenezy, spermatogoniach i spermatocytach, ujawniono acetylację tego histonu w innych pozycjach lizyny (Hazzouri i wsp. 2000).

Biorąc pod uwagę powyższe informacje podjęto badania spermatyd *C. vulgaris*, z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko H4K12ac. **Pozytywną immunoreakcję ujawniono w jądrach w stadiach I-VII.** Najsilniejszą reakcję, na całej powierzchni jądra, obserwowano w początkowych stadiach spermiogenezy (I-IV). W kolejnym etapie immunosygnały były nadal intensywne, jednak mniej liczne, a w stadiach VI i VII reakcja była już znacznie słabsza, w porównaniu z obserwowaną poprzednio [5]. W przeciwieństwie do *C. vulgaris*, podczas spermiogenezy u myszy acetylowany histon H4 był obecny tylko w wydłużających się spermatydach w stadiach 8-9 do 11 (Laberge i Boissonneault 2005a). Przeprowadzono także ilościowe analizy ziaren złota, świadczących

o obecności H4K12ac na obszarze chromatyny skondensowanej i nieskondensowanej spermatyd (badania z zastosowaniem techniki immunogold). Poziom acetylacji histonów jest połączony z kondensacją jądra, która zmienia się w przebiegu spermiogenezy u *C. vulgaris*. **Analiza mikrofotografii** ze stadiów III/IV (stadia analizowane razem ze względu na bardzo podobną strukturę jądra) oraz VI **ujawniła prawie dwukrotny wzrost średniej całkowitej liczby ziaren złota na terenie chromatyny w stadium III/IV w stosunku do VI, co potwierdziło wyniki badań immunocytochemicznych**. We wczesnej spermiogenezie (III/IV) ziarna złota były równomiernie rozdzielone pomiędzy chromatynę skondensowaną (48,11%) i nieskondensowaną (51,89%). W stadium VI, kiedy postępujący proces kondensacji chromatyny prowadzi do powstania na terenie jądra struktury sieci, znakowanie jest wyższe o 14% na obszarze chromatyny skondensowanej (57,27%) w stosunku do chromatyny nieskondensowanej (42,73%) i wyższe o 9% w stosunku do wcześniej analizowanego etapu [5].

Acetylacja histonów jest także powiązana z poziomem transkrypcji, a jej wysoki stopień jest charakterystyczny dla euchromatyny. Podobną zależność zaobserwowano także u *Arabidopsis* (Ha 2013). **W początkowych stadiach spermiogenezy u *C. vulgaris* intensywna acetylacja histonu H4 prowadzi do dekondensacji chromatyny umożliwiając jednocześnie transkrypcję** (najwyższy jej poziom w stadium IV) **i translację** (najwyższy poziom w stadium V). Następuje wówczas aktywacja licznych genów zaangażowanych w dalsze etapy różnicowania spermatyd m.in. wymianę białek jądrowych. Zmiany w ultrastrukturze spermatyd we wczesnych stadiach są powiązana z częściową demetylacją DNA (Olszewska i wsp. 1997), podobnie jak ma to miejsce podczas spermiogenezy u myszy (del Mazo i wsp. 1994). **W stadiach V-VII acetylacja histonu H4 [5] występuje jednocześnie z ujawnionymi wcześniej DNA DSBs** [2] i oba te procesy przyczyniają się do prawidłowego przebiegu spermiogenezy. Jest interesujące, że niektóre gatunki, należące do odległych od *Chara* grup systematycznych (bezkęgowców i kęgowców) pomimo różnic w sposobie wymiany białek jądrowych charakteryzują się podobnym przebiegiem procesu acetylacji histonu H4.

### **Publikacja [6]**

W procesie reorganizacji struktury chromatyny spermatyd uczestniczą kompleksy remodelingu chromatyny, odgrywające rolę w wielu procesach komórkowych m.in. w interakcji histonów z DNA (Sif 2004, Jerzmanowski 2007, Clapier i Cairns 2009). Jednym z rodzajów kompleksów jest SWI/SNF, który został zidentyfikowany u *Saccharomyces cerevisiae* i posiada podjednostkę o aktywności ATPazy - Swi2/Snf2 (Hirschhorn i wsp. 1992). Funkcjonalnymi homologami tej podjednostki u ludzi są: Brg1 (brahma-related gene 1) i hBrm (Wang i wsp. 1996). W dotychczasowej literaturze brak informacji na temat roli kompleksów w przebudowie chromatyny podczas spermatogenezy u roślin. Stwierdzono tylko ich udział w rozwoju organów generatywnych i wegetatywnych u kilku gatunków roślin lądowych (Reyes 2014). Wśród glonów badania kompleksów remodelingu chromatyny podczas spermiogenezy prowadzono tylko na jednym gatunku

Chlorophyta, *Chlamydomonas reinhardtii*, u którego stwierdzono obecność białka należącego do podrodziny Snf2 (Strenkert i wsp. 2011) oraz czterech gatunkach Rhodophyta, gdzie odkryto homologi podjednostki SNF2 (Matsuzaki i wsp. 2004, Stiller i wsp. 2012, Caudell 2014).

Celem obecnej pracy było więc sprawdzenie obecności katalitycznej podjednostki kompleksu SWI/SNF - Brg1 w komórkach nici spermatogenicznych podczas spermatogenezy u *C. vulgaris*.

**Badania immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał przeciwko Brg1 wykazały pozytywną reakcję w stadiach 32- i 64-komórkowych nici spermatogenicznych oraz I/II-VII.**

Najsilniejszą reakcję na całej powierzchni jąder spermatyd obserwowano we wczesnej spermiogenezie (I/II-III) [6], podobnie jak w okrągłych spermatydach myszy i szczura (Dhar i wsp. 2012, Wang i wsp. 2012), natomiast bardzo słabą w stadium VII. Analizy ilościowe ziaren złota koloidalnego (badania z zastosowaniem techniki immunogold) wykazały najwyższą ich liczbę w etapach I/II-III. Prawie dwukrotnie niższą liczbę ziaren, w porównaniu do I/II, obserwowano w stadium 64-komórkowych nici spermatogenicznych. W stadiach IV-VI występował znaczny spadek, a w VII obserwowano już tylko pojedyncze ziarna. Badania ultrastrukturalne potwierdziły wyniki analiz immunocytochemicznych. Ponadto **zastosowanie metody Western blot ujawniło dwie izoformy białka o masach około 50 i 185 kDa w ekstraktach komórek nici spermatogenicznych** [6].

Badania immunofluorescencyjne wykazały u myszy wzrost poziomu białka Brg1 od stadium pachytenu, co jest skorelowane z procesem crossing-over, rekombinacją i naprawą DNA. U osobników pozbawionych genu *Brg1* mejoza ulega zablokowaniu i nie obserwuje się także spermatyd oraz dojrzałych plemników (Bultman i wsp. 2006, Kim i wsp. 2012, Wang i wsp. 2012). U *C. vulgaris* udział białka Brg1 nie był analizowany w procesie mejozy, ponieważ w przeciwieństwie do myszy, u których mejoza prowadzi do powstania gamet, glon ten jest haplobiontem z mejozą typu zygotycznego. Pomimo niewielkich różnic w przebiegu spermatogenezy u obu wspomnianych wyżej gatunków można przypuszczać, że u *C. vulgaris* **intensywna immunoreakcja w stadium bezpośrednio poprzedzającym spermiogenezę (64-komórkowe nici spermatogeniczne) jest odpowiednikiem reakcji podczas mejozy u myszy**. U ssaków tych wykazano, że obecność Brg1 jest niezbędna do fosforylacji histonu H2AX (Kim i wsp. 2012). Podobna sytuacja ma również miejsce u *C. vulgaris*. Kompleks remodelingu chromatyny SWI/SNF, podobnie jak acetylacja H4K12, jest zaangażowany w wyciszenie transkrypcji (Zhu i wsp. 2013), co obserwowano także w spermatydach *C. vulgaris*, u których w stadiach VI i VII transkrypcja jest na bardzo niskim poziomie (Olszewska i Godlewski 1973). Proteasomy, odpowiedzialne za usuwanie nukleohistonów (Załącznik 3.IIA.2-1), uczestniczą także w degradacji Brg1 i innych podjednostek katalitycznych kompleksów SWI/SNF (Cullen i wsp. 2009) o czym może świadczyć niski poziom tego białka w stadiach VI i VII. Ponadto Brg1, podobnie jak inni przedstawiciele rodziny Swi2/Snf2 zawiera sekwencje rozpoznające acetylowane lizyny, bromodomeny. W stadiach I-VII stwierdzono jednocześnie immunoreakcję świadczącą o obecności Brg1 i H4K12ac [5], co można tłumaczyć faktem, że bromodomeny do właściwego funkcjonowania wymagają pewnego stopnia acetylacji histonów. Znaczna **obecność Brg1**

**pod koniec fazy proliferacyjnej i we wczesnych (I/II-III) stadiach spermiogenezy (łącznie wyznakowanie powyżej 63%) jest istotna dla kolejnych przemian chromatyny spermatyd.**

### Podsumowanie

Za najważniejsze wyniki moich badań stanowiący osiągnięcie habilitacyjne uważam wykazanie, że:

- 1) Proces wymiany histonów na białka typu protamin u *C. vulgaris* i *C. tomentosa* odbywa się w stadiach środkowej spermiogenezy (V-VIII),
- 2) Analizy Western blot ujawniły u obu gatunków *Chara* występowanie dodatkowej grupy białek typu protamin,
- 3) System szorstkiego retikulum endoplazmatycznego stanowi miejsce, w którym odbywa się synteza białek typu protamin. Ustalono także drogę transportu tych białek do jądra spermatyd poprzez otoczkę jądrową. Wpuklenie jej wewnętrznej błony prowadzi do utworzenia wewnątrzjądrowego retikulum, które przemieszcza protaminy w obszarze jądra,
- 4) Topoizomeraza II DNA odgrywa istotną rolę w procesie różnicowania spermatyd *C. vulgaris* wywołując przejściowe dwuniciowe pęknięcia DNA w środkowej spermiogenezie. Ich obecność warunkuje przekształcenie nukleosomowej struktury chromatyny w fibrylną połączoną z protaminami, a brak pęknięć, po zastosowaniu inhibitora (etopozydu), uniemożliwia eliminowanie nukleosomowych superzwojów DNA w spermatydach, co prowadzi do zaburzeń w procesie wymiany białek jądrowych i kondensacji chromatyny,
- 5) Spermatogeneza u *C. vulgaris* odbywa się z udziałem białka Brg1 - katalitycznej podjednostki kompleksu remodelingu chromatyny SWI/SNF. Brg1 współistnieje z acetylowaną formą histonu H4K12, a w stadiach środkowej spermiogenezy (V-VII) także z przejściowymi dwuniciowymi pęknięciami DNA. Wysoki poziom Brg1 w początkowej spermiogenezie wraz ze wzmożoną acetylacją histonów, prowadzącą do dekondensacji chromatyny, umożliwia przygotowaniem spermatyd do dalszych etapów ich różnicowania.

Przeprowadzone badania wykazały, że prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy jest wynikiem współdziałania, wymienionych powyżej, czynników reorganizacji chromatyny. Na podstawie otrzymanych wyników oraz uwzględniając stwierdzone do tej pory podobieństwa pomiędzy spermiogenezą u *Chara* i odległymi filogenetycznie pewnymi grupami zwierząt (ssaki, ryby i bezkręgowce) można uznać, że reorganizacja struktury chromatyny odbywa się u badanego glonu zgodnie z modelem zaproponowanym dla ssaków.

Obecne badania poszerzą wiedzę na temat spermatogenezy glonów, która do tej pory nie była tak szczegółowo analizowana. Uważam, że glon *Chara* w pełni zasługuje na traktowanie jako organizm modelowy także w badaniach procesu spermatogenezy. Wyniki badań uzyskane na tym modelu mogą mieć ogólnobiologiczny wymiar. Myślę, że zachęcą one do dalszych analiz spermiogenezy także u organizmów zwierzęcych w tym człowieka, ze zwróceniem szczególnej uwagi

na zaburzenia w przekształcaniu struktury chromatyny, które mogą mieć istotne znaczenie dla reprodukcji zarówno roślin, jak i zwierząt.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Cytowana w tekście literatura uzupełniająca zamieszczona została na końcu Autoreferatu. Pozostałe prace habilitanta, nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego przedstawione są w Załączniku 3 i cytowane jako: Zał.3IIA, Zał.3IID. Kopie tych prac zawarte są w Załączniku 7.

### 5a) Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Łódzkiego. W 1996 r. będąc na piątym roku studiów zostałam zatrudniona w Katedrze Cytofizjologii na etacie technicznym (w wymiarze połowy etatu). Pracę magisterską pt. „Wpływ kwasu giberelowego ( $GA_3$ ) w stężeniu  $10^{-5}M$  na poziom endoreplikacji manubriów oraz komórek główkowatych w anterydiostanach *Chara vulgaris* L.” wykonałam w tym samym roku pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Marii Kwiatkowskiej. W pracy magisterskiej wykazałam, że egzogeny kwas giberelowy ( $GA_3$ ) stymuluje proces syntezy DNA w jądrach manubriów *Chara vulgaris*. Giberelina ta zwiększa dwukrotnie produktywność anterydiostanu w wyniku jej bezpośredniego działania na procesy zachodzące w obrębie komórek nici spermatogenicznych lub działania pośredniego poprzez stymulację syntezy polisacharydów wydzielanych przez manubria do wewnętrznej przestrzeni anterydiostanu.  $GA_3$  zwiększa również liczbę podziałów komórek nici spermatogenicznych, co powoduje opóźnienie rozpoczęcia spermiogenezy. Ponadto wykazałam, że  $GA_3$  nie stymuluje procesu endoreplikacji w jądrach komórek główkowatych, a także nie zmienia dośrodkowego gradientu wartości C DNA w jądrach komórek poddanych analizie. Gradient ten pozostaje pod kontrolą genetyczną. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Plant Cell Physiology* (Zał.3IIA.1-1). Od 1997r., będąc na etacie - asystenta doktoranta, w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Fizjologiczno-Mikrobiologicznego, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Łódzkiego rozpoczęłam, wraz z zespołem Pani prof. dr hab. M. Kwiatkowskiej, badania zmian ultrastrukturalnych podczas spermatogenezy dotyczące jednego z rodzajów nierozrodczych komórek anterydiostanów *C. vulgaris* – manubriów (Zał.3IIA.1-3). Przeanalizowano także plazmodesmy występujące pomiędzy komórkami nici spermatogenicznych *Chara tomentosa* zarówno w fazie proliferacyjnej, jak i różnych stadiach spermiogenezy (Zał.3IIA.1-4). Dalsze badania koncentrowały się na procesie różnicowania spermatyd i udziału w nim systemu proteolitycznego ubikwityna/proteasom (Zał.3IIA.1-2,6). Zastosowanie inhibitora aktywności proteolitycznej proteasomów, epoksomycyny, wywołało wzrost liczby spermatyd we wczesnej spermiogenezie, co jak przypuszczano było efektem blokowania proteolizy białek istotnych w dalszych procesach przekształcania spermatyd (Zał.3IIA.1-5, Zał.3IID.1-1). Badania dotyczące tego zagadnienia były przeze mnie kontynuowane w ramach rozprawy doktorskiej pt. „Rola wybiórczej proteolizy z udziałem proteasomu i ubikwityny w przebiegu procesu spermatogenezy *Chara vulgaris*

L.”, którą obroniłam w 2006r. Prace były prowadzone w ramach grantu promotorskiego (szczegółowe informacje Zał.3II.1.2.). Promotorem w przewodzie doktorskim była prof. dr hab. M. Kwiatkowska, a recenzentami: prof. dr hab. Zofia Bielańska-Osuchowska (emerytowany prof. Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie) i prof. dr hab. Maria Olszewska (emerytowany prof. Uniwersytetu Łódzkiego).

Głównymi osiągnięciami mojej dysertacji było wykazanie, że:

1. inhibitory aktywności proteolitycznej proteasomów (epoksomycyna i MG-132) powodują zatrzymanie cyklu komórkowego komórek nici spermatogenicznych *C. vulgaris* głównie na etapie metafaza/anafaza, przez blokowanie funkcji kompleksu APC/Cyklosom,
2. okres wczesnej spermiogenezy ulega przedłużeniu pod wpływem wszystkich zastosowanych inhibitorów proteasomów (laktacystyna, clasto-laktacystyna  $\beta$ -lakton, epoksomycyna. MG-115, MG-132). Najwyraźniejsze zmiany uzyskano po 48 godz. działania laktacystyny i epoksomycyny,
3. we wczesnej spermiogenezie badania mikroskopowo-elektronowe ujawniły postać nukleosomową chromatyny i jej brak w późnej spermiogenezie, w której widoczne są cząsteczki DNA połączone z białkami protamino-podobnymi,
4. obecność ubikwityny i rdzenia proteasomu 20S stwierdzono we wszystkich stadiach spermiogenezy, w różnych obszarach komórki w zależności od etapu procesu,
5. system ubikwityna/proteasom jest nieodzowny dla usuwania zbędnych histonów w okresie ich zastępowania przez białka protamino-podobne. Inhibitory proteasomów powodują blokowanie degradacji histonów w środkowych i późnych stadiach spermiogenezy,
6. w końcowych stadiach spermiogenezy (VIII-IX) w jądrach spermatyd traktowanych epoksomycyną i MG-132 zaburzeniu ulega fibrylarna struktura chromatyny charakterystyczna dla tworzących się spermatozoidów. Obserwowano także struktury przypominające agresomy stanowiące skupiska ubikwitynowanych histonów, które nie uległy proteolizie w wyniku zablokowania aktywności proteasomów.
7. anterydiostan *C. vulgaris* stanowi gametangium, które można porównywać z układami rozrodczymi u zwierząt, ponieważ spermiogeneza u tego glonu i zwierząt wykazuje pewne podobieństwa.

Obrona mojej pracy doktorskiej została bardzo dobrze oceniona i złożono wniosek o jej wyróżnienie nagrodą Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Łódzkiego.

### **5b) Kontynuacja pracy naukowej – po uzyskaniu stopnia doktora**

Wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w czasopiśmie *Biology of Reproduction* (Zał.3IIA.2-1) i czterech streszczeniach komunikatów konferencyjnych w czasopismach naukowych (Zał.3IIIB.1.1-3,4,5,6). W 2009r. otrzymałam indywidualną Nagrodę III<sup>o</sup> JM Rektora Uniwersytetu Łódzkiego za cykl publikacji związanych z rozprawą doktorską (Zał.3IIID). Po doktoracie kontynuowałam badania dotyczące procesu spermatogenezy u dwóch gatunków *Chara*,

wchodzące w skład opisanego powyżej osiągnięcia naukowego. Równoległe z tymi pracami uczestniczyłam w badaniach zespołu Pani prof. M. Kwiatkowskiej, których tematem były lipotubuloidy oraz proces tworzenia kutikuli z udziałem enzymów i kutinsomów u wybranych gatunków roślin.

Lipotubuloidy to struktury cytoplazmatyczne, które zostały odkryte w epidermie zalążni u śniedka (*Ornithogalum umbellatum*). Nazwę lipotubuloidy, które nie są plastydami, wprowadziła prof. Kwiatkowska w 1971r. dla odróżnienia tych struktur od „elajoplastów” opisanych przez Wakker’a w 1888r. (Kwiatkowska 1971). Badania na poziomie mikroskopu elektronowego wykazały, że lipotubuloidy to skupiska kul lipidowych oplecionych mikrotubulami. Domeny te, otoczone w większości obszaru tonoplastem, zawierają także pęcherzyki i cysterny retikulum endoplazmatycznego (ER), rybosomy, struktury Golgiego, mitochondria i mikrociała (peroksosomy, glioksosomy), a w późniejszych stadiach rozwojowych także wakuole autolityczne. Kule lipidowe otoczone są połówką błony elementarnej (jednowarstwa fosfolipidowa) i wypełnione tłuszczami obojętnymi oraz wolnymi kwasami tłuszczowymi (Kwiatkowska 2004, Zał.3IID.2-1,1a). Wielkość lipotubuloidów, które powstają w wyniku gromadzenia się pojedynczych kul lipidowych, jest podobna do wielkości jądra komórkowego. Dzięki obecności mikrotubul pomiędzy kulami lipidowymi, lipotubuloidy wykazują ruch postępowo-obrotowy, którego prędkość obrotowa jest około 6 razy większa w porównaniu z prędkością ruchu cytoplazmy. Zablokowanie ruchu cytoplazmy 2,4-dwunitrofenolem (DNF) nie hamuje ruchu obrotowego lipotubuloidów, powoduje natomiast zmniejszenie jego prędkości. Ruch postępowo-obrotowy tych cytoplazmatycznych domen uczestniczy w przekazywaniu substancji pomiędzy lipotubuloidami a pozostałymi składnikami komórki. W lipotubuloidach *O. umbellatum* oprócz mikrotubul stwierdzono także, przebiegające równoległe do nich, krótkie filamenty aktynowe (Kwiatkowska i wsp. 2005). Ich wzajemne oddziaływania mogą wpływać na przekształcanie mikrotubul o większej średnicy w wąskie lub odwrotnie. Badania z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał sprzężonych ze złotem koloidalnym (technika immunogold) wykazały, że filamenty aktynowe są powiązane z mikrotubulami białkami motorycznymi: kinezyną i miozyną, a współpraca tych wymienionych elementów umożliwia ruch obrotowy lipotubuloidów. Wykryto także obecność lekkich łańcuchów kolejnego białka motorycznego - dyneiny (Zał.3IIA.2-7).

Badania autoradiograficzne z zastosowaniem <sup>3</sup>H-kwasu palmitynowego wykazały, że w lipotubuloidach zachodzi synteza lipidów (Kwiatkowska 1972). Prace dotyczące tego zagadnienia były prowadzone w latach 2009-2012 w ramach grantu MNiSW (szczegółowe informacje Zał.3II.1.2.), w realizacji którego uczestniczyłam jako główny wykonawca. W ramach projektu badawczego zostało opublikowanych 7 prac (Zał.3IIA.2-2,3,5,6,7; Zał.3IID.2-2,3). Badania miały również na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy mikrotubule związane z kulami lipidowymi uczestniczą także w syntezie lipidów.



Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały, obecność lipotubuloidów także u innych roślin (*Haemanthus albiflos*, *Althaea rosea*, *Funkia Sieboldiana*, *Vanilla planifolia*), u których do tej pory stwierdzono występowanie „elajoplastów”. U *H. albiflos*, którego mikrotubule są bardzo labilne, udało się je ujawnić dopiero po inkubacji z taksolem (czynnik stabilizujący mikrotubule). „Elajoplasty” powyżej wymienionych gatunków posiadają wszystkie cechy charakterystyczne dla lipotubuloidów opisanych u *O. umbellatum*. Badania z zastosowaniem techniki immunogold potwierdziły obecność tubuliny  $\alpha$  na terenie tych cytoplazmatycznych domen (Zał.3IIA.2-2,3).

Komórki epidermy załązni *O. umbellatum* nie dzielą się podczas rozwoju tego organu tylko ulegają silnemu wydłużeniu (30-krotny wzrost). Ponadto ujawniono także wprost proporcjonalną zależność pomiędzy wzrostem tych komórek, a powiększaniem się lipotubuloidu, w wyniku zwiększania się w nich liczby kul lipidowych. Średnica dojrzałych kul lipidowych utrzymuje się w przedziale 0,1 - 0,4  $\mu\text{m}$ , ponieważ na ich terenie zachowana zostaje dynamiczna równowaga pomiędzy syntezą i degradacją lipidów (Kwiatkowska i wsp. 2007, Zał.3IID.2-2). Stosując procedurę standardowego utrwalania materiału do badań w mikroskopie elektronowym nie obserwowano w komórkach epidermy załązni mikrotubul korowych, charakterystycznych dla wydłużających się komórek. Zastosowanie utrwalania materiału w zimnym metanolu i przeciwciał przeciwko tubulinie  $\beta$  ujawniło obecność mikrotubul korowych przebiegających poprzecznie lub skośnie do długiej osi tych komórek. Stabilne mikrotubule lipotubuloidu tworzyły natomiast gęsto upakowane jasne miejsce. Niestabilne mikrotubule korowe ujawniono także na mikrofotografiach po wcześniejszym zastosowaniu taksolu (Zał.3IIA.2-4).

Kolejne badania z zastosowaniem techniki immunozłota wykazały, że dojrzałe kule lipidowe lipotubuloidu *O. umbellatum*, w pobliżu fosfolipidowej monowarstwy, zawierają enzymy zaangażowane w syntezę kwasów tłuszczowych i lipidów: lipazę oraz acylotransferazę diacyloglicerolową 2 (DGAT2), która katalizuje przekształcenie diacyloglicerolu (DAG) do triacyloglicerolu (TAG). Powierzchnia kul lipidowych jest również miejscem włączania  $^3\text{H}$ -kwasu palmitynowego do lipidów. Otrzymane wyniki pozwalały przypuszczać, że tłuszcze zawarte w lipotubuloidach są prawdopodobnie jednostkami budulcowymi kutikuli (Zał.3IID.2-2).

Wykazano, że w lipotubuloidach *O. umbellatum* ER uczestniczy w biogenezie kul lipidowych. Tłuszcze pojawiają się w przestrzeni, w postaci soczewki, pomiędzy listkami błony cystern ER. Dojrzałe kule lipidowe, wypełnione mniej osmofilną substancją niż w momencie tworzenia się, nie są bezpośrednio połączone z ER. Utrzymują jednak kontakt z tymi strukturami przez przylegające do nich mikrotubule. Badania dotyczące lokalizacji enzymów (DGAT1, DGAT2 i fosfolipazy D1) syntetyzowanych przy udziale rybosomów związanych z ER, potwierdziły wcześniejszą hipotezę dotyczącą udziału kul lipidowych i mikrotubul w syntezie lipidów. Podczas tworzenia kul lipidowych enzymy te są transportowane z obszaru ER na powierzchnię tych kul przy udziale mikrotubul (Zał.3IIA.2-5, Zał.3IID.2-3). Obecność enzymu DGAT2 wykazano także na powierzchni kul lipidowych w komórkach zarodka i merystemu korzeniowego *Arabidopsis thaliana* co dowodzi, że

jest to kolejny gatunek rośliny, u którego wykazano powiązanie kul lipidowych, będących miejscem syntezy lipidów z otaczającymi je mikrotubulami uczestniczącymi w tym procesie (Załącznik 3.IIA.2-6). Wcześniej przypuszczano, że lipotubuloity uczestniczą w syntezie kutikuli (Załącznik 3.IID.2-2). Analiza autoradiogramów komórek epidermy zalążni *O. umbellatum* wykazała, że po 2 godz. inkubacji w kwasie <sup>3</sup>H-palmitynowym oraz 6 godz. inkubacji w środowisku nieradioaktywnym (postinkubacja) ziarna autoradiograficzne skupione nad lipotubuloitem rozprzestrzeniają się na powierzchni całej komórki. Liczba ziaren autoradiograficznych ulega obniżeniu o około 70% po okresie postinkubacji, co świadczy o metabolizowaniu znacznej ilości lipidów w tym czasie. Nie wszystkie pozostałe ziarna srebra zanikają po ekstrakcji w rozpuszczalnikach lipidów (woski są łatwo rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych) i są zlokalizowane w warstwie kutikularnej. Powyższe obserwacje pozwoliły wysunąć przypuszczenie, że około 30% lipidów obecnych w lipotubuloitach ulega przekształceniu w jednostki budulcowe kutikuli (Załącznik 3.IID.2-2,3). Należało jeszcze wyjaśnić, czy proces ten zachodzi na terenie lipotubuloitów, czy innych przedziałów komórki.

Zagadnienie dotyczące syntezy kutikuli jest bardzo istotne z ekonomicznego i biotechnologicznego punktu widzenia (Heredia i wsp. 2009, Domínguez i wsp. 2011, Załącznik 3.IID.2-3). Stanowi ono nadal przedmiot naszych dociekań, które prowadzimy w ramach badań z zespołem prof. Antonio Heredia (Uniwersytet Malaga, Hiszpania). Nawiązana współpraca zaowocowała do tej pory czterema wspólnymi publikacjami w czasopiśmie z listy JCR (Załącznik 3.IIA.2-8,9,10,11). Zespół hiszpańskich badaczy prowadzi badania nad kutinsomami – strukturami komórkowymi (średnica 40-200nm), zawierającymi polihydroksy kwasy tłuszczowe i uczestniczącymi w tworzeniu kutikuli. Hydrofobowa lipidowa zawartość kutinsomów jest oddzielona od środowiska wodnego przez otaczającą ją hydrofilową otoczkę (shell) (Heredia-Guerrero i wsp. 2011).

Kutikula jest warstwą pokrywającą powietrzną powierzchnię ściany komórek epidermy, a jej główną funkcją jest zapobieganie utracie wody podczas wymiany gazowej. Pełni ona także istotną rolę ochronną przed uszkodzeniami zewnętrznymi wywołanymi promieniowaniem UV, infekcjami bakteryjnymi i grzybowymi, łączeniem się organów rośliny podczas ich rozwoju (Załącznik 3.IIA.2-8). Proces syntezy składników kutikuli w komórkach epidermy przebiega wieloetapowo. Zespół prof. Heredii przedstawił kutinsomy w badaniach *in vitro* dotyczących syntezy biopoliestrów oraz w ścianie komórkowej owocu pomidora 5 dni po zakwitaniu stosując metodę immunogold z przeciwciałami rozpoznającymi kutinsomy (Domínguez i wsp. 2010). Z wykorzystaniem tych samych przeciwciał ujawniliśmy te struktury także w komórkach epidermy zalążni *O. umbellatum* głównie w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej, warstwie kutikularnej i kutikuli właściwej oraz w mniejszym stopniu na terenie lipotubuloitu, cytoplazmy i w pobliżu plazmolemy (Załącznik 3.IIA.2-8). Przedstawione powyżej badania dotyczące ultrastruktury lipotubuloitu *O. umbellatum* i obecności na jego terenie enzymów uczestniczących w produkcji elementów kutyny (GPAT6) i wosków (DGAT) oraz białek motorycznych pozwoliły na potraktowanie lipotubuloitu jako kompleksu. Pani prof. Kwiatkowska zaproponowała dla tego strukturalno-funkcjonalnego kompleksu enzymów i struktur komórkowych

termin lipotubuloidowy metabolon (lipotubuloid metabolon, LM). Na terenie LM odbywa się synteza lipidów, których pewna część jest metabolizowana i wykorzystywana przez komórkę jako substancje odżywcze, a pozostałe lipidy są przekształcane w składniki kutikuli, przy udziale kutinsomów. Wieloletnie badania dotyczące lipotubuloidowego metabolonu w komórkach epidermy załąźni *O. umbellatum* pozwoliły sformułować listę procesów, w których uczestniczą te cytoplazmatyczne struktury:

- 1) synteza lipidów i ich rozkład na terenie kul lipidowych,
- 2) tworzenie nowych kul lipidowych, mikrotubul i ER,
- 3) synteza i transport składników kutikuli,
- 4) wytwarzanie autonomicznego ruchu obrotowego (Zał.3IIA.2-9,10).

Podwójna reakcja immunogold z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających kutinsomy i enzym GPAT6 lub DGAT2 wykazała obecność tych enzymów jako swobodnych cząsteczek na terenie cytoplazmy, w miejscu ich syntezy, oraz w powiązaniu z otoczką kutinsomów. Świadczy to o udziale kutinsomów w transporcie tych enzymów, istotnych dla syntezy kutyny i wosków, z cytoplazmy przez plazmolemę i polisacharydową warstwę ściany komórkowej do kutikuli, czyli miejsca ich funkcjonowania. Przemieszczanie kutinsomów, na zasadzie transportu bez udziału pęcherzyków, jest możliwe dzięki obecności hydrofilowej otoczki na powierzchni kutinsomów (Zał.3IIA.2-10).

Zarówno synteza kutikuli, jak i transport hydrofobowych jej składników z terenu cytoplazmy na powierzchnię organu pozostają ciągle w sferze badań wielu ośrodków naukowych. Dotychczas przedstawione zostały różne koncepcje dotyczące syntezy tej zewnętrznej okrywy roślin z udziałem powstających spontanicznie kutinsomów – nanocząsteczek zawierających polihydroksy kwasy tłuszczowe lub udziału tych cząsteczek także w transporcie enzymów, istotnych dla syntezy kutyny i wosków. Prawdopodobnie w procesie przemieszczania enzymów uczestniczą, zlokalizowane w błonie komórkowej, transportery ABC (ATP-binding cassette) (Zał.3IIA.2-10).

Przeprowadzone badania udowodniły istnienie związku między syntezą kutikuli i lipotubuloidowym metabolonem u *O. umbellatum*. Ponieważ u *A. thaliana* w komórkach epidermy nie stwierdzono występowania LM-ów (Zał.3IIA.2-6), postanowiono sprawdzić na tym modelu rośliny obecność kutinsomów w komórkach epidermy liścieni dojrzałego zarodka. W badaniach immunogold z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko kutinsomom stwierdzono obecność tych cząsteczek w cytoplazmie, w pobliżu plazmolemy, w ścianie komórkowej i warstwie kutikuli, co potwierdza udział kutinsomów w tworzeniu kutikuli zarodkowej (Zał.3IIA.2-11).

Nasze dotychczasowe badania wzbogaciły informacje dotyczące drogi biosyntezy składników lipidowych uczestniczących w formowaniu kutikuli. Mamy nadzieję, że w przyszłości mogą one mieć szersze zastosowanie np. w sadownictwie, ponieważ grubość kutikuli może być istotna ze względu na ochronę przed szkodnikami, a tym samym mieć wpływ na jakość owoców.

Na posiedzeniu Rady Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Łódzkiego w dniu 28.06.2018r. przedstawiłam tezy mojej rozprawy habilitacyjnej, które zostały przyjęte z jednym głosem wstrzymującym się.

## Bibliografia

- Alfert M, Geschwind I. 1953. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 39: 991-998.
- Bakshi R.P, Galange S, Bali P, Dighe R, Muniyappa K. 2001. Developmental and hormonal regulation of type II DNA topoisomerase in rat testis. *J. Mol. Endocrinol.* 26: 193-206.
- Bieleńska – Osuchowska Z, Liwska J. 1991. Spermatogeneza [w:] *Struktura funkcjonalna komórek i tkanek*, Bieleńska – Osuchowska Z, Kawiak J. (red). PWN, Warszawa, s. 313-322.
- Biggiogera M, Muller S, Courtens J.L, Fakan S, Romanini M.G. 1992. Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines in the course of mouse spermiogenesis. *J. Elect. Microsc. Tech.* 20: 259-267.
- Bloch D.P, Howard Y.C, Hew M.S. 1961. Methods for the cytochemical characterization of nuclear basic proteins and their application to problems of development. *Ann. Histochem.* 7: 497-500.
- Bultman S, Gebuhr T.C, Pan H, Svoboda P, Schultz R.M, Magnuson T. 2006. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes Dev.* 20: 1744-1754.
- Cabrero J, Palomino-Morales J, Camacho P.M. 2007. The DNA-repair Ku70 protein is located in the nucleus and tail of elongating spermatids in grasshoppers. *Chromosome Res.* 15: 1093-1100.
- Caudell E.K. 2014. Conservation and expression of SNF2 proteins in *Chondrus crispus* (Undergraduate Thesis, East Carolina University). Retrieved from the Scholarship. (<http://hdl.handle.net/10342/4492>.)
- Clapier C.R, Cairns B.R. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 78: 273-304.
- Cullen S.J, Ponnappan S, Ponnappan U. 2009. Catalytic activity of the proteasome fine-tunes Brg1-mediated chromatin remodeling to regulate the expression of inflammatory genes. *Mol. Immunology* 47: 600-605.
- del Mazo J, Prantera G, Torres M, Ferraro M. 1994. DNA methylation changes during mouse spermatogenesis. *Chrom. Res.* 2: 147-152.
- Dhar S, Thota A, Rao M.R.S. 2012. Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J. Biol. Chem.* 287: 6387-6405.
- Domínguez E, Heredia-Guerrero J.A, Benítez J.J, Heredia A. 2010. Self-assembly of supramolecular lipid nanoparticles in the formation of plant biopolyester cutin. *Mol BioSyst* 6: 948-950.
- Domínguez E, Heredia-Guerrero J.A, Heredia A. 2011. The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytol.* 189: 938-849.
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Sophie Rousseaux S, Khochbin S. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 271: 3459-3469.
- Ha M. 2013. Understanding the chromatin remodeling code. *Plant Sci.* 211: 137-145.
- Hammoud S.S, Nix D.A, Zhang H, Purwar J, Carrell D.T, Cairns B.R. 2009. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460: 473-478.
- Har-Vardi I, Mali R, Breietman M, Sonin Y, Albotiano S, Levitas E, Potashnik G, Priel E. 2007. DNA topoisomerases I and II in human mature sperm cells: characterization and unique properties. *Hum. Reprod.* 22: 2183-2189.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure A.K, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S. 2000. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 950-960.
- Heredia A, Heredia-Guerrero J.A, Domínguez E, Benitez J.J. 2009. Cutin synthesis: A slippery paradigm. *Biointerphases* 4: P1-P3.

- Heredia-Guerrero JA, San-Miguel MA, Luna M, Domínguez E, Heredia A, Benítez J.J. 2011. Structure and support induced structure disruption of soft nanoparticles obtained from hydroxylated fatty acids. *Soft Matter* 7: 4357-4363.
- Hirschhorn J.N, Brown S.A, Clark C.D, Winston F. 1992. Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Gen. Develop.* 6: 2288-2298.
- Jerzmanowski A. 2007. SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct Expr* 1769: 330-345.
- Kim Y, Fedoriw A.M, Magnuson T. 2012. An essential role for a mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complex during male meiosis. *Development* 139: 1133-1140.
- Kuo M-H, Brownell J.E, Sobel R.E, Ranalli T.A, Cook R.G, Edmondson D.G, Roth S.Y, Allis C.D. 1996. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383: 269-272.
- Kurtz K, Martínez-Soler F, Ausió J, Chiva M. 2007. Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *J. Cell. Biochem.* 102: 1432-1441.
- Kwiatkowska M. 1971. Fine structure of the lipotubuloids (elaioplasts) in *Ornithogalum umbellatum* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* 40: 451-465.
- Kwiatkowska M. 1972. Autoradiographic studies on the incorporation of [<sup>3</sup>H] palmitic acid into lipotubuloids of *Ornithogalum umbellatum* L. *Folia Histochem. Cytochem.* 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 <sup>3</sup>H-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, Popłońska K. 2002. Further ultrastructural research of *Chara vulgaris* spermiogenesis: endoplasmic reticulum, structure of chromatin, <sup>3</sup>H-lysine and <sup>3</sup>H-arginine incorporation. *Folia Histochem. Cytobiol.* 40: 85-97.
- 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, Stępiński D. 2005. Actin filaments connected with the microtubules of lipotubuloids, cytoplasmic domains rich in lipid bodies and microtubules. *Protoplasma* 226: 163-167.
- 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*. *J. Exp. Bot.* 58: 2023-2031.
- Laberge R-M, Boissonneault G. 2005a. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol. Reprod.* 73: 289-296.
- Laberge R-M, Boissonneault G. 2005b. Chromatin remodeling in spermatids: a sensitive step for the genetic integrity. *Arch. Androl.* 51: 1-9.
- Leduc F, Maquennehan V, Nkoma G.B, Boissonneault G. 2008. DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol. Reprod.* 78: 324-332.
- Marcon L, Boissonneault G. 2004. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol. Reprod.* 70: 910-918.
- Maselli J, Hales B.F, Chan P, Robaire B. 2012. Exposure to bleomycin, etoposide, and Cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biol. Reprod.* 86: 1-10.
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin-i T, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima S, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K, i wsp. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653-657.
- Meiners S, Heyken D, Weller A, Ludwig A, Stangl K, Kloetzel P-M, Krüger E. 2003. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes. *J. Biol. Chem.* 278: 21517-21525.
- Meistrich M.L, Trostle-Weige P.K, Lin R, Bhatnagar Y.M, Allis C.D. 1992. Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 170-181.
- Meyer-Ficca M.L, Scherthan H, Bürkle A, Meyer R.G. 2005. Poly (ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma* 114: 67-74.

- Morse-Gaudio M, Risley M.S. 1994. Topoisomerase II expression and VM-26 induction of DNA breaks during spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* 107: 2887–2898.
- Myśliwski A. 1982. Histochemia histonów. [w:] *Topochemiczne Metody Badań Komórek i Tkanek*, Krygier-Stojalowska A, Godlewski H (red). PWN, Warszawa, s. 361-376.
- Nitiss J.L. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 9: 338–350.
- Olszewska M.J, Godlewski M. 1972. An autoradiographic study of the synthesis of nucleic acids and protein during the cell cycle of synchronously dividing antheridial filaments in *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem. Cytochem.* 10: 245-256.
- Olszewska M.J, Godlewski M. 1973. A cytochemical study of spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem. Cytochem.* 11: 9–20.
- Olszewska MJ, Gemand D, Godlewski M, Kunachowicz A. 1997. DNA methylation during antheridial filament development and spermiogenesis in *Chara vulgaris* (*Charophyceae*) analysed by in situ nick-translation driven by methylation-sensitive restriction enzymes. *Eur. J. Phycol.* 32: 287-291.
- Pickett-Heaps J.D. 1968. Ultrstructure and differentiation in *Chara (fibrosa)* IV. Spermatogenesis. *Aust. J. Biol. Sci.* 21: 655-690.
- Popłońska K. 2002. Cytochemical studies on histone-type and protamine-type proteins during spermiogenesis in *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. *Folia Histochem. Cytobiol.* 40: 233-234.
- Rathke C, Baarends W.M, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R, Renkawitz-Pohl R. 2007. Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 120: 1689–1700.
- Reyes J.C. 2014. The many faces of plant SWI/SNF complex. *Mol. Plant* 7: 454–458.
- Reynolds W.F, Wolfe S.L. 1978. Changes in basic proteins during sperm maturation in a plant, *Marchantia polymorpha*. *Exp. Cell Res.* 116: 269-273.
- Reynolds W.F, Wolfe S.L. 1984. Protamines in plant sperm. *Exp. Cell Res.* 152: 443–448.
- Sif S. 2004. ATP-dependent nucleosome remodeling complexes: enzymes tailored to deal with chromatin. *J. Cell. Biochem.* 91: 1087-98.
- Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. 2002. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 34: 384-390.
- Stiller J.W, Perry J, Rymarquis L.A, Accerbi M, Green P.J, Prochnik S, Lindquist E, Chan C.X, Yarish C, Lin S, Zhuang Y, Blouin N.A, Brawley S.H. 2012. Major developmental regulators and their expression in two closely related species of *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 48: 883–896.
- Strenkert D, Schmollinger S, Sommer F, Schulz-Raffelt M, Schroda M. 2011. Transcription factor-dependent chromatin remodeling at heat shock and copper responsive promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 23: 2285–2301.
- Sukhacheva T.V, Bogush T.A, Kolomiets O.L. 2003. Destructive effect of DNA topoisomerase II inhibitor Vepesid on mouse spermatogenesis. *Bull. Exp. Bio. Med.* 135: 464-469.
- Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns B.R, Crabtree G.R. 1996. Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* 10: 2117-2130.
- Wang J, Gu H, Lin H, Chi T. 2012. Essential roles of the chromatin remodeling factor Brg1 in spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* 86: 1–10.
- Ward W.S. 1994. The structure of the sleeping genome: implications of sperm DNA organization for somatic cells. *J. Cell Biochem.* 55: 77–82.
- Wolniak S.M, Klink V.P, Hart P.E, Tsai C-W. 2000. Control of development and motility in the spermatozooids of lower plants. *Gravit Space Biol. Bull.* 13: 85-93.
- Wouters-Tyrou D, Sautière P, Biserte G. 1976. Covalent structure of the sea urchin histone H4. *FEBS Lett.* 65: 225-228.
- Xu W, Zhao S. 2011. Metabolism is regulated by protein acetylation. *Front. Biol.* 6: 213–218.
- Zhu Y, Rowley M.J, Böhmendorfer G, Wierzbicki A.T. 2013. A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Mol. Cell* 49: 298–309.

**Podsumowanie całego dorobku naukowego:**

(szczegółowe informacje zawiera Załącznik 3)

Dorobek naukowy: - 27 publikacji (w tym 6 wchodzących w skład osiągnięcia)

- 34 doniesienia konferencyjne

Łączna liczba cytowań wszystkich publikacji – 114 (bez autocytowań – 63)

Łączny IF (zgodny z rokiem publikacji) – 47,761

Łączne punkty MNiSW (zgodne z rokiem publikacji) - 577

**Indeks H = 7;** (według Web of Science) (na dzień 09.07.2018)

Dorobek publikacyjny przed doktoratem: - 7 publikacji naukowych

- 12 doniesień konferencyjnych

Dorobek publikacyjny po doktoracie: - 20 publikacji

- 1 rozdział w monografii zagranicznej

- 22 doniesienia konferencyjne

Liczba projektów badawczych: 5 (Funkcja Kierownika – 1, Funkcja Wykonawcy – 4)

Nagrody za działalność naukową: 2

**Podsumowanie bibliometryczne dla całego dorobku naukowego:**

Wskaźnik IF		Punkty MNiSW	
z roku opublikowania	5-letni	z roku opublikowania	wg wykazu z 2016

## Główne osiągnięcie naukowe

12,095	13,683	139	165
--------	--------	-----	-----

## Pozostałe publikacje przed doktoratem

6,591	11,85	48	140
-------	-------	----	-----

## Pozostałe publikacje po doktoracie

23,883	26,199	281	315
--------	--------	-----	-----

## Komunikaty zjazdowe opublikowane w czasopiśmie naukowych przed doktoratem

2,195	6,912	44	105
-------	-------	----	-----

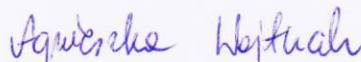
## Komunikaty zjazdowe opublikowane w czasopiśmie naukowych po doktoracie

2,997	4,247	65	73
-------	-------	----	----

## Cały dorobek naukowy

47,761	62,891	577	798
--------	--------	-----	-----

Łódź, 31.07.2018


.....  
Podpis