

Załącznik nr 2

**AUTOREFERAT PRZEDSTAWIAJĄCY
OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

dr Katarzyna Niedojadło

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej

Spis treści

1. Dane biograficzne	2
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	2
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego.....	2
5. Komentarz autorski do publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.....	4
5.1 Wprowadzenie	4
5.2 Cel badań	7
5.3 Główne tezy osiągnięcia naukowego	9
5.4 Podsumowanie.....	18
5.5 Plany naukowe.....	19
5.6 Literatura	20
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	22

1. Imię i Nazwisko

Katarzyna Niedojadło

Web of Science ResearcherID: O-3116-2015

ORCID: 0000-0003-0104-0058

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 1999 dyplom magistra biologii – Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (BiNoZ), Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (UMK w Toruniu), specjalność biologia molekularna, tytuł pracy magisterskiej: *„Immunocytochemiczna lokalizacja kalretikuliny w niezapyłonym i zapyłonym szluku Petunia hybrida Hort.”*, promotor: prof. dr hab. Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz;
- 1999 dyplom ukończenia Międzywydziałowego Studium Pedagogicznego – UMK w Toruniu;
- 2007 dyplom doktora nauk biologicznych – Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMK w Toruniu, tytuł pracy doktorskiej: *„Badania nad ekspresją genu efektora apoptozy Apaf-1 w znamionach barwnikowych, czerniaku pierwotnym i jego przerzutach u człowieka”*, promotor: prof. dr hab. Barbara W. Chwirot;

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 1999-2001 młodszy asystent, Poradnia Onkologiczna, Wojewódzki Szpital Zespolony im. L. Rydygiera w Toruniu (etat), UMK w Toruniu, Interdyscyplinarny Zespół Optycznych Metod Wczesnego Wykrywania Nowotworów, Pracownia Autofluorescencji Znamion (miejsce pracy);
- 2004-2007 asystent (1/2 etatu), Zakład Biologii Medycznej, Wydział BiNoZ, UMK w Toruniu;
- 2007-2009 asystent, Zakład Biologii Komórki, Wydział BiNoZ, UMK w Toruniu;
- 01.10.2009 adiunkt, Zakład Biologii Komórki (od 2018 Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej), Wydział BiOŚ, UMK w Toruniu.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Wybrane elementy czasowo-przestrzennej organizacji ekspresji genów podczas różnicowania gamet, zapłodnienia oraz wczesnej embriogenezy u *Hyacinthus orientalis* L.

- b) publikacje wchodzące w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi spójny tematycznie cykl pięciu prac eksperymentalnych. Łączny *Impact Factor* wg JCR (zgodnie z rokiem opublikowania) tych pozycji wynosi **17,775**, natomiast sumaryczna liczba punktów wg listy MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi **190**.

Dane bibliometryczne Biblioteki Głównej UMK w Toruniu znajdują się w Załączniku nr 7, natomiast Oświadczenia wszystkich współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji zawiera Załącznik nr 6.

1. Zienkiewicz K[✉], Suwińska A, **Niedojadło K**, Zienkiewicz A, Bednarska E (2011) Nuclear activity of sperm cell during *Hyacinthus orientalis* L. in vitro pollen tube growth. J Exp Bot 62(3): 1255-1269. **IF: 5,364; 45 pkt. MNiSW**
Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował współuczestnictwo na etapie opracowania koncepcji badań oraz współudział we wszystkich doświadczeniach. Wykonałam reakcje fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) pierwotnego (ITS1 pre-rRNA) i dojrzałego 26S rRNA, interpretowałam wyniki badań oraz współuczestniczyłam w korekcie ostatecznej wersji manuskryptu.
Swój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 25%.
2. **Niedojadło K[✉]**, Pięciński S, Smoliński DJ, Bednarska-Kozakiewicz E (2012a) Transcriptional activity of *Hyacinthus orientalis* L. female gametophyte cells before and after fertilization. Planta 236(1): 153-169. **IF: 3,347; 40 pkt. MNiSW**
Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował współudział w opracowaniu koncepcji badań oraz zaangażowanie na wszystkich etapach pracy eksperymentalnej. Przeprowadziłam reakcje immunocytochemicznej lokalizacji całkowitej puli polimerazy RNA II oraz jej formy inicjacyjnej i elongacyjnej na poziomie mikroskopu świetlnego i elektronowego (w tym przygotowanie materiału oraz półcienkich i ultracienkich skrawków). Wykonałam analizę statystyczną i uczestniczyłam w interpretacji wszystkich wyników badań. Przygotowałam manuskrypt pracy i dokonałam korekty wydawniczej jako autor korespondencyjny.
Swój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 70%.
3. **Niedojadło K[✉]**, Pięciński S, Smoliński DJ, Bednarska-Kozakiewicz E (2012b) Ribosomal RNA of *Hyacinthus orientalis* L. female gametophyte cells before and after fertilization. Planta 236(1): 171-184. **IF: 3,347; 40 pkt. MNiSW**
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań i przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń. Wykonałam reakcje fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) dojrzałych i niedojrzałych transkryptów rRNA oraz U3 snoRNA (w tym przygotowanie materiału oraz półcienkich skrawków) i analizę statystyczną otrzymanych wyników. Dokonałam interpretacji uzyskanych wyników badań, przygotowałam manuskrypt pracy oraz korektę wydawniczą jako autor korespondencyjny.
Swój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 80%.
4. **Niedojadło K[✉]**, Lenartowski R, Lenartowska M, Bednarska-Kozakiewicz E (2015) Late progamic phase and fertilization affect calreticulin expression in the *Hyacinthus orientalis* female gametophyte. Plant Cell Rep 34(12): 2201-2215. **IF: 3,088; 35 pkt. MNiSW**
Mój wkład w powstanie tej publikacji to współudział w opracowaniu koncepcji badań oraz zaangażowanie we wszystkie etapy pracy doświadczalnej. Wykonałam reakcje

fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) mRNA kalretikuliny oraz immunolokalizacji białka na poziomie mikroskopu świetlnego i elektronowego (w tym przygotowanie materiału oraz półcienkich skrawków), współuczestniczyłam w analizie Western blot. Dokonałam analiz statystycznych, interpretowałam uzyskane wyniki badań, przygotowałam manuskrypt pracy oraz dokonałam korekty wydawniczej jako autor korespondencyjny.

Swój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 80%.

5. Kozłowska M*, Niedojadło K*✉, Brzostek M, Bednarska-Kozakiewicz E (2016) Epigenetic marks in the *Hyacinthus orientalis* L. mature pollen grain and during *in vitro* pollen tube growth. Plant Reprod 29(3): 251-263. IF: 2,629; 30 pkt. MNiSW

* wskazani autorzy mają równy udział procentowy w powstaniu pracy

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował współudział w opracowaniu koncepcji badań i wszystkich pracach eksperymentalnych. Wykonałam także analizę statystyczną, interpretowałam uzyskane wyniki badań, przygotowałam manuskrypt pracy oraz korektę wydawniczą jako autor korespondencyjny.

Swój udział procentowy w powstaniu pracy szacuję na 45%.

5. Komentarz autorski do publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Cytowania prac własnych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zostały **wyróżnione**.

5.1 Wprowadzenie

W przeciwieństwie do zwierząt, komórki rozrodcze roślin okrytonasiennych nie różnicują się z komórek pomejotycznych, lecz są wytworem kilkukomórkowego gametofitu, który powstaje w wyniku podziałów mitotycznych zredukowanych spor - megaspor w zalążkach słupka i mikrospor w pylnikach.

Gametofit męski (ziarno pyłku)

Dojrzały gametofit męski roślin okrytozalążkowych w okresie wypylecia może być dwu- lub trójkomórkowy. Dwukomórkowe ziarno pyłku zbudowane jest z komórki wegetatywnej i generatywnej, natomiast w pyłku trójkomórkowym, poza komórką wegetatywną, obecne są dwie komórki plemnikowe powstałe po podziale komórki generatywnej. Komórki pyłkowe pełnią odmienne funkcje biologiczne. Komórka generatywna i powstające z niej komórki plemnikowe (gamety męskie) przekazują męski materiał genetyczny do żeńskich komórek docelowych podczas podwójnego zapłodnienia. Natomiast komórka wegetatywna, otaczająca całkowicie komórkę generatywną, spełnia funkcje somatyczne (odżywcze), a po zgodnym zapyleniu wyrasta w łagiewkę pyłkową. W przypadku pyłku dwukomórkowego podział komórki generatywnej na dwie komórki plemnikowe odbywa się w rosnącej w słupku łagiewce pyłkowej. U większości roślin okrytonasiennych, w tym u *Hyacinthus*, dojrzałe ziarna pyłkowe są dwukomórkowe. Natomiast trójkomórkowy pyłek jest produkowany przez jednoliścienne trawy oraz niektóre rośliny dwuliścienne, w tym z rodziny *Cruciferae*, np. *Arabidopsis*.

Dosyć powszechnym zjawiskiem obserwowanym zarówno w dwu-, jak i trójkomórkowych ziarnach pyłkowych/rosnących łagiewkach pyłkowych jest obecność tzw. męskiej jednostki rozrodczej (ang. Male Germ Unit - MGU), opisanej po raz pierwszy u *Plumbago* (Russell i Cass 1981). W obrębie tej struktury jądro komórki wegetatywnej występuje w bliskim sąsiedztwie komórki generatywnej, a po jej podziale w fizycznym związku z dwiema komórkami plemnikowymi. MGU to wyspecjalizowana jednostka transportująca, która warunkuje transport gamet męskich w łagiewce pyłkowej rosnącej w kierunku żeńskiego gametofitu. W ostatnich latach postuluje się, że MGU stanowi także kompleks funkcjonalny, umożliwiając komunikację oraz wymianę cząsteczek sygnałowych między poszczególnymi jego elementami (Slotkin i wsp. 2009; McCue i wsp. 2011).

Gametofit żeński (woreczek zalążkowy)

U ok. 70% roślin okrytozalążkowych, w tym u *H. orientalis*, dojrzały żeński gametofit jest siedmiokomórkowy, zbudowany z haploidalnej komórki jajowej i diplohaploidalnej komórki centralnej oraz pięciu komórek towarzyszących – dwóch haploidalnych synergid i trzech antypod często polihaploidalnych. Komórki żeńskiego gametofitu pełnią odmienne funkcje biologiczne. Komórka jajowa i centralna są komórkami docelowymi dla męskich gamet, bezpośrednio uczestniczącymi w podwójnym zapłodnieniu. Równie ważne są także synergidy, które wydzielają chemoatraktanty ukierunkowujące wzrost łagiewki pyłkowej do woreczka zalążkowego, a następnie są miejscem uwolnienia komórek plemnikowych. Pozbawione ruchu komórki plemnikowe są przemieszczane w obrębie gametofitu żeńskiego w kierunku komórki jajowej i centralnej przy udziale cytoszkieletu aktynowego (Higashiyama 2002). Podkreślając funkcjonalne zróżnicowanie komórek woreczka zalążkowego wprowadzono pojęcie żeńskiej jednostki rozrodczej (ang. Female Germ Unit – FGU), rozumianej jako minimalny zestaw komórek konieczny do zajścia efektywnego procesu podwójnego zapłodnienia. Strukturalnie FGU tworzy aparat jajowy (komórka jajowa i synergidy) oraz komórka centralna (Dumas i Mogensen 1993; Russell 1993). Z kolei antypody pełnią funkcje odżywcze i często degenerują przed zapłodnieniem.

U roślin okrytozalążkowych fuzję gamet poprzedza tzw. faza progamiczna obejmująca kolejno zapylenie, kiełkowanie ziaren pyłkowych na znamieniu słupka, ukierunkowany wzrost łagiewki pyłkowej w szlaku transmisyjnym słupka oraz uwolnienie komórek plemnikowych w synergidzie. Efektem fuzji męskiej gamety z komórką jajową jest zygota, z której rozwija się zarodek, natomiast z zapłodnionej komórki centralnej różnicuje się tkanka odżywcza w postaci triploidalnego bielma (Boavida i wsp. 2005a, 2005b).

W przeciwieństwie do zwierząt, badania skupione na komórkowych i molekularnych mechanizmach włączonych w proces generatywnego rozmnażania roślin okrytonasiennych są znacznie mniej zaawansowane. Wiedza w zakresie czasowo-przestrzennej organizacji ekspresji genów w komórkach żeńskiego i męskiego gametofitu oraz podczas aktywacji genomu zygotycznego (ang. Zygotic Genom Activation – ZGA) i pierwotnej komórki bielmowej jest wręcz fragmentaryczna. Wynika to przede wszystkim z trudności technicznych. U większości roślin okrytozalążkowych komórki plemnikowe powstają dopiero w rosnącej w słupku łagiewce pyłkowej, natomiast komórka jajowa i komórka centralna zamknięte są w woreczku zalążkowym, otoczonym wieloma warstwami

komórek somatycznych zalążka i słupka. Dojrzały zalążek jest także miejscem zapłodnienia i embriogenezy. Taka lokalizacja utrudnia prowadzenie cytologicznych i molekularnych badań komórek rozrodczych oraz mechanizmów funkcjonujących podczas fuzji gamet i wczesnego rozwoju zarodka w warunkach *in vivo*.

Jednym z wciąż nierozstrzygniętych aspektów płciowego rozmnażania roślin okrytozalążkowych jest wielopoziomowa regulacja ekspresji genów w komórkach linii płciowej, zygocie oraz rozwijającym się bielmie. Większość dostępnych danych pochodzi z badań transkryptomicznych. Analizy transkryptomiczne są istotne w poznaniu funkcji badanych komórek, jednak nie wyjaśniają wielu etapów metabolizmu RNA. Poznanie procesów takich jak transkrypcja genów kodujących białka, stabilizacja mRNA, następnie translacja i dystrybucja białka są kluczowe w zrozumieniu regulacji ekspresji genów.

Analiza transkryptomów komórek FGU u *Arabidopsis* (Wuest i wsp. 2010), *Oryza* (Ohnishi i wsp. 2011) oraz *Triticum* (Domoki i wsp. 2013) ujawniła występowanie w komórkach żeńskiego gametofitu transkryptów, które odzwierciedlają ich specyficzne funkcje biologiczne. Komórka centralna uważana jest też za źródło transkryptów transpozonowych, które włączone są w stabilizację/reprogramowanie genomu żeńskiej gamety i zarodka (Law i Jacobsen 2010).

Badania komórek męskiego gametofitu w zasadzie ograniczone są do analizy transkryptomów dojrzałych trójkomórkowych ziaren pyłkowych. W komórkach plemnikowych zidentyfikowano obecność transkryptów białek związanych z naprawą DNA, progresją cyklu komórkowego oraz zależną od ubikwityny degradacją białek (Borges i wsp. 2008). Z kolei komórka wegetatywna zawiera transkrypty związane głównie z kiełkowaniem ziarna pyłkowego i wzrostem łagiewki pyłkowej (Pina i wsp. 2005; Wang i wsp. 2008). Dodatkowo w komórce tej ma miejsce ekspresja transpozonów, których transkrypty stanowią prekursor siRNA uczestniczące w utrzymaniu integralności genomu gamet (Slotkin i wsp. 2009; Borges i wsp. 2011), a po zapłodnieniu prawdopodobnie również w reprogramowaniu genomu zarodka (Calarco i wsp. 2012). Do tej pory brak jest danych transkryptomicznych komórek plemnikowych, które powstają w wyniku podziału komórki generatywnej w łagiewce pyłkowej podczas fazy progamicznej.

Uważa się, że komórki uczestniczące w podwójnym zapłodnieniu mają niską aktywność metaboliczną. Jednakże to, czy ich dojrzałość, a tym samym „nabycie potencjału” do zapłodnienia jest skorelowana z **transkrypcyjnym wyciszeniem** pozostaje kwestią otwartą. **Brak także odpowiedzi na pytanie, czy faza progamiczna jest etapem „biernego” oczekiwania komórek woreczka zalążkowego na komórki plemnikowe, czy też zapylenie indukuje zmiany w poziomie ich transkrypcji.**

Postuluje się, że u roślin okrytonasiennych, podobnie jak u zwierząt, wczesny rozwój zarodka kontrolowany jest przez matczyne transkrypty, a genom ojcowski pozostaje wyciszony (Vielle-Calzada i wsp. 2000; Baroux i wsp. 2001; Grimanelli i wsp. 2005; Pillot i wsp. 2010; Anderson i wsp. 2017). Jednak nie wiadomo, czy **transkrypty uczestniczące w pierwszym etapie embriogenezy są wcześniej gromadzone w komórce jajowej (tzw. długowieczny mRNA), czy też są syntetyzowane *de novo* w wyniku aktywacji genomu zygotycznego (ZGA).** Badania u *Arabidopsis* są niejednoznaczne. W 2-4 komórkowych zarodkach transkrypty matczyne stanowią 88%, dopiero w stadium

globularnym 15% puli transkryptów to transkrypty ojcowskie (Autran i wsp. 2011). Z kolei badania Nodine i Bartel (2012) wskazują na obecność zarówno matczynych, jak i ojcowskich transkryptów już w 1-2 komórkowym zarodku. Nierozstrzygniętym zagadnieniem pozostaje również kwestia, **czy podczas zapłodnienia komórka plemnikowa wnosi do komórki jajowej ojcowskie transkrypty.**

Zdecydowana większość badań dotyczących regulacji ekspresji genów w komórkach uczestniczących w generatywnym rozmnażaniu roślin okrytozalążkowych prowadzona jest u *Arabidopsis*. Jest to roślina o małym, w pełni poznanym genomie, dzięki czemu powstało wiele określonych mutantów. *Arabidopsis* stanowi zatem bardzo dobry model do badań genetycznych i molekularnych. Jednak niewielkie organy generatywne (pręciki i słupki) utrudniają prowadzenie badań cytologicznych w zakresie biologii rozwoju u tej modelowej rośliny. Krótka szyjka słupka *Arabidopsis* uniemożliwia prowadzenie precyzyjnych analiz w obrębie żeńskiego i męskiego gametofitu podczas fazy progamicznej, a niewielkich rozmiarów woreczek zalążkowy utrudnia obserwacje poszczególnych komórek. Dodatkowo wykluczone są badania procesów związanych z wytwarzaniem komórek plemnikowych podczas wzrostu łagiewki pyłkowej, ponieważ pyłek *Arabidopsis* jest trójkomórkowy w momencie wypylenia. Dlatego swoje badania prowadziłam u *Hyacinthus*. Jest to gatunek produkujący duże, dwukomórkowe ziarna pyłku, które w warunkach *in vitro* stosunkowo łatwo kiełkują i wyrastają w łagiewki pyłkowe. Opracowałam autorską technikę uzyskiwania komórek plemnikowych w hodowanych *in vitro* łagiewkach pyłkowych, która umożliwiła mi analizę procesów zachodzących w warunkach *in vivo* podczas fazy progamicznej. W kwiatach hiacynta obecne są duże słupki o stosunkowo długich szyjkach (ok. 2-3 mm), 7 – komórkowe woreczki zalążkowe są duże - łatwo rozróżnić w nich biegun mikropylarny i chalazalny oraz zlokalizowane na nich komórki żeńskiego gametofitu. Faza progamiczna u hiacynta trwa ok. 24 h, a od zapylenia do zapłodnienia mija ok. 48 h, co jest dużą zaletą podczas obserwacji kolejnych zdarzeń reprodukcyjnych. Jest to zatem dogodny model do badań z zastosowaniem technik biologii komórkowej i molekularnej, takich jak fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) czy badania immunocytochemiczne.

5.2 Cel badań

Wcześniejsze badania prowadzone w zespole prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz pozwoliły poznać wzorzec czasowo-przestrzennej organizacji ekspresji genów w komórkach różnicującego się ziarna pyłkowego i rosnącej *in vitro* łagiewki pyłkowej u *H. orientalis* (Zienkiewicz i wsp. 2006, 2008a, 2008b). Badania te nie obejmowały analizy komórek plemnikowych. Stwierdzono, że komórki pyłkowe różnią się aktywnością transkrypcyjną przez cały okres różnicowania pyłku – poziom nowo syntetyzowanych transkryptów jest wyższy w komórce wegetatywnej aniżeli w komórce generatywnej. Zróżnicowana aktywność transkrypcyjna komórek męskiego gametofitu jest pozytywnie skorelowana z poziomem molekuł splicingowych. Tuż przed wypyleniem, w obu komórkach pyłkowych odnotowano wyciszenie transkrypcji, jednakże w ich jądrach nadal obserwowano elementy systemu splicingowego. Wzorzec aktywności transkrypcyjnej komórki wegetatywnej i generatywnej jest odmienny od wzorca dystrybucji i poziomu obecnych w nich transkryptów poli(A) RNA. Na krótko przed antezą, tj. w okresie hamowania transkrypcji, w komórce wegetatywnej silnie

wzrastał poziom poli(A), głównie w jej cytoplazmie. Pomimo obecności długowiecznego mRNA w rosnącej łagiewce pyłkowej odnotowano czasowe wznowienie transkrypcji, najpierw w jądrze wegetatywnym, a następnie w jądrze generatywnym. **Jednak nieznane są mechanizmy włączone w regulację dynamiki aktywności transkrypcyjnej komórek męskiego gametofitu, szczególnie w okresie od dojrzałości ziaren pyłkowych do wytworzenia komórek plemnikowych.**

Pierwsze badania zmierzające do poznania wzorca ekspresji genów w **komórkach żeńskiego gametofitu *H. orientalis*** dotyczyły ustalenia poziomu i lokalizacji poli(A) RNA oraz elementów splicingowych w niezapłodnionym i zapłodnionym woreczku zalążkowym (Pięciński i wsp. 2008). Stwierdzono, że w komórce jajowej i centralnej poziom poli(A) RNA oraz molekuł splicingowych jest niski, lecz gwałtownie wzrasta po zapłodnieniu. Wyniki te wskazują, że **komórki docelowe dla męskich gamet nie gromadzą dużej puli matczynych transkryptów mRNA, jednak nie wyjaśniają czasu aktywacji genomu zygotycznego.**

Po dołączeniu do zespołu prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz postanowiłam kontynuować badania związane z problematyką aktywności transkrypcyjnej komórek linii płciowej oraz komórek powstałych po fuzji gamet, tj. zygoty i bielma.

Celem badań stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego było poznanie czasowo-przestrzennej organizacji ekspresji genów w komórkach męskiego gametofitu oraz woreczka zalążkowego przed i po zapłodnieniu u *Hyacinthus orientalis* L.

W gametoficie męskim prowadziłam badania zmierzające do:

- poznania aktywności transkrypcyjnej, organizacji systemu splicingowego, poziomu i dystrybucji poli(A) RNA oraz metabolizmu rRNA w **komórkach plemnikowych** (Zienkiewicz i wsp. 2011, publikacja nr 1);
- ujawnienia wzorca wybranych modyfikacji epigenetycznych w **komórkach wegetatywnej, generatywnej i gametach** podczas wzrostu łagiewki pyłkowej w warunkach *in vitro* (Kozłowska i wsp. 2016, publikacja nr 5).

Badania gametofitu żeńskiego objęły:

- określenie dynamiki transkrypcji jąder różnicującego się, dojrzałego oraz zapłodnionego **woreczka zalążkowego** (Niedojadło i wsp. 2012a, publikacja nr 2);
- poznanie metabolizmu rRNA w komórkach niezapłodnionego i zapłodnionego **woreczka zalążkowego** (Niedojadło i wsp. 2012b, publikacja nr 3);
- analizę wzorca ekspresji genu kalretikuliny (CRT) w komórkach **żeńskiego gametofitu** przed i po zapłodnieniu (Niedojadło i wsp. 2015, publikacja nr 4).

Poznane wzorce aktywności transkrypcyjnej badanych komórek **męskiego i żeńskiego gametofitu** hiacynta dyskutowane były na tle ujawnionych zmian w organizacji/stopniu kondensacji chromatyny jądrowej.

Podczas realizacji badań dokonałam analizy:

- organizacji/stopnia kondensacji chromatyny komórek żeńskiego i męskiego gametofitu: na poziomie mikroskopu świetlnego metodą DAPI oraz mikroskopu elektronowego – analiza ultrastrukturalna;
- poziomu i dystrybucji nowo powstałych transkryptów w komórkach różnicującego się gametofitu żeńskiego metodą immunolokalizacji inkorporowanego 5-bromouracylu (BrU);
- dystrybucji i poziomu polimerazy RNA II, w tym całkowitej puli oraz jej formy inicjacyjnej (Pol RNA IIA) i elongacyjnej (Pol RNA IIO) z użyciem techniki immunofluorescencyjnej w komórkach męskiego i żeńskiego gametofitu oraz immunozłotowej (mikroskopia elektronowa) w komórkach woreczka zalążkowego przed i po zapłodnieniu;
- wzorca/poziomu modyfikacji epigenetycznych, takich jak 5-metylocytozyny (5metC), acetylowanego histonu 4 (acH4), deacetylazy histonowej 1 (HDT1) w komórkach rozwijającego się gametofitu męskiego po wypileniu z użyciem techniki immunofluorescencyjnej;
- metabolizmu rRNA w komórkach męskiego i żeńskiego gametofitu oraz w zygocie i pierwotnej komórce bielmowej poprzez określenie poziomu nowo transkrybowanego i dojrzałego rRNA techniką FISH z użyciem sond molekularnych do ITS1 pre-rRNA oraz 26S i 5S rRNA, a także do U3 snoRNA,
- wzorca ekspresji genu CRT w komórkach niezapłodnionego i zapłodnionego woreczka zalążkowego – transkrypt lokalizowałam techniką FISH a białko CRT techniką immunofluorescencyjną.

5.3. Główne tezy osiągnięcia naukowego

Gametofit męski

1. Powstające w rosnącej łagiewce pyłkowej komórki plemnikowe przechodzą okres dojrzewania, podczas którego następuje włączenie ich aktywności transkrypcyjnej

Zienkiewicz K, Suwińska A, **Niedojadło K**, Zienkiewicz A, Bednarska E (2011) Nuclear activity of sperm cell during *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro* pollen tube growth. J Exp Bot 62(3): 1255-1269 (publikacja nr 1)

Ze względu na wysoki stopień kondensacji chromatyny i niewielką zawartość cytoplazmy postulowano, że komórki plemnikowe roślin okrytozalążkowych są metabolicznie wyciszone (McCormic 1993) i zależne całkowicie od aktywności jądra wegetatywnego (Eady i wsp. 1995). Badania transkryptomyczne, prowadzone przede wszystkim na dojrzałych, trójkomórkowych ziarnach pyłku *Arabidopsis* i *Oryza* (Rutley i Twell 2015), nie dają jednoznacznej odpowiedzi, czy obecne w komórkach plemnikowych transkrypty są syntetyzowane w nich *de novo*, czy też pochodzą z komórki generatywnej. Dlatego **celem prowadzonych badań było poznanie aktywności transkrypcyjnej jąder komórek męskiego gametofitu hiacynta przed podziałem komórki generatywnej oraz podczas dojrzewania gamet**. Badania prowadziłam w rosnących *in vitro* łagiewkach pyłkowych,

w których obserwowałam MGU. Dzięki opracowanej eksperymentalnie metodologii w wydłużających się łagiewkach pyłkowych dochodziło do podziału komórki generatywnej (w łagiewkach wzrastających w warunkach *in vitro* na standardowych pożywkach nie obserwuje się tego efektu), co umożliwiło mi dokonanie analizy męskich gamet. W toku badań określono:

- całkowitą pulę nowo syntetyzowanych transkryptów; badania przeprowadzono na żywym materiale techniką inkorporacji BrU, który następnie lokalizowano immunocytochemicznie;
- immunolokalizację inicjacyjnej, hypofosforylowanej (Pol RNA IIA) i elongacyjnej, hyperfosforylowanej (Pol RNA IIO) polimerazy RNA II oraz elementów systemu splicingowego (TMG snRNA, SC35) – molekuł uczestniczących w transkrypcji i dojrzewaniu mRNA; założono, że obecność Pol RNA IIA jest wyznacznikiem przygotowania aparatu transkrypcyjnego do szybkiego podjęcia transkrypcji, natomiast obecność Pol RNA IIO ujawnia aktywną transkrypcję, głównie mRNA;
- obecność niedojrzałych (ITS1 pre-rRNA) i dojrzałych (26S rRNA) transkryptów rRNA, jako parametr metabolizmu jąderka (aktywności transkrypcyjnej rDNA); analizę przeprowadzono z użyciem techniki FISH.

W zastosowanych warunkach eksperymentalnych podział komórki generatywnej występował w 8-12 h wzrostu łagiewek pyłkowych. W tym okresie oraz podczas dalszej hodowli (do 24 h) **jądro wegetatywne wykazywało wysoką aktywność transkrypcyjną**. Nowo powstałe transkrypty występowały zarówno w nukleoplazmie, jak i na terenie cytoplazmy. Dodatkowo, w jądrze wegetatywnym obserwowałam wysoki poziom inicjacyjnej, jak i elongacyjnej Pol RNA II oraz nagromadzenie molekuł splicingowych. Wskazuje to, iż podczas wzrostu łagiewki pyłkowej w jądrze wegetatywnym zachodzi proces transkrypcji i składania mRNA. Pomimo braku zorganizowanego jąderka w jądrze tym obecny był rRNA, co może sugerować, że niewielka pula rDNA jest wciąż aktywna. W końcowym etapie hodowli (36 h) poziom badanych cząsteczek był niski, co wskazuje na wyciszenie aktywności metabolicznej jądra wegetatywnego.

Tuż przed podziałem jądro komórki generatywnej było transkrypcyjnie wyciszone, jednakże w obszarach interchromatynowych obecne były obie formy Pol RNA II oraz molekuły splicingowe. Nie można zatem wykluczyć, że czynniki te są przekazywane do komórek plemnikowych. W **nowo powstałych gametach obserwowano aktywację procesu transkrypcji**, jednak na poziomie niższym aniżeli w jądrze wegetatywnym. W komórkach plemnikowych transkrypty zawierające BrU lokalizowano zarówno w jądrach, jak i cytoplazmie. W puli nowych transkryptów obecny jest zapewne mRNA, o czym świadczy obecność Pol RNA II oraz czynników splicingowych. Ponadto w jądrach gamet lokalizowałam ITS1 pre-rRNA oraz 26 rRNA, co może świadczyć o syntezie podjednostek rybosomowych. Po około 24 h hodowli łagiewek pyłkowych **aktywność transkrypcyjna komórek plemnikowych ulegała wyciszeniu**, a następnie nowo powstałe transkrypty oraz Pol II RNA nie były wykrywane. Dojrzewaniu komórek plemnikowych towarzyszyła również eliminacja elementów maszynerii splicingowej oraz rRNA.

Uzyskane wyniki wskazują, że powstające w łągiewce pyłkowej *Hyacinthus* komórki plemnikowe:

- przechodzą okres różnicowania/dojrzewania, którego wyrazem jest krótkotrwała aktywność transkrypcyjna, prawdopodobnie włączająca syntezę mRNA oraz rRNA;
- po osiągnięciu „dojrzałości” ulegają transkrypcyjnemu wyciszeniu oraz eliminują czynniki splicingowe i rRNA; pozwala to wnioskować, że męskie gamety nie wnoszą tych molekuł do komórek docelowych podczas podwójnego zapłodnienia.

2. Epigenetyczne modyfikacje chromatyny zaangażowane są w regulację aktywności transkrypcyjnej komórek męskiego gametofitu

Kozłowska M, Niedojadło K, Brzostek M, Bednarska-Kozakiewicz E (2016) Epigenetic marks in the *Hyacinthus orientalis* L. mature pollen grain and during *in vitro* pollen tube growth. Plant Reprod 29(3): 251-263 (publikacja nr 5)

Dynamiczne zmiany aktywności metabolicznej komórek męskiego gametofitu *H. orientalis* w okresie jego dojrzewania (Zienkiewicz i wsp. 2006, 2008a) oraz w rosnącej łągiewce pyłkowej (Zienkiewicz i wsp. 2008b, 2011- publikacja nr 1) stały się podstawą do sformułowania **hipotezy**, że w regulację struktury chromatyny i jej aktywności transkrypcyjnej zaangażowane są mechanizmy epigenetyczne, w tym metylacja DNA i potranslacyjne modyfikacje białek histonowych. Dlatego też kolejnym **etapem moich badań było poznanie wzorca lokalizacji i poziomu wybranych znaczników epigenetycznych w komórkach męskiego gametofitu podczas powypyleniowego rozwoju ziarna pyłkowego**. W komórce wegetatywnej/łągiewce pyłkowej oraz komórce generatywnej/komórkach plemnikowych wykonałam immunocytochemiczną lokalizację oraz analizę ilościową znaczników nieaktywnej chromatyny: 5-metylocytozyny (5metC) i deacetylazy histonowej 1 (HDT1) oraz markera aktywnej euchromatyny - acetylowanego histonu 4 (acH4). Należy podkreślić, że do tej pory nie analizowano udziału procesów epigenetycznych w regulacji aktywności transkrypcyjnej komórek podczas powypyleniowego rozwoju męskiego gametofitu.

Badania ujawniły, że **DNA obu komórek dojrzałego, odwodnionego ziarna pyłku hiacynta jest wysoce zmetylowane**, przy czym poziom 5metC w jądrze generatywnym jest wyższy aniżeli w jądrze wegetatywnym. W nieaktywnych transkrypcyjnie jądrach (Zienkiewicz i wsp. 2008a) nie obserwowałam obecności znacznika aktywnej chromatyny acH4. W tym okresie w obu jądrach pyłkowych nie występował enzym kontrolujący deacetylację histonów HDT1. Jednak podczas uwodnienia pyłku, w jądrze wegetatywnym przygotowującym się do wznowienia procesu transkrypcji (Zienkiewicz i wsp. 2008b), wzorzec dystrybucji badanych znaczników epigenetycznych ulegał zmianie. Dekondensacji chromatyny towarzyszyła zmiana wzorca dystrybucji 5metC (ze skupiskowej na bardziej homogennej), aczkolwiek w jądrze nadal nie potwierdziłam występowania znacznika euchromatyny acH4. Natomiast w cytoplazmie komórki wegetatywnej obserwowałam obecność enzymu HDT1, co wskazuje, iż jest on syntetyzowany *de novo* po uwodnieniu

pyłku. Z kolei w komórce generatywnej wzorec dystrybucji i poziom badanych znaczników nie ulegał istotnym zmianom podczas uwodnienia ziaren pyłkowych, obserwowano w niej nadal wysoki poziom 5metC oraz brak acH4 na terenie jej jądra.

Podczas kielkowania i wczesnych etapów wzrostu łagiewki pyłkowej chromatyna jądra wegetatywnego ulegała dalszej dekondensacji, co było skorelowane z obniżeniem poziomu metylacji DNA (5metC), acetylacją histonu H4 i obecnością enzymu HDT1. W tym okresie jądro łagiewki hiacynta wznawia aktywność transkrypcyjną (Zienkiewicz i wsp. 2008b). **Chromatyna komórki generatywnej zlokalizowanej w rosnącej łagiewce także ulegała stopniowej dekondensacji**. Procesowi temu towarzyszyło obniżenie poziomu 5metC, pojawienie się acH4 i enzymu HDT1. Z badań wcześniejszych wiadomo, że jest to okres czasowego włączenia aktywności transkrypcyjnej jądra generatywnego (Zienkiewicz i wsp. 2008b). Z kolei krótko przed podziałem komórki generatywnej hamowaniu syntezy RNA (Zienkiewicz i wsp. 2011, publikacja nr 1) towarzyszyło obniżenie poziomu znaczników aktywnej chromatyny i wzrost poziomu 5metC. W tym okresie jądro wegetatywne z rozproszoną chromatyną nadal pozostawało aktywne transkrypcyjnie (Zienkiewicz i wsp. 2011, publikacja nr 1).

Po podziale komórki generatywnej w jądrach gamet odnotowałam wysoki poziom 5metC oraz deacetylazy histonów HDT1. Wykazałam także występowanie acH4. Obecność w chromatynie obszarów potencjalnie zdolnych do włączenia transkrypcji wskazuje, że aktywacja genomu gamet jest możliwa. **Dojrzewanie komórek plemnikowych związane jest z reorganizacją ich chromatyny. DNA plemnikowe ulega dalszej metylacji**, natomiast poziom acH4 i HDT obniża się, czego efektem jest wzrost kondensacji chromatyny i jej transkrypcyjne wyciszenie (Zienkiewicz i wsp. 2011, publikacja nr 1).

Analiza wzorca dystrybucji badanych modyfikacji epigenetycznych wykazała, że podczas wzrostu łagiewki pyłkowej hiacynta w obszarze bliskości jądra wegetatywnego i komórki generatywnej, tj. w obrębie MGU, wzorec dystrybucji badanych znaczników epigenetycznych był szczególny. Obserwowałam obniżenie poziomu znacznika heterochromatyny, tj. 5metC oraz wzrost poziomu markera euchromatyny - acH4 oraz obecność enzymu HDT1 uczestniczącego w regulacji poziomu acetylacji białek histonowych. Wskazuje to na potencjalnie podwyższoną aktywność transkrypcyjną chromatyny w tych obszarach, w których nie można wykluczyć lokalizacji genów specyficznych dla prawidłowego funkcjonowania MGU oraz komunikacji jego elementów składowych. Ten aspekt pozostaje jednak kwestią otwartą i wymaga dalszych badań, m.in. na poziomie ultrastrukturalnym.

Przeprowadzone obserwacje zmian poziomu i wzorca dystrybucji markerów hetero- i euchromatynowych pozwoliły mi na sformułowanie następujących wniosków:

- jądro wegetatywne oraz generatywne/komórki plemnikowych różnią się poziomem metylacji DNA oraz wzorcem modyfikacji białek histonowych (acH4, HDT1), co skutkuje odmienną organizacją ich chromatyny;
- w jądrach badanych komórek obecne są te same znaczniki epigenetyczne, jednakże w bardziej aktywnym transkrypcyjnie jądrze wegetatywnym poziom markerów euchromatynowych jest wyższy i pojawiają się w nim wcześniej, aniżeli w mniej

aktywnym jądrze generatywnym;

- dojrzewaniu komórek plemnikowych i wyłączaniu ich aktywności transkrypcyjnej (Zienkiewicz i wsp. 2011, publikacja nr 1) towarzyszy postępująca kondensacja chromatyny, wzrost poziomu metylacji DNA oraz eliminacja markera euchromatyny (acH4).

Gametofit żeński

3. Funkcjonalne zróżnicowanie komórek woreczka zalążkowego wyraża się odmiennym wzorcem ich aktywności transkrypcyjnej

Niedojadło K, Pięciński S, Smoliński, DJ, Bednarska-Kozakiewicz E (2012a) Transcriptional activity of *Hyacinthus orientalis* L. female gametophyte cells before and after fertilization. *Planta* 236(1): 153-169 (publikacja nr 2)

W celu poznania dynamiki transkrypcji jąder żeńskiego gametofitu analizowałam poziom i dystrybucję nowo powstałych transkryptów, całkowitej puli polimerazy RNA II (Pol RNA II), jej hypofosforylowanej formy inicjacyjnej (Pol RNA IIA) oraz hyperfosforylowanej formy elongacyjnej (Pol RNA IIO). Badania prowadziłam w różnicującym się i dojrzałym woreczku zalążkowym a następnie w okresie fazy progamicznej i po zapłodnieniu.

W różnicującym się woreczku zalążkowym, tj. przed otwarciem kwiatu, obserwowałam wysoki poziom nowo powstałych transkryptów, obecnych głównie na terenie cytoplazmy. Wysokiej aktywności transkrypcyjnej jąder komórkowych towarzyszył wysoki poziom formy inicjacyjnej i elongacyjnej Pol RNA II. Poziom badanych molekuł był tylko nieznacznie niższy od obserwowanego w komórkach somatycznych niedojrzałego zalążka. Istotne różnice w poziomie syntezy RNA w komórkach pełniących funkcje rozrodcze i komórkach somatycznych odnotowałam w dojrzałym woreczku zalążkowym po antezie. Wówczas w aparacie jajowym najwyższy poziom nowo powstałych transkryptów, puli Pol RNA II oraz obu form enzymu obserwowałam w synergidach. Wysoka aktywność transkrypcyjna tych komórek pozostaje w zgodzie z ich funkcją, bowiem synergidy wydzielają atraktanty, które ukierunkowują wzrost łagiewek pyłkowych. W synergidach nowo powstałe transkrypty lokalizowałam głównie w cytoplazmie okołojądrowej, gdzie obecne są liczne kanały retikulum endoplazmatycznego. **Z kolei w komórkach docelowych dla męskich gamet w komórce jajowej i centralnej, które charakteryzowały się rozluźnioną chromatyną, obserwowałam niski poziom aktywności transkrypcyjnej, przy czym poziom nowo powstałych transkryptów był nieco wyższy w komórce centralnej.** Aktywność transkrypcyjna skorelowana była z poziomem całkowitej puli Pol RNA II. W komórkach aparatu jajowego potwierdziłam występowanie obu form Pol RNA II, przy czym poziomy Pol RNA IIA były porównywalne we wszystkich komórkach, natomiast poziom formy elongacyjnej Pol RNA IIO był nieco niższy w jądrze komórki jajowej w porównaniu do synergid i enzym lokalizowałam głównie w obszarach interchromatynowych. Wyższy poziom Pol RNA IIO obserwowałam również w komórce centralnej oraz w pełniących funkcje odżywcze antypodach.

Faza progamiczna, to okres dalszego wyciszenia metabolicznego gamet. Relatywnie niski poziom nowo powstałych RNA utrzymuje się w obu komórkach, w których poziomy Pol RNA II nie ulegały istotnym zmianom. Nieznaczne obniżenie aktywności transkrypcyjnej podczas fazy progamicznej odnotowałam również w synergidach oraz w antypodach.

Natomiast zapłodnienie indukuje istotne zmiany aktywności transkrypcyjnej komórek woreczka zalążkowego. Najwyższy poziom nowo syntetyzowanych transkryptów obserwowałam w zygocie oraz zapłodnionej komórce centralnej, z której rozwinie się bielmo. Wynik ten wskazuje, że **u hiacynta aktywacja genomu zygotycznego oraz bielmowego zachodzi tuż po zapłodnieniu**, podczas pierwszej interfazy cyklu życiowego komórek. **Procesom tym towarzyszy zmiana organizacji struktury chromatyny.** W zapłodnionej komórce jajowej, w której widoczne jest już drugie jąderko, chromatyna kondensuje w różnej wielkości agregaty, a jądro swoją strukturą przypomina siateczkowate jądra komórek somatycznych zalążka. W zygocie i pierwotnej komórce bielmowej dochodzi także do syntezy nowej puli Pol RNA II, która ulega hiperfosforylacji (obserwowałam wysoki poziom formy elongacyjnej enzymu). W zygocie enzym lokalizowałam głównie w obszarach perichromatynowych, w obrębie agregatów chromatyny. Obecność inicjacyjnej formy enzymu odnotowałam także w obszarach interchromatynowych. Poziomy badanych form Pol RNA II są porównywalne z poziomami znakowania enzymu w komórkach somatycznych zalążka. Z kolei w degenerujących w tym okresie synergidach i antypodach następowało obniżenie aktywności metabolicznej komórek, w których poziom nowych transkryptów oraz Pol RNA II był bardzo niski.

Otrzymane wyniki badań stały się podstawą do wyciągnięcia wniosku, że **w badanym okresie funkcjonowania gametofitu żeńskiego możemy wyróżnić 3 etapy rozwoju różniące się aktywnością transkrypcyjną jego jąder, a także poziomami i dystrybucją Pol RNA II, w tym formy inicjacyjnej i elongacyjnej enzymu:**

- Etap I – wysoka aktywność transkrypcyjna jąder różnicującego się woreczka zalążkowego, w wielojądrowym gametoficie oraz tuż po jego celularyzacji aktywność transkrypcyjna jąder jest porównywalnie wysoka, co prawdopodobnie związane jest z dojrzewaniem komórek woreczka zalążkowego;
- Etap II – obniżanie aktywności transkrypcyjnej komórek docelowych dla męskich gamet, w dojrzałym woreczku zalążkowym, tj. w okresie antezy dochodzi do wyciszenia aktywności transkrypcyjnej zdekondensowanej chromatyny komórki jajowej i centralnej, czemu towarzyszy obniżenie poziomu elongacyjnej formy Pol RNA II; wysoki poziom syntezy RNA nadal występuje w synergidach, które mają też wyższy poziom Pol RNA II; niska aktywność transkrypcyjna komórki jajowej i centralnej utrzymuje się **w fazie progamicznej**, co wskazuje że zapylenie nie indukuje istotnych zmian w ich metabolizmie. W tym okresie sukcesywnie obniża się poziom transkrypcji synergid, czemu towarzyszy obniżanie poziomu Pol RNA II;
- Etap III – aktywacja genomu zygoty i pierwotnej komórki bielmowej, po zapłodnieniu dochodzi do szybkiej reorganizacji chromatyny i uruchomienia

transkrypcji zarówno w zygocie jak i pierwotnej komórce bielkowej, co jest skorelowane z wzrostem poziomu oraz zmianami wzorca dystrybucji Pol RNA II.

Uzyskane wyniki badań stanowiły **pierwsze doniesienie** dotyczące aktywności transkrypcyjnej komórek żeńskiego gametofitu roślin okrytozalążkowych w warunkach *in situ*.

4. Komórka jajowa i centralna magazynują niedojrzałe transkrypty rRNA, a zapłodnienie inicjuje ich dojrzewanie oraz wznowienie ekspresji ojcowskiego rDNA

Niedojadło K, Pięciński S, Smoliński DJ, Bednarska-Kozakiewicz E (2012b) Ribosomal RNA of *Hyacinthus orientalis* L. female gametophyte cells before and after fertilization. *Planta* 236(1): 171-184 (publikacja nr 3)

W kolejnym etapie badań określiłam, czy w różniących się aktywnością metaboliczną komórkach żeńskiego gametofitu hiacynta, wśród nowo syntetyzowanych transkryptów znajduje się pula rybosomalnego RNA. Aby wykazać aktywność transkrypcyjną jąderka wykrywałam niedojrzałe transkrypty zawierające sekwencję ITS1 (pre-rRNA) na tle dojrzałych transkryptów rRNA (26S i 5S rRNA). Intensywność dojrzewania pierwotnych transkryptów pre-rRNA określiłam lokalizując małe jąderkowe U3 snoRNA, biorące udział w pierwszych etapach dojrzewania i modyfikacji pre-rRNA.

Uzyskane wyniki wykazały, że **wszystkie komórki woreczka zalążkowego zawierały wysoką pulę cytoplazmatycznego rRNA**, natomiast różniły się poziomem ITS1 pre-rRNA oraz U3 snoRNA. W dojrzałym woreczku zalążkowym jąderko komórki jajowej było miejscem nagromadzenia ITS1 pre-rRNA, przy czym tylko w strefie peryferycznej jąderka lokalizowałam 26S i 5S rRNA. Proces dojrzewania tych cząsteczek wydawał się być jednak powolny, gdyż na terenie jąderka poziom U3 snoRNA był niski i podczas fazy progamicznej ulegał dalszemu obniżeniu. W wyciszonej transkrypcyjnie komórce jajowej nie odnalazłam nowo powstałych transkryptów na terenie jąderka (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2), komórka także nie gromadziła poli(A) RNA (Pięciński i wsp. 2008). To pozwala mi wnioskować, że przed zapłodnieniem **jąderko komórki jajowej stanowi miejsce przechowywania niedojrzałych transkryptów pre-rRNA, a większość cytoplazmatycznych rRNP nie jest zaangażowana w translację i stanowi pulę nieaktywnych podjednostek rybosomowych**.

W przeciwieństwie do komórki jajowej, **jąderko komórki centralnej** w okresie antezy było aktywne, bowiem na jego terenie występowały wyższe niż w komórce jajowej poziomy niedojrzałych i dojrzałych transkryptów rRNA, a także U3 snoRNA. Prawdopodobnie jest to także okres intensywnego transportu podjednostek rybosomowych, o czym świadczy nagromadzenie 26S rRNA w cytoplazmie w rejonie okołojądrowym. Dojrzewanie podjednostek rybosomowych odbywało się nadal podczas fazy progamicznej, jednakże stopniowemu obniżeniu poziomu 26S i 5S rRNA w jąderku towarzyszył wysoki poziom ITS1 pre-rRNA. Zatem **jąderko komórki centralnej, podobnie jak komórka jajowa, magazynuje niedojrzałe transkrypty pre-rRNA**.

Jąderka aktywnych transkrypcyjnie synergid (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2) zawierają wysoką pulę zarówno ITS1 pre-rRNA jak i 26S i 5S rRNA oraz charakteryzują się wysokim poziomem U3 snoRNA. Jednoczesna obecność nowych i dojrzałych transkryptów rRNA oraz czynnika uczestniczącego w dojrzewaniu pre-rRNA wskazuje na stosunkowo wysoki metabolizm jąderek synergid. Z kolei podczas fazy progamicznej stopniowemu wyciszeniu ogólnej aktywności transkrypcyjnej synergid (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2) towarzyszyło obniżenie aktywności genów rDNA. W komórkach tych obserwowałam zmniejszenie puli rybosomów aż do całkowitego zaniku rRNA w cytoplazmie jednej z synergid (prawdopodobnie docelowej dla łagiewki pyłkowej). W okresie dojrzałości kwiatu oraz podczas fazy progamicznej wysoki poziom syntezy i dojrzewania rRNA utrzymany jest w antypodach.

Zapłodnienie indukuje istotne zmiany w metabolizmie rRNA komórek woreczka zalążkowego. W jądrze zapłodnionej komórki jajowej obserwowałam już dwa jąderka, w których obecny był wysoki poziom ITS1 pre-rRNA, U3 snoRNA oraz dojrzałych transkryptów rRNA. Wyniki te pozwoliły mi wnioskować, że w transkrypcyjnie aktywnej **zygotie (Niedojadło i wsp. 2012a, publikacja nr 2) dochodziło do wznowienia syntezy rRNA, także z ojcowskiego rDNA**. Ponadto w nukleoplazmie oraz na obrzeżach obu jąderek zygoty obecny był dojrzały 5S rRNA, co świadczyć może o intensywnym procesie składania dużych podjednostek rybosomowych, w tym dojrzewaniu nagromadzonych w jąderku matczynych ITS1 pre-rRNA. Biogeneza nowej puli rybosomów jest zapewne związana z pozapłodnieniową intensyfikacją translacji, co pozostaje w zgodzie z pojawieniem się w zygotie dużej puli poli(A) RNA (Pięciński i wsp. 2008).

Wkrótce po zapłodnieniu w **jądrze pierwotnej komórki bielmowej obecne są trzy jąderka**, w których potwierdziłam obecność ITS1 pre-rRNA oraz U3 snoRNA. Świadczy to o wznowieniu aktywności ojcowskiego rDNA, a także o intensywnym dojrzewaniu pierwotnych transkryptów rRNA. Podczas tworzenia tkanki odżywczej w jądrach bielma obserwowałam pojedyncze, duże jąderka, w których intensywnie zachodził proces syntezy i dojrzewania rRNA. Jąderka synergid i antypod, które spełniły już swoją funkcję i podlegają stopniowemu transkrypcyjnemu wyciszeniu (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2), pozbawione są 26S i 5S rRNA ale nadal na ich terenie wykrywałam nagromadzone niedojrzałe transkrypty pre-rRNA. Postępującej degradacji komórek towarzyszyło obniżenie poziomu cytoplazmatycznej puli rRNA.

Podsumowując, **otrzymane wyniki wskazują, że u *H. orientalis*:**

- w transkrypcyjnie wyciszonej komórce jajowej i centralnej dojrzałego woreczka zalążkowego (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2) metabolizm rRNA skierowany jest na akumulację niedojrzałych transkryptów pre-rRNA w jąderku oraz rRNP na terenie cytoplazmy;
- zapłodnienie indukuje dojrzewanie matczynego pre-rRNA oraz wznowienie aktywności ojcowskiego rDNA;
- w pełniących funkcje somatyczne synergidach i antypodach metabolizm jąderkowy skorelowany jest z aktywnością transkrypcyjną komórek, która zmienia się w kolejnych etapach rozwoju woreczka (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2).

Są to **pierwsze i prawdopodobnie jedyne dane** na temat aktywności jąderek w komórkach żeńskiego gametofitu roślin okrytozalążkowych, uzyskane podczas badań *in situ*.

Obecnie prowadzę badania dotyczące epigenetycznego zróżnicowania komórek żeńskiego gametofitu *H. orientalis*. Pierwsze wyniki zostały przedstawione w formie posteru na XXXI Konferencji Embriologicznej Rośliny-Zwierzęta-Człowiek w Olsztynie w 2018 roku (Załącznik nr 3) i są przygotowywane do druku.

5. Wzorzec ekspresji genu CRT w komórkach jajowej i centralnej oraz w zygocie i bielmie jest skorelowany z ogólnym poziomem ich transkrypcji

Niedojadło K, Lenartowski R, Lenartowska M, Bednarska-Kozakiewicz E (2015) Late progamic phase and fertilization affect calreticulin expression in the *Hyacinthus orientalis* female gametophyte. Plant Cell Rep 34(12): 2201-2215 (publikacja nr 4)

W kolejnym etapie badań postanowiłam określić wzór czasowo-przestrzennej ekspresji wybranego genu na tle ogólnej, zróżnicowanej aktywności transkrypcyjnej komórek żeńskiego gametofitu *H. orientalis*. Zapoczątkowane w zespole prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz i kontynuowane przez dr hab. Martę Lenartowską, prof. UMK i dr. hab. Roberta Lenartowskiego badania u *Petunia* dowodzą, że kalretikulina (CRT) uczestnicząc w mechanizmach magazynowania i mobilizacji jonów Ca^{2+} oraz kontroli jakości białek wydzielniczych pełni istotną rolę w procesie generatywnego rozmnażania roślin okrytozalążkowych (Lenartowska i wsp. 2002, 2009; Lenartowski i wsp. 2014, 2015). Założyłam, że CRT odgrywa również istotną rolę w wydarzeniach reprodukcyjnych u hiacynta, a ekspresja tego genu w komórkach żeńskiego gametofitu podlega precyzyjnej kontroli. Dlatego też celem moich badań było określenie poziomu mRNA (hybrydyzacja *in situ*) i białka CRT (immunocytochemia) na tle ogólnej aktywności transkrypcyjnej komórek woreczka zalążkowego w okresie jego dojrzewania, fazy progamicznej oraz po zapłodnieniu (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2).

Wkrótce po celularyzacji we wszystkich dojrzewających komórkach woreczka zalążkowego obserwowałam wysoki poziom mRNA CRT, co skorelowane było z ich wysoką aktywnością transkrypcyjną (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2). Różnice w poziomie transkryptów CRT odnotowałam podczas antezy oraz fazy progamicznej. **W wyciszonej transkrypcyjnie komórce jajowej i centralnej** (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2) **poziom mRNA CRT** obniżał się, ale był nieco wyższy w komórce centralnej. W komórkach tych mRNA CRT obecny był głównie na terenie okołojądrowej cytoplazmy. W aparacie jajowym najwyższy poziom transkryptów i białka CRT obserwowałam z kolei w synergidach charakteryzujących się wysoką aktywnością transkrypcyjną (**Niedojadło i wsp. 2012a**, publikacja nr 2). Transkrypty lokalizowałam w cytoplazmie poniżej aparatu fibrylarnego. Badania na poziomie mikroskopu elektronowego wykazały, że białko CRT występuje zewnątrzkomórkowo na obrzeżach elektronowo-gęstych obszarów tej unikalnej struktury, a także na terenie cytoplazmy w siateczce śródplazmatycznej i diktiosomach. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka CRT dowodzi, że w synergidach może istnieć szlak jego wydzielania z ER poprzez aparat Golgiego do aparatu fibrylarnego, gdzie może pełnić

istotną rolę w buforowaniu jonów Ca^{2+} . Dane literaturowe wskazują, że na terenie aparatu fibrylarnego obecna jest wysoka pula wolnego i luźno związanego wapnia, odgrywająca kluczową rolę we wzroście i ukierunkowaniu łagiewki pyłkowej. Ponadto synergidy wydzielają atraktanty i nie wykluczone, że CRT jako białko opiekuńcze kontroluje jakość intensywnie syntetyzowanych polipeptydów (Lenartowski i wsp. 2014, 2015). W okresie, kiedy łagiewki dorastały już do załączni poziom mRNA i białka CRT w synergidach był zróżnicowany – znacząco wyższy w synergidzie docelowej. Wskazuje to, że białko CRT (być może w sposób pośredni poprzez regulację homeostazy jonów Ca^{2+}) uczestniczy w procesie ukierunkowania łagiewki pyłkowej na jedną z siostrzanych synergid.

Istotne zmiany wzorca ekspresji mRNA i białka CRT w komórkach woreczka zalążkowego obserwowałam po zapłodnieniu. Aktywacji genomu zygotycznego i bielmowego (Niedojadło i wsp. 2012a, publikacja nr 2) towarzyszy **wzmoczona transkrypcja genu CRT. Wzrasta także poziom białka**, które lokalizowałam w okołojądrowej cytoplazmie, głównie na powierzchni długich cystern ER. Białko występuje obficie tuż pod ścianą komórkową zygoty, w cytoplazmie bogatej w ER i diktiosomy. Taka lokalizacja CRT pozwala wnioskować, że CRT może pełnić istotną rolę w inicjowaniu powstawania fali wapniowej podczas fuzji gamet (Hammamura i wsp. 2014; Denninger i wsp. 2014). Stabilizacja homeostazy jonów Ca^{2+} z udziałem CRT może być istotna podczas bloku polispermii a następnie inicjacji programu rozwoju zarodka i bielma. W degenerujących synergidach obniżeniu całkowitej aktywności transkrypcyjnej (Niedojadło i wsp. 2012a, publikacja nr 2) towarzyszył niski poziom mRNA i białka CRT. Po zapłodnieniu struktura aparatu fibrylarnego ulegała zmianie, lecz w zanikających elektronowo-gęstych obszarach wciąż odnotowałam obecność CRT.

Podsumowując, **wyniki badań nad ekspresją genu CRT wskazują, że:**

- w komórkach aparatu jajowego gen CRT podlega ekspresji w okresie funkcjonowania woreczka zalążkowego, przy czym poziom transkryptów i białka CRT jest skorelowany z ich ogólną aktywnością transkrypcyjną (Niedojadło i wsp. 2012a, publikacja nr 2);
 - w wyciszonych transkrypcyjnie komórkach jajowej i centralnej dojrzałego woreczka zalążkowego poziom ekspresji genu CRT jest niski,
 - poziom ekspresji genu CRT w aktywnych transkrypcyjnie synergidach jest wysoki a białko CRT występuje zarówno wewnątrzkomórkowo (ER, diktiosomy), jak i zewnątrzkomórkowo (aparat fibrylarny);
 - poziom ekspresji genu CRT wzrasta istotnie po zapłodnieniu podczas aktywacji genomu zygotycznego oraz pierwotnej komórki bielmowej.

5.4. Podsumowanie

Wyniki badań prowadzonych u *H. orientalis*, stanowiących podstawę prezentowanego osiągnięcia naukowego, pozwalają na sformułowanie następujących wniosków końcowych:

- podczas wzrostu łagiewki pyłkowej różnicujące komórki plemnikowe są aktywne transkrypcyjnie, a po osiągnięciu dojrzałości podlegają metabolicznemu wyciszeniu,

któremu towarzyszy hamowanie syntezy RNA i eliminacja elementów maszynarii splicingowej;

- MGU obecna w rosnącej łagiewce, poza funkcją strukturalną, prawdopodobnie uczestniczy w „genetycznej” interakcji między jądrem wegetatywnym a komórką generatywną;
- różnicujący się woreczek zalążkowy charakteryzuje wysoka aktywność transkrypcyjna jąder, natomiast okres dojrzewania komórki jajowej i centralnej skorelowany jest z hamowaniem syntezy RNA,
- wyciszone transkrypcyjnie dojrzałe żeńskie i męskie gamety charakteryzuje odmienna organizacja chromatyny - w komórkach plemnikowych za silną kondensację może odpowiadać wzrost poziomu metylacji DNA i eliminacja znacznika euchromatyny acH4, natomiast w komórce jajowej i centralnej chromatyna pozostaje rozproszona;
- zapylenie nie indukuje istotnych zmian w metabolizmie komórki jajowej i centralnej a faza progamiczna jest okresem utrzymania wyciszonej aktywności transkrypcyjnej żeńskich gamet;
- zapłodnienie indukuje aktywację genomu zygoty i pierwotnej komórki bielkowej, w tym ojcowskiego rDNA; aktywacji genomu zygoty towarzyszy reorganizacja chromatyny z rozproszonej na typową dla komórek somatycznych (typ siateczkowaty);
- ekspresja genu CRT skorelowana jest z poziomem aktywności transkrypcyjnej komórek w okresie różnicowania żeńskich gamet, zapłodnienia oraz podczas wczesnej embriogenezy.

5.5 Plany naukowe

W przyszłości planuję kontynuować badania zmierzające do poznania mechanizmów regulacji ekspresji genów w komórkach linii płciowej oraz podczas wczesnych etapów embriogenezy u roślin okrytozalążkowych. Obecnie prowadzę badania dotyczące wzorca dystrybucji markerów epigenetycznych w komórkach żeńskiego gametofitu *H. orientalis*. Wciąż doskonale swój warsztat badawczy i staram się rozszerzyć moje eksperymenty o metody biologii molekularnej. Kontynuuję badania podjęte w granie NCN pt. „Analiza ekspresji i dystrybucji mikro RNA w komórkach męskiego i żeńskiego gametofitu przed i po zapłodnieniu u roślin okrytozalążkowych”. Opracowałam metodę izolacji pojedynczych komórek żeńskiego gametofitu *Arabidopsis* techniką mikrodysekcji laserowej. Podjęłam się zadania identyfikacji cząsteczek miRNA w żeńskich gametach. Pomimo trudności technicznych obecnie moje badania koncentrują się na przygotowaniu bibliotek miRNA, które będą sekwencjonowane w oparciu o RNA pozyskane z wyciętych komórek. Próbuję także dopracować technikę qPCR na materiale pochodzącym z mikrodysekcji. Dane bioinformatyczne wraz z wynikami badań uzyskanymi z wykorzystaniem technik biologii komórkowej z pewnością przybliżą mnie do zrozumienia procesów związanych z czasowym włączeniem i hamowaniem transkrypcji na tle zmieniającej się organizacji chromatyny żeńskich gamet. Chciałabym również wyjechać na dłuższy zagraniczny staż naukowy do jednego z wiodących ośrodków uniwersyteckich w Europie w zakresie badań dotyczących generatywnego rozmnażania roślin okrytonasiennych, np. do laboratorium

prof. T. Dresselhaus (University of Regensburg), czy laboratorium prof. U. Grossniklaus (University of Zurich).

5.6 Literatura

- Anderson SN, Johnson CS¹, Chesnut J, Jones DS, Khanday I, Woodhouse M, Li C, Conrad LJ, Russell SD, Sundaresan V (2017) The Zygotic Transition Is Initiated in Unicellular Plant Zygotes with Asymmetric Activation of Parental Genomes. *Dev Cell* 43(3): 349-358
- Autran D, Baroux C, Raissig MT, Lenormand T, Wittig M, Grob S, Steimer A, Barann M, Klostermeier UC, Leblanc O (2011) Maternal epigenetic pathways control parental contributions to *Arabidopsis* early embryogenesis. *Cell* 145: 707-719
- Baroux C, Blanvillain R, Gallois P (2001) Paternally inherited transgenes are down-regulated but retain low activity during early embryogenesis in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 509 (1): 11-16
- Boavida L, Becker, J Feijó J (2005a) The making of gametes in higher plants. *Int J Dev Biol* 49: 595–614
- Boavida LC, Vieira AM, Becker JD, Feijó JA (2005b) Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote. *Int J Dev Biol* 49(5-6):615-632
- Borges, F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijó JA, Becker JD (2008) Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells. *Plant Physiol.* 148, 1168–1181
- Borges F, Pereira PA, Slotkin RK, Martienssen RA, Becker JD (2011) MicroRNA activity in the *Arabidopsis* male germline. *J Exp Bot* 62(5):1611-1620
- Calarco JP, Borges F, Donoghue MT, Van Ex F, Jullien PE, Lopes T, Gardner R, Berger F, Feijó JA, Becker JD, Martienssen RA (2012) Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* 151(1):194-205
- Denninger P, Bleckmann A, Lausser A, Vogler F, Ott T, Ehrhardt DW, Frommer WB, Sprunck S, Dresselhaus T, Grossmann G (2014) Male-female communication triggers calcium signatures during fertilization in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 22;5: 4645
- Domoki M, Szűcs A, Jäger K, Bottka S, Barnabás B, Fehér A (2013) Identification of genes preferentially expressed in wheat egg cells and zygotes. *Plant Cell Rep* 32(3): 339-348
- Dumas, C, Mogensen HL (1993) Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. *Plant Cell* 5: 1337-1348
- Eady C, Lindsey K, Twell D (1995) The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. *Plant Cell* 7:65-74
- Grimanelli D, Perotti E, Ramirez J, O Leblanc (2005) Timing of the maternal-to-zygotic transition during early seed development in maize. *Plant Cell*, 17 (4): 1061-1072
- Hamamura Y, Nishimaki M, Takeuchi H, Geitmann A, Kurihara D, Higashiyama T (2014) Live imaging of calcium spikes during double fertilization in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 22;5: 4722
- Higashiyama T (2002) The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. *J Plant Res* 115(1118):149-160
- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11(3):204-220
- Lenartowska M, Karaś K, Marshall J, Napier R, Bednarska E (2002) Immunocytochemical evidence of calreticulin-like protein in pollen tubes and styles of *Petunie hybrida* Hort. *Protoplasma* 219(1-2):23-30
- Lenartowska M, Lenartowski R, Smoliński DJ, Wróbel B, Niedojadło J, Jaworski K, Bednarska E (2009) Calreticulin expression and localization in plant cells during pollen-pistil interactions. *Planta* 231(1): 67-77
- Lenartowski R, Suwińska A, Prusińska J, Gumowski K, Lenartowska M (2014) Molecular cloning and transcriptional activity of a new *Petunia* calreticulin gene involved in pistil transmitting tract maturation, progamic phase, and double fertilization. *Planta* 239(2):437-454

- Lenartowski R, Suwińska A, Lenartowska M (2015) Calreticulin expression in relation to exchangeable Ca(2+) level that changes dynamically during anthesis, progamic phase, and double fertilization in *Petunia*. *Planta* 241(1): 209-227
- McCormick S (1993) Male gametophyte development. *The Plant Cell* 5: 1265–1275
- McCue AD, Cresti M, Feijó JA, Slotkin RK (2011) Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *J Exp Bot* 62(5):1621-1631
- Nodine MD, Bartel DP (2012) Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos. *Nature* 482: 94-97
- Ohnishi T, Takanashi H, Mogi M, Takahashi H, Kikuchi S, Yano K, Okamoto T, Fujita M, Kurata N, Tsutsumi N (2011) Distinct gene expression profiles in egg and synergid cells of rice as revealed by cell-type-specific microarrays. *Plant Physiol* 155: 881–891
- Pięciński S, Smoliński JD, Zienkiewicz K, Bednarska E (2008) Changes in poly(A) and TMG snRNA distribution in the embryo sac of *Hyacinthus orientalis* L. before and after fertilization. *Sex Plant Reprod* 21: 247–257
- Pillot M, Baroux C, Vazquez MA, Autran D, Leblanc O, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Grimanelli D (2010) Embryo and endosperm inherit distinct chromatin and transcriptional states from the female gametes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22 (2): 307-320
- Pina C, Pinto F, Feijó JA, Becker JD (2005) Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol* 138(2):744-756
- Russell SD (1993) The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1349-1359
- Russell SD, Cass DD (1981) Ultrastructure of the sperm of *Plumbago zeylanica*: cytology and association with the vegetative nucleus. *Protoplasma* 107:85–107
- Rutley N, Twell D (2015) A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reprod* 28(2): 73-89
- Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurdzić M, Becker JD, Feijó JA, Martienssen RA (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136(3):461-472
- Vielle-Calzada JP, Baskar R, Grossniklaus U (2000) Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 404 (6773): 91-94
- Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH (2008) Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148(3):1201-1211
- Wuest SE, Vijverberg K, Schmidt A, Weiss M, Gheyselinck J, Lohr M, Wellmer F, Rahnenführer J, von Merig C, Grossniklaus U (2010) *Arabidopsis* female gametophyte gene expression map reveals similarities between plant and animal gametes. *Curr Biol* 20: 506–512
- Zienkiewicz K, Smoliński DJ, Bednarska E (2006) Distribution of poly(A) RNA and splicing machinery elements in mature *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains and pollen tubes growing *in vitro*. *Protoplasma* 227: 95–103
- Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Smoliński DJ, Rafińska K, Świdziński M, Bednarska E (2008a) Transcriptional state and distribution of poly(A) RNA and RNA polymerase II in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains. *Sex Plant Reprod* 21
- Zienkiewicz K, Zienkiewicz A, Rodriguez-Garcia MI, Smoliński DJ, Świdziński M, Bednarska E (2008b) Transcriptional activity and distribution of splicing machinery elements during *Hyacinthus orientalis* L. pollen tube growth. *Protoplasma* 233: 129–139

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pozostały dorobek publikacyjny **nie wchodzący w skład osiągnięcia naukowego** stanowi (Załącznik nr 7):

- 9 oryginalnych prac eksperymentalnych, w tym 8 opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR o łącznej wartości **IF=26,271** (zgodnie z rokiem opublikowania) oraz 1 bez współczynnika wpływu IF; sumaryczna liczba punktów wg listy MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi **263**;
- 47 doniesień konferencyjnych prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych.

Rozwój naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

Udział CRT w interakcji pyłek–słupek u *Petunia hybrida*

Pracę magisterską pt. „Immunocytochemiczna lokalizacja kalretikuliny w niezapyłonym i zapyłonym słupku *Petunia hybrida* Hort.” wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz w Pracowni Biologii Rozwoju (Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział BiNoZ UMK w Toruniu). Badania, które prowadziłam w trakcie realizacji pracy magisterskiej stanowiły część projektu dotyczącego udziału jonów Ca^{2+} oraz białek wiążących Ca^{2+} (kalmoduliny i CRT) w interakcjach pyłek–słupek u roślin okrytozalążkowych. Moim zadaniem było wykonanie immunofluorescencyjnej lokalizacji CRT w słupku *Petunia* przed i po zapyleniu. Wyniki badań ujawniły obecność tego białka w komórkach szlaku transmisyjnego szyjki słupka, które lokalizowałam głównie na terenie cytoplazmy komórek. Natomiast znacząco wyższy poziom CRT odnotowałam w rosnących w słupku łagiewkach pyłkowych, głównie w ich szczytowej cytoplazmie. Otrzymane wyniki zostały opublikowane:

- Lenartowska M, **Karaś* K**, Marshall J, Napier R, Bednarska E (2002) Immunocytochemical evidence of calreticulin-like protein in pollen tubes and styles of *Petunia hybrida* Hort. Protoplasma 219(1-2): 23-30. **IF: 1,473; 21 pkt. MNiSW**

*moje panieńskie nazwisko

Diagnostyka i molekularne mechanizmy rozwoju i progresji nowotworów skóry człowieka

Po ukończeniu studiów w 1999 roku zostałam zatrudniona na stanowisku młodszego asystenta w Poradni Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Toruniu. Jako członek Interdyscyplinarnego Zespołu Optycznych Metod Wczesnego Wykrywania Nowotworów UMK w Toruniu, kierowanym przez prof. dr hab. Barbarę W. Chwirot, przez dwa lata wykonywałam badania pacjentów w celu diagnostyki znamion z wykorzystaniem nieinwazyjnej fluorescencyjnej metody wczesnego wykrywania czerniaka skóry. W tym okresie, pomimo że nie pracowałam na stanowisku naukowym, włączona zostałam w projekty badawcze Zespołu oraz kierowanego przez Panią Profesor Chwirot Zakładu Biologii Medycznej (Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydziału BiNoZ UMK w Toruniu). W 2001 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale BiNoZ UMK w Toruniu, co pozwoliło mi w pełni realizować moje pasje badawcze. Prowadzone przeze mnie badania

nadal dotyczyły biologii czerniaka i skupiały się na próbie wyjaśnienia związku zaburzeń ekspresji genu *Apaf-1* z rozwojem czerniaka i nabywaniem zdolności jego komórek do przerzutowania. Białko *Apaf-1* jest elementem apoptosomu w tzw. mitochondrialnym szlaku indukcji apoptozy, w którym następuje aktywacja pierwszej, inicjującej kaskadę kaspaz prokaspazy-9. Detekcję genu i jego transkryptu prowadziłam techniką FISH z zastosowaniem wygenerowanych przeze mnie sond molekularnych (sensowna i antysensowna) na podstawie sekwencji *Apaf-1* cDNA. Białko lokalizowałam techniką immunohistochemiczną z zastosowaniem tyraminy w celu wzmocnienia (amplifikacji) sygnału reakcji (TSA). Analizie poddałam komórki skóry, znamion barwnikowych uważanych za potencjalne zmiany prekursorowe, czerniaków pierwotnych w różnym stadium zaawansowania oraz przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych. Badania te pozwoliły stwierdzić, że:

- kluczowym momentem w nabywaniu przez komórki czerniaka zdolności do inwazji i tworzenia przerzutów może być zahamowanie ekspresji genu *Apaf-1*, na co wskazują:
- wyraźna, ujemna korelacja w przypadku progresji czerniaka ocenianej wg skali Clarka oraz istotne obniżenie poziomu mRNA i białka *Apaf-1* dla czerniaków II i III stopniu, co związane może być z przejściem nowotworu z poziomej do pionowej fazy wzrostu,
- częstsze zahamowanie ekspresji genu *Apaf-1* w czerniakach guzowatych w porównaniu do czerniaków szerzących się powierzchownie,
- zahamowana ekspresja genu *Apaf-1* we wszystkich badanych przerzutach czerniaka do węzłów chłonnych;
- zahamowany lub obniżony poziom ekspresji genu *Apaf-1* w łagodnych znamionach barwnikowych dowodzi, że ich komórki mogły już przejść pierwsze etapy złośliwej transformacji i pozwala uznać je za znamiona prekursorowe dla rozwoju czerniaka;
- ocena poziomu ekspresji genu *Apaf-1* może stać się w przyszłości potencjalnym markerem prognostycznym i/lub predykcyjnym w określeniu progresji, rokowań i doboru terapii dla pacjentów, a opracowanie metody przywrócenia ekspresji badanego genu mogłoby doprowadzić do podjęcia próby opracowania nowej metody leczenia czerniaka.

Rozprawę doktorską pt. „Badania nad ekspresją genu efektoru apoptozy *Apaf-1* w znamionach barwnikowych, czerniaku pierwotnym i jego przerzutach u człowieka” obroniłam z wyróżnieniem w 2007 roku. Promotorem w przewodzie doktorskim była prof. dr hab. Barbara W. Chwirot, a recenzentami prof. dr hab. Lech Chyczewski (Uniwersytet Medyczny w Białymstoku) oraz prof. dr hab. Jan Filipowski (Zakład Genetyki, UMK w Toruniu). Wyniki zawarte w pracy doktorskiej prezentowałam na konferencjach międzynarodowych i krajowych w formie komunikatu ustnego i doniesień plakatowych (*Załącznik nr 7*) oraz opublikowałam:

- **Niedojadło K, Łabadzka K, Łada E, Milewska A, Chwirot BW (2006) Apaf-1 expression in human cutaneous melanoma progression and in pigmented nevi. Pigment Cell Res 19(1): 43-50. IF: 3,180; 20 pkt. MNiSW**

Rozwój naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych

Organizacja chromatyny i regulacja ekspresji genów w komórkach linii płciowej oraz podczas wczesnych etapów embriogenezy u roślin kwiatowych

Od października 2007 roku zatrudniona zostałam na stanowisku asystenta (od 2009 roku adiunkta) w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału BiNoZ UMK w Toruniu, kierowanym przez prof. dr hab. Elżbietę Bednarską-Kozakiewicz. Moja kariera naukowa „zatoczyła koło” i powróciłam do badań na roślinnym materiale embriologicznym. Moje zainteresowania badawcze skoncentrowały się **na poznaniu procesów włączonych w organizację chromatyny i regulację ekspresji genów w komórkach linii płciowej oraz podczas wczesnych etapów embriogenezy u dwóch modelowych gatunków roślin okrytozalążkowych *Arabidopsis thaliana* i *Hyacinthus orientalis***. W 2008 roku zostałam głównym wykonawcą w grantie MNiSW N N303 290434 pt. „Dynamika transkrypcji i dystrybucja elementów systemu splicingowego podczas płciowego rozmnażania roślin kwiatowych” (2008-2011, kierownik prof. dr hab. Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz). Szczególnie istotne miejsce w moich badaniach zajęły zagadnienia związane z mechanizmami transkrypcyjnej i posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, w tym z udziałem małych niekodujących RNA. W latach 2011-2016 kierowałam grantem NCN SONATA 2011/03/D/NZ3/00603 pt. „Analiza ekspresji i dystrybucji mikro RNA w komórkach męskiego i żeńskiego gametofitu przed i po zapłodnieniu u roślin okrytozalążkowych”. W 2015 r. zostałam powołana na promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr Marleny Kozłowskiej realizującej pracę doktorską pt. „Epigenetyczne modyfikacje chromatyny w komórkach męskiego gametofitu *Hyacinthus orientalis* L. w okresie od dojrzałości pyłku do powstania komórek plemnikowych”, której obrona odbyła się w 2017 roku. Uzyskane przez mnie wyniki badań w tym okresie mojej działalności naukowej zostały opublikowane i weszły w skład mojego osiągnięcia naukowego (opisane w pkt. 4). Ponadto, wyniki badań prezentowałam na licznych krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych w formie wykładu plenarnego, komunikatów ustnych oraz doniesień plakatowych (Załącznik nr 7). Dwukrotnie w tym okresie otrzymałam wyróżnienie za najlepszą prezentację posterową.

*Czasowo-przestrzenna dystrybucja białek AGO1 i AGO4 w komórkach męskiego gametofitu *H. orientalis**

W ramach projektu dotyczącego roli małych niekodujących RNA w komórkach żeńskiego i męskiego gametofitu roślin okrytozalążkowych prowadzone przeze mnie badania *in situ* ujawniły, że mechanizmy transkrypcyjnej (TGS) i posttranskrypcyjnej (PTGS) regulacji ekspresji genów z udziałem białek AGO mogą odgrywać istotną rolę w podczas wzrostu łagiewki pyłkowej oraz dojrzewania gamet u hiacynta. Do tej pory jedynie wyniki analiz transkryptomów trójkomórkowych ziaren pyłku *Arabidopsis* wskazywały na obecność mRNA AGO1 i AGO4, nieznany wciąż pozostawał wzorzec lokalizacji tych białek. W swoich badaniach immunocytochemicznych wykazałam dynamiczne zmiany poziomu i dystrybucji białek AGO1 i AGO4 podczas dojrzewania pyłku oraz powypyleniowego rozwoju męskiego gametofitu. Wyniki badań dyskutowane na tle zmieniającej się aktywności transkrypcyjnej

komórek (Zienkiewicz i wsp. 2008b, 2011) a także wzorca dystrybucji znaczników hetero – i euchromatyny (Kozłowska i wsp. 2016) pozwoliły mi na wysunięcie następujących głównych wniosków, że:

- wzorec dystrybucji białka AGO1 w jądrze komórkowym skorelowany jest z aktywnością transkrypcyjną badanych komórek,
- stopniowe pojawianie się białka AGO 1 w cytoplazmie łagiewki pyłkowej wskazuje na włączenie szlaku PTGS podczas jej szczytowego wzrostu;
- pojawienie się AGO4 w cytoplazmie podczas kiełkowania pyłku, a następnie stopniowej akumulacji białka w jądrach komórek podczas wzrostu łagiewki pyłkowej może odzwierciedlać czasowo-przestrzenną organizację procesu RdDM (ang. *RNA-directed DNA methylation*, metylacji DNA zależnej od RNA) podczas rozwoju męskiego gametofitu hiacyntha,
- lokalizacja białek AGO1 i AGO4 w pobliżu MGU, może wskazywać na komunikację międzykomórkową w obrębie tej wyspecjalizowanej jednostki strukturalno-funkcjonalnej.

Otrzymane wyniki prezentowane były na konferencji w formie komunikatu ustnego (Załącznik nr 4) oraz zostały opisane w manuskrypcie publikacji, która obecnie podlega recenzji w czasopiśmie *Protoplasma*:

- **Niedojadło K**, Kupiecka M, Kołowerzo-Lubnau A, Lenartowski R, Niedojadło J, Bednarska-Kozakiewicz E (2019) Dynamic distribution of AGO1 and AGO4 in *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains and *in vitro* growing pollen tubes.

Rola apoplastu w procesie podwójnego zapłodnienia u roślin okrytozalążkowych

Jony Ca^{2+} odgrywają ważną rolę w procesach płciowego rozmnażania roślin, m.in. w ukierunkowanym wzroście łagiewki pyłkowej, uwolnieniu komórek plemnikowych w synergidzie oraz zapłodnieniu. Wcześniejsze wyniki badań zespołu prof. Elżbiety Bednarskiej-Kozakiewicz wykazały udział nisko i wysoko estryfikowanych pektyn (homogalakuronianów HG) w regulacji zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} podczas ukierunkowanego wzrostu łagiewki pyłkowej w szlaku transmisyjnym słupka *Petunia hybrida* i *Haemanthus albiflos* (Lenartowska i wsp. 2001, *Planta* 213(2):182-191; Lenartowska i wsp. 2011, *Protoplasma* 248(4):695-705). Nieznany pozostał udział tych pektyn w końcowym etapie fazy progamicznej i podczas zapłodnienia, tj. w zalążku. Dlatego też celem moich badań było określenie dystrybucji trzech wariantów HG: o wysokim i niskim stopniu estryfikacji oraz niskim stopniu estryfikacji sieciowanych jonami Ca^{2+} w zalążkach *Hyacinthus* przed i po zapłodnieniu. Przeprowadzone badania wykazały że:

- zapylenie indukuje zmiany w dystrybucji HG na drodze wzrostu łagiewki pyłkowej w zalążku; w wyniku lizy HG- Ca^{2+} w kanale mikropylarnym dochodzi do uwolnienia wolnych jonów Ca^{2+} , co warunkuje utworzenie optymalnego środowiska wapniowego dla ukierunkowanego wzrostu łagiewek pyłkowych;

- estryfikowane HG aparatu fibrylarnego synergid ulegają demetylacji lecz nie są sieciowane jonami Ca^{2+} , co prawdopodobnie sprzyja penetracji synergidy docelowej przez wrastającą łagiewkę pyłkową,
- podczas fazy progamicznej następuje deestryfikacja HG obecnych w chalazalnym regionie ściany komórki jajowej promująca lizę pektyn; może to mieć związek z degradacją ściany komórkowej gamety żeńskiej w miejscu przyszłej fuzji z komórką plemnikową;
- zapłodnienie indukuje reorganizację pektynowego składu HG w kanale mikropylarnym oraz w aparacie fibrylarnym synergid, co prawdopodobnie stanowi jeden z potencjalnych elementów mechanizmu blokowania polispermii; obserwowany wzrost poziomu HG- Ca^{2+} w tych lokalizacjach oraz w aparacie fibrylarnym wskazuje na udział tej frakcji pektyn w obniżeniu lokalnego stężenia jonów Ca^{2+} , efektem może być hamowanie wrastania kolejnych łagiewek pyłkowych do zalążka i/lub synergid;
- po zapłodnieniu, wokół zygoty syntetyzowana jest nowa, ciągła ściana komórkowa o charakterystycznej strukturze „sporoderm-like”, która zawiera wszystkie badane frakcje HG; ściana ta prawdopodobnie chroni zygotę i/lub bierze pośredni udział w transporcie związków odżywczych między zygotą i bielmem.

Wyniki badań prezentowane były na konferencji krajowej (Załącznik nr 7) i zostały opublikowane:

- **Niedojadło K**, Hyjek M, Bednarska-Kozakiewicz E (2015). Spatial and temporal localization of homogalacturonans in *Hyacinthus orientalis* L. ovule cells before and after fertilization. Plant Cell Rep 34(1): 97-109. IF: 3,088; 35 pkt. MNiSW

Regulacja ekspresji genów roślin w warunkach fizjologicznych i stresu abiotycznego

Ważną częścią mojej aktywności naukowej związanej z badaniami regulacji ekspresji genów w komórkach roślinnych jest udział w projektach zespołów z innych uczelni oraz innych jednostek macierzystego Wydziału.

Wpływ stresu solnego na ekspresję miRNA u Arabidopsis thaliana

Uczestniczyłam w badaniach zespołu prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej i prof. dr hab. Artura Jarmołowskiego z Zakładu Ekspresji Genów (Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu), które dotyczyły wpływu stresu solnego na ekspresję miRNA u *Arabidopsis thaliana*. Analizy transkryptomu ujawniły zmianę ekspresji zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i posttranskrypcyjnym około 40% genów *MIR*. Wykazano m.in., że w odpowiedzi na stres podwyższonego stężenia NaCl obniża się poziom pri-miRNA161 i pri-miRNA173, a wzrasta poziom miRNA161 oraz miRNA173. Okazało się, że w regulacji ekspresji obu genów *MIR161* i *MIR173* istotną rolę pełni białko AGO1, które z jednej strony w cytoplazmie stabilizuje dojrzałe cząsteczki miRNA, a z drugiej - w wyniku oddziaływania kompleksu AGO1/miRNA z nowo syntetyzowanym pri-miRNA. Prowadzi to do przedwczesnej terminacji transkrypcji przez polimerazę RNA II, demontażu kompleksu transkrypcyjnego

i uwolnienia krótkich i niepoliadenylowanych transkryptów. Jest to nowa, nieznana dotąd rola białka AGO1 w kotranskrypcyjnej regulacji ekspresji roślinnych genów *MIR*. Moim zadaniem badawczym w tym projekcie była immunolokalizacja białka AGO1 w komórkach mezofilowych oraz w ich izolowanych jądrach roślin hodowanych w warunkach kontrolnych i poddanych stresowi solnemu. Pomimo dostępności kilku linii *Arabidopsis* ze stabilną transformacją białek fuzyjnych zawierających AGO1, występowanie białka było zróżnicowane pomiędzy liniami. Dlatego też zdecydowano się na lokalizację AGO1 z zastosowaniem sprawdzonych, komercyjnie dostępnych przeciwciał. Prowadzone przeze mnie na poziomie mikroskopu konfokalnego analizy jednoznacznie wskazały na jądrową i cytoplazmatyczną immunolokalizację białka AGO1. Wyniki badań zespołu były prezentowane na konferencji międzynarodowej w formie komunikatu ustnego (dr Jakub Dolata) (Załącznik nr 7) i zostały opublikowane:

- Dolata J, Bajczyk M, Bielewicz D, **Niedojadło K**, Niedojadło J, Pietrykowska H, Walczak W, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A (2016) Salt Stress Reveals a New Role for ARGONAUTE1 in miRNA Biogenesis at the Transcriptional and Posttranscriptional Levels. *Plant Physiol* 172(1): 297-312. **IF: 6,456; 45 pkt. MNiSW**

Akumulacja poli(A) RNA w komórkach roślin poddanych stresowi niedotlenienia

Wraz z zespołem dr. hab. Janusza Niedojadło (Katedra Biologii komórkowej i Molekularnej, Wydział BiOŚ UMK w Toruniu) realizowałam projekt zmierzający do poznania roli akumulacji poli(A) RNA w komórkach roślin poddanych stresowi niedotlenienia (hipoksji). Przeprowadzone u *Arabidopsis* badania wykazały, że podczas stresu abiotycznego w komórkach korzeni następuje obniżenie poziomu transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA II oraz akumulacja/retencja poli(A) RNA na terenie jądra komórkowego, w tym w ciałach Cajala (CB, ang. *Cajal body*). Kumulacji ulega mRNA kodujące białka niezwiązane z odpowiedzią na stres hipoksji. Procesowi temu towarzyszy obniżenie poziomu poli(A) RNA w cytoplazmie i pojawienie się granul stresowych, które nie są miejscem translacji. Dodatkowo analiza mutantów *Arabidopsis ncb-1* (mutanty genu kodującego białko markerowe CB koiliny) w porównaniu z roślinami typu dzikiego (WT) ujawniła, że brak CB w jądrze komórkowym obniża tolerancję roślin na stres hipoksji. Stwierdziliśmy że CB są nie tylko związane z magazynowaniem, ale także ze stabilizacją i/lub ochroną mRNA przed degradacją. Po ustąpieniu czynnika stresującego, nagromadzony w jądrze komórkowym mRNA przemieszcza się do cytoplazmy, gdzie może podlegać procesowi translacji. Zaproponowany przez nas mechanizm retencji poli(A) RNA w jądrze komórkowym jest zatem elementem strategii obronnej roślin, która podejmowana jest w celu przetrwania niekorzystnych/stresowych warunków środowiska. Moja rola w tym projekcie koncentrowała się na lokalizacji U2 snRNA techniką FISH. Jedną z hipotez zakładała, że szybsza śmierć mutantów *ncb-1* w porównaniu do roślin WT podczas hipoksji może być wywołana obniżonym poziomem splicingowych snRNP, czego konsekwencją jest hamowanie procesu dojrzewania mRNA. Wykazałam, że w przypadku korzeni roślin hodowanych w warunkach kontrolnych poziom U2 snRNA są porównywalne. Jedyne istotne różnice obserwowałam po pierwszej godzinie niedotlenienia w roślinach WT, w których poziom U2 snRNA był

wyższy. Obniżenie poziomu U2 snRNA następowało jednak w kolejnych godzinach stresu. Ostatecznie podobne poziomy U2 snRNA u WT i mutantu *ncb-1* pozwoliły na sformułowanie wniosku, że ilość snRNP nie obniża tolerancji roślin na stres hipoksji.

Badania te są kontynuowane w ramach projektu pt. „Funkcje ciał Cajala w posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów w komórkach roślin w warunkach fizjologicznych i stresu abiotycznego” (grant NCN OPUS 11 2016/21/B/NZ3/00367, 2016-2019, kierownik dr hab. Janusz Niedojadło), którego jestem jednym z wykonawców. Dotychczasowe wyniki zostały opublikowane w pracy:

- Niedojadło J, Deleńko K, Niedojadło K. (2016) Regulation of poly(A) RNA retention in the nucleus as a survival strategy of plants during hypoxia. RNA Biol 13(5): 531-543. IF: 3,900; 35 pkt. MNiSW

Udział auksyny oraz ekspresji genów ARF6, ARF8 i MIR167 w procesach związanych z odcinaniem kwiatów

W ramach współpracy podjętej z mgr Mileną Kulasek (Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Wydział BiOŚ UMK w Toruniu) jestem wykonawcą w grantie NCN PRELUDIUM 13 nr 2017/25/N/NZ3/00524 pt. „Znaczenie tkankowej lokalizacji auksyny oraz regulowanej przez miRNA167 akumulacji transkryptów genów ARF6 i ARF8 w pylnikach i słupkach rozwijających się kwiatów łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) w procesie odcinania tego organu” (2018-2020). Mój udział w realizacji tego projektu polega na przygotowaniu materiału (pylniki i słupki *L. luteus*) do technik mikroskopowych oraz wykonaniu serii analiz FISH w odniesieniu do transkryptów badanych genów. Dzięki tym badaniom możliwe będzie porównanie wzorca czasowo-przestrzennej dystrybucji transkryptów genów miRNA167 oraz ARF6 i ARF8 w pylnikach i słupkach kwiatów odpadających i nieodpadających łubinu żółtego. Badania te oprócz charakteru poznawczego mają znaczenie aplikacyjne, bowiem zakładamy, że przybliżą nas do opracowania metody ograniczenia ilości odrzucanych kwiatów łubinu, co zwiększy ich plonowanie.

Interakcje mikroorganizmów i roślin

Znajomość technik bioobrazowania (mikroskopii świetlnej i elektronowej) wykorzystałam w projektach realizowanych we współpracy z prof. dr hab. Katarzyną Hryniewicz (Zakład Mikrobiologii, Wydział BiOŚ UMK w Toruniu), które koncentrują się na wzajemnych relacjach zachodzących między roślinami a mikroorganizmami, takimi jak grzyby mykoryzowe oraz ryzosferowe i endofityczne bakterie i grzyby, które podwyższają tolerancję roślin na biotyczny i abiotyczny stres środowiskowy.

Mikrobiologiczne wspomaganie fitoremediacji metali ciężkich

W celu zbadania wpływu grzybów mykoryzowych oraz bakterii na fitoekstrakcję metali ciężkich, wierzbę wiciową (*Salix viminalis*) inokulowano grzybem *Hebeloma mesophaeum* i bakteriami *Bacillus cereus*. Stwierdzono, że ta podwójna inokulacja stymuluje wzrost i rozwój gospodarza roślinnego w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Ponadto, wytworzona na korzeniach roślin symbioza mykoryzowa i towarzyszące im bakterie *B. cereus*

promują proces fitoekstrakcji Cd^{2+} i Zn^{2+} , co przekłada się na ich potencjalną możliwość wykorzystania w procesach remediacji zdegradowanych gleb. Mój udział w tym projekcie obejmował badania ultrastrukturalne korzeni wierzb (roślin kontrolnych oraz inokulowanych grzybami i bakteriami), analizę i dokumentację wyników w postaci elektronogramów oraz ich interpretację. Wyniki prezentowane były podczas konferencji krajowej (Załącznik nr 7) i zostały opublikowane:

- Hryniewicz K, Dąbrowska G, Baum C, **Niedojadło K**, Leinweber P (2011) Interactive and single effects of ectomycorrhiza formation and *Bacillus cereus* on metallothionein *MT1* expression and phytoextraction of Cd and Zn by willows. *Water Air and Soil Pollut* 223(3): 957-968. **IF: 1,748; 30 pkt. MNiSW**

Kolejnym realizowanym zadaniem było zbadanie wpływu wyselekcjonowanych szczepów bakterii na wydajność procesu fitoekstrakcji Cd^{2+} z gleby. Analizowaliśmy wpływ szczepienia bakteriami wyizolowanymi z ryzosfery, korzeni ektomykoryzowych i owocników (np. *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Bacteroidetes*) na przyrost biomasy oraz bioakumulację jonów Cd^{2+} w tkankach *S. viminalis*. Wykazaliśmy, że 3 z 15 analizowanych szczepów (*Massilia* sp. III-116-18, *Pseudomonas* sp. IV-111-14, and *Bacillus* sp. ML1-2) charakteryzowały się wysokim stopniem wewnątrzkomórkowej akumulacji Cd^{2+} oraz obniżały stężenie toksycznych jonów w częściach nadziemnych roślin. Wyselekcjonowane szczepy mogą więc stać się potencjalnymi kandydatami wykorzystanymi w celu poprawy wydajności procesu fitoremediacji podczas rekultywacji skażonych gleb. Moją rolą w tym projekcie było przygotowanie prób szczepów bakterii *Massilia* sp. III-116-18, *Pseudomonas* sp. IV-111-14, *Bacillus* sp. ML1-2, *P. fulva* i *S. entomophila* I-111-21 hodowanych w warunkach kontrolnych i na pożywce z dodatkiem 2 mM Cd^{2+} do badań w transmisyjnym mikroskopie elektronowym oraz mikroanaliza składu chemicznego próbek techniką rentgenowskiej spektroskopii energodispersyjnej EDS (EDS- Energy Dispersive X-ray Spectrometry). Badania prowadzone były w ramach Europejskiego Programu Współpracy Naukowo-Technicznej (European Cooperation in Science and Technology) FA COST (FA 1103) „Endophytes in Biotechnology and Agriculture”, kierowanej w Polsce przez prof. Hryniewicz. Wyniki prezentowane były na konferencji krajowej i trzech konferencjach międzynarodowych (Załącznik nr 7) i opublikowane:

- Hryniewicz K, Złoch M, Kowalkowski T, Baum Ch, **Niedojadło K**, Buszewski B (2015). Strain-specific bioaccumulation and intracellular distribution of Cd^{2+} in bacteria isolated from the rhizosphere, ectomycorrhizae, and fruitbodies of ectomycorrhizal fungi. *Environ Sci Pollut Res*, 22(4): 3055-3067. **IF: 2,760; 30 pkt. MNiSW**

Wpływ kolonizacji grzybami (symbiotycznym, saprofitycznym i patogennym na wzrost i rozwój roślin infekowanych wirusem PVY (PVY+)

Celem badań było określenie wpływu kolonizacji grzybami: symbiotycznym *Glomus intraradices*, saprofitycznymi *Trichoderma viride* i *T. harzianum* oraz patogennym *Colletotrichum coccodes* na wzrost i rozwój roślin *Solanum tuberosum* L. infekowanych

wirusem PVY (PVY+) i kontrolnych (PVY-). Założyliśmy, że infekcja grzybowa może doprowadzić do uruchomienia w roślinie mechanizmów odpowiedzi i obrony w wyniku stresu biotycznego, a tym samym zakłócenia szlaków metabolicznych i obniżenia negatywnego wpływu infekcji wirusowej na roślinę. Ostatecznie badania wykazały, że *G. intraradices* stymuluje, a pozostałe gatunki grzybów nie mają wpływu na wzrost i rozwój zainfekowanych wirusem PVY roślin. Z kolei w roślinach nie zarażonych inokulacje grzybami hamują ich wzrost, z wyjątkiem obojętnego dla ziemniaka grzyba mykoryzowego *G. intraradices*. Mój udział w projekcie dotyczył identyfikacji jednoczesnej infekcji grzybowej i wirusowej u ziemniaka *Solanum tuberosum* L. na poziomie mikroskopu elektronowego.

Wyniki badań prezentowane były na międzynarodowej konferencji (Załącznik nr 7) i zostały opublikowane:

- Thiem D, Szmidt-Jaworska A, Baum Chl, Muders K, **Niedojadło K**, Hryniewicz K (2014) Interactive physiological response of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to fungal colonization and *Potato virus Y* (PVY) infection. *Acta Mycol*, 49; 291-303;
7 pkt. MNiSW

Wyniki tych badań o charakterze aplikacyjnym są zachęcające, dlatego moja współpraca w tym projekcie będzie nadal kontynuowana.

Interakcja halotolerancyjnych mikroorganizmów endofitycznych z rośliną-gospodarzem

W ramach długoletniej współpracy zostałam również wykonawcą w grantie NCN OPUS 4 nr 2012/07/B/NZ9/01801 pt. „Udział organizmów endofitycznych w toleracji na stres roślin rosnących na glebach zasolonych i możliwości ich zastosowania w rolnictwie” (2013-2016, kierownik prof. dr hab. Katarzyna Hryniewicz). Badania dotyczyły interakcji halotolerancyjnych mikroorganizmów endofitycznych z rośliną-gospodarzem. Założono, że specyficzne właściwości metaboliczne bakterii mogą promować kolonizowanym roślinom wzrost i rozwój w niekorzystnych warunkach środowiskowych, takich jak zasolenie gleb. Celem jednego z zadań badawczych projektu było określenie udziału wyselekcjonowanego z korzeni halofitu *Salicornia europaea* (soliród) endofitycznego szczepu bakterii *Pseudomonas stutzeri* ISE12 w obniżeniu skutków stresu solnego inokulowanych roślin *Brassica napus*. Uzyskane wyniki wskazują, że inokulacja roślin halotolerancyjną bakterią zwiększała parametry wzrostu zarówno roślin uprawianych w warunkach kontrolnych jak i poddanych stresowi solnemu oraz obniżała stres abiotyczny poprzez aktywację systemu obrony antyoksydacyjnej roślin (obserwowano m.in. spadek proliny oraz nadtlenu wodoru w organach roślin) i reorganizację ich ścian komórkowych. Moim zadaniem w tym projekcie była immunofluorescencyjna lokalizacja pektyn o niskim i wysokim stopniu estryfikacji w korzeniach, łodydze i liściach *B. napus* uprawianych w warunkach kontrolnych i poddanych stresowi solnemu. Wykazałam, że jedną z adaptacji do niekorzystnych warunków zasolenia inokulowanych roślin są zmiany w proporcji badanych pektyn, które prowadzą do pogrubienia ścian komórkowych, mniejszej elastyczności oraz przepuszczalności. Zaobserwowałam także lignifikację i suberynizację ścian komórek, co stanowi jeden z mechanizmów zabezpieczenia przed utratą wody i toksycznym wpływem jonów Na⁺ i Cl⁻. Wyniki badań zostały opublikowane:

- Szymańska S, Dąbrowska GB, Tyburski J, Niedojadło K, Piernik A, Hryniewicz K (2019) Boosting the *Brassica napus* L. response to salinity by the halotolerant strain *Pseudomonas stutzeri* ISE12. Environ Exp Bot **IF: 3,666; 40 pkt. MNiSW**

Wykaz wszystkich publikacji z moim udziałem oraz pozostałe działania składające się na moją działalność naukową przedstawiłam w załączonym wykazie opublikowanych prac wraz z wykazem osiągnięć naukowo-badawczych oraz dorobkiem dydaktycznym, organizacyjnym i popularyzatorskim w *Załączniku nr 4*. Dane bibliometryczne Biblioteki Głównej UMK w Toruniu zawiera *Załącznik nr 7*.

Katarzyna Niedojadło