

dr Dorota Rybaczek

## **AUTOREFERAT**

Katedra Cytofizjologii

Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

Łódź, maj 2016

### 1. Imię i nazwisko

Dorota Rybaczek

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 2000 r. - dyplom ukończenia stacjonarnych 5-letnich studiów wyższych (magisterskich)
- Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego
  - **tytuł magistra biologii w zakresie fizjologii i biotechnologii**
  - tytuł pracy magisterskiej: "*Zawartość nadtlenu wodoru i aktywność: dysmutazy i oksydazy/peroksydazy NADH w liściach pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) traktowanych kwasem  $\beta$ -aminomasłowym i zakażonych *Botrytis cinerea* Pers"*
  - promotor pracy magisterskiej: Prof. dr hab. Henryk Urbanek
- 2003 r. - **stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii komórki** nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, z dnia 30 września 2003 roku
- tytuł rozprawy doktorskiej: "*Indukcja przedwczesnej kondensacji chromosomów w komórkach merystemów korzeni *Vicia faba*"*
  - promotor rozprawy doktorskiej: Prof. dr hab. Janusz Maszewski
  - rozprawa nagrodzona nagrodą Rektora UŁ

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 1.09.2003 - 30.09.2003 - **asystent** naukowo-dydaktyczny w Katedrze Cytofizjologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki
- od 1.10.2003 - do chwili obecnej - **adiunkt** naukowo-dydaktyczny w Katedrze Cytofizjologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

### 4. Urlopy macierzyńskie:

2009 r. - w związku z urodzeniem Córki

2012 r. - w związku z urodzeniem Syna

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

#### (a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Zachowanie się chromatyny w warunkach stresu replikacyjnego i podczas przedwczesnej kondensacji chromosomów

Chromatin behavior during replication stress and premature chromosome condensation

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 7 publikacji z lat 2007-2016, których sumaryczny IF (według roku publikacji - lub w przypadku prac wydanych w 2015 i 2016 - dla roku 2014) wynosi **12,765**, a liczba punktów MNiSW (według wykazu z dnia 18.12.2015) wynosi **185**.

Oświadczenia współautorów publikacji zawiera **Załącznik 5**.



**(b) Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania)**

Praca przeglądowa

- H1. **Rybaczek D**, 2011, Eidetic analysis of the premature chromosome condensation process. In: DNA Repair (Ed. Inna Kruman) InTech - Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, ISBN: 978-953-307-697-3, pp:185-204;

Autor korespondencyjny,

**Indywidualny wkład - 100%** (koncepcja pracy, przygotowanie szaty graficznej oraz napisanie i zredagowanie publikacji).

Prace oryginalne

- H2. **Rybaczek D**, Maszewski J, 2007, Phosphorylation of H2AX histones in response to double-strand breaks and induction of premature chromosome condensation in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Raphanus sativus*, *Vicia faba*, and *Allium porrum*. *Protoplasma* 230(1-2):31-39.

Autor korespondencyjny,

**Indywidualny wkład - 65%** (przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań i ich analiza, samodzielne przygotowanie szaty graficznej i zredagowanie pracy; współudział w opracowaniu koncepcji pracy, jej niektórych wyników i angielskiej wersji artykułu).

- H3. **Rybaczek D**, Bodys A, Maszewski J, 2007, H2AX foci in late S/G2- and M-phase cells after hydroxyurea- and aphidicolin-induced DNA replication stress in *Vicia*. *Histochem Cell Biol* 128(3):227-241.

Autor korespondencyjny,

**Indywidualny wkład - 60%** (przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań, samodzielne przygotowanie szaty graficznej i zredagowanie pracy; współudział w opracowaniu koncepcji pracy, jej niektórych wyników i angielskiej wersji artykułu).

- H4. **Rybaczek D**, Kowalewicz-Kulbat M, 2011, Premature chromosome condensation induced by caffeine, 2-aminopurine, staurosporine and sodium metavanadate in S-phase arrested HeLa cells is associated with a decrease in Chk1 phosphorylation, formation of phospho-H2AX and minor cytoskeletal rearrangements. *Histochem Cell Biol* 135(3):263-280.

Autor korespondencyjny,

**Indywidualny wkład - 95%** (koncepcja badawcza, przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań, analiza i opracowanie uzyskanych wyników, samodzielne przygotowanie szaty graficznej, współudział w analizie statystycznej uzyskanych wyników, samodzielne napisanie i zredagowanie manuskryptu).



- H5. **Rybaczek D**, Kowalewicz-Kulbat M, 2013, Relation of the types of DNA damage to replication stress and the induction of premature chromosome condensation. In: New Research Directions in DNA Repair (Ed. Clark Chen) InTech - Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, ISBN: 978-953-51-1114-6, pp:231-248.

*Autor korespondencyjny,*

**Indywidualny wkład - 95%** (koncepcja badawcza, przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań, analiza i opracowanie uzyskanych wyników, samodzielne przygotowanie szaty graficznej, współudział w analizie statystycznej uzyskanych wyników, samodzielne napisanie i zredagowanie manuskryptu).

- H6. **Rybaczek D**, Musiałek MW, Balcerczyk A, 2015, Caffeine-induced premature chromosome condensation results in the apoptosis-like programmed cell death in root meristem cells of *Vicia faba*. *PLoS ONE* 10(11):e0142307

*Autor korespondencyjny,*

**Indywidualny wkład - 90%** (koncepcja badawcza, przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań [poza elektroforezą DNA], samodzielna analiza i opracowanie uzyskanych wyników, współudział w przygotowaniu szaty graficznej pracy, samodzielne napisanie i zredagowanie manuskryptu).

- H7. **Rybaczek D**, 2016, Hydroxyurea-induced replication stress causes poly(ADP-ribose) polymerase-2 accumulation and changes its intranuclear location in root meristems of *Vicia faba*. *J Plant Physiol* 198:89-102.

*Autor korespondencyjny,*

**Indywidualny wkład - 100%** (koncepcja pracy, przygotowanie materiału do badań, samodzielne wykonanie badań, analiza i opracowanie uzyskanych wyników, przygotowanie szaty graficznej oraz napisanie i zredagowanie publikacji).

**Tabela 1. Wskaźniki Impact Factor** (podano wartości wskaźników IF dla czasopism z roku wydania publikacji, bieżący - z 2014 r. - oraz 5-letni), **punkty MNiSW** (podano wartości według wykazu z dnia 18.12.2015) oraz **liczba cytowań** (na podstawie bazy *Web of Science* z dnia 30 maja 2016 r.) **publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe**

Nr publikacji	Wskaźnik IF			Punkty MNiSW wg wykazu z dn. 18.12.2015	Indeks cytowań (WoS)
	z roku wydania publikacji	bieżący	5-letni		
H1	-	-	-	5	-
H2	1,493	2,651	2,72	30	16
H3	2,893	3,054	2,49	35	20
H4	2,588	3,054	2,49	35	7
H5	-	-	-	5	-
H6	3,234	3,234	3,7	40	1
H7	2,557	2,557	3,04	35	-
<b>Suma</b>	<b>12,765</b>	<b>14,55</b>	<b>14,44</b>	<b>185</b>	<b>44</b>



**(c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Prace, wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, cytowane są (w opisie zawartym w punkcie "c" - poniżej) zgodnie z nadaną im numeracją [H1-H7], pozostałe prace habilitanta - nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego cytowane są jako: **Załącznik 7.1-Załącznik 7.14**. Cytowana w tekście literatura uzupełniająca zamieszczona została na końcu rozdziału "c" (w porządku alfabetycznym).

**Zachowanie się chromatyny w warunkach stresu replikacyjnego i podczas przedwczesnej kondensacji chromosomów**

**WPROWADZENIE**

Problematyka badań prowadzonych przeze mnie w ramach niniejszej rozprawy habilitacyjnej dotyczy funkcjonowania dwóch wewnętrznych punktów kontrolnych fazy S, które blokują podziały komórkowe (mitozę) w przypadku pojawienia się strukturalnych uszkodzeń DNA, lub w przypadku spowolnienia albo zahamowania jego biosyntezy [Bartek i wsp. 2004]. Działanie tego mechanizmu uzależnione jest od sprawności szlaków transdukcji sygnałów wyzwalanych przez aparat sensoryczny komórki i przekazywanych do czynników efektorowych. Aktywacja systemu biochemicznego blokującego mitozę stwarza możliwość naprawy uszkodzeń DNA, zakończenia jego biosyntezy, lub - jeśli uszkodzenia okażą się być zbyt rozległe - indukcji programowanej śmierci komórki (PCD; *programmed cell death*) [H6].

Podjęte przeze mnie zadania badawcze polegały na poszukiwaniu skutecznych metod zaburzania funkcji tego systemu - tj. takich metod, które sprawiają, że punkty kontrolne fazy S przestają pełnić swoje funkcje regulacyjne, umożliwiając indukcję "nieuprawnionej" mitozy - przedwczesnej kondensacji chromosomów [H1].

**UKŁAD BADAWCZY**

Badane komórki poddano:

- (1) indukcji stresu replikacyjnego (wywoływanego wpływem hydroksymocznika [HU] lub afidikoliny [APH]). HU zmniejszał pulę dostępnych deoksyrybonukleotydów poprzez inhibitory wpływ na funkcję reduktazy rybonukleotydowej, natomiast APH stosowano jako klasyczny inhibitor polimerazy DNA;
- (2) indukcji przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) - wywoływanej głównie wpływem kofeiny [CF], stosowanej jednocześnie z HU (ale także 2-aminopuryny [2-AP], staurosporyny [ST] i wanadanu sodu [Van]);
- (3) synchronizacji cyklu komórkowego (przez 24-godziną inkubację w HU a następnie przez przeniesienie komórek do wody na kolejne 8 godzin);
- (4) monitorowaniu procesu regeneracji komórek (uprzednio blokowanych w trakcie fazy S wpływem HU).

**MATERIAŁ**

Materiałem do badań były:

- (1) komórki roślinne (merystematyczne komórki korzeni) głównie *Vicia faba* subsp. *minor* (bobik; prace H1-H3, H5-H7), ale także *Allium porrum* (por; praca H2) i *Raphanus sativus* (rzodkiewka; praca H2), oraz
- (2) ludzkie komórki nabłonkowe (HeLa) pochodzące z raka szyjki macicy, w hodowli *in vitro* (praca H4).



W pracy stosowano nomenklaturę przyjętą uprzednio podczas pisania rozprawy doktorskiej, z jednoczesnym uwzględnieniem aktualnego stanu wiedzy, opisanej w literaturze światowej [Cremer i wsp. 1982; Bezrookove i wsp., 2003; Kowalska i wsp., 2003; Gotoh i Durante, 2006; Gotoh, 2009; Darroudi i wsp., 2010; Cadwell i wsp, 2011; cyt za. H1]. Przyjęto - za Johnson'em i Rao [1970] - że badany proces jest **przedwczesną kondensacją chromosomów (PCC) [H1]**, a w trakcie indukowanej w sposób przedwczesny i wymuszony nieuprawnionej mitozy chromatyna interfazowa kondensuje, przybierając ostatecznie postać **przedwcześnie skondensowanych chromosomów; PCCs [Gotoh i Durante, 2006; H1]**.

Cytologicznymi symptomami PCC w badanych komórkach były: (1) nierównomierna kondensacja chromatyny w profazie; (2) fragmentacja chromosomów; (3) zaburzenia w układzie metafazowym; (4) obecność zagubionych lub poprzerywanych fragmentów chromatyd i chromosomów podczas anafazy; (5) defekty procesu segregacji chromosomów np. formowanie mostków chromosomowych i mikrojąder [H1; H6].

Dla uproszczenia opisywanych zjawisk przyjęto także, że komórki które - na poziomie mikroskopu świetlnego - nie wykazują symptomów PCC, są komórkami o fenotypie A (**fenotyp A** = brak symptomów PCC). Komórki o fenotypie B to takie, w których obserwowano  $\leq 20$  przerw w ciągłości chromosomów (określane były one także jako G2-PCC, ponieważ inicjowały PCC nie ukończywszy poreplikacyjnych procesów naprawczych w fazie G2 cyklu komórkowego). Z kolei komórki o fenotypie C (S-PCC) inicjowały przedwczesne mitozy z różnych podokresów fazy S (od wczesnych - przez środkowe do - późnych jej podokresów ; H1; H4; H6; Zał.7.7; Zał. 7-12).

## CEL NAUKOWY I ZNACZENIE PROWADZONYCH BADAŃ

Celem pierwszego etapu podjętych przeze mnie prac doświadczalnych było:

### (1) Sprawdzenie zakresu i rodzaju uszkodzeń DNA indukowanych:

- w warunkach fizjologicznych;
- podczas stresu replikacyjnego;
- podczas synchronizacji cyklu komórkowego (po uprzedniej indukcji stresu replikacyjnego);
- podczas indukcji PCC;
- w czasie regeneracji komórek, poddanych uprzednio indukcji PCC w warunkach przedłużającego się stresu replikacyjnego.

Na drugim etapie badań sprawdzano:

- jakie są konsekwencje indukowanych uprzednio uszkodzeń DNA;
- czy w ich następstwie dochodzi do eliminacji komórek na drodze programowanej śmierci (PCD);
- czy indukcja PCD mogła być powiązana z jednoczesną aktywacją mechanizmów prowadzących do włączenia odpowiedzi adaptacyjnych na warunki stresowe.

### H1.

Rybaczek D, 2011, Eidetic analysis of the premature chromosome condensation process. In: DNA Repair (Ed. Inna Kruman) InTech - Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, ISBN: 978-953-307-697-3, pp:185-204.

### Cel naukowy pracy i syntetyczne omówienie wyników:

Celem niniejszej pracy było usystematyzowanie wiedzy dotyczącej procesu przedwczesnej kondensacji chromosomów. W pracy wykazano, że termin "PCC" nierozłącznie związany jest z nazwiskami P. N. Rao i R. T. Johnsona [1970] oraz ich doświadczeniami nad przedwczesną mitozą indukowaną w wyniku fuzji interfazowych i mitotycznych komórek HeLa (G1/M, S/M oraz G2/M).



Wykazano także, że indukcja procesu PCC nastąpić jednak może także na drodze chemicznej i często chemiczna indukcja PCC jest poprzedzona synchronizacją cyklu komórkowego np. w fazie S (tak, jak to mam miejsce w pozostałych pracach składających się na osiągnięcie naukowe: **H2, H4-H6**).

W pracy wykazano, że stabilność genomu wynika przede wszystkim z przemienności fazy S i mitozy. Dodatkowo, wykazano, że indukcja PCC jest możliwa z różnych podokresów cyklu komórkowego. Co więcej wykazane zostało istnienie związków przyczynowo-skutkowych między strukturą chromosomów określającą „fenotyp PCC”, a podokresami np. fazy S inicjującymi biosyntezę „wczesnych” lub „późnych” replikonów. W pracy podjęto zatem próbę odpowiedzi na pytanie: jak zmusić komórki do wyłamania się z reguł, które Natura wypracowywała przez miliardy lat? Jak – mimo przerwanej, nieukończony jeszcze procesu replikowania genomu – zmusić komórkę do zainicjowania podziału? Jakie mechanizmy niweczą sprawdzoną w toku ewolucji zasadę subordynacji: najpierw twórz (faza S, powielająca DNA), potem dziel (mitoza – stadium kondensacji DNA i formowania siostrzanych jąder potomnych)? Ingerowanie w systemy regulacyjne cyklu komórkowego nie jest sprawą prostą. Pula genów, których produkty uczestniczą w tworzeniu tych systemów wciąż zmienia się w czasie, formując ustawicznie nowe układy i nowe interakcje. Z ich mnogości i stopnia skomplikowania, z możliwości włączania mechanizmów zastępczych i biochemicznych systemów awaryjnych, wynikają ogromne trudności w opracowaniu skutecznych i selektywnych metod powstrzymujących proliferację komórek nowotworowych. Badania nad mechanizmami hamującymi podziały komórek wydają się więc najkrótszą drogą prowadzącą do celu. W tym rozdziale [**H1**] wykazano celowość podejmowania prób wymuszenia podziałów w komórkach – przy jednoczesnym nawiązywaniu do strategii w terapii antynowotworowej. Zjawisko PCC stanowi bowiem, w rzeczywistości, nie tylko istotny problem podstawowy w biologii cyklu komórkowego, ale jest także zagadnieniem niezmiernie ważnym ze względu na zastosowania praktyczne. Metody radio- i chemioterapii stosowane w leczeniu chorób nowotworowych prowadzą do rozległych uszkodzeń DNA, wstrzymujących proces replikacji materiału genetycznego, a mimo tego zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych ma jednak najczęściej charakter albo przejściowy, albo obejmujący tylko część ich populacji. W pracy podjęto także próbę wyjaśnienia molekularnego podłoża indukcji PCC do czego punktem wyjścia była biochemiczna organizacja punktów kontrolnych fazy S blokujących inicjację mitozy i mechanizmy umożliwiające przełamywanie ich restrykcyjnych oddziaływań.

## H2.

Rybaczek D, Maszewski J, 2007, Phosphorylation of H2AX histones in response to double-strand breaks and induction of premature chromosome condensation in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Raphanus sativus*, *Vicia faba*, and *Allium porrum*. *Protoplasma* 230(1-2):31-39.

### Cel naukowy pracy i syntetyczne omówienie wyników:

Celem niniejszej pracy było przetestowanie czy indukcji stresu replikacyjnego i PCC towarzyszy fosforylacja histonu H2AX na serynie 139 (tj. fosforylacja markerowa dla dwuniciowych pęknięć DNA). W pracy postawiono także pytanie: czy na wydajność indukcji PCC mogą wpływać różnice w zawartości 2C DNA u badanych gatunków roślin, a co za tym idzie - czy na wydajność indukcji PCC i generowanie uszkodzeń DNA typu dwuniciowych pęknięć może mieć wpływ typ budowy jądra komórkowego. Dotychczas nie było bowiem pewne czy wszystkie zaburzenia replikacji DNA wykrywane są przy pomocy jednego tylko, uniwersalnego mechanizmu sensorycznego. Być może, bez względu na rodzaj czynnika blokującego fazę S, struktura DNA generowana przez widełki replikacyjne w miejscu uszkodzenia jest jednakowa. Nie można było także wykluczyć, że każdy rodzaj zaburzenia struktury DNA wywiera odmienny, specyficzny wpływ na widełki replikacyjne, a czynniki rozpoznające poszczególne rodzaje uszkodzeń także są różne [cyt. za **Osborn i wsp. 2002**].



W pracy badano trzy gatunki roślin różniące się poziomem zawartości 2C DNA i typem jądra komórkowego:

- (i) *Raphanus sativus* (rzodkiewka) - jądro chromocentryczne, zawartość 2C DNA: 1.3 pg;
- (ii) *Vicia faba* (bobik) - jądro siateczkowate z chromocentrami, zawartość 2C DNA: 26.1 pg;
- (iii) *Allium porrum* (por) - jądro siateczkowate, zawartość DNA: 65.3 pg [Johnston i wsp. 1999].

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że rozproszona chromatyna rzodkiewki okazała się być najbardziej podatna na generowanie dwuniciowych pęknięć DNA, a chromatyna w jądrach komórkowych pora - o najwyższej z badanych zawartości DNA - najmniej podatna (średnia liczba foci H2AXS139ph w przeliczeniu na jądro w fazie G2 wynosiła odpowiednio: 35.6 dla rzodkiewki, 20.0 dla jąder komórkowych bobiku i w końcu: 13.8 dla pora). Jednocześnie wykazano, że chromatyna *R. sativus* jest najbardziej oporna na działanie czynników, które - przez omijanie funkcji punktów kontrolnych - prowadzić mogą do indukcji PCC. Z dalszych analiz wykluczono też chromatynę jąder siateczkowatych *A. porrum*, z powodu skrajnie małej podatności na synchroniczne wchodzenie w podział mitotyczny, a co za tym idzie - skrajnie niski wskaźniki indeksu mitotycznego. Stąd decyzja by do dalsze analizy ograniczyć wyłącznie do merystatycznych komórek korzeni *Vicia faba* subsp. *minor*.

### H3.

Rybaczek D, Bodys A, Maszewski J, 2007, H2AX foci in late S/G2- and M-phase cells after hydroxyurea- and aphidicolin-induced DNA replication stress in *Vicia*. *Histochem Cell Biol* 128(3):227-241.

#### Cel naukowy pracy i syntetyczne omówienie wyników:

Celem kolejnej pracy składającej się na przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe było porównanie efektywności:

- (i) bloku replikacyjnego wywołanego - w komórkach *V. faba* - wpływem hydroksymocznika (HU) i afidikoliny (APH);
- (ii) synchronicznego wchodzenia w mitozę, po uprzednim blokowaniu fazy S wpływem HU lub APH;
- (ii) generowania foci H2AXS139 indukowanych wpływem HU i APH (ze szczególnym uwzględnieniem ich ilości, rozmieszczenia i wielkości).

Sekwencją wyróżniającą H2AX jest C-końcowy motyw SQ(D/E)(I/L/Y), w którym  $\gamma$ -fosforylacja seryny (u ssaków Ser139) uznawana jest za modyfikację markerową dwuniciowych pęknięć DNA (DSB). Badania immunocytochemiczne (potwierdzone biochemicznie techniką Western blot) wykazały, że stres replikacyjny wywołany działaniem hydroksymocznika lub afidikoliny indukuje formowanie się ognisk  $\gamma$ -H2AX w specyficznych regionach jąder komórkowych *V. faba* [H3; Zał.7.6]. Wykazana w pracy zbieżność miejsc znakowania przeciwciałami  $\alpha$ -Chk1S317 i  $\alpha$ -H2AXS139 wydaje się sugerować, że ogniska kumulujące cząsteczki ufosforylowanych histonów H2AX - przynajmniej częściowo - pokrywają się z regionami wzmożonej aktywności kinazy Chk1 [H3]. Zastosowanie - w celu indukcji bloku replikacyjnego - co najmniej dwóch inhibitorów replikacji (HU i APH) oraz wynikające z tego różnice w efektywności synchronizacji cyklu komórkowego *V. faba* skłoniły mnie do zaplanowania dalszych eksperymentów już wyłącznie na modelu blokowania komórek w fazie S wpływem 2.5 mM roztworu HU (stosowanego przez okres 24 godzin).



**H4.**

Rybaczek D, Kowalewicz-Kulbat M, 2011, Premature chromosome condensation induced by caffeine, 2-aminopurine, staurosporine and sodium metavanadate in S-phase arrested HeLa cells is associated with a decrease in Chk1 phosphorylation, formation of phospho-H2AX and minor cytoskeletal rearrangements. *Histochem Cell Biol* 135(3):263-280.

**Cel naukowy pracy i syntetyczne omówienie wyników:**

Celem niniejszej pracy było wykazanie czy skuteczność indukcji PCC jest podobna u roślin i w komórkach zwierzęcych?

Badania wstępne wykazały, że zdolność do zainicjowania przedwczesnej mitozy przez komórki, które zakończyły replikację DNA i znajdują się w fazie G2, pojawia się – pod wpływem induktora PCC (kofeiny) – niemal natychmiast; równie szybko i niemal równie liczne subpopulacje merystematycznych komórek w korzeniach *V. faba* inicjują przejście G2→PCC w wyniku działania wortmanniny, 2-aminopuryny, staurosporyny, wanadanu sodu, kalikuliny A, estru forbolu, dioktanoglicerolu czy ICRF-193 (Załącznik 7.7). Pojawienie się przedwczesnych mitoz o fenotypie C, w komórkach które nie ukończyły biosyntezy części sekwencji DNA, wiąże się jednak z upływem dość długiego okresu czasu (ok. 6 - 8 godzin); zdolność do indukcji PCC w tej kategorii komórek (możliwość przejścia S→PCC) wykazuje tylko kofeina i ester forbolu (PMA). Reakcje merystematycznych komórek korzeni *Vicia faba* i komórek HeLa na stres replikacyjny i indukcję PCC skłaniają do poszukiwania sposobu zmuszenia jak największej liczby komórek do samobójczej mitozy. Wyniki wstępnych badań cytologicznych i ultrastrukturalnych sugerują, że komórki inicjujące PCC są jednocześnie – paradoksalnie – częściowo zwracane ze szlaku apoptotycznej degradacji. Powstaje zatem pytanie, czy istnieje możliwość takiej ingerencji w układy odpowiedzialne za regulację cyklu komórkowego u *Vicia faba* i w komórkach HeLa, aby doprowadzić do masowej indukcji PCC, przy jednoczesnym wyeliminowaniu możliwości wydajnej naprawy DNA po to, aby skierować możliwie największą liczbę komórek na szlak programowanej śmierci?

W pracy wykazano, że:

- indukcja PCC w komórkach HeLa zachodzi na drodze Chk1-zależnej;
- indukcji PCC towarzyszy generowanie uszkodzeń DNA i formowanie mikrojąder;
- niewielka część komórek indukowanych do PCC wkracza następnie na szlak apoptozy;
- najskuteczniejszym induktorem PCC w komórkach HeLa okazała się być staurosporyna.

**H5.**

Rybaczek D, Kowalewicz-Kulbat M, 2013, Relation of the types of DNA damage to replication stress and the induction of premature chromosome condensation. In: *New Research Directions in DNA Repair* (Ed. Clark Chen) InTech - Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, ISBN: 978-953-51-1114-6, pp.231-248.

**Cel naukowy pracy i syntetyczne omówienie wyników:**

Celem niniejszej pracy było dokonanie oceny ilości i typu uszkodzeń DNA generowanych w warunkach stresu replikacyjnego wywołanego wpływem 2.5 mM HU oraz podczas indukcji PCC wywołanej wpływem 5 mM kofeiny (w warunkach stale utrzymującego się stresu replikacyjnego).

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że: (i) traktowanie komórek HU (stres replikacyjny), a następnie co-traktowanie HU/CF (omijanie funkcji punktów kontrolnych) prowadzi do indukcji PCC zarówno z fazy S (S-PCC) jak i z fazy G2 (G2-PCC) cyklu; (ii) występowanie aberracji chromosomowych w przebiegu PCC jest związane z generowaniem uszkodzeń w cząsteczkach DNA; (iii) uszkodzenia DNA indukowane przez HU są - w większości - uszkodzeniami typu dwuniciowych pęknięć DNA (DSBs); (iv) uszkodzenia DNA generowane przez mieszaninę indukującą PCC (HU/CF) są - w znacznej mierze - uszkodzeniami typu jednociowych pęknięć DNA (SSBs).



H6.

Rybaczek D, Musiałek MW, Balcerczyk A, 2015, Caffeine-induced premature chromosome condensation results in the apoptosis-like programmed cell death in root meristem cells of *Vicia faba*. *PLoS ONE* 10(11):e0142307.

#### Cel naukowy pracy i syntetyczne omówienie wyników:

W pracy opisano wyniki eksperymentów prowadzonych przeze mnie od 2003 roku. Przez te wszystkie lata obserwowałam, że część jąder zaindukowanych do przedwczesnej mitozy pod wpływem kofeiny (w warunkach stale utrzymującego się stresu replikacyjnego) wkracza na szlak śmierci komórkowej. W tamtych czasach dbałam szczególnie o to żeby nie utożsamiać obserwowanych zjawisk z procesem apoptozy, znanym i szeroko opisywanym w literaturze naukowej w kontekście komórek drożdży, zwierząt i ludzi. Klasyfikacja różnych typów śmierci wprowadzona przez van Doorn'a w 2011 roku i kolejne prace Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD), także mające na względzie usystematyzowanie wiedzy w tym zakresie (Kroemer i wsp. 2009; Galluzzi i wsp. 2012), stały się dla mnie podstawą do sformułowania wniosku o występowaniu autolityczno-wakuolarnej programowanej śmierci komórki typu apoptotycznego ([V/A] AL-PCD) w komórkach *V. faba*. Niniejsza praca jest, w pewnym sensie, zwieńczeniem 12 lat pracy na 'moim' modelu badawczym. W pracy stwierdzono, że wkraczanie na szlak programowanej śmierci w badanych komórkach było konsekwencją rozległych uszkodzeń generowanych podczas kofeino-zależnej indukcji PCC.

H7.

Rybaczek D, 2016, Hydroxyurea-induced replication stress causes poly(ADP-ribose) polymerase-2 accumulation and changes its intranuclear location in root meristems of *Vicia faba*. *J Plant Physiol* 198:89-102.

#### Cel naukowy pracy i syntetyczne omówienie wyników:

W niniejszej pracy badano:

- wewnątrzjądrową akumulację białka PARP-2 (markera SSBs, Isabelle et al. 2010) w warunkach indukowanego HU stresu replikacyjnego;
- zjawisko wewnątrzjądrowego przemieszczania się białka PARP-2 w zależności od czasu trwania i/lub intensywności stresu replikacyjnego indukowanego HU;
- kolokalizację PARP-2 i fosfo-formy histonu H2AXS139;
- użyteczność białka PARP-2 jako białka markerowego w określaniu intensywności stresu replikacyjnego;
- zachowanie się białka PARP-2 podczas regeneracji merystemów *V. faba* (po uprzednim stresie replikacyjnym).

W pracy stosowano hydroksymocznik (HU) - najlepiej poznany i najczęściej stosowany induktorem stresu replikacyjnego w komórkach roślinnych, zwierzęcych i ludzkich. HU hamuje widełki replikacyjne w sposób pośredni, przez blokowanie katalitycznej domeny reduktazy rybonukleotydomowej (RNR) [Roa et al. 2009; Koç et al. 2004; Alvino et al. 2007]. Zanik aktywności RNR, przekształcającej rybonukleotydy w trifosforany deoksyrybonukleozydów (dNTP, prowadzi do: (i) zachwiania bilansu ilościowego prekursorów niezbędnych do syntezy DNA [Chabes and Thelander 2000; Osborn et al. 2002]; oraz (ii) zmniejszenia szybkości replikacji poprzez zaktywowanie punktów kontrolnych fazy S (S-phase checkpoints) [Bartek et al. 2004; Rybaczek and Kowalewicz-Kulbat 2011; Hartsuiker i wsp. 2001]. Badania nad wzbudzeniem aktywności punktów kontrolnych fazy S przez HU wykazały, że mimo ograniczenia puli endogennych dNTP proces replikacji DNA nie zostaje zatrzymany całkowicie a jedynie jest silnie ograniczony, w celu umożliwienia stabilizacji widełek replikacyjnych [reviewed by Bartek et al. 2004; Boddy and Russell 2001] oraz zachowania zdolności do kontynuacji biosyntezy DNA bezpośrednio po zniesieniu bloku replikacyjnego, już bez konieczności montażu *de novo* kompleksów replikacyjnych [Dimitrova and Gilbert 2000; Desany et al. 1998; Boddy and



**Russell 2001; Santocanale and Diffley 1998; Shirahige et al. 1998**]. W zależności od typu komórek, stężenia inhibitora i czasu inkubacji HU blokuje komórki na granicy faz G1/S [**Sree et al. 2012**], w fazie S [**Hartsuiker et al. 2001**], na granicy faz S/G2 [**Rybaczek et al. 2008**] lub w fazie G2 [**Krause et al. 2001**].

Przeprowadzone badania potwierdziły przydatność PARP-2 jako markera intensywności natężenia stresu replikacyjnego (analogicznie do markerowej dla DSBs fosforylacji Ser139 histonu H2AX). Wykazano, że wydłużenie czasu trwania stresu indukowanego przez HU zwiększa ilość foci PARP-2-specyficznych, które korespondują z ilością foci H2AX-specyficznych. Co więcej, wraz ze wzrostem ilości PARP-2-pozytywnych foci osiągane są przez nie kolejne kompartmenty wewnątrzjądrowe. Przy małym natężeniu stresu replikacyjnego – okolice otoczki jądrowej, następnie – frakcje interchromatynowe, kolejno – heterochromatyna okołojąderkowa i ostatecznie – przy największym natężeniu bodźca stresowego – kompartment jąderkowy.

## PODSUMOWANIE

Analizy prowadzone w ramach rozprawy habilitacyjnej wskazują, że odpowiedź badanych komórek na stres genotoksyczny oraz następującą po nim indukcję PCC jest procesem złożonym. Do najważniejszych wyników należy zaliczyć:

1. Wykazanie, że indukcja PCC powoduje znaczne zmiany w materiale genetycznym: liczne aberracje chromosomowe (zarówno w jądrach typu S-PCC jak i G2-PCC), formowanie mikrojąder, defekty w segregacji chromosomów [**H1, H2, H4, H6**], co - w efekcie końcowym - prowadzić może do niestabilności chromosomowej (CIN);
2. Wykazanie zwiększonego poziomu uszkodzeń DNA po działaniu HU i podczas indukcji PCC. Stwierdzenie, że HU generuje głównie dwuniciowe pęknięcia DNA (DSBs - double strand breaks), podczas gdy kofeino-zależna indukcja PCC prowadzi do wzrostu liczby uszkodzeń DNA typu jednoniciowych pęknięć (SSBs - single strand breaks) [**H5;H6**]. Białkiem markerowym dla jednoniciowych pęknięć - badanym podczas prac nad rozprawą habilitacyjną - była polimeraza poli(ADP-rybozy) [**Isabelle i wsp., 2010; H5;H7**], natomiast białkiem markerowym dla dwuniciowych pęknięć DNA była fosfo-forma histonu H2AXS139ph [**Paull i wsp., 2000; Rogakou i wsp., 1998, H2-H7**];
3. Opracowanie wydajnej metody synchronizacji komórek *V. faba* i wykazanie, że synchroniczne wejście w mitozę (po uprzednim bloku wywołanym HU) jest możliwe mimo obecności w cząsteczkach DNA uszkodzeń typu DSBs [**H3**];
4. Udowodnienie, że rozproszona chromatyna w jądrach chromocentrycznych *R. sativus* jest bardziej podatna na generowanie uszkodzeń typu DSBs, ale także bardziej oporna na działanie czynników, które - omijając funkcję punktów kontrolnych - prowadzić mogą do indukcji PCC [**H2**];
5. Wykazanie, że następstwem indukowanych kofeiną uszkodzeń DNA jest inicjowanie PCD.
6. Stwierdzenie występowania klasycznej apoptozy w komórkach HeLa [**H4**];
7. Wykazanie występowania wakuolarno-autolitycznej programowanej śmierci komórki typu apoptotycznego ([V/A] AL-PCD) w merystemach korzeni *V. faba* [**H6**];
8. Stwierdzenie, że długotrwały stres replikacyjny indukowany 1- lub 2-dobową inkubacją w roztworze HU powoduje wzrost aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy) [PARP-2], enzymu markerowego dla uszkodzeń DNA. Stwierdzono, że wzrostowi ilości PARP-2 towarzyszy zmiana ich wewnątrzjądrowej lokalizacji tj. przemieszczenie z epichromatynowych (brzeżnych, por. **Olins i wsp., 2011**) obszarów jądra komórkowego ku jego wnętrzu, aż do osiągnięcia kompartmentu jąderkowego (co następuje w warunkach najdłużej działającego stresu replikacyjnego i jest poprzedzone PARP-2-specyficznym wyznakowaniem heterochromatyny okołojąderkowej [**H7**]



Na posiedzeniu Rady Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Łódzkiego w dniu 10 maja 2016 roku przedstawiłam tezy mojej rozprawy habilitacyjnej, które zostały przyjęte jednomyślnie w głosowaniu jawnym, co upoważniło mnie do ubiegania się o wszczęcie procedury habilitacyjnej.

#### LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

Alvino GM, Collingwood D, Murphy JM, Derlow J, Brewer Bj, Raghuraman MK, 2007, Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol Cell Biol* 27 6396-6406;

Bartek J, Lukas C, Lukas J, 2004, Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:792-804;

Bezrookove V, Smits R, Moeslein G, Fodde R, Tanke HJ, Raap AK, Darroudi F, 2003, Premature chromosome condensation revisited: a novel chemical approach permits efficient cytogenetic analysis of cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 38:177-186;

Boddy MN, Russell P, 2001, DNA replication checkpoint. *Curr Biol* 11:R953-R956;

Cadwell KK, Curwen GB, Tawn EJ, Winther JF, Boice JD Jr., 2011, G2 checkpoint control and G2 chromosomal radiosensitivity in cancer survivors and their families. *Mutagenesis* 26:291-294;

Chabes A, Thelander L, 2000, Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J Biol Chem* 275:17747-17753;

Cremer T, Cremer C, Baumann H, Luedtke E-K, Sperling K, Teuber V, Zorn C, 1982, Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet* 60: 46-65;

Darroudi F, Bergs JWJ, Berookove V, Buist MR, Stalpers LJ, Franken NAP, 2010, PCC and COBRA-FISH a new tool to characterize primary cervical carcinomas: To assess hall-marks and stage specificity. *Cancer Lett* 287:67-74;

Desany BA, Alcasabas AA, Bachant JB, Elledge SJ, 1998, Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathways. *Genes Dev* 12:2956-2970;

Dimitrova DS, Gilbert DM, 2000, Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis. *Nat Cell Biol* 2:686-694;

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al., 2012, Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 19:107-120;

Gotoh E, Durante M, 2006, Chromosome condensation outside of mitosis: mechanism and new tools. *J Cell Physiol*, 2009:1-9;

Gotoh E, 2009, Drug-induced premature chromosome condensation (PCC) protocols: cytogenetic approaches in mitotic chromosome and interphase chromatin, In: *Chromatin Protocols: Second Edition*, series: *Methods in Molecular Biology*, Srikumar P Cellappan, 523:83-92, Humana Press;

Hartsuiker E, Vaessen E, Carr AM, Kohli J, 2001, Fission yeast Rad50 stimulated sister chromatid recombination and links cohesion with repair. *EMBO J*, 20:6660-6671;



- Isabelle M, Moreel X, Gagnè J-P, Rouleau M, Ethier C, Gagnè P, Handzel MJ, Poirier GG, 2010, Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Science* 8:22;
- Johnson RT, and Rao PN, 1970, Mammalian cell fusion: Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226:7127-722;
- Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, Galbraith DW, Price HJ, 1999, Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am J Bot* 86:609-613.
- Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF, 2004, Hydroxyurea arrest DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* 279:223-230;
- Kowalska A, Srebniak M, Wawrzkiwicz A, Kamiński K, 2003, The influence of calyculin A on lymphocytes *in vitro*. *J Appl Genet* 44:413-418;
- Krause SA, Loupert M-L, Vass S, Schoefelder S, Harrison D, Heck MMS, 2001, Loss of the cell cycle checkpoint control in *Drosophila* RFC mutants. *Mol Cell Biol* 21:5156-51-68;
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehre-hecke EH, et al., 2009, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, 16:3-11;
- Olins AL, Langhans M, Monestier M, Schlotterer A, Robinson DG, Viotti C, et al, 2011, An epichromatin epitope: persistence in the cell cycle and conservation in evolution. *Nucleus* 2:47-60;
- Osborn AJ, Elledge SJ, Zou L, 2002, Checking of the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* 12:509-516;
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM, 2000, A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, 10:886-895;
- Roa H, Lang J, Culligan KM, Keller M, Holec S, Coqnat V, et al, 2009, Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 151:461-471;
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM, 1998, DNA-double stranded DNA breaks induce histone H2AX phosphorylation on serie 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868;
- Santocanale C, Diffley JF, 1998, A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 395:615-618;
- Shirahige K, Hori Y, Shiraishi K, Yamashita M, Takahashi K, Obuse C, et al., 1998, Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* 395:618-621;
- Sree NK, Anesh R, Radha V, 2012, Dynamic changes in nuclear localization of a DNA-binding protein tyrosine phosphatase TCPTP in response to DNA damage and replication arrest. *Cell Biol Toxicol*, 28:409-419;
- van Doorn WG, 2011, Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J Exp Bot*, 63:4749-4761;



**(d) Dalsze plany badawcze**

W wyniku zrealizowania badań finansowanych z czterech grantów UŁ (własnych, tzw. habilitacyjnych), grantu N N303 355 935 (którego byłam kierownikiem) i projektu POMOST/2011-4/8 (którego byłam koordynatorem) zyskałam pewność, że po zakończeniu procedur związanych z uzyskaniem habilitacji chcę ukierunkować prowadzoną przeze mnie działalność naukową na zagadnienia związane ze współzależnościami replikacji DNA i mitozy (zależności S-M i M-S w cyklu komórkowym). Aktualnie jest wysłana do druku praca, w której opisano zjawisko kontynuacji uprzednio zablokowanej replikacji DNA w chromatynie mitotycznej typu PCC. Wynik ten zaburza powszechnie panujący pogląd o genetycznej inercji silnie skondensowanej chromatyny mitotycznej:

**Rybaczek D**, Vrána J, Ciszewski WM, Wnuk M, Balcerczyk A, Petrovská B, Bartosz G, Doležel J, 2016, Induction of premature chromosome condensation causes an imbalance of the heterochromatin and deregulation of replication timing in root meristems of *Vicia faba*. *PLoS Genet*, w recenzji

Dzięki współpracy z profesorem Jaroslav'em Doleželem i Jego zespołem (Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometry, Institute of Experimental Botany AS CR, v. v. i., Olomouc, Czech Republic) oraz zrealizowanemu na terenie tego ośrodka stażowi naukowemu, udało się ostatecznie udowodnić, że: (i) ujawniona w przebiegu PCC zdolność do replikacji DNA świadczy o możliwości łączenia (*in vivo*) zarówno cech stanu mitotycznego, jak i stanu gotowości do replikacji DNA, a także że (ii) obserwowana replikacja jest kontynuacją biosyntezy DNA uprzednio zatrzymanej w przebiegu fazy S, a nie włączaniem prekursorów DNA w procesie o charakterze wyłącznie reperacyjnym (naprawczym).

Dodatkowo, w 2014 roku opublikowałam pracę (zawierającą, w części, wyniki z mojej rozprawy doktorskiej), w której wskazuję na specyficzną organizację strukturalną przedwcześnie skondensowanych chromosomów:

**Rybaczek D**, 2014, Ultrastructural changes associated with the induction of premature chromosome condensation in *Vicia faba* root meristem cells. *Plant Cell Rep* 33(9):1547-64.

Na bazie tych zainteresowań opublikowałam także (we współautorstwie z moimi magistrantkami - stypendystkami w programie POMOST/2011-4/8) dwie prace przeglądowe traktujące o znaczeniu replikacji DNA dla zachowania integralności genomu:

Mazurczyk M, **Rybaczek D**, 2015, Replication and re-replication: different implications of the same mechanism. *Biochimie* 108:25-32.

Musiątek MW, **Rybaczek D**, 2015, Behavior of replication origins in Eukaryota – spatio-temporal dynamics of licensing and firing. *Cell Cycle* 14(14):2251-64.

Kolejnym etapem podejmowanych przeze mnie badań będzie monitorowanie miejsc inicjacji replikacji i zachowania się widełek replikacyjnych prowadzone na modelu merystemów korzeni *V. faba*, w wybranych liniach komórek nowotworowych i na modelu komórek *Xenopus*, dokonywane we współpracy z profesorem J. Juliane'em Blow'em w Wellcome Trust Centre for Gene Regulation & Expression (University of Dundee, UK), jako kontynuacja współpracy zainicjowanej w ramach mojego projektu POMOST. Planuję także, bezpośrednio po zakończeniu procedur związanych z uzyskaniem stopnia doktora habilitowanego, wystąpić z projektem dotyczącym epigenetycznej regulacji procesu przedwczesnej kondensacji chromosomów (projekt ten - szczególnie w swym aspekcie proteomicznym - zakłada ścisłą współpracę z profesorem Jaroslav'em Doleželem z Institute of Experimental Botany, AS CR).



**(e) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Prace naukowe nie wchodzące w skład osiągnięcia są cytowane zgodnie z wykazem opublikowanych prac naukowych (Załącznik 7) jako kolejno: **Zał. 7.1 - Zał. 7.14.**

**(e.1) Początki pracy naukowej - do uzyskania tytułu magistra**

Działalność naukową rozpoczęłam od pracowni magisterskiej, 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 traktowaniu liści pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) kwasem  $\beta$ -aminomasłowym, a następnie zakażaniu ich zarodnikami *Botrytis cinerea* Pers. W ramach pracy magisterskiej dokonywano pomiarów zawartości nadtlenu wodoru, a także badano aktywność enzymów: dysmutazy ponadtlenkowej i oksydazy/peroksydazy NADH. W pracy wykazano, że elicytacja roślin, które następnie są zakażane, prowadzi do osłabienia reakcji na zakażenie. Pracę magisterską obroniłam z wynikiem bardzo dobrym.

Część wyników pracy magisterskiej została zaprezentowana na V Międzynarodowym Sympozjum: Wolne Rodniki w Biologii i Medycynie (czerwiec, 2000 r.):

Patykowski J, **Chrzanowska (Rybaczek) D**<sup>1</sup>, Wyrwicka-Maciejewska A, Kuźniak E, Urbanek H, 2000, Changes of peroxidase activity and ascorbic contents in cytosol and apoplast of tomato leaves after *Botrytis cinerea* infection – komunikat zjazdowy na V Międzynarodowe Sympozjum: Wolne Rodniki w Biologii i Medycynie („Free Radicals in Biology and Medicine”) – czerwiec, Łódź.

W trakcie studiów byłam współinicjatorką, a następnie członkiem Sekcji Fizjologii i Ekobiotechnologii Roślin Studenckiego Koła Naukowego Biologów - aktywnie i twórczo zaangażowanym w jego działalność naukową (opiekunem naukowym Sekcji była wówczas dr hab. Elżbieta Kuźniak-Gębarowska, prof. nadzw. UŁ). Za osiągnięcia podjętych przez nas zespołowych prac eksperymentalnych nad wpływem zanieczyszczeń atmosferycznych na pro- i antyoksydacyjne reakcje liści klonu wyróżnieni zostaliśmy III nagrodą za najlepszy poster podczas XXXVIII Ogólnopolskiej Konferencji STN Akademii Medycznej w Łodzi (maj, 2000 r.):

**Chrzanowska (Rybaczek) D**, Wyrwicka-Maciejewska A, Majorowicz H, Banasik E, Caban E, 2000, Wybrane elementy pro- i antyoksydacyjnej reakcji liści klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) na stres abiotyczny związany z zanieczyszczeniami atmosferycznymi – praca w ramach Sekcji Fizjologii i Ekobiotechnologii Roślin Studenckiego Koła Naukowego Biologów na XXXVIII Ogólnopolską Konferencję STN Akademii Medycznej w Łodzi, Łódź 12-13 maja.

**(e.2) 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, gdzie mogłam poszerzać swoje zainteresowania biologią eksperymentalną. W Katedrze Cytofizjologii, pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Maszewskiego, prowadziłam badania nad indukcją przedwczesnej kondensacji chromosomów w komórkach merystemów korzeni *Pisum sativum* i *Vicia faba*.

W czasie trwania I i II roku studiów doktoranckich prof. dr hab. Janusz Maszewski zaproponował mi współudział w realizacji kierowanego przez Niego projektu badawczego pt. "Rola fosforylacji i defosforylacji białek w regulacji cyklu komórkowego i endoreduplikacji DNA u roślin" (**grant KBN nr 6 PO4C 026 17**). Mój udział w tym projekcie był nieformalny, ale stałam się pierwszą autorką publikacji wchodzącej w skład artykułów rozliczających dorobek grantu [**Zał. 7.1**]:



Rybaczek D, Polit J, Łuchniak P, Maszewski J, 2002, Induction of premature mitosis in root meristem cells of *Vicia faba* and *Pisum sativum* by various agents is correlated with an increased level of protein phosphorylation. *Folia Histochem Cytobiol* 40(1):51-9.

Współrealizowane przez nas badania dotyczyły wpływu inhibitora fosfataz białkowych (wanadanu sodu) i szeregu inhibitorów kinaz cyklicznych (m.in. 2-aminopuryny, benzyloaminopuryny, olomoucyny, staurosporyny i 6-dimetyloaminopuryny) na zdolność do indukcji nieprawidłowych (aberracyjnych) podziałów mitotycznych. Osobiście prowadziłam jakościową i ilościową analizę zmian kariologicznych związanych z wymuszoną kondensacją chromosomów w komórkach merystemów korzeni zarodkowych *P. sativum* i *V. faba*. Realizując przypisaną mi część zadań wykazałam, że czynnikami indukującymi PCC może być nie tylko kofeina i niektóre inhibitory cyklicznych kinaz białkowych (CDK), ale także podobna do nich pod względem struktury chemicznej benzyloaminopuryna (fitohormon) i wanadan sodu (inhibitor fosfatazy cdc25). Dodatkowo, analizy prowadzone z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał rozpoznających fosfotreoninę sugerowały, że PCC indukowane kofeiną wiązało się - u obu badanych gatunków - z nasiloną ekspresją CDK. Powyższe badania, wykonane przeze mnie zaledwie w ciągu roku pracy, opublikowane zostały w *Folia Histochemica et Cytobiologica* [Załącznik 7.1] i stały się podstawą do ubiegania się o grant promotorski (projekt zgłoszony do Komitetu Badań Naukowych został zakwalifikowany do finansowania na lata 2001-2003 i otrzymał numer **3PO4C 030 24**; tytuł projektu promotorskiego, w którym byłam głównym wykonawcą brzmiał: "**Indukcja przedwczesnej kondensacji chromosomów w komórkach merystematycznych *Vicia faba***"). Także po roku pracy, Rada Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, na wniosek mojego Promotora prof. dr hab. Janusza Maszewskiego, otworzyła mi przewód doktorski.

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej eksperymentów upoważniły mnie do sformułowania następujących wniosków:

1. Merystematyczne komórki korzeni *Vicia faba*, zablokowane w przebiegu replikacji DNA pod wpływem hydroksymocznika (HU), omijają punkt kontrolny "S-M" inicjując przedwczesną mitozę (PCC) w wyniku działania kofeiny (CF), 2-aminopuryny (2-AP), wanadanu sodu (Van) oraz aktywatorów kinazy białkowej C - DOG (1,2-dioctanoylo-sn-glicerolu) i PMA (estru forbolu);
2. Najbardziej efektywnymi stymulatorami PCC w komórkach zablokowanych w trakcie replikacji DNA są: kofeina oraz PMA. Ominięcie punktu kontrolnego "S-M" wywołane działaniem CF lub PMA indukuje przedwczesne mitozy w komórkach, które nie zrealizowały fazy S (S→PCC). Działanie innych czynników (2-AP, Van, DOG) prowadzi do inicjacji PCC w tych komórkach, które nie zakończyły poreplikacyjnych procesów naprawczych podczas fazy G2 (G2→PCC);
3. Inicjacja przedwczesnej, mitotycznej kondensacji chromosomów pod wpływem Van, DOG i PMA wydaje się wskazywać na istnienie alternatywnych szlaków biochemicznych, omijających punkt kontrolny "S-M" w sposób niezależny od aktywacji kinaz cyklicznych;
4. W merystemach korzeni *V. faba* poddawanych działaniu bloku replikacyjnego, a następnie indukcji PCC, chromatyna komórek interfazowych ulega dyspersji. Najsilniejszą dekondensację wywołuje 2-AP;
5. Komórki z symptomami S-PCC, wykazujące silną fragmentację chromosomów, wkraczają na drogę programowanej śmierci;
6. Mechanizmem wywołującym blok mitotyczny w komórkach merystemów korzeni *V. faba* zatrzymanych w przebiegu replikacji DNA pod wpływem HU jest - prawdopodobnie - fosforylacja kinazy białkowej o motywach homologicznych do fragmentów ludzkiej kinazy efektorowej Chk1, podrzędnej wobec sensorycznych kinaz typu ATM-ATR-Rad3;



7. Stres replikacyjny wywołany działaniem HU generuje pęknięcia DNA. Uszkodzenia te indukują fosforylację histonów H2AX. Prawdopodobnie, niektóre spośród ich wewnątrzjądrowych ognisk wykazują wspólną lokalizację z regionami wzmożonej fosforylacji kinazy typu Chk1;
8. W komórkach zablokowanych w fazie S działaniem HU, a następnie indukowanych do inicjacji przedwczesnej mitozy (PCC) pod wpływem CF, chromosomy zachowują stan kompetencji do replikacji DNA. Zdolność "chromatyny typu PCC" do replikacji DNA zablokowana jest w profazie i metafazie; ujawnia się po przejściu metafaza→anafaza, prawdopodobnie na skutek redukcji aktywności CDK mitotycznych. Struktura przedwcześnie skondensowanych chromosomów wykazujących zdolność do replikacji DNA jest mniej zwarta w porównaniu z chromosomami mitotycznych komórek kontrolnych [Załącznik 7.2].

Obrona rozprawy doktorskiej pt.: "Indukcja przedwczesnej kondensacji chromosomów w komórkach merystemów korzeni *Vicia faba*" odbyła się 30 września 2003 roku.

Recenzentami mojej rozprawy doktorskiej były: prof. dr hab. Joanna Deckert z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i prof. dr hab. Wanda M. Krajewska z Uniwersytetu Łódzkiego. Na wniosek recenzenta pracę nominowano do wyróżnienia. Rada Wydziału BNZ jednogłośnie przyjęła wniosek o wyróżnienie mojej rozprawy doktorskiej. Wówczas także, stopień doktora nauk biologicznych został zatwierdzony przez Radę Wydziału BNZ, a w roku 2007 otrzymałam indywidualną nagrodę JM Rektora UŁ za cykl publikacji związanych z tematyką rozprawy doktorskiej.

### **(e.3) Kontynuacja pracy naukowej - po uzyskaniu stopnia doktora**

W wyniku przeprowadzonego postępowania konkursowego, od 1 października 2003 roku, zostałam zatrudniona w Katedrze Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego na stanowisku adiunkta.

Bezpośrednio po zakończeniu etapu związanego z realizacją rozprawy doktorskiej powstała koncepcja projektu naukowego nt. "**Wewnętrzne punkty kontrolne fazy S. Zależność S-M a indukcja przedwczesnych mitoz w komórkach roślinnych**", który został zakwalifikowany do finansowania na lata 2004-2007 (**3PO4C 044 27**) i był realizowany w Katedrze Cytofizjologii, pod kierownictwem prof. dr hab. Janusza Maszewskiego i ze mną w roli głównego wykonawcy. W ramach tego projektu sfinansowano dwie prace składające się na przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe [**H2, H3**].

Wśród istotnych osiągnięć tej części mojej dotychczasowej pracy naukowo-badawczej wymienić należy:

1. Określenie różnic w czasie i efektywności indukcji PCC, w zależności od tego, który z etapów szlaku przekazu sygnałów o zatrzymaniu lub spowolnieniu replikacji DNA ulega zablokowaniu;
2. Ujawnienie zmian ultrastrukturalnych na poziomie chromosomów w komórkach wykazujących symptomy PCC oraz przeprowadzenie charakterystyki organizacji fibryli chromatynowych w jądrach interfazowych, które nie uległy procesowi PCC;
3. Wykazanie, że różnice w morfologii chromosomów indukowanych w procesie przedwczesnej mitozy zależą od podokresu fazy S, w którym komórki zablokowane w trakcie replikacji ulegają procesowi PCC;
4. Wykazanie synergizmu działania kofeiny i estrów forbolu w procesie indukcji PCC;
5. Wykazanie, że stres replikacyjny u roślin generuje fosforylację histonów H2AX, a niektóre z ognisk tej modyfikacji wykazują wspólną lokalizację z regionami wzmożonej fosforylacji kinazy typu Chk1 i Chk2;



6. Wykazanie zdolności przedwcześnie skondensowanych chromosomów do replikacji DNA i opracowanie kierunku badawczego nad zdolnością chromatyny typu PCC do kontynuacji replikacji w komórkach roślinnych i zwierzęcych.

Zagadnienia wspomniane w punkcie 6, związane bezpośrednio ze współzależnościami replikacji DNA i mitozy (zależności S-M i M-S) staną się wiodącym kierunkiem mojej pracy badawczej już po zakończeniu postępowania habilitacyjnego (służyć temu ma również, nawiązana przeze mnie w trakcie realizacji grantu POMOST/2011-4/8, współpraca naukowa z profesorem J. Julian'em Blow'em i planowany na rok 2017/2018 staż naukowy w Cancer Research UK Chromosome Replication Research Group kierowanej przez prof. J.J. Blow'a [Wellcome Trust Centre for Gene Regulation & Expression, University of Dundee, Down Street, Dundee DD1 5EH, UK]).

Następnie, w mojej pracy zajmowałam się kontynuacją badań nad indukcją PCC, tym razem w ramach kierowanego przeze mnie (w latach 2008-2011) grantu o numerze **N N303 355 935** pt.: **"Kompetencja przedwcześnie skondensowanej chromatyny do replikacji DNA w mitozie"**. W ramach tego projektu sfinansowano dwie prace składające się na przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe [H1, H4].

Za istotne osiągnięcia tej części prac badawczych uważam:

1. Wykazanie, że replikacyjna aktywacja przedwcześnie skondensowanych chromosomów zależy nie tylko od ich organizacji strukturalnej (tj. odpowiedniego rozluźnienia fibryli chromatynowych, **Załącznik 7.12**), ale przede wszystkim od ich stanu biochemicznego. Wykazano, że czynnikiem wyzwalającym kompetencję do ponownego uruchomienia widełek replikacyjnych jest wieloenzymatyczny kompleks APC/cyklosom, ponieważ kompetencja przedwcześnie skondensowanych chromosomów do wznowienia przerwanej biosyntezy DNA jest skorelowana z zanikiem katalitycznych funkcji MPF (**Rybaczek i wsp., w recenzji: Załącznik 3a, pkt. 1.1 [poz.23]**);
2. Stwierdzenie, że stres replikacyjny wywołany wpływem hydroksymocznika (HU) zwiększa pulę nieufosforylowanych form białek Rb, a także wykazanie, że wznowienie i kontynuacja uprzednio zablokowanej replikacji nie jest związana ze wznowieniem fosforylacji białek Rb na Ser807/811, mimo, że ma ona miejsce w newralgicznym obszarze granicznym eu- i heterochromatyny w jądrach interfazowych (**Rybaczek i wsp., w recenzji: Załącznik 3a, pkt. 1.1 [poz.23]**).
3. Potwierdzenie, że markerem kontynuacji replikacji w chromatynie typu PCC może być białko PCNA (**Rybaczek i wsp., w recenzji: Załącznik 3a, pkt. 1.1 [poz.23]**).

W roku 2004 nawiązałam, trwającą do dziś, współpracę z dr Anetą Balcerczyk z Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego. Efektem pierwszego etapu współpracy jest artykuł opublikowany w 2005 roku w *Biochemical Pharmacology* [**Załącznik 7.5**]:

Balcerczyk A, Soszyński M, **Rybaczek D**, Przygodzki T, Karowicz-Bilińska A, Maszewski J, Bartosz G, 2005, Induction of apoptosis and modulation of production of reactive oxygen species in human endothelial cells by diphenyleioldonium. *Biochem Pharmacol* 69(8):1263-1273.

Aktualnie prowadzona współpraca naukowa z dr Anetą Balcerczyk dotyczy badania zmian epigenetycznych związanych z procesem angiogenezy (jednym z kluczowych zjawisk regulujących rozwój nowotworu). Celem bieżących badań jest zdefiniowanie roli metylacji wybranych reszt lizyn białek histonowych (ze szczególnym uwzględnieniem lizyny w pozycji 4 i 9, histonu H3) w regulacji procesu angiogenezy, a także wyodrębnienie mechanizmu odpowiedzialnego za tę regulację. Badania są prowadzone we współpracy z profesorem Assam'em El-Osta (Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, AU), u którego dr Balcerczyk przebywała na długoterminowym stażu. Moje



zadania polegają na przeprowadzeniu szeregu szczegółowych analiz immunocytochemicznych po zastosowaniu wybranych inhibitorów metylotransferaz histonów, m.in. Bix-01294 i A(K)MI-1/5. Aktualnie w recenzji znajduje się publikacja opisująca wyniki związane z wpływem inhibitora AMI-1 i AMI-5 na komórki śródbłonka [Balcerczyk i wsp., w recenzji: Załącznik 3a, pkt. 1.1 [poz.22]].

Z uwagi na sprawność z jaką posługuję się metodami cytologicznymi, prof. dr hab. Janusz Maszewski zarekomendował moją osobę Pani prof. dr hab. Krystynie Góreckiej z Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach do przeprowadzenia badań z wykorzystaniem komórek gametycznych do wyprowadzania linii homozygotycznych marchwi, w efekcie czego powstała następująca publikacja: [Zał.7.8];

Kowalska U, Rybaczek D, Krzyżanowska D, Kiszczak W, Górecka K, 2008, Cytological assessment of carrot plants obtained in anther culture. *Acta Biol Cracov s. Bot* 50(2):7-11.

Z kolei, prof. dr hab. Joanna Deckert z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, zaprosiła mnie do wspólnego napisania rozdziału w monografii pod redakcją prof. dr hab. Waldemara Maksymca. Rozdział poświęcony był odpowiedziom komórki na działanie różnorodnych czynników stresowych [Zał.7.9]:

Deckert J, Pawlak S, Rybaczek D, 2009, The nucleus as a „headquarters” and target in plant cell stress reactions. In: *Compartmentation of Responses to Stress in Higher Plants, True or False*. (Ed. Waldemar Maksymiec) Transworld Research Network, Kerela, India, ISBN:978-81-7895-422-6, pp 61-90.

Jedna z figur opisywanych w naszym rozdziale i przesłanych uprzednio do recenzji, została wybrana przez edytorów na okładkę ww. monografii: "Compartmentation of Responses to Stress in Higher Plants, True or False".

Nawiązana w 2009 roku współpraca naukowa z profesorem dr hab. Krystyną Janas z Uniwersytetu Łódzkiego (z Katedry Ekofizjologii i Rozwoju Roślin) dotyczyła badania wpływu jonów miedzi na siewki soczewicy [Zał.7.11]:

Janas KM, Zielińska-Tomaszewska J, Rybaczek D, Maszewski J, Posmyk MM, Amarowicz R, Kosińska A, 2010, The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris Medic.*) seedlings. *J Plant Physiol* 167(4):270-6.

#### **(e.4) Autorstwo i współautorstwo publikacji naukowych**

#### **NA MÓJ CAŁY DOROBEK NAUKOWY SKŁADA SIĘ:**

- **21 prac** o łącznym **IF 32.601** i **455 pkt MNiSW**, oraz
- **55 doniesień zjazdowych: 44 postery** i **11 referatów**.

w tym - prace składające się na osiągnięcie naukowe: o współczynniku oddziaływania

**IF 12.765** (zgodnie z rokiem publikacji) i **185 punktach MNiSW**;



**(e.5) Udział w projektach badawczych****Jako kierownik/koordynator**

1. **2012-2015**, koordynator projektu POMOST/BRIDGE Fundacji na rzecz Nauki Polskiej finansowanego w ramach PROGRAMU OPERACYJNEGO INNOWACYJNA GOSPODARKA, PRIORYTET I, DZIAŁANIE 1.2 – WZMOCNIENIE POTENCJAŁU KADROWEGO NAUKI.  
**Numer projektu: POMOST/2011-4/8**  
**Tytuł projektu:** "Chromatin, chromatids and chromosomes during the course of prematurely induced mitoses and their behavior within the second round of the nuclear replication and division"  
**Czas trwania:** od lipca 2012 do czerwca 2015
2. **2008-2011**, kierownik projektu MNiSW/NCN (35 konkurs)  
**Typ projektu:** własny  
**Numer projektu:** N N303 355 935  
**Tytuł projektu:** "Kompetencja przedwcześnie skondensowanej chromatyny do replikacji DNA w mitozie"
3. UŁ - własny, habilitacyjny; UŁ/505/378/2008; Zastosowanie spektrometrii mas w badaniu udziału kinaz białkowych (ATM, ATR, Chk1 i Chk2) w omijaniu punktów kontrolnych cyklu w merystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba*; Czas trwania projektu: **2008 r.**
4. UŁ - własny, habilitacyjny; UŁ/505/378/2007; Udział cyklin D i B w cyklu komórkowym *Vicia faba*; Czas trwania projektu: **2007 r.**
5. UŁ - własny, habilitacyjny; UŁ/505/378/2006; Czy inicjacja fazy S w komórkach *Vicia faba* jest związana z fosforylacją białek Rb na serynach 780, 795 i na Ser807/811; Czas trwania projektu: **2006 r.**
6. UŁ - własny, habilitacyjny; UŁ/505/378/2005; Replikacja sekwencji heterochromatyny przycentromerowej w przebiegu przedwczesnej kondensacji chromosomów; Czas trwania projektu: **2005 r.**

**Jako wykonawca**

7. **2004-2007**, główny wykonawca projektu MNiSW  
**Typ projektu:** własny  
**Numer projektu:** 3PO4C 044 27  
**Tytuł projektu:** "Wewnętrzne punkty kontrolne fazy S. Zależność S-M a indukcja przedwczesnych mitoz w komórkach roślinnych"
8. **2001-2003**, główny wykonawca projektu MNiSW  
**Typ projektu:** promotorski  
**Numer projektu:** 3PO4C 030 24  
**Tytuł projektu:** "Indukcja przedwczesnej kondensacji chromosomów w komórkach merystematycznych *Vicia faba*"
9. UŁ – badania własne UŁ/505/389/2010; Ultrastrukturalne badania *Chara vulgaris* po aplikacji etopozydu jako inhibitora topoizomerazy II; Czas trwania projektu: **2010 r.**



10. Uł – badania statutowe; Wpływ estrów forbolu na indukcję i przebieg przedwczesnej kondensacji chromosomów; Czas trwania projektu: **2004 r.**
11. Uł - badania własne; Uł/505/432/; Fosforylacja histonu H2AX podczas indukcji dwuniciowych pęknięć w jądrach różniących się rozmiarem genomu i strukturą chromatyny; Czas trwania projektu: **2003-2004 r.**
12. Uł - badania własne; Uł/505/467/2002; Rearanżacje cytoszkieletu podczas indukcji przedwczesnej kondensacji chromosomów u *Vicia faba*; Czas trwania projektu: **2002 r.**
13. Uł - badania statutowe; Changes of absorbent of silver are connected with the increase of threonine phosphorylation in *Pisum sativum* Ag-NOR proteins; Czas trwania projektu: **2001 r.**

#### **(e.6) Staże zagraniczne i szkolenia (krajowe i zagraniczne)**

##### **Staże zagraniczne:**

1. 5-tygodniowy staż naukowy (w 2013 roku) w Instytucie Botaniki Eksperymentalnej (Centre of Plant Structural and Functional Genomics, AS CR, Olomouc, Republika Czeska) – praca w zespole Profesora Jaroslav'a Doležel'a.

##### **Udział w kursach i szkoleniach oraz posiadane certyfikaty:**

1. 2003 r. - kurs naukowy: ***Protein electrophoresis and Western blot technique***  
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych,  
Katedra Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Łódź  
- prowadzący: dr Sławomir Antoszczyk.
2. 2006 r. - tygodniowy kurs naukowy: ***Techniques of molecular cytogenetics in analysis of plant genome***  
Uniwersytet Śląski, Katedra Anatomii Roślin i Cytologii  
- prowadzący: Prof. Robert Hasterok wraz z zespołem.
3. II. 2009 r. - tygodniowy kurs naukowy: ***Techniques of immunocytochemistry and in situ hybridization at the level of electron microscope***  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Zakład Biologii Komórki  
- prowadzący: dr hab. Marta Lenartowska, prof. UMK; dr hab. Dariusz Smoliński, prof. UMK; dr Janusz Niedojadło, dr Agnieszka Kołowerzo-Lubnau.
4. IX. 2010 r. - tygodniowy kurs naukowy: ***FISH and PRINS techniques***,  
Uniwersytet Rzeszowski, Zamiejscowy Wydział Biotechnologii, Kolbuszowa  
- prowadzący: dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR.
5. X. 2010 r. - ***Warsztaty technik pamięciowych***, Uł, Łódź (w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, 4.1.1. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni)
6. XI. 2012 r. - ***Kurs szybkiego czytania***, Uł, Łódź (w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, 4.1.1. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni)



7. I/II. 2013 r. - **Research Team Management course (Zarządzanie zespołem naukowym)**, szkolenie w ramach projektu SKILLS Fundacji na rzecz Nauki Polskiej,
  - szkolenie prowadzone przez Susanne Marx, Weisbaden, Germany.
8. V. 2013 r. - **Scientific writing training course - advanced level (kurs: Pisanie tekstów naukowych)**, szkolenie w ramach projektu SKILLS Fundacji na rzecz Nauki Polskiej,
  - szkolenie prowadzone przez Jean-Luc Lebrun, Warszawa, Polska.
9. III. 2014 r. - **Training workshop in self-presentation and public speaking skills (kurs z zakresu autoprezentacji i sztuki występów publicznych)**, szkolenie w ramach projektu SKILLS Fundacji na rzecz Nauki Polskiej,
  - szkolenie prowadzone przez Caroline van der Brul, Warszawa, Polska

#### **(e.7) Uzyskane nagrody i wyróżnienia**

##### **Wyróżnienia wynikające z prowadzenia badań naukowych lub prac rozwojowych:**

1. 2007 r. - Indywidualna nagroda Rektora UŁ za cykl publikacji związanych z rozprawą doktorską;
2. 2015 r. - Brązowy Medal Prezydenta RP za Długoletnią Służbę;
3. 2015 r. - III nagroda za najlepszy poster - III Konferencja MSB "Symbioza", SGGW Warszawa;
4. 2005 r. - I nagroda za najlepszy poster - IX Konferencja Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Łódź;
5. 2005 r. - I nagroda za najlepszy poster - XXXIV Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych, Olsztyn;
6. 2003 r. - I nagroda za najlepszy poster - I Conference of Polish Society for Cell Biology;
7. 2000 r. - III nagroda za najlepszy poster - XXXVIII Conference of Student Scientific Society of the Medical University of Lodz.

#### **(e.8) Członkostwo w towarzystwach naukowych**

##### **Działalność w krajowych i zagranicznych organizacjach naukowych:**

1. członek Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin;
2. członek Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki;
3. członek Polskiego Towarzystwa Botanicznego.

#### **(e.9) Recenzje publikacji**

##### **Recenzowanie prac naukowych:**

1. recenzent prac naukowych w czasopismach:
  - International Journal of Radiation Biology (IF 1.687)
  - Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B (IF 1.124).



**(f) OMÓWIENIE DZIAŁALNOŚCI DYDAKTYCZNEJ I ORGANIZACYJNEJ****(f.1) Omówienie pracy organizacyjnej i działalności popularyzatorskiej**

1. 2003 r. - pomysłodawca i organizator Sekcji "Homunculus" Studenckiego Koła Naukowego przy Kole Naukowym Biologów UŁ;
2. od 2003 r. - opiekun naukowy jednego z pięciu (aktualnie) zespołów działających w Katedrze Cytofizjologii w ramach Sekcji "Homunculus";
3. 2005 r. - sekretarz IX Konferencji Biologii Komórki;
4. 2005 r. - współorganizator IX Konferencji Biologii Komórki;
5. 2005 r. - pomysłodawca i organizator Sekcji Studenckiej podczas IX Konferencji Biologii Komórki;
6. od czerwca 2006 r. do chwili obecnej - konsultant naukowy z ramienia Polskiej firmy Cell Signaling Technology (USA);
7. 2007 r. - członek panelu ekspertów zewnętrznych w ramach National Foresight Programme Poland 2020;
8. od lipca 2010 r. do chwili obecnej - konsultant naukowy z ramienia Polskiej szwedzkiej firmy AGRISERA;
9. 2011 r. - członek Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej;
10. 2016 r. - członek Kolegium Elektorów Wydziału BiOŚ

**(f.2) Omówienie działalności i osiągnięć dydaktycznych**

W latach 2003-2016 byłam opiekunem naukowym łącznie 15 studentów wykonujących pracę magisterską oraz sprawowałam opiekę naukową nad 1 doktorantką (dr Anna Pastucha). Nie pełniłam funkcji promotora pomocniczego.

Byłam promotorem 1 pracy magisterskiej (mgr Marceliny W. Musiałek; magisterium zrealizowano w ramach stypendium magisterskiego w programie POMOST/FNP), kopromotorem 1 pracy magisterskiej (mgr Ewy G. Pikus; magisterium zrealizowano w ramach stypendium magisterskiego w programie POMOST/FNP) oraz promotorem 1 pracy licencjackiej (Pani Agnieszki Drążkowskiej).

Od roku 2003 r. (z dwiema przerwami na urlopy macierzyńskie) jestem opiekunem naukowym studentów Sekcji "Homunculus" (dokładnie: studentów jednego z pięciu aktualnie funkcjonujących w ramach Sekcji zespołów).

Od roku 2015 r. prowadzę, na terenie Katedry Cytofizjologii, autorskie warsztaty dotyczące "Technik immunocytochemicznych", skierowane do studentów studiów stacjonarnych i niestacjonarnych.

Prowadziłam także warsztaty, pokazy i wykłady w ramach Nocy Biologów i Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki (lata: 2014, 2015, 2016).



W ramach pracy dydaktycznej prowadzę zajęcia na studiach dziennych i zaocznych na kierunku biologia, mikrobiologia i biotechnologia. Prowadzone przeze mnie przedmioty to: ćwiczenia z *biologii komórki*, ćwiczenia z *botaniki ogólnej*, ćwiczenia z *biologii stresu*, ćwiczenia i wykłady z *fizjologii reakcji adaptacyjnych do środowiska*, pracownie specjalistyczne, pracownie magisterskie oraz seminaria (w języku polskim i angielskim). W związku z prowadzoną przeze mnie działalnością dydaktyczną opracowałam: (1) autorsko: ćwiczenia z *biologii komórki*, *biologii stresu* i *fizjologii reakcji adaptacyjnych do środowiska*, oraz (2) współautorsko: wykłady z *fizjologii reakcji adaptacyjnych do środowiska*.

**(f.3) Wykaz prac doktorskich, magisterskich i licencjackich, w których byłam opiekunem naukowym i/lub kierującym pracą:**

**f3.1. Praca doktorska:**

**- opieka naukowa:**

3.6a.1.1. mgr Anna Pastucha,

obrona pracy doktorskiej: **2011 r.**

tytuł pracy doktorskiej:

"Indukcja stresu replikacyjnego i przedwczesnej kondensacji chromosomów w merystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba*. Wybrane modyfikacje potranslacyjne histonów rdzeniowych".

Promotor: Prof. dr hab. Janusz Maszewski (nie pełniłam funkcji promotora pomocniczego).

**f3.2. Prace magisterskie:**

**- opieka naukowa:**

f3.2.1. Hubert Syrek,

obrona pracy magisterskiej: **2003 r.**

tytuł pracy magisterskiej:

"Wpływ różnych stężeń hydroksymocznika na efektywność indukowanej kofeiną przedwczesnej kondensacji chromosomów w komórkach merystemów korzeni *Allium cepa*".

f3.2.2. Cezary Wójcik,

obrona pracy magisterskiej: **2004 r.**

tytuł pracy magisterskiej:

"Indukcja przedwczesnej kondensacji chromosomów w merystemach korzeni *Vicia faba*. Włączenie <sup>3</sup>H-urydyny i <sup>3</sup>H-lizyny - badania autoradiograficzne".

f3.2.3. Katarzyna Dośpiał,

obrona pracy magisterskiej: **2004 r.**

tytuł pracy magisterskiej:

"Włączenie <sup>3</sup>H-tymidyny w przebiegu indukcji przedwczesnej kondensacji chromosomów w merystemach korzeni *Vicia faba*".

f3.2.4. Aleksandra Bodys,

obrona pracy magisterskiej: **2005 r.**

tytuł pracy magisterskiej:

"Indukcja ATR-zależnych sekwencji zdarzeń w przebiegu przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) w komórkach merystemów korzeni *Vicia faba*. Uwarunkowania związane z aktywnością funkcjonalnego odpowiednika fosfatazy Cdc25".



f3.2.5. Agnieszka Krzyżowska,obrona pracy magisterskiej: **2005** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Omijanie funkcji wewnętrznych punktów kontrolnych fazy S pod wpływem kofeiny, staurosporyny i 5-azacytydyny w komórkach merystemów korzeni *Vicia faba*".

f3.2.6. Ewa Kramek,obrona pracy magisterskiej: **2006** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Identyfikacja homologa zwierzęcej kinazy białkowej Chk2 w metystematycznych komórkach korzeni *V. faba* poddanych działaniu związków blokujących replikację DNA i indukujących PCC".

f3.2.7. Kamil Karolczak,obrona pracy magisterskiej: **2006** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Identyfikacja homologa zwierzęcej kinazy białkowej Chk1 w metystematycznych komórkach korzeni zarodkowych *Vicia faba* podczas stresu replikacyjnego i przedwczesnej kondensacji chromosomów".

f3.2.8. Antoni Kowalski,obrona pracy magisterskiej: **2006** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Wpływ stresu replikacyjnego na barwność chromatyny w merystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba*".

f3.2.9. Piotr Kostrzewski,obrona pracy magisterskiej: **2007** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Zjawiska towarzyszące indukcji stresu replikacyjnego i PCC po działaniu hydroksymocznika, afidikoliny oraz inhibitorów fosfataz białkowych w merystemach *Vicia faba* - analizy cytologiczne, cytometryczne, immunocytochemiczne i biochemiczne".

f3.2.10. Agnieszka Bukowska,obrona pracy magisterskiej: **2007** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Zjawiska towarzyszące indukcji stresu replikacyjnego po działaniu hydroksymocznika, afidikoliny oraz inhibitorów kinaz białkowych w merystemach *Vicia faba* - analizy cytologiczne, cytometryczne, immunocytochemiczne i biochemiczne".

f3.2.11. Magdalena Grażul,obrona pracy magisterskiej: **2008** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Włączanie bromodeoksyurydyny do jąder interfazowych i przedwczesnie skondensowanych chromosomów w komórkach merystemów korzeni *Vicia faba* poddanych działaniu stresu replikacyjnego".

f3.2.12. Konrad Winnicki,obrona pracy magisterskiej: **2008** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Ekspresja cykliny B1 podczas mitozy i przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) w komórkach merystemów korzeni *V. faba*".

f3.2.13. Marta Milanowicz,obrona pracy magisterskiej: **2008** r.

tytuł pracy magisterskiej:

"Ekspresja cykliny D podczas mitozy i przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) w komórkach merystemów korzeni *V. faba*".



f3.2.14. Agnieszka Tomaszewska,  
obrona pracy magisterskiej: **2009** r.  
tytuł pracy magisterskiej:

"Wpływ aktynowycyny D na proces przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) w komórkach mersystemów korzeni *Vicia faba*".

f3.2.15. Aleksandra Makarewicz,  
obrona pracy magisterskiej: **2009** r.  
tytuł pracy magisterskiej:

"Wpływ cykloheksymidu na proces przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) w komórkach mersystemów korzeni *Vicia faba*".

**- kierowanie pracą (kopromotor):**

3.6a.2.16. Ewa Gabriela Pikus,  
obrona pracy magisterskiej: **2015** r.  
tytuł pracy magisterskiej:

"Uszkodzenia DNA w stresie replikacyjnym i kofeino-zależnej indukcji przedwczesnej kondensacji chromosomów (PCC) oraz kinetyka naprawy DNA w mersystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba*" ['DNA damage in replication stress and caffeine-dependent induction of premature chromosome condensation (PCC) and the kinetics of DNA repair in root meristem cells of *Vicia faba*'].

*Kierujący pracą: dr Dorota Rybaczek i dr hab. Tomasz Popławski, prof. nadzw. UŁ*

**Praca magisterska zrealizowana w ramach stypendium magisterskiego w programie POMOST/2011-4/8 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.**

**- kierowanie pracą (promotor):**

3.6a.2.17. Marcelina Weronika Musiałek,  
obrona pracy magisterskiej: **2015** r.  
tytuł pracy magisterskiej:

"Obrazowanie przebiegu replikacji, uszkodzeń DNA i symptomów programowanej śmierci komórki na modelu komórek mersystemów wierzchołkowych korzeni *Vicia faba* indukowanych do PCC" ('Imaging of replication, DNA damage and symptoms of programmed cell death based on the model of PCC-induced root apical meristem cells of *Vicia faba*').

*Kierujący pracą: dr Dorota Rybaczek*

**Praca magisterska zrealizowana w ramach stypendium magisterskiego w programie POMOST/2011-4/8 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.**

**f3.3. Praca licencjacka:**

**- kierowanie pracą (promotor):**

3.6a.3.1. Agnieszka Drażkowska,  
obrona pracy licencjackiej: **2016** r.  
tytuł pracy licencjackiej:

"Przedwczesna kondensacja chromosomów (PCC) i katastrofa mitotyczna (MC) - dwie różne drogi prowadzące do śmierci komórki" ('Premature chromosome condensation and mitotic catastrophe - two different ways leading to cell death').

*Kierujący pracą: dr Dorota Rybaczek*



**(g) INNE RODZAJE DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ (WSPÓŁPRACA NAUKOWA)**

1. od 2012 r. - współpraca naukowa z Profesorem Jaroslav'em Doležel'em, doktorem Janem Vrána i doktor Beátą Petrovská z Instytutu Botaniki Eksperymentalnej (Centre of Plant - Structural and Functional Genomics, AS CR, Olomouc, Republika Czeska) - badania z zakresu proteomiki; pierwsza publikacja - w recenzji.
2. od 2012 r. - współpraca naukowa z Profesorem J. Julian'em Blow'em z Wellcome Trust Centre for Gene Regulation & Expression, UK (badania procesu replikacji DNA) - staż naukowy odbędzie się w roku 2017/2018;
3. współpraca naukowa z dr Anetą Balcerczyk z Uniwersytetu Łódzkiego (badania dotyczące zmian epigenetycznych związanych z procesem angiogenezy) i z Profesorem Assam'em El-Osta (Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, AU); pierwsza publikacja - w recenzji; druga publikacja - w przygotowaniu.
4. współpraca naukowa z dr Januszem Niedojadło z Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu (analizy mikroskopowo-elektronowe procesu replikacji DNA w chromatynie mitotycznej typu PCC - publikacja w przygotowaniu);
5. współpraca naukowa z dr hab. Maciejem Wnukiem prof. nadzw. z Uniwersytetu Rzeszowskiego (analizy FISH i PRINS) – publikacja – w recenzji;
6. współpraca naukowa z dr Danielem Broda z Uniwersytetu Rzeszowskiego (metoda DIGE: 2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis - białka PCNA i Cdc6 - publikacja w przygotowaniu);
7. współpraca naukowa z dr hab. Moniką Bugno-Poniewierską prof. IZ z Instytutu Zoologii, PAN w Balicach k. Krakowa (metoda mikrodysekcji i otrzymywanie sond genetycznych malujących chromosomy *Vicia faba* – przygotowano zgłoszenie patentowe);
8. współpraca naukowa z Profesor dr hab. Krystyną Górecką z Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach (**Zał. 7.8**; wykorzystanie komórek gametycznych do wyprowadzania linii homozygotycznych marchwi);
9. współpraca naukowa z Profesor dr hab. Krystyną Janas z Uniwersytetu Łódzkiego (**Zał. 7.11**; badanie wpływu jonów miedzi na siewki soczewicy);
10. współpraca naukowa z dr Marcinem Kiedrzyńskim z Katedry Geobotaniki i Ekologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego (badania kariologiczne *Cimicifuga europea*; określenie stopnia ploidalności i morfologii chromosomów u osobników pochodzących z różnych siedlisk tj. lasów bukowych vs lasów dębowych - publikacja w przygotowaniu);



**PODSUMOWUJĄC:****NA MÓJ CAŁY DOROBEK NAUKOWY SKŁADA SIĘ \*:**

- **21 prac** o łącznym **IF 32.601** i **455 pkt MNiSW**, oraz
- **55 doniesień zjazdowych: 44 postery i 11 referatów.**

w tym - prace składające się na osiągnięcie naukowe: o współczynniku oddziaływania

**IF 12.765** (zgodnie z rokiem publikacji) i **185 punktach MNiSW**;

\* dane szczegółowe zawiera Tabela 2 (zamieszczona poniżej) i Załącznik 3a.

**Indeks Hirsch'a (h-index): 6** (według bazy *Web of Science*);

**Sumaryczna liczba cytowań: 119** (według bazy *Web of Science*),

w tym liczba cytowań prac stanowiących osiągnięcie naukowe: **44** (według bazy *Web of Science*);

Sumaryczna liczba cytowań (**bez autocytowań**): **87** (według bazy *Web of Science*).

**DOROBEK PRZED DOKTORATEM STANOWIĄ:**

- **1 praca (IF 0.526 i 15 pkt MNiSW)**, **1 monografia** (rozprawa doktorska, 2003 r.), oraz
- **14 doniesień zjazdowych**, w tym **10 posterów** i **4 referaty.**

**DOROBEK PO DOKTORACIE STANOWIĄ:**

- **19 prac (IF 32.075 i 440 pkt MNiSW)**, oraz
- **41 doniesień zjazdowych**, w tym **34 postery** i **7 referatów.**



Tabela 2. Podsumowanie danych bibliograficznych i bibliometrycznych  
(publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe zaznaczono pogrubioną czcionką)

Lp.	Rok wydania publikacji	IF z roku wydania publikacji	IF 2014/2015 (ostatni dostępny)	IF 5-letni	punkty MNIŚW	Sposób oznaczenia publikacji w załączonych plikach
1	2002	0.526	1.364	1.08	15	Zał.7.1
2	2003		Rozprawa doktorska			Zał.7.2
3	2004	0	0.203	0.126	5	Zał.7.3
4	2004	0	0.203	0.126	5	Zał.7.4
5	2005	3.617	5.009	4.69	40	Zał.7.5
6	<b>2007</b>	<b>1.493</b>	<b>2.651</b>	<b>2.72</b>	<b>30</b>	<b>H2</b>
7	2007	1.259	1.849	1.55	25	Zał.7.6
8	<b>2007</b>	<b>2.893</b>	<b>3.054</b>	<b>2.49</b>	<b>35</b>	<b>H3</b>
9	2008	0.807	1.584	1.67	25	Zał.7.7
10	2008	0.351	0.73	1.04	20	Zał.7.8
11	2009	0	0	0	5	Zała.7.9
12	2009	0	0.203	0.126	5	Zał.7.10
13	2010	2.677	2.557	3.04	35	Zał.7.11
14	<b>2011</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>H1</b>
15	<b>2011</b>	<b>2.588</b>	<b>3.054</b>	<b>2.49</b>	<b>35</b>	<b>H4</b>
16	<b>2013</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>H5</b>
17	2014	3.071	3.071	2.89	35	Zał.7.12
18	2015	2.963	2.963	3.12	25	Zał.7.13
19	2015	4.565	4.565	4.64	30	Zał.7.14
20	<b>2015</b>	<b>3.234</b>	<b>3.234</b>	<b>3.7</b>	<b>40</b>	<b>H6</b>
21	<b>2016</b>	<b>2,557</b>	<b>2.557</b>	<b>3.04</b>	<b>35</b>	<b>H7</b>
<b>Sumarycznie:</b>		<b>32.601</b>	<b>37.851</b>	<b>38.538</b>	<b>455</b>	



**INNOWACYJNA  
GOSPODARKA**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Fundacja na rzecz Nauki Polskiej

**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI FUNDUSZ  
ROZWOJU REGIONALNEGO



#### DOTACJE NA INNOWACJE – PROGRAM POMOST

"Praca została częściowo sfinansowana z projektu POMOST (POMOST/2011-4/8)  
Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, finansowanego ze środków  
Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka,  
Priorytet I, Działanie 1.2 - Wzmocnienie potencjału kadrowego nauki)".

Łódź, dnia 31 maja 2016 roku

Podpis habilitanta ..... 