

ZAŁĄCZNIK NR 2

dr Jarosław Gzyl

## **Autoreferat**

Opis osiągnięć i dorobku naukowego

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Instytut Biologii Eksperymentalnej

Zakład Ekofizjologii Roślin

Poznań 2018

**1. Imię i nazwisko:** Jarosław Gzyl

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

**magister nauk biologicznych w zakresie biologii,**

Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 1993

Praca magisterska pt. „Wykrywanie i wstępna charakterystyka białek indukowanych jonami ołowiu w wybranych organach roślinnych”

Promotor: prof. dr hab. Adam Woźny

**doktor nauk biologicznych w zakresie biologii,**

Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 2000

Praca doktorska pt. „Fizjologiczne i ultrastrukturalne aspekty oddziaływania czynników stresowych na zawiesinę komórkową ogórka (*Cucumis sativus* L.)”

Promotor: prof. dr hab. Edward A. Gwóźdź

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

**10.1993-09.1998** – doktorant w Zakładzie Ekofizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**10.1998-04.2000** – starszy technik w Zakładzie Ekofizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**05.2000-12.2001** - Postdoctoral Fellow, Center for Neurovirology and Cancer Biology, Temple University, Philadelphia, PA, USA

**01.2002-01.2003** - Postdoctoral Fellow, Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA

**od 02.2003** – adiunkt w Zakładzie Ekofizjologii Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

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

**A) Tytuł osiągnięcia naukowego**

**Cytologiczne i biochemiczne efekty działania kadmu na komórki korzeni siewek soi ze szczególnym uwzględnieniem cytoszkieletu tubulinowego**

**B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

1. **Gzyl J.**<sup>1</sup>, Chmielowska-Bąk J., Przymusiński R., Gwóźdź A.E., **2015.** „Cadmium affects microtubule organization and post-translational modifications of tubulin in seedlings of soybean (*Glycine max* L.)”. *Frontiers in Plant Science*, 6: 937  
**IF<sub>2015</sub>: 4.495**                      **40pkt. MNiSW**  
Mój wkład procentowy szacuję na 80%.
2. **Gzyl J.**, Izbiańska K., Floryszak-Wieczorek J., Jelonek T., Arasimowicz-Jelonek M.\*, **2016.** „Cadmium affects peroxynitrite generation and tyrosine nitration in seedling roots of soybean (*Glycine max* L.)”. *Environmental and Experimental Botany*, 131: 155-163  
**IF<sub>2016/2017</sub>: 4.369**                      **40pkt. MNiSW**  
Mój wkład procentowy szacuję na 55%.
3. **Gzyl J.**\*, Chmielowska-Bąk J., Przymusiński R., **2017.** “Gamma-tubulin distribution and ultrastructural changes in root cells of soybean (*Glycine max* L.) seedlings under cadmium stress”. *Environmental and Experimental Botany*, 143: 82-90  
**IF<sub>2016/2017</sub>: 4.369**                      **40pkt. MNiSW**  
Mój wkład procentowy szacuję na 80%.

**C) Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl trzech oryginalnych prac eksperymentalnych opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny **impact factor** (zgodny z rokiem opublikowania) artykułów naukowych wynosi **13.23**, natomiast suma punktów MNiSW wynosi **120** (wg listy z 9 grudnia 2016). We wszystkich artykułach jestem pierwszym autorem, a w dwóch autorem korespondencyjnym.

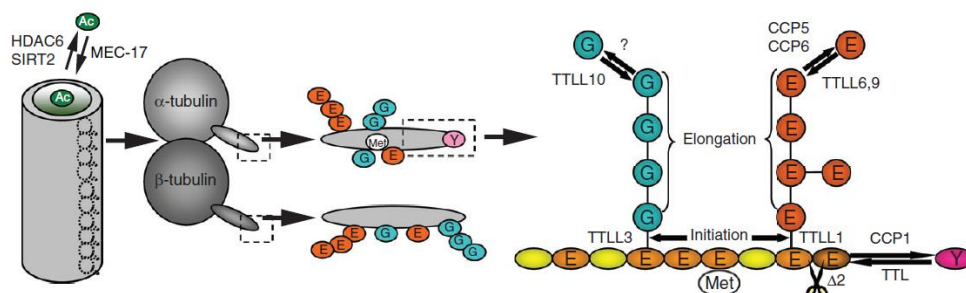
---

<sup>1</sup> \* autor korespondencyjny

Kadm (Cd) jest pierwiastkiem zbędnym dla roślin i nawet w bardzo niskich stężeniach może być toksyczny dla komórek powodując szereg niekorzystnych zmian w procesach metabolicznych i fizjologicznych, co prowadzi w efekcie do zahamowania podziałów komórek, ograniczenia wzrostu roślin, a w skrajnych przypadkach do śmierci całego organizmu (Küpper i Andresen, 2016). Jedną z głównych dróg wnikania tego pierwiastka do roślin są korzenie, stąd też w tym organie obserwuje się najwięcej niekorzystnych zmian wywołanych bezpośrednim oddziaływaniem jonów tego metalu. Liczne badania udokumentowały niekorzystny wpływ jonów Cd na procesy metaboliczne i struktury komórkowe (Tran i Popova, 2013). Wyniki tych badań potwierdzają, że jednym z głównych procesów zakłócanych przez Cd są podziały komórkowe (Fusconi i wsp., 2006). Wpływ Cd na podziały komórkowe zależy od jego stężenia i czasu działania na komórki roślinne, a głównym skutkiem jest redukcja lub całkowite zahamowanie podziałów komórkowych z równoczesnym pojawieniem się aberracji chromosomowych oraz ograniczeniem wzrostu komórek w strefie wydłużania się korzenia. Mało jest jednak danych doświadczalnych dotyczących szczegółowych mechanizmów prowadzących do tych zaburzeń. Wiele przesłanek wskazuje na to, że główna przyczyna zakłóceń podziałów i wzrostu komórek wywołanych przez Cd, a także inne czynniki stresowe, jest ściśle związana z zaburzeniami działania cytoszkieletu komórek, w tym mikrotubul i związanych z nimi białek.

Cytoszkielet odgrywa kluczową rolę w tak ważnych procesach życiowych roślin jak podziały komórkowe, synteza ściany komórkowej, wzrost i różnicowanie komórek, a także bierze udział w innych procesach metabolicznych i molekularnych m.in. w translacji czy transdukcji sygnałów komórkowych (Muench i Park, 2006; Thomas i Staiger, 2014). Cytoszkielet komórek roślinnych jest złożoną strukturą, w skład której wchodzi dwie grupy polimerów białkowych: mikrotubule (MT) i mikrofilamenty aktynowe oraz najslabiej poznana w przypadku roślin grupa białek włóknkowych - filamenty pośrednie. **W ramach osiągnięcia habilitacyjnego podjęto próbę charakterystyki struktury MT oraz biochemicznej analizy białek wchodzących w skład cytoszkieletu tubulinowego w warunkach stresu wywołanego jonami Cd.** Mikrotubule stanowią dynamiczną tubularną strukturę o średnicy ok. 25nm zbudowaną najczęściej z 13 protofilamentów, z których każdy jest liniowym polimerem heterodimerów składających się z  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny. Liniowe ułożenie heterodimerów tubuliny w protofilamencie determinuje polarny charakter MT z dynamicznym końcem plus zakończonym  $\beta$ -tubuliną i bardziej stabilnym końcem minus zakończonym  $\alpha$ -tubuliną. Pomimo iż pod względem strukturalnym MT wydają się prostą „konstrukcją”, to jednak dynamicznie i zarazem precyzyjnie reagują na sygnały wewnątrzkomórkowe oraz te płynące ze środowiska. W komórkach roślinnych, w trakcie cyklu komórkowego, z MT powstają układy, z których najbardziej charakterystyczne to: MT kortykalne, pasmo przedprofazowe, wrzeciono podziałowe i wrzeciono cytokinetyczne (fragmoplast).

Mikrotubule kortykalne znajdują się w peryferycznych częściach cytoplazmy i kontrolują m.in. organizację mikrofibryli celulozowych w ścianie komórkowej, stanowiąc dla nich przestrzenną matrycę - modulują w ten sposób wzrost i kształt komórki. Z początkiem mitozy MT formują zwarte pasmo przedprofazowe wyznaczające płaszczyznę przyszłej ściany komórkowej. Z kolei w trakcie podziału jądra, MT wchodzi w skład wrzeciona kariokinetycznego uczestniczącego w prawidłowej segregacji chromosomów. W cytokinezie natomiast, MT fragmoplastu biorą udział w przemieszczaniu pęcherzyków pochodzenia diktiosomalnego, zawierających materiał do budowy nowo powstającej ściany komórkowej, oddzielającej komórki potomne (Kost i Chua, 2002). O ile dość dokładnie poznana jest budowa samego cytoszkieletu tubulinowego, to nadal niewiele wiadomo na temat mechanizmów regulujących jego działanie i właściwości. Kluczowy wpływ na kompetencje i prawidłowe działanie cytoszkieletu tubulinowego ma z jednej strony ekspresja poszczególnych genów (izotypów) należących do rodziny tubulin, natomiast z drugiej strony potranslacyjne modyfikacje (PTM), które prowadzą do powstania różnych izoform tubuliny. Wypadkowa tych dwóch procesów oraz repertuar białek o charakterze regulacyjnym towarzyszących MT tzw. białek MAP (ang. **m**icro**t**ubule-**a**ssociated **p**roteins) decydują o unikalnych właściwościach MT w komórkach danego organu czy tkanki podczas różnych stadiów cyklu komórkowego (Cai, 2010). Zatem unikalne właściwości MT biorących udział w różnych procesach komórkowych mogą być wypadkową ekspresji różnych izotypów tubuliny, różniących się sekwencjami aminokwasowymi, które z kolei mogą podlegać PTM takim jak detyrozynacja/tyrozynacja, acetylacja, glutamylacja, glicylacja czy fosforylacja, przy czym większość wymienionych modyfikacji dotyczy karboksylowego końca  $\alpha$ - lub  $\beta$ -tubuliny (Schemat 1).



**Schemat 1. Modyfikacje potranslacyjne tubuliny.** Ac, acetylated lysine; E, glutamic acid; G, glycine; Met, methylated glutamic acid;  $\Delta 2$ , proteolytic removal of the penultimate C-terminal amino acid. MEC-17 - alpha-tubulin acetyltransferase; HDAC6, SIRT2 - deacetylases; TLL1, 3, 6, 9, 10 - ligases; CCP1 - carboxypeptidase; TTL - tyrosine ligase; CCP5, CCP6 – deglutamylases; (Włoga i Gaertig, 2010)

Generalnie PTM wpływają na stabilność i/lub strukturę powstających MT, przez co mogą kontrolować przyłączanie białek motorycznych oraz białek MAP (Parrotta i wsp., 2014). Rodzaj i poziom modyfikacji potranslacyjnych tubulin, wchodzących w skład MT, wpływa na ich funkcjonalne właściwości takie jak dynamika polimeryzacji, konformacja czy interakcje z innymi białkami. Z kolei białka MAP są grupą liczącą co najmniej kilkadziesiąt białek (Krtková i wsp., 2016). Do tej pory wiele z nich zostało zidentyfikowanych i okazało się, że odgrywają zasadniczą rolę w organizacji cytoszkieletu tubulinowego m.in. poprzez tworzenie mostków pomiędzy MT (białko MAP65), łączenie MT z innymi elementami cytoszkieletu np. filamentami aktynowymi (białko MAP190) czy też regulację dynamiki MT (np. białko MOR1). Wiele z nowo odkrywanych białek MAP wymaga potwierdzenia konkretnej funkcji w regulacji działania cytoszkieletu. Coraz więcej danych wskazuje jednak, że regulują one wiele procesów w obrębie komórki włączając w to nukleację i polimeryzację MT, organizację układów MT typowych dla komórek roślinnych, interakcje MT z białkami błony komórkowej lub innymi organellami oraz interakcje z innymi białkami komórkowymi. O ile jednak pojawia się coraz więcej danych dotyczących białek regulujących działanie cytoszkieletu tubulinowego, to badania określające wpływ stresu metali ciężkich na cytoszkielet tubulinowy i białka z nim związane są fragmentaryczne. Wykazano, że cytoszkielet tubulinowy jest zaangażowany w odpowiedź roślin na działanie metali ciężkich, przy czym wyniki tych badań ograniczały się do opisu zaburzeń organizacji MT podczas działania stresu (Horiunova i wsp., 2016). Podobnie niewiele wiadomo na temat wpływu jonów Cd na cytoszkielet tubulinowy. Nieliczne dane sugerują, że MT oraz białka z nimi związane mogą być jedną z najbardziej wrażliwych na jony Cd struktur komórkowych (Fusconi i wsp., 2007).

W świetle przedstawionych danych literaturowych uzasadnionym było podjęcie badań nad wpływem jonów Cd na strukturę MT i właściwości biochemiczne białek cytoszkieletu tubulinowego. Wyniki tych badań składają się na niniejsze osiągnięcie habilitacyjne. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono na korzeniach siewek soi (*Glycine max* L. cv. Nawiko). Zastosowano dwa stężenia tego metalu, które zostały wyznaczone w oparciu o pomiary długości korzeni. Stężenie jonów Cd, które ograniczało wzrost korzeni w ok. 50% i wynosiło 85  $\mu\text{M}$ , zostało określone jako stres umiarkowany. Z kolei dwukrotnie wyższe stężenie metalu (170  $\mu\text{M}$  Cd), prawie całkowicie hamujące przyrost korzeni zostało określone jako stres o silnym natężeniu (**Gzyl i wsp., 2015; Fig. 1**). Obserwacje mikroskopowe z użyciem specyficznego przeciwciała wykazały szereg zaburzeń w układach MT, zarówno w komórkach interfazowych jak i w trakcie podziałów komórkowych (**Gzyl i wsp., 2015; Fig. 2 i Fig. 3**). Obejmowały one zróżnicowany stopień degradacji cytoszkieletu tubulinowego, w zależności od stężenia Cd oraz położenia komórek w korzeniu. Przy umiarkowanym stresie kadmowym następował spadek gęstości sieci kortykalnych włókien tubulinowych, do ich prawie całkowitego zaniku w trakcie silnego natężenia stresu (170  $\mu\text{M}$  Cd). Ponadto

obserwowano nieregularny, nieuporządkowany przebieg MT korykalnych, które często wykazywały falistą strukturę i liczne zgrubienia. Ekspozycja na stres kadmowy o silnym natężeniu powodowała pojawienie się bardziej zaawansowanych etapów dezintegracji cytoszkieletu tubulinowego, objawiające się brakiem wyraźnych, wyodrębnionych włókien mikrotubularnych i występowaniem fluorescencji tubuliny w postaci amorficznych grudek, skupionych często w jednym obszarze zamierającej lub martwej komórki, przy czym najbardziej spektakularne zmiany obserwowano w zewnętrznych warstwach komórek korzenia. W komórkach znajdujących się w fazie podziałów komórkowych obserwowano również wyraźne zmiany struktury cytoszkieletu tubulinowego. W przypadku korzeni siewek kontrolnych obserwowano liczne komórki w trakcie różnych faz podziału komórkowego oraz charakterystyczne dla nich figury cytoszkieletu tubulinowego, takie jak pasmo przedprofazowe, wrzeciono kariokinetyczne oraz fragmoplast. W komórkach korzeni poddanych działaniu jonów Cd podziały obserwowano wyłącznie w przypadku stresu umiarkowanego (85  $\mu\text{M}$  Cd) i towarzyszyły im zdeformowane struktury cytoszkieletu tubulinowego.

**Wyniki uzyskane w trakcie obserwacji mikroskopowych jednoznacznie potwierdziły negatywny wpływ Cd na strukturę cytoszkieletu tubulinowego.** W związku z tym nasunęło się pytanie o przyczynę obserwowanych zmian strukturalnych i zaburzeń układów MT w trakcie cyklu komórkowego. **Hipoteza wysunięta w trakcie dalszych badań zakładała, że obserwowane zaburzenia funkcjonowania cytoszkieletu tubulinowego mają związek ze zmianami ilości i właściwości samych MT oraz nieprawidłowym funkcjonowaniem białek regulujących ich działanie.** W celu weryfikacji postawionej hipotezy sprawdzono zmiany poziomu tubuliny jak i jej potranslacyjnych modyfikacji w trakcie działania stresu kadmowego o różnym natężeniu. Analiza profilu akumulacji izoform  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny z wykorzystaniem elektroforezy 2D, techniki Western blot i specyficznych przeciwciał wykazała stopniowy spadek akumulacji izoform obu podjednostek tubuliny, szczególnie w trakcie działania stresu o silnym natężeniu (**Gzyl i wsp., 2015; Fig. 5**). Co więcej, analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała wyraźny spadek ekspresji zdecydowanej większości genów dla  $\alpha$ -tubuliny, zarówno podczas umiarkowanego jak i silnego stresu kadmowego (**Gzyl i wsp., 2015; Fig. 4**).

**Kolejnym etapem badań była identyfikacja i oszacowanie poziomu PTM, przy czym należy podkreślić, że przeprowadzone analizy były pierwszą odnotowaną w literaturze próbą określenia zmian poziomu modyfikacji potranslacyjnych tubuliny w warunkach stresu kadmowego.** Do identyfikacji PTM poszczególnych izoform tubuliny w korzeniach soi wykorzystano metodę elektroforezy 2D, technikę Western-blot oraz cały panel specyficznych przeciwciał. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zidentyfikowano w komórkach korzeni soi kilkanaście izoform tubuliny o różnym poziomie PTM obejmujących:

detyrozynację/tyrozynację, acetylację i glutamylację (**Gzyl i wsp., 2015; Fig. 6**). Co więcej, w oparciu o uzyskane wyniki i dostępne dane literaturowe, postawiono hipotezę, według której w trakcie stresu kadmowego, kierunek zmian w poziomie modyfikacji potranslacyjnych części izoform  $\alpha$ -tubuliny, obejmujący wzrost acetylacji i detyrozynacji przy jednoczesnym spadku poliglutamylacji, jest charakterystyczny dla MT o mniejszej dynamice. Dodatkową przesłanką wskazującą na zmniejszenie dynamiki MT w trakcie działania jonów Cd mogą być wyniki identyfikacji potencjalnych białek ulegających nitrowaniu (**Gzyl i wsp., 2016; Fig. S2**). Okazało się, że po elektroforezie 1D-SDS, Western blottingu i użyciu przeciwciała przeciwko nitrotyrozynie, tylko w przypadku ekstraktu z korzeni siewek kontrolnych pojawił się prążek, którego intensywność dodatkowo wzrastała po zastosowaniu SIN1 - donora nadtlenoazotynu, odpowiedzialnego z kolei za nitrowanie tyrozyny. Identyfikacja białek z zastosowaniem spektrometrii mas wykazała, że jednym z białek obecnych w prążku była  $\alpha$ -tubulina. Dane literaturowe wskazują z kolei, że nitrowanie tyrozyny jest jedną z tych PTM, które są charakterystyczne dla dynamicznych układów mikrotubularnych takich jak pasmo przedprofazowe, wrzeciono kariokinetyczne czy fragmoplast (Blume i wsp., 2013). W przypadku komórek korzeni soi eksponowanych na umiarkowany stres kadmowy wymienione układy MT były zdeformowane, natomiast nie występowały w ogóle w przypadku stresu o silnym natężeniu.

Dalsze badania wykazały, że obniżona dynamika cytoszkieletu tubulinowego w warunkach stresu kadmowego może mieć związek z upośledzeniem procesów nukleacji włókien tubulinowych, w których kluczową rolę odgrywa gamma-tubulina (**Gzyl i wsp., 2017**). Gamma-tubulina ( $\gamma$ -tubulina) jest białkiem wysoce konserwatywnym należącym do rodziny tubulin, wykazującym ok. 30% identyczności aminokwasowej z  $\alpha$ -tubuliną oraz  $\beta$ -tubuliną (Liu i wsp., 1994). Ze względu na stosunkowo wysoki poziom  $\gamma$ -tubuliny w komórkach roślinnych, pełni ona najprawdopodobniej znacznie szerszy zakres funkcji niż podobne białko w komórkach zwierzęcych. Do najlepiej poznanych funkcji  $\gamma$ -tubuliny należy nukleacja MT, która u roślin ma charakter rozproszony i związana jest ze stabilnością oraz właściwą strukturą MT, prawidłowym przebiegiem podziału komórki (kariokinezy i cytokinezy) oraz reszty cyklu komórkowego. **Badania przeprowadzone w ramach trzeciej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego wykazały zmiany w dystrybucji i akumulacji  $\gamma$ -tubuliny pod wpływem Cd, przy czym należy podkreślić, że wyniki te stanowią również pierwsze doniesienie na ten temat odnotowane w literaturze.** Obserwacje osiowych przekrojów podłużnych korzeni soi przy użyciu mikroskopu konfokalnego i zastosowaniu specyficznego przeciwciała wykazały słabnącą fluorescencję w obecności coraz wyższych stężeń Cd, co może świadczyć o spadku poziomu  $\gamma$ -tubuliny pod wpływem jonów tego metalu (**Gzyl i wsp., 2017; Fig. 1**). W przypadku stężenia subletalnego (170  $\mu$ M Cd) obserwowano najslabszy sygnał fluorescencyjny w zewnętrznych warstwach



komórek korzenia (podobnie jak w przypadku  $\alpha$ -tubuliny), gdzie sygnał ograniczał się do obszaru splazmolizowanych (martwych) komórek i niespecyficznych skupisk fluorescencji przy ścianach komórkowych. Zastosowanie większych powiększeń ujawniło zróżnicowanie dystrybucji  $\gamma$ -tubuliny w obrębie komórek korzenia i wykazało obecność silniejszego sygnału dla  $\gamma$ -tubuliny w okolicach otoczki jądrowej i błony cytoplazmatycznej komórek interfazowych oraz przede wszystkim w obszarze figur podziałowych komórek (**Gzyl i wsp., 2017; Fig. 1**). Analiza obrazów uzyskanych z korzeni siewek kontrolnych i siewek poddanych działaniu jonów Cd wykazała wyraźnie słabszy sygnał fluorescencyjny w przypadku stresu kadmowego, co było szczególnie widoczne w odniesieniu do zdeformowanych figur podziałowych podczas działania umiarkowanego stresu (85  $\mu$ M Cd). Z kolei w trakcie stresu o silnym natężeniu (170  $\mu$ M Cd) nie obserwowano podziałów komórkowych, a słaby równomierny sygnał fluorescencyjny ograniczał się do obszaru cytoplazmy.

**Wykonana równolegle analiza biochemiczna (elektroforeza 2D, immunoblotting) z użyciem specyficznego przeciwciała wykazała wyraźne zmiany w akumulacji izoform  $\gamma$ -tubuliny pod wpływem stresu kadmowego, co ponownie było pierwszym doniesieniem odnotowanym w literaturze (Gzyl i wsp., 2017; Fig. 3).** W wariancie kontrolnym wykryto wzór co najmniej 7 izoform  $\gamma$ -tubuliny powtarzających się w kolejnych rozdzielach elektroforetycznych. W warunkach stresowych obserwowano zróżnicowany poziom akumulacji izoform  $\gamma$ -tubuliny, świadczący o możliwych zakłóceniach funkcjonowania kompleksów nukleacyjnych, w skład których wchodzi  $\gamma$ -tubulina. Co więcej, wraz ze wzrostem stężenia Cd zaczęły się pojawiać dodatkowe plamki białkowe o masie cząsteczkowej ok. 45kDa i wartościach pI przesuniętych w kierunku pH kwaśnego, przy czym większość z nich wykryto po ekspozycji na stres o silnym natężeniu (170  $\mu$ M Cd). Pojawienie się dodatkowych białek o zmienionej masie cząsteczkowej może być odzwierciedleniem zarówno procesów adaptacyjnych jak i zakłóceń procesu translacji spowodowanych wysokim stężeniem Cd. Dodatkowe plamki białkowe mogą być efektem intensywnych procesów proteolitycznych zachodzących w komórkach korzenia soi pod wpływem stresu kadmowego. Przeprowadzone równolegle obserwacje ultrastruktury z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazały bowiem obecność ciał autofagowych w komórkach korzeni soi poddanych działaniu jonów Cd (**Gzyl i wsp., 2017; Fig. 5**). Liczne dane literaturowe wykazują na istotne znaczenie autofagii zarówno w trakcie procesów rozwojowych jak i w odpowiedzi komórek na różne stresy (Zhai i wsp., 2016). Zatem intensyfikacja procesów autofagii pod wpływem stresu kadmowego może wynikać z konieczności usunięcia z cytoplazmy toksycznego metalu, jak i uszkodzonych organelli lub innych struktur komórkowych. Odzwierciedleniem większego natężenia procesów proteolitycznych może być pojawienie się produktów degradacji różnych białek w tym  $\gamma$ -tubuliny, co zostało uwidocznione w rozdziale elektroforetycznym.

Z drugiej strony nie można wykluczyć udziału zakłóceń różnych procesów metabolicznych komórki spowodowanych jonami Cd, co prowadzi do pojawienia się dysfunkcyjnych białek np.  $\gamma$ -tubuliny. Doświadczenia przeprowadzone na komórkach króliczych i ludzkich dowiodły bowiem, że oksydacja mRNA może prowadzić do przedwczesnej terminacji procesu translacji i formowania skróconych polipeptydów (Tanaka i wsp., 2007). Istnieje zatem możliwość oksydacji mRNA wywołanej działaniem wysokich stężeń jonów Cd, co z kolei może indukować zakłócenia procesu translacji prowadzące do powstawania dysfunkcyjnych białek np.  $\gamma$ -tubuliny. Co ciekawe, pojawienie się dodatkowych białek  $\gamma$ -tubuliny w przypadku silnego natężenia stresu było skorelowane z podwyższoną ekspresją genów  $\gamma$ -tubuliny. Może to być związane z większym zapotrzebowaniem na funkcjonalne kompleksy nukleujące biorące udział w powstawaniu nowych i reorganizacji istniejących MT w celu zapewnienia efektywnego działania cytoszkieletu tubulinowego w warunkach stresu. Dodatkowo, obserwacje ultrastruktury wykazały wzrost częstotliwości występowania ciałek Cajala i wakuol jąderkowych, co jest kolejną przesłanką wskazującą na wysoką aktywność transkrypcyjną jądra komórkowego w warunkach stresu kadmowego. Ciałka Cajala biorą udział m.in. w procesach składnia i dojrzewania rybonukleoprotein – cząsteczek niezbędnych dla modyfikacji i przetwarzania pre-mRNA i rRNA (Ogg i Lamond, 2002), z kolei wzrost liczby i rozmiarów wakuol jąderkowych wydaje się być skorelowany z wyższą aktywnością jąderek (Stępiński, 2014).

Do mechanizmów adaptacyjnych o niejednoznacznym charakterze, stwierdzonych w trakcie obserwacji ultrastruktury, można również zaliczyć odkładanie kalozy (szczególnie w przypadku stresu o silnym natężeniu) i zwiększoną wakuolizację komórek (**Gzyl i wsp., 2017; Fig. 5**). Z jednej strony oba procesy mogą przyczyniać się do zwiększonej tolerancji na Cd, tworząc odpowiednio barierę utrudniającą przenikanie metalu do protoplastu lub zwiększając możliwości jego sekwestracji w wakuoli, co zapobiega jego toksycznemu wpływowi na procesy zachodzące w aktywnych metabolicznie kompartmentach komórkowych (Krzesłowska, 2011; Sharma i wsp., 2016). Z drugiej strony zwiększona wakuolizacja komórek korzeni soi może być objawem obniżenia tempa transportu dyfuzyjnego wody spowodowanego ograniczeniem możliwości jej przenikania przez błony komórkowe (w tym tonoplast) oraz spowalnianiem jej ruchu w apoplastie, co zostało wcześniej wykazane na korzeniach siewek łubinu (Rucińska-Sobkowiak i wsp., 2013). Odkładanie kalozy w ścianach komórek korzeni soi, często w bezpośrednim sąsiedztwie plazmodesm, może być przyczyną spowolnionego wewnątrzkomórkowego transportu wody, co prowadzi do jej gromadzenia w wakuolach. Dodatkowo obecność w ścianie komórkowej hydrofobowego polisacharydu, takiego jak kaloza, może wpływać na obniżoną przepuszczalność apoplastu dla cząsteczek wody.

**Kolejnym interesującym i stosunkowo słabo poznany wątkiem badawczym poruszonym w ramach osiągnięcia habilitacyjnego było zagadnienie wzajemnego oddziaływania reaktywnych form tlenu i azotu.** Jednym z pierwszych, dobrze udokumentowanych efektów działania Cd na komórki roślinne jest powstawanie reaktywnych form tlenu oraz synteza tlenku azotu (NO), co może prowadzić do zaburzeń statusu oksydoredukcyjnego komórek. Liczne badania wskazują, że NO jest zaangażowany zarówno w szereg procesów rozwojowych roślin (m.in. kiełkowanie nasion, rozwój korzeni, kwitnienie czy dojrzewanie owoców) jak i odpowiedzi na różne czynniki stresowe, w tym Cd (Arasimowicz-Jelonek i wsp., 2016a). Dwoista natura NO została wykazana m.in. podczas działania Cd na rośliny, gdzie z jednej strony NO przyczyniał się do zwiększonej akumulacji toksycznego metalu, z drugiej zaś strony brał udział w reakcjach adaptacyjnych poprzez regulację ekspresji odpowiednich genów obronnych. Jako cząsteczka sygnałowa NO może modulować aktywność białek poprzez przyłączenie do istotnych dla aktywności białka reszt cysteinowych (s-nitrozylacja) lub też może doprowadzać do pośredniej modyfikacji białek poprzez nitrowanie tyrozyny. W tę ostatnią reakcję zaangażowany jest nadtlenonozotyn ( $\text{ONOO}^-$ ), powstający w reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym ( $\text{O}_2^-$ ) - jednej z najszybszych i najbardziej gwałtownych reakcji znanych w biologii. W środowisku komórkowym,  $\text{ONOO}^-$  jest stosunkowo krótko żyjącą reaktywną formą azotu, która jednak może przenikać przez błony komórkowe i wchodzić w interakcje z innymi białkami w promieniu jednej do dwóch komórek. W przeciwieństwie jednak do komórek zwierzęcych, w komórkach roślinnych  $\text{ONOO}^-$  nie wydaje się być jedynie wskaźnikiem natężenia cytotoksycznego działania różnych czynników stresowych, ale bierze udział w regulacji integralnych procesów metabolicznych zachodzących w komórce podczas jej funkcjonowania zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w warunkach stresowych.

**Badania przeprowadzone w ramach drugiej pracy będącej częścią osiągnięcia habilitacyjnego wykazały, że nitrowanie tyrozyny *via*  $\text{ONOO}^-$  ma charakter selektywny i jest integralną częścią mechanizmów sygnalizacyjno-regulacyjnych funkcjonujących w komórkach korzeni siewek soi zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w trakcie działania stresu kadmowego (Gzyl i wsp., 2016).** Bioobrazowanie *in situ* z wykorzystaniem specyficznego fluorochromu APF wykazało stosunkowo wysoki poziom  $\text{ONOO}^-$  w komórkach korzeni kontrolnych i wyraźny wzrost poziomu tej reaktywnej formy azotu pod wpływem Cd, ale tylko w przypadku komórek poddanych stresowi o silnym natężeniu tj. 170  $\mu\text{M}$  Cd (**Gzyl i wsp., 2016; Fig. 1**). Co więcej, indukowana wysokim stężeniem Cd akumulacja  $\text{ONOO}^-$  była skorelowana z wysokim poziomem zarówno NO, jak i  $\text{O}_2^-$  (**Gzyl i wsp., 2016; Fig. 2 i Fig. 3**). Z kolei w trakcie stresu umiarkowanego (85  $\mu\text{M}$  Cd) następował jedynie niewielki wzrost poziomu  $\text{ONOO}^-$  połączony z wyraźną indukcją ekspresji genu dla peroksyredoksyny *PrxII F* – enzymu odpowiedzialnego za neutralizowanie tej reaktywnej formy azotu (**Gzyl i wsp.,**

**2016; Fig. 5).** Przeprowadzona równolegle analiza nitroproteomu wykazała, że w kontrolnych i eksponowanych na Cd komórkach korzeni soi nitrowaniu podlegają najprawdopodobniej białka zaangażowane w podstawowe procesy metaboliczne takie jak oksydoredukcja, fosforylacja, proteoliza i glikoliza, brak jest natomiast białek o charakterze obronnym (**Gzyl i wsp., 2016; Tabela 2**). Obserwowane pod wpływem Cd zmiany w poziomie nitrowania zidentyfikowanych białek wskazują na zróżnicowane funkcje regulacyjne tej potranslacyjnej modyfikacji w zależności od natężenia stresu. Z jednej strony obniżony w warunkach stresu kadmowego, w stosunku do kontroli, poziom nitrowania poszczególnych białek może być związany z potencjalną możliwością uruchomienia, bądź szybkiego wzmocnienia procesów sygnalizacyjnych. Jak udokumentowano, zjawisko nitrowania tyrozyny może być mechanizmem konkurującym i jednocześnie wpływającym na wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów oparte na odwracalnej fosforylacji tyrozyny (Monteiro i wsp., 2008) Z drugiej strony podwyższony poziom nitrowania białek, szczególnie w przypadku silnego stresu kadmowego, może prowadzić do zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej komórek korzenia soi i zwiększenia toksycznego działania metalu. Co ciekawe, większość białek o podwyższonym poziomie nitrowanej tyrozyny była związana z proteolizą, co może świadczyć o przesunięciu aktywności proteolitycznej w kierunku autofagii. Wskazuje na to obecność ciał autofagowych w wakuolach komórek korzenia soi poddanych działaniu stresu kadmowego, szczególnie o dużym natężeniu (**Gzyl i wsp., 2017; Fig. 5**).

**W podsumowaniu należy stwierdzić, iż najważniejsze wyniki badań wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego to:**

- (1) wykazanie niekorzystnego wpływu Cd na strukturę cytoszkieletu tubulinowego, w tym MT kortykalnych i MT wchodzących w skład figur podziałowych;**
- (2) wykazanie negatywnego wpływu Cd na poziom ekspresji genów  $\alpha$ -tubuliny i akumulacji izoform  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny;**
- (3) wykazanie modulującego wpływu Cd na poziom modyfikacji potranslacyjnych izoform  $\alpha$ -tubuliny obejmujących detyrozynację/tyrozynację, acetylację i glutamylację, co było pierwszą próbą odnotowaną w literaturze;**
- (4) wykazanie zmian w dystrybucji  $\gamma$ -tubuliny w komórkach korzenia soi traktowanych Cd, którym towarzyszyły zmiany w ekspresji genów  $\gamma$ -tubuliny oraz akumulacji izoform  $\gamma$ -tubuliny; co było pierwszą próbą odnotowaną w literaturze;**
- (5) charakterystyka ultrastrukturalnych zmian komórek korzeni soi traktowanych Cd;**
- (6) wykazanie indukcji nadtlenoazotynu i zmian nitroproteomu w komórkach korzeni soi pod wpływem Cd.**

Wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego zostały sfinansowane całkowicie (**praca 1 i 3**) lub częściowo (**praca 2**) z projektu przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N N303 537938), którego byłem kierownikiem. Dodatkowo ze środków projektu została częściowo sfinansowana praca przeglądowa dotycząca roli reaktywnych form tlenu, NO, hormonów oraz regulacji ekspresji genów w reakcji roślin na działanie Cd (Chmielowska-Bąk i wsp., 2014).

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Po uzyskaniu stopnia doktora wyjechałem na ponad 2-letni staż (maj 2000-styczeń 2003) do Stanów Zjednoczonych Ameryki, gdzie brałem udział w badaniach zespołu dr Danuty Kozbor, zmierzających do otrzymania skutecznej szczepionki przeciwko różnym szczepom retrowirusa HIV-1. Badania te były prowadzone w dwóch ośrodkach naukowych: Centrum Neurowirusologii i Biologii Raka na Uniwersytecie Temple w Filadelfii oraz w Instytucie Raka Roswell Park w Buffalo i zaowocowały opublikowaniem 5 prac w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej, których jestem współautorem (łączny *impact factor* prac zgodny z rokiem opublikowania wg listy Journal Citation Reports wynosi 16.04).

Nadrzędnym celem badań było zaprojektowanie szczepionki DNA zdolnej do wzbudzenia efektywnej odpowiedzi immunologicznej zarówno komórkowej jak i humoralnej ze strony układu odpornościowego. Hipoteza badawcza zakładała, że modyfikacja białek strukturalnych wirusa HIV (Env, Gag i Pol), pozwoli na zaprojektowanie skutecznej szczepionki przeciwko wirusowi. W tym celu z genu kodującego glikoproteinę otoczki wirusa HIV (gp160), stanowiącej potencjalny cel limfocytów T cytotoksycznych i przeciwciał neutralizujących, usunięto lub zmodyfikowano sekwencje nukleotydów kodujące regiony zmienne (V1, V2, V3). Zabieg ten pozwolił na ekspozycję konserwatywnych epitopów glikoproteiny co stworzyło możliwość uzyskania skutecznej odpowiedzi immunologicznej. Immunizacja myszy zmodyfikowanymi w ten sposób szczepionkami DNA, a następnie infekcja zwierząt rekombinowanym wirusem krowianki zawierającym gen *gp160*, pozwoliła na porównanie odpowiedzi immunologicznej ze szczepionką DNA zawierającą gen typu dzikiego. Uzyskane wyniki wykazały, że szczepionka DNA pozbawiona regionu zmiennego V3 przyczyniła się do stymulacji limfocytów T cytotoksycznych specyficznych względem konserwatywnych epitopów glikoproteiny gp160 i obniżyła wiremię u zainfekowanych myszy (Kiszka i wsp., 2002). Z kolei specyficzna odpowiedź humoralna została uzyskana w przypadku szczepionek DNA zawierających gen otoczki (*Env*) wirusa z częściowo usuniętymi sekwencjami nukleotydów kodującymi regiony zmienne V2 i V3 (Gzyl i wsp., 2004). Podjęto również próby otrzymania szczepionki DNA w oparciu o modyfikacje struktury genów kodujących białka prekursorowe Gag (białka strukturalne) i Pol (kluczowe białka

enzymatyczne) wirusa HIV. Polegały one na zaprojektowaniu konstruktów DNA kodujących białko fuzyjne (G/P-92) będące połączeniem konserwatywnych i wysoce immunogennych epitopów białek macierzy (p17), kapsydu (p24) oraz odwrotnej transkryptazy (p51) wirusa HIV. Dodatkowo z konstruktów usunięto motyw odpowiedzialny za przesunięcie ramki odczytu w trakcie translacji wirusowego mRNA w celu zwiększenia ekspresji genu *Pol*. Doświadczenia na myszach immunizowanych wirusem krowianki zawierającym gen kodujący białko fuzyjne G/P-92 wykazały wzmocnioną, w porównaniu z białkiem typu dzikiego, odpowiedź immunologiczną typu komórkowego i humoralnego przeciwko antygenom białek Gag-Pol (Kmieciak i wsp., 2001). Przeprowadzono również badania, w trakcie których myszy immunizowano plazmidem zawierającym DNA kodujące białko fuzyjne Gag-Pol z usuniętymi genami potencjalnie immunosupresyjnych białek p15 (białko nukleokapsydu), p10 (proteaza) i p31 (integraza) wirusa HIV-1 oraz motywu odpowiedzialnego za przesunięcie ramki odczytu w trakcie translacji wirusowego mRNA (Bolesta i wsp., 2005). Immunizacja myszy zrekombinowanym plazmidem doprowadziła do indukcji odpowiedzi immunologicznej i wzrostu odporności u myszy zainfekowanych wirusem krowianki zawierającym niezmodyfikowane geny prekursorowego białka Gag-Pol. Równolegle były prowadzone badania zmierzające do podniesienia efektywności doustnych szczepionek skierowanych przeciwko glikoproteinie otoczki (gp160) wirusa HIV (Wierzbicki i wsp., 2002). Wykazały one, że sekwencyjne doustne podanie myszom plazmidowego DNA i zrekombinowanego wirusa krowianki zawierających gen *gp160* połączone z równoczesną aplikacją immunomodulatorów (lentinan, cytokina IL-2) doprowadziło do indukcji specyficznej śluzówkowej i systemowej odpowiedzi immunologicznej.

Udział w tych badaniach, oprócz niezwykle ważnej i ciekawej tematyki, pozwolił mi na zapoznanie się z szeroką gamą metod laboratoryjnych obejmujących hodowlę zwierzęcych linii komórkowych, w tym zakładanie kultur pierwotnych, hodowlę i namnażanie wirusów, technikę ELISA i ELISpot, immunoprecypitację białek, cytometrię przepływową czy metody biologii molekularnej (izolacja, oczyszczanie i analiza kwasów nukleinowych, PCR, klonowanie DNA, mutageneza ukierunkowana, transfekcja komórek eukariotycznych i transformacja bakterii).

Po powrocie do kraju zostałem zatrudniony na stanowisku adiunkta w Zakładzie Ekofizjologii Roślin UAM. Opracowałem i opublikowałem najważniejsze wyniki mojej pracy doktorskiej dotyczące odpowiedzi komórek kultury zawieszinowej ogórka na Cd. Pierwszym etapem tych badań była selekcja *in vitro* linii komórkowej ogórka o podwyższonej tolerancji na Cd, z której wyprowadzono następnie kulturę zawieszinową zdolną do stabilnego i długotrwałego wzrostu w obecności 100  $\mu$ M Cd (Gzyl i Gwóźdź, 2005). Otrzymano w ten sposób dwie kultury zawieszinowe: wyselekcjonowaną tolerancyjną i wyjściową wrażliwą, która nie była zdolna do długotrwałego wzrostu w obecności jonów Cd. W kolejnym etapie

badania obie zawiesiny posłużyły do poszukiwań potencjalnych mechanizmów leżących u podstaw zwiększonej tolerancji na Cd. Pierwszym z nich była synteza fitochelatyn (PCs) – niskocząsteczkowych oligopeptydów zdolnych do wiązania jonów różnych metali. Pod wpływem Cd zarówno w komórkach kultury tolerancyjnej jak i kultury wrażliwej obserwowano zwiększoną syntezę PCs z równoczesnym obniżeniem poziomu glutationu. Nie stwierdzono jednak bezpośredniego związku pomiędzy akumulacją PCs a tolerancją na Cd. Po 3 i 24 godzinach ekspozycji na jony Cd, poziom akumulacji PCs w komórkach obu kultur zawiesinowych soi był zbliżony, natomiast po 5 dniach ekspozycji na jony tego metalu, poziom PCs w komórkach zawiesiny wrażliwej był ponad dwukrotnie wyższy w porównaniu z komórkami zawiesiny tolerancyjnej. W komórkach obu zawiesin porównano również aktywność enzymów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na stres kadmowy (Gzyl i wsp., 2009b). W tym celu przeprowadzono elektroforezę natywną izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy askorbinianowej (APOX) i gwajakolowej (POX). W trakcie stresu kadmowego w komórkach linii wrażliwej obserwowano spadek aktywności SOD i POX, przy jednoczesnym wzroście aktywności CAT i APOX. Z kolei w komórkach kultury tolerancyjnej po ekspozycji na metal stwierdzono spadek aktywności SOD i CAT, natomiast całkowita aktywność peroksydaz utrzymywała się na zbliżonym poziomie, przy czym obserwowano zmiany w składzie (APOX) i aktywności (POX) poszczególnych izoenzymów w porównaniu z komórkami zawiesin wrażliwych. Badania te wykazały brak bezpośredniego związku pomiędzy aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, a zwiększoną tolerancją komórek wyselekcjonowanej kultury ogórka na Cd. Z kolei przeprowadzone równoległe badania ultrastrukturalne uwidoczniły szereg różnic pomiędzy komórkami linii wrażliwej a tolerancyjnej w reakcji na działanie jonów Cd (Gzyl i wsp., 2009a). W komórkach kultury wrażliwej, po ekspozycji na metal, stwierdzono zwiększoną wakuolizację oraz stopniową dezintegrację cytoplazmy, którym towarzyszyły zmiany strukturalne organelli komórkowych takich jak retikulum endoplazmatyczne (rozdęcia i fragmentacja cystern) czy mitochondria (rozdęcia i redukcja liczby grzebieni mitochondrialnych). Z kolei komórki kultury tolerancyjnej nie wykazywały symptomów uszkodzeń podobnych do tych obserwowanych w komórkach kultury wrażliwej. Stwierdzono natomiast obecność mitochondriów o wydłużonych kształtach i elektronowo gęstych substancji w obrębie wakuoli, wzrost liczby osmofilnych globuli na terenie cytoplazmy oraz większą częstotliwość występowania ciałek Cajala w jąderkach, co wydaje się być przejawem, diskutowanych w pracy, procesów adaptacyjnych.

W międzyczasie podjąłem również próbę otrzymania drogą androgenezy *in vitro* podwojonych haploidów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) odpornych na podwyższone stężenie Cd (we współpracy z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Poznaniu). Pomimo wielu prób nie udało mi się doprowadzić do otrzymania normalnie wykształconych,

odpornych na Cd osobników, ponieważ metal zatrzymywał rozwój roślin na etapie zdeformowanego haploidalnego zarodka somatycznego. Wyprowadziłem jednak i scharakteryzowałem kulturę zawiesinową rzepaku ozimego, która razem z kulturą zawiesinową soi (hodowaną od lat w Zakładzie Ekofizjologii Roślin) jest wykorzystywana do badań prowadzonych w ramach prac licencjackich i magisterskich. W związku z tym, że zawiesiny stanowią jeden z podstawowych układów doświadczalnych wykorzystywanych w Zakładzie Ekofizjologii Roślin, przystosowałem do potrzeb kultur rzepaku i soi metodę średnioterminowego przechowywania kultur zawiesinowych w obniżonej temperaturze (10°C), bez konieczności częstych pasaży oraz utraty właściwości fizjologicznych komórek (Schumacher i wsp., 2004). Opracowana metoda przechowywania dała podstawy do badań opisujących wpływ obniżonej temperatury na procesy fizjologiczne i ultrastrukturę komórek zawiesin soi i rzepaku w obecności lub braku osmoprotektantów takich jak prolina, mannitol czy sacharoza. Rezultatem tych doświadczeń było doniesienie zaprezentowane na konferencji międzynarodowej (Gzyl i wsp., 2007).

Kolejny wątek badawczy mojej działalności naukowej, prowadzony we współpracy z dr hab. Magdaleną Arasimowicz-Jelonek, dotyczył mechanizmów odpowiedzi obronnej dwóch odmian ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.): podatnej (Bintje) i odpornej (Bzura) na patogenicznego lęgniowca *Phytophthora infestans* – sprawcę zarazy ziemniaczanej. W badaniach wykazano m.in. akumulację homocysteiny (Hcy) jako zdarzenie sprzyjające rozwojowi zarazy ziemniaka (Arasimowicz-Jelonek i wsp., 2013). W trakcie doświadczeń z użyciem metod immunohistochemicznych obserwowano większą (począwszy od 48 godziny po inokulacji patogenem) akumulację Hcy w liściach odmiany podatnej w porównaniu z odmianą odporną. Co więcej, akumulacja Hcy była skorelowana w czasie ze zwiększoną ekspresją genów biorących udział w jej syntezie, tj. liazy cystationinowej i hydrolazy S-adenozyl-L-homocysteiny. Z kolei egzogenna aplikacja Hcy skutkowała wzrostem poziomu peroksydacji lipidów i gwałtowniejszym przebiegiem choroby. Co istotne, akumulacja endogennej Hcy w liściach obu odmian ziemniaka była poprzedzona aktywacją kluczowych enzymów systemu obronnego rośliny, takich jak liaza fenyloalaninowa czy  $\beta$ -1,3-glukanazy. Przeprowadzone badania wskazały na Hcy jako potencjalny biochemiczny marker zaawansowanego stanu patofizjologicznego roślin ziemniaka.

Dalsze badania w zakresie interakcji pomiędzy patogenem a rośliną wykazały udział nadtlenoazotynu ( $\text{ONOO}^-$ ) jako istotnego czynnika biorącego udział w odpowiedzi liści ziemniaka na atak patogena (Arasimowicz-Jelonek i wsp., 2016b). W przypadku roślin odpornych (odmiana Sarpo Mira) obserwowano początkowy (do 6 godzin po inokulacji patogenem) wzrost poziomu  $\text{ONOO}^-$ , co było skorelowane ze wzrostem stężenia cząsteczek prekursorowych tj. tlenku azotu (NO) i anionorodnika nadotlenkowego ( $\text{O}_2^-$ ). Jednocześnie zwiększonej akumulacji  $\text{ONOO}^-$  nie towarzyszyła zwiększona ekspresja genów peroksydazy



tiodoksyny (TPx) - enzymu uczestniczącego w jego rozkładzie. Z kolei w przypadku odmiany podatnej (Bintje) powstawanie ONOO<sup>-</sup> w odpowiedzi na atak *P. infestans* było opóźnione o 24 godziny w stosunku do odmiany odpornej. Co prawda, wcześniej obserwowano wzrost poziomu NO i O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ale był on równocześnie skorelowany ze wzrostem ekspresji genu TPx. Co więcej, począwszy od 24 godziny po inokulacji patogenem, w liściach odmiany podatnej stwierdzono wzrost poziomu nitrowania licznych białek, w przeciwieństwie do odmiany odpornej, w przypadku której nie obserwowano widocznych różnic w nitroproteomie, z wyjątkiem jednego prążka, odnotowanego w 48 godzinie po inokulacji. Prążek ten zawierał subtylizynę. Dodatkowo, w przypadku genotypu podatnego, zastosowanie donora ONOO<sup>-</sup> (SIN-1), a następnie inokulacja *P. infestans* spowodowała wolniejszą kolonizację tkanek rośliny przez patogena, co było połączone ze szybszą i silniejszą ekspresją genów o charakterze obronnym tj. genów kodujących białka związane z patogenezą. Otrzymane wyniki wskazują na istotne znaczenie ONOO<sup>-</sup> jako regulatora statusu oksydoredukcyjnego komórek w reakcjach obronnych roślin, przy czym w przypadku reakcji odpornej kluczowa wydaje się być precyzyjna kontrola powstawania NO i O<sub>2</sub><sup>-</sup> oraz regulacja aktywności TPx w miejscu ataku patogena.

Kolejny wątek badawczy w mojej działalności naukowej dotyczył mechanizmów odpowiedzi łubinu (*Lupinus luteus* L.) na stres metali ciężkich. Rezultatem tych badań było wykazanie udziału NO w indukcji programowanej śmierci komórek (PCD) korzenia i przekazywaniu sygnału o stresie do innych, dystalnych części roślin w warunkach stresu kadmowego (Arasimowicz-Jelonek i wsp., 2012). W wyniku działania krótkotrwałego (24 godziny), umiarkowanego stężenia Cd (89 μM), stosując metodę TUNEL, wykryto w wierzchołkach korzeni siewek łubinu proces zamierania komórek typu PCD. Proces ten został poprzedzony relatywnie wysokim poziomem NO jak i O<sub>2</sub><sup>-</sup>, generowanego przez błonową oksydazę NADPH, przy czym nie obserwowano wzrostu poziomu ONOO<sup>-</sup> w komórkach korzeni. Z kolei zastosowanie „zmiatacza” NO (cPTIO) oraz inhibitora oksydazy NADPH (DPI) skutkowało znaczącą redukcją poziomu NO i O<sub>2</sub><sup>-</sup> połączoną z obniżoną liczbą komórek podlegających PCD, co wskazuje na istotny udział reaktywnych form azotu i tlenu w inicjacji procesów prowadzących do aktywnej śmierci komórek korzeni łubinu. Co więcej, na przykładzie 14-dniowych roślin łubinu eksponowanych na umiarkowany stres kadmowy wykazano, że zainicjowana przez NO programowana śmierć komórek korzenia może być zaangażowana, wraz z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i kwasem salicylowym, w przekaz sygnału o stresie do liści i zwiększenie w ten sposób potencjału obronnego dystalnych części roślin.

Siewki łubinu stanowiły również materiał doświadczalny w badaniach dotyczących akumulacji białek stresowych w reakcji roślin na działanie ołowiu i miedzi (Przymusiński i Gzyl, 2013). Większość danych dotyczących białek stresowych typu PR-10 (Pathogenesis related-10), których akumulacja jest wskaźnikiem działania różnych stresów środowiskowych

pochodzi z analiz dotyczących ekspresji genów lub akumulacji białek (polipeptydów). Brak było natomiast badań dotyczących lokalizacji tkankowej lub komórkowej tych białek stresowych. W związku z tym, w badaniach przeanalizowano metodami barwienia immunologicznego lokalizację oraz poziom białek PR (L1-L6) w wierzchołkach wzrostu korzeni siewek łubinu hodowanych w roztworach ołowiu lub miedzi. Lokalizacja immunohistochemiczna wykazała obecność białek PR we wszystkich analizowanych tkankach korzenia, przy czym badane metale ciężkie nie wpływały na zmianę dystrybucji tych białek, a jedynie zwiększały poziom ich akumulacji, szczególnie w obrębie komórek merystematycznych oraz tkanki prokambium. Z kolei analiza immunocytochemiczna wykazała cytoplazmatyczną, wewnątrzkomórkową lokalizację białek PR (L1-L6), potwierdzając tym samym ich przynależność do klasy białek PR-10.

Podjąłem również współpracę z Katedrą Użytkowania Lasu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w ramach której były prowadzone badania dotyczące właściwości drewna sosny zwyczajnej (*Pinus silvestris* L.). Rezultatem tych badań było wykazanie zależności pomiędzy cechami morfologicznymi sosny, obejmującymi wymiary pnia i korony, a właściwościami drewna takimi jak grubość ścian komórkowych, zawartość ligniny i krystaliczność celulozy (Jelonek i wsp., 2015). Badania te wskazują na występowanie u sosny złożonych mechanizmów optymalizacyjnych w zakresie właściwości drewna, co umożliwia drzewom wykształcenie najlepszej strategii przeżycia w danych warunkach środowiskowych. Z kolei analiza poziomu lignifikacji ścian komórkowych w strefie drewna dojrzałego na poziomie pierśnicy wykazała różnice w zawartości ligniny i szerokości przyrostu rocznego pnia sosny w zależności od formy korowiny (Jelonek i wsp., 2009).

Podsumowując, pobyt na stażu zagranicznym, współpraca z innymi ośrodkami naukowymi w kraju oraz udział w projektach badawczych (**załącznik nr 4, pkt I**) i szkoleniach (**załącznik nr 5, pkt Q**) umożliwił mi poznanie szerokiego wachlarza metod eksperymentalnych oraz podejść metodycznych obejmujących kultury *in vitro* komórek roślinnych i zwierzęcych, elektroforezę białek natywnych i zdenaturowanych oraz elektroforezę DNA, preparatykę materiału biologicznego do obserwacji w mikroskopie elektronowym (transmisyjnym i skaningowym), fluorescencyjnym, konfokalnym, metody immunologiczne (ELISA, ELISpot, Western blot, immunoprecypitacja, cytometria przepływowa) oraz wspomniane wcześniej metody biologii molekularnej. Moja aktywność naukowa zaowocowała 19 publikacjami naukowymi (**załącznik nr 4, pkt. IB i IIA**) i 29 doniesieniami na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym (**załącznik nr 5, pkt B**). Za osiągnięcia w pracy naukowej zostałam trzykrotnie (2013, 2014, 2016) wyróżniony nagrodą zespołową III stopnia przyznaną przez Rektora Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

## Dane bibliometryczne

Sumaryczny *impact factor* zgodny z rokiem opublikowania dla wszystkich prac (wliczając publikacje stanowiące osiągnięcie habilitacyjne) wynosi **47.23**, natomiast suma punktów MNiSW wg listy z 9 grudnia 2016 roku wynosi **550**. Łączna liczba cytowań wg bazy Web of Science na dzień 18.01.2018 wynosi **217 (202 bez autocytowań)**, natomiast indeks Hirscha wg bazy Web of Science wynosi **8**.

## Literatura

- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Deckert J., Rucińska-Sobkowiak R., **Gzyl J.**, Pawlak-Sprada S., Abramowski D., Jelonek T., Gwóźdź E. A., 2012. Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *Plant Physiol. Biochem.* 58: 124-134.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., **Gzyl J.**, Chmielowska-Bak J., 2013. Homocysteine over-accumulation as the effect of potato leaves exposure to biotic stress. *Plant Physiol. Biochem.* 63: 177-184.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Izbiańska K., 2016a. Costs and benefits of nitric oxide generation in plants exposed to cadmium. *Adv. Bot. Res.* 77: 97-121.
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Izbiańska K., **Gzyl J.**, Jelonek T., 2016b. Implication of peroxynitrite in defence responses of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 65: 754-766.
- Blume Y. B., Krasylenko Y. A., Demchuk O. M., Yemets A. I., 2013. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Front. Plant Sci.* 4: 530.
- Bolesta E., **Gzyl J.**, Wierzbicki A., Kmiecik D., Kowalczyk A., Kaneko Y., Srinivasan A., Kozbor D., 2005. Clustered epitopes within the Gag-Pol fusion protein DNA vaccine enhance immune responses and protection against challenge with recombinant vaccinia viruses expressing HIV-1 Gag and Pol antigens. *Virology* 332: 467-479.
- Cai G., 2010. Assembly and disassembly of plant microtubules: tubulin modifications and binding to MAPs. *J. Exp. Bot.* 61: 623-626.
- Chmielowska-Bak J., **Gzyl J.**, Rucińska-Sobkowiak R., Arasimowicz-Jelonek M., Deckert J., 2014. The new insights into cadmium sensing. *Front. Plant Sci.* 5: 245.
- Fusconi A., Gallo C., Camusso W., 2007. Effects of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 632: 9-19.
- Fusconi A., Repetto O., Bona E., Massa N., Gallo C., Dumas-Gaudot E., Berta G., 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 58: 253-260.
- Gzyl J.**, Bolesta E., Wierzbicki A., Kmiecik D., Naito T., Honda M., Komuro K., Kaneko Y., Kozbor D., 2004. Effect of partial and complete variable loop deletions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein on the breadth of gp160-specific immune responses. *Virology* 318: 493-506.
- Gzyl J.**, Chmielowska-Bak J., Przymusiński R., 2017. Gamma-tubulin distribution and ultrastructural changes in root cells of soybean (*Glycine max* L.) seedlings under cadmium stress. *Environ. Exp. Bot.* 143: 82-90.

- Gzyl J.**, Chmielowska-Bąk J., Przymusiński R., Gwóźdź E. A., 2015. Cadmium affects microtubule organization and post-translational modifications of tubulin in seedlings of soybean (*Glycine max* L.). *Front. Plant Sci.* 6: 937.
- Gzyl J.**, Gwóźdź E. A., 2005. Selection in vitro and accumulation of phytochelatins in cadmium tolerant cell line of cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 80: 59-67.
- Gzyl J.**, Izbiańska K., Floryszak-Wieczorek J., Jelonek T., Arasimowicz-Jelonek M., 2016. Cadmium affects peroxynitrite generation and tyrosine nitration in seedling roots of soybean (*Glycine max* L.). *Environ. Exp. Bot.* 131: 155-163.
- Gzyl J.**, Przymusiński R., Gwóźdź E. A., 2009a. Ultrastructure analysis of cadmium-tolerant and -sensitive cell lines of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 99: 227-232.
- Gzyl J.**, Rymer K., Gwóźdź E. A., 2009b. Differential response of antioxidant enzymes to cadmium stress in tolerant and sensitive cell line of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Biochim. Pol.* 56: 723-727.
- Horiunova I. I., Krasylenko Y. A., Yemets A. I., Blume Y. B., 2016. Involvement of plant cytoskeleton in cellular mechanisms of metal toxicity. *Cytol. Genet.* 50: 47-59.
- Jelonek T., Pazdrowski W., Arasimowicz-Jelonek M., **Gzyl J.**, Tomczak A., Floryszak-Wieczorek J., 2009. The relationship between the form of dead bark and lignin content in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Turk. J. Agric. For.* 33: 455-462.
- Jelonek T., Tomczak A., Remlein A., Katrusiak A., Arasimowicz-Jelonek M., **Gzyl J.**, 2015. The novel relationship between the morphological characteristics of trees and ultrastructure of wood tissue in scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Wood Res.* 60: 519-530.
- Kiszka I., Kmiecik D., **Gzyl J.**, Naito T., Bolesta E., Sieron A., Singh S. P., Srinivasan A., Trinchieri G., Kaneko Y., Kozbor D., 2002. Effect of the V3 loop deletion of envelope glycoprotein on cellular responses and protection against challenge with recombinant vaccinia virus expressing gp160 of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* 76: 4222-4232.
- Kmiecik D., Bolesta E., Naito T., **Gzyl J.**, Kaneko Y., Kozbor D., 2001. Enhancement of cellular and humoral immune responses to human immunodeficiency virus type 1 Gag and Pol by a G/P-92 fusion protein expressing highly immunogenic Gag p17/p24 and Pol p51 antigens. *J. Hum. Virol.* 4: 306-316.
- Kost B., Chua N. H., 2002. The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell* 108: 9-12.
- Krtková J., Benáková M., Schwarzerová K., 2016. Multifunctional microtubule-associated proteins in plants. *Front. Plant Sci.* 7: Article 474.
- Krzyszowska M., 2011. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol. Plant.* 33: 35-51.
- Küpper H., Andresen E., 2016. Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics* 8: 269-285.
- Liu B., Joshi H. C., Wilson T. J., Silflow C. D., Palevitz B. A., Snustad D. P., 1994.  $\gamma$ -Tubulin in arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* 6: 303-314.
- Monteiro H. P., Arai R. J., Travassos L. R., 2008. Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 843-889.
- Muench D. G., Park N. I., 2006. Messages on the move: the role of the cytoskeleton in mRNA localization and translation in plant cells. *Can. J. Bot.* 84: 572-580.
- Ogg S. C., Lamond A. I., 2002. Cajal bodies and coilin - moving towards function. *J. Cell Biol.* 159: 17-21.
- Parrotta L., Cresti M., Cai G., 2014. Accumulation and post-translational modifications of plant tubulins. *Plant Biol.* 16: 521-527.
- Przymusiński R., **Gzyl J.**, 2013. Immunohisto- and cytochemical localization of PR-10 proteins induced by heavy metals in lupine roots. *Acta Physiol. Plant.* 35: 1707-1711.

- Rucińska-Sobkowiak R., Nowaczyk G., Krzesłowska M., Rabeda I., Jurga S., 2013. Water status and water diffusion transport in lupine roots exposed to lead. *Environ. Exp. Bot.* 87: 100-109.
- Schumacher H. M., Malik K. A., Van Iren F., 2004. Simple storage of plant cell cultures in liquid media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 703-705.
- Sharma S. S., Dietz K. J., Mimura T., 2016. Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell Environ.* 39: 1112-1126.
- Stępiński D., 2014. Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma* 251: 1285-1306.
- Tanaka M., Chock P. B., Stadtman E. R., 2007. Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 66-71.
- Thomas C., Staiger C. J., 2014. A dynamic interplay between membranes and the cytoskeleton critical for cell development and signaling. *Front. Plant Sci.* 5: 335.
- Tran T. A., Popova L. P., 2013. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turk. J. Bot.* 37: 1-13.
- Wierzbicki A., Kiszka I., Kaneko H., Kmiecik D., Wasik T. J., **Gzyl J.**, Kaneko Y., Kozbor D., 2002. Immunization strategies to augment oral vaccination with DNA and viral vectors expressing HIV envelope glycoprotein. *Vaccine* 20: 1295-1307.
- Wloga D., Gaertig J., 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci.* 123: 3447-3455.
- Zhai Y., Guo M., Wang H., Lu J., Liu J., Zhang C., Gong Z., Lu M., 2016. Autophagy, a conserved mechanism for protein degradation, responds to heat, and other abiotic stresses in *Capsicum annuum* L. *Front. Plant Sci.* 7: 131.

Poznań, 18.01.2018

Jarosław Gzyl