

Autoreferat

Katarzyna Popłońska

*Uniwersytet Łódzki
Katedra Cytofizjologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Pomorska 141/143
90-236 Łódź*

Łódź, czerwiec 2012 r.

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

1988r. - Magister Biologii

„Wpływ pory roku na poziom endoreplikacji w komórkach manubriów oraz wielkość i produktywność anterydiostanów *Chara vulgaris*”

1999r. - Doktor Nauk Biologicznych

„Cytochemiczne, autoradiograficzne i ultrastrukturalne badania procesu spermiogenezy *Chara spp*”

Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 10. 12. 1986r. - 05. 1991r.** pracownik techniczny w Pracowni Cytofizjologii, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Łódzkiego
- 05. 1991r. – 31. 10. 1999r.** pracownik naukowo-dydaktyczny – asystent w Katedrze Cytofizjologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Łódzkiego
- 01. 11. 1999r. – do chwili obecnej** adiunkt w Katedrze Cytofizjologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego

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

Problematyka opisywana w cyklu publikacji na temat „Wymiana nukleohistonów na białka typu protamin podczas spermiogenezy u *Chara vulgaris* i *Chara tomentosa* oraz rola retikulum endoplazmatycznego w tym procesie” stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego

a) Cykl prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej

Publikacje zrealizowane w ramach projektu badawczego **Grant KBN nr 6PO4C 053 17** „Cytofizjologiczne badania procesu spermiogenezy *Chara sp*”, którego habilitantka była **głównym wykonawcą**

- 1. Kwiatkowska M, Kaźmierczak A, Popłońska K (2002)** Ultrastructural, autoradiographic and electrophoretic examinations of *Chara tomentosa* spermiogenesis. Acta Soc Bot Pol 71: 201-209; (13p_{MNiSW}/0,222_{IF})

cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge – 7

Wkład habilitantki: 50%; Wykonanie pracy eksperymentalnej (bez badań elektroforetycznych), skolekcjonowanie materiału do badań elektroforetycznych, wraz z prof. M. Kwiatkowską opracowanie i interpretacja wyników, współprzygotowanie manuskryptu.

2. **Kwiatkowska M, Popłońska K (2003)** RER and protamine-type proteins during *Chara tomentosa* spermiogenesis. Acta Soc Bot Pol 72: 5-9; (13p/0,338)
cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge – 2
Wkład habilitantki: 70%; Wykonanie pracy eksperymentalnej, wraz z prof. M. Kwiatkowską opracowanie i interpretacja wyników, współprzygotowanie manuskryptu.
3. **Kwiatkowska M, Wojtczak A, Popłońska K, Teodorczyk M (2003)** The influence of epoxomicin, inhibitor of proteosomal proteolytic activity, on spermiogenesis in *Chara vulgaris*. Folia Histochem Cytobiol 41: 51-54; (13p/0,475)
cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge – 3
Wkład habilitantki: 50%; Współautor koncepcji pracy, opieka nad pracą eksperymentalną, pomoc w opracowaniu i interpretacji wyników, wraz z prof. M. Kwiatkowską i dr A. Wojtczak przygotowanie manuskryptu.
4. **Popłońska K, Kwiatkowska M, Stępiński D, Gosek A, Wojtczak A (2004)** Immunocytochemical localization of ubiquitin and proteasomes in spermatids during spermiogenesis of *Chara vulgaris* (Charophyceae). Eur J Phycol 39: 309-315; (32p/2,506)
cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge - 2
Wkład habilitantki: 45%; Autor korespondencyjny manuskryptu, stworzenie koncepcji pracy, wraz z dr D. Stępińskim wykonanie pracy eksperymentalnej, z prof. M. Kwiatkowską opracowanie i interpretacja wyników oraz przygotowanie manuskryptu.
- Publikacja zrealizowana w ramach projektu badawczego **Grant KBN nr 3 PO4C 033 25** „Rola RER w spermiogenezie *Chara vulgaris* i *Chara tomentosa*”, którego habilitantka była **głównym wykonawcą**.
5. **Popłońska K, Wojtczak A, Kwiatkowska M, Kaźmierczak A (2007)** Cytochemical and immunocytochemical studies of the localization of histones and protamine-type proteins in spermatids of *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. Folia Histochem Cytobiol 45: 367-374; (13p/0,886)
cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge – 4
Wkład habilitantki: 40%; Autor korespondencyjny manuskryptu, współautor koncepcji pracy oraz projektu badań wraz z dr A. Wojtczak, wykonanie pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników oraz razem z dr A. Wojtczak przygotowanie manuskryptu.
- Publikacja zrealizowana w ramach projektu badawczego **Badań własnych UŁ z 2007r. nr 505/390** „Immunofluorescencyjne badania procesu powstawania podwójnych pęknięć nici DNA podczas spermiogenezy u *Chara vulgaris*”- **główny wykonawca**
6. **Wojtczak A, Popłońska K, Kwiatkowska M (2008)** Phosphorylation of H2AX histone as indirect evidence for double-stranded DNA breaks related to the exchange of nuclear proteins and chromatin remodeling in *Chara vulgaris* spermiogenesis. Protoplasma 233: 263-267; (27p/1,460)
cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge – 3
Wkład habilitantki: 30%; Wraz z dr A. Wojtczak wykonanie pracy eksperymentalnej, częściowe opracowanie i interpretacja wyników, wraz z dr A. Wojtczak i prof. M. Kwiatkowską przygotowanie manuskryptu.

Publikacja zrealizowana w ramach projektu badawczego **Grant KBN nr 3 PO4C 033 25** „Rola RER w spermiogenezie *Chara vulgaris* i *Chara tomentosa*.” - zakończony w **2007r.**, którego habilitantka była **głównym wykonawcą**

7. **Popłońska K, Kwiatkowska M, Wojtczak A, Polit JT (2009)** Immunogold evidence suggests that endoplasmic reticulum is the site of protamine type protein synthesis and participates in translocation of these proteins into the nucleus during *Chara vulgaris* spermiogenesis. Biol Reprod 80: 572-580; (32p/3,3)
cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge – 3
Wkład habilitantki: 60%; Autor korespondencyjny manuskryptu, projekt i wykonanie pracy eksperymentalnej (bez Western blot), opracowanie i interpretacja wyników, wraz z prof. M. Kwiatkowską i dr A. Wojtczak przygotowaniem manuskryptu.

Publikacja zrealizowana w ramach projektu badawczego **Badań własnych UŁ w ramach rozprawy habilitacyjnej z 2008, 2009 oraz 2010r. nr 505/393**

8. **Popłońska K (2012)** Occurrence of calreticulin during the exchange of nucleohistones into protamine-type proteins in *Chara vulgaris* spermiogenesis. Protoplasma DOI 10.1007/s00709-011-0370-6 (on line 2011) (27p/ 1,922)

Razem za cykl prac, wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej otrzymałam 170 punktów MNiSW i uzyskałam wartość wskaźnika IF – 11,109

*Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5.

b) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z przedstawieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Spermiogeneza jest kluczowym procesem morfogenetycznym (Mayer i wsp. 2000), występującym u zwierząt (Wouters-Tyrou i wsp. 1998, Rathke i wsp. 2007) i u niektórych roślin, u których powstają plemniki swobodnie poruszające się w wodzie (Reynolds i Wolfe 1978, 1984). Prowadzi ona do ekstremalnej kondensacji chromatyny (Pogany i wsp. 1981, Ward i Coffey 1991, Daban 2000, Ausio i wsp. 2007) i jest efektem wymiany histonów na protaminy lub inne silnie zasadowe białka (Steger 1999, Dadoune 2003, Balhorn 2007, Worawittayawong i wsp. 2008, Hecht i wsp. 2009, Kurtz i wsp. 2009, Miller i wsp. 2010). Weześniejsze analizy pochodzące z mojego doktoratu wykazały, że u glonu *Chara vulgaris* podczas dyferencjacji spermatyd odbywa się wymiana nukleohistonów na białka silnie zasadowe protamino barwliwe. **Obecnie, zestaw 8 prac przedstawia wnikliwe badania dotyczące wymiany białek podczas spermiogenezy u 2 gatunków *Chara* – *C. vulgaris* oraz *C. tomentosa*.**

Badania z zastosowaniem mikroskopii świetlnej i elektronowej (przedstawione w moim doktoracie) pozwoliły wyróżnić u *Chara vulgaris* 10 faz spermiogenezy (I–X) na podstawie

rozmiaru, położenia, kształtu i struktury jądra w spermatydach, zmniejszającej się powierzchni cytoplazmy, a także formowania się mankietu mikrotubul i 2 wici, jak również przeobrażenia proplastydów w amyloplasty. Ze względu na fakt, że anterydiostany *Chara vulgaris* są znacznie mniejsze od *Chara tomentosa*, ten drugi gatunek został wybrany do dalszych badań biochemicznych. Najpierw jednak przeprowadzono gruntowne ultrastrukturalne analizy spermiogenezy, zachodzącej u tego gatunku *Chara* (**Kwiatkowska i wsp. 2002**). W badaniach tych wykazano duże podobieństwo przeobrażeń chromatyny podczas różnicowania spermatyd u obu gatunków *Chara*. W początkowych stadiach spermiogenezy (I–II) skondensowana chromatyna występuje w postaci nieregularnych skupień wokół otoczki jądrowej oraz wewnątrz jądra. Chromatyna luźna zajmuje znacznie większą część jądra niż chromatyna zwarta. W kolejnych fazach (III–V) – powierzchnia jądra ulega stopniowemu zmniejszeniu, a chromatyna zwarta formuje dość gruby pierścień przylegający ściśle do otoczki jądrowej. Powierzchnia zajmowana przez chromatynę luźną począwszy od III fazy ulega stopniowemu zmniejszeniu. W VI fazie dyferencjacji następuje przeorganizowanie postaci chromatyny zwartej z pierścieniowatej w sieciowatą, rozprzestrzeniającą się w całym jądrze przyjmującym kształt cytryny. Podczas przejścia z fazy VI do VII sieciowata chromatyna zwarta stopniowo zanika, a wydłużające się jądro wypełnia szara struktura z fibrylami o różnej długości, ułożonymi początkowo bezładnie, które nieco później uporządkują się, staną się grubsze i bardziej skupione. W fazie VIII, kiedy jądro przybiera kształt rogala, chromatyna ma strukturę fibrylarną, a długie fibryle ułożone są równoległe do długiej osi jądra, podczas gdy w kolejnej IX fazie jądro zawiera chromatynę posiadającą strukturę lamelarną (beleczkowatą), w której fibryle chromatynowe uległy agregacji. Najsilniej skondensowaną chromatynę posiadają jądra spermatyd z ostatniej X fazy spermiogenezy w postaci silnie upakowanej elektronowo-gęstej masy. Ta homogenna struktura jądra początkowo pojawia się wokół centrów kondensacji, a następnie rozprzestrzenia się na całe jądro.

Autoradiograficzne analizy z użyciem mieszaniny ^3H -lizyny oraz ^3H -argininy w kolejnych stadiach dyferencjacji (**Kwiatkowska i wsp. 2002**) wykazały, że po krótkiej 2 min inkubacji następuje aktywne włączanie tych aminokwasów do spermatyd w pierwszych sześciu stadiach, przy wyraźnym stopniowym zmniejszaniu się powierzchni jądra i cytoplazmy. Prawdopodobnie w pierwszych czterech stadiach, podobnie jak u *C. vulgaris*, ma miejsce proces demetylacji genów odpowiedzialnych za uruchamianie procesu różnicowania, stwierdzony wcześniej przez zespół prof. Olszewskiej (1997). Późniejszy okres (faza V–VI) może być związany z syntezą białek typu protamin.

Zarówno cytochemiczne (Popłońska 2002) jak i immunocytochemiczne badania, z użyciem przeciwciał przeciw białkom typu protamin izolowanych z anterydiostanów *C. tomentosa* (Popłońska i wsp. 2007), wykazały u obu gatunków *Chara*, że we wczesnych etapach (I-IV) występują tylko histony, natomiast etapy końcowe (IX-X) charakteryzują się obecnością jedynie białek typu protamin. Począwszy od stadium V pojawiają się białka typu protamin przy obecności białek histonowych. Wymiana tych ważnych dla spermiogenezy białek prowadzona jest aż do VIII stadium.

Proces wymiany białek był także obserwowany w spermatydach *C. tomentosa* przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej (Kwiatkowska i wsp. 2002). Wykazano, że we wczesnych fazach występują w dużych ilościach cztery frakcje histonów rdzeniowych oraz mniejsze ilości trzech frakcji histonu linkerowego H1. Niewielkie ilości białek typu protamin pojawiają się w środkowej spermiogenezie (V-VI), a w okresie późnej spermiogenezy (IX-X) osiągają prawie poziom maksymalny. W pełni dojrzałych spermatozoidach nie stwierdzono histonów, które zostały zastąpione przez trzy frakcje białek zasadowych, posiadających ruchliwość elektroforetyczną zbliżoną do protamin łososia. W spermiogenezie u *C. tomentosa* nie stwierdzono jednak występowania białek przejściowych – TP, które są charakterystyczne dla spermiogenezy zwierzęcej (w tym ludzkiej). Późniejsze badania z zastosowaniem metody Western blot potwierdziły wyniki elektroforezy, a ponadto ujawniły u 2 gatunków *Chara* dodatkowe białka typu protamin (Popłońska i wsp. 2009).

Ultrastrukturalne badania obu gatunków *Chara* wykazały, że właśnie w tej V fazie spermiogenezy występuje silnie rozbudowany system pęcherzyków i cystern ER połączonych z otoczką jądrową. Zarówno pęcherzyki jak i rozdęte cysterny ER wypełnione są szarą, drobnoziarnistą substancją, jak również międzybłonowa przestrzeń otoczki jądrowej zawiera podobną homogenną substancję, zawierającą protaminy (Kwiatkowska i Popłońska 2002, 2003), jak wcześniej sugerowała prof. Kwiatkowska (1996). W VI fazie, kiedy chromatyna skondensowana formuje sieć rozprzestrzeniającą się po całym jądrze, ER jest jeszcze dość wyraźne, przy postępującej redukcji cytoplazmy. Szorstkie retikulum endoplazmatyczne (RER) formuje pęcherzyki z szarą zawartością podobną do tej znajdującej się w przestrzeni perinuklearnej, oraz liczne pęcherzyki bez zawartości. Pęcherzyki te mogą pochodzić zarówno od ER jak i od diktyosomów. W kolejnych stadiach (VII i VIII) w silnie zredukowanej cytoplazmie system ER staje się coraz słabiej widoczny, aż w końcu w IX fazie zanika (Kwiatkowska i Popłońska 2002, 2003).

Obrazy przypominające cysterny ER w V stadium różnicowania uzyskano zarówno w badaniach cytochemicznych jak i immunocytochemicznych, gdzie wyraźną barwną reakcję oraz silne sygnały antygenowe przeciwko białkom typu protamin ujawniono na terenie cytoplazmy w pobliżu jądra spermatyd w postaci równolegle ułożonych pasm (**Popłońska i wsp. 2007**). Uzyskane rezultaty za pomocą różnych dotychczasowych metod potwierdzały przypuszczenia prof. Kwiatkowskiej z 1996r., że synteza białek typu protamin może odbywać się na terenie ER.

W celu bezpośredniego udowodnienia powyższej sugestii, podjęto dalsze badania z wykorzystaniem techniki immunogold. Przeciwciała przeciw białkom typu protamin pochodziły z wyizolowanego i oczyszczonego białka z anterydiostanów *C. tomentosa*, w ostatnim stadium spermiogenezy. Metoda koloidalnego złota ujawniła znakowanie zarówno pęcherzyków jak i cystern ER właśnie w V fazie spermiogenezy. Wyraźnie pokazano, iż obie te subdomeny są miejscem występowania białek typu protamin, które następnie zostają przetransportowane bezpośrednio do otoczki jądrowej i drogą endocytozy poprzez wpuklanie błony wewnętrznej otoczki jądrowej, tworząc tzw. wewnątrzjądrowe retikulum (NR) dostają się do miejsca przeznaczenia czyli do jądra (Popłońska i wsp. 2009).

Badania autoradiograficzne z użyciem mieszaniny ^3H -lizyny oraz ^3H -argininy ujawniły właśnie w V stadium najbardziej dynamiczne włączanie tych aminokwasów do komórek po 4 min inkubacji w środowisku radioaktywnym. Następnie, prekursorzy te są natychmiast transportowane do jądra spermatyd. Metoda ta potwierdziła czas syntezy białek typu protamin w V stadium dyferencjacji spermatyd oraz ogromną dynamikę transportu nowosyntetyzowanych białek do jądra. Ponadto, autoradiografia puls and chase, polegająca na 4 min inkubacji roślin w mieszaninie ^3H -lizyny oraz ^3H -argininy, a następnie postinkubacji przez 120 min w środowisku nieradioaktywnym, nie wykazała istotnych statystycznie zmian w znakowaniu komórek w V fazie spermiogenezy, w porównaniu z wcześniejszym wariantem (0 min postinkubacja). Wyraźny ok. 3-krotny wzrost znakowania jąder zaobserwowano natomiast w kolejnych stadiach VI i VII, oraz mniejszy w stadium VIII. Ten dynamiczny wzrost wyznakowania jąder nie mógł pochodzić z mniej znakowanej w tym czasie cytoplazmy. Wynik ten staje się zrozumiały, jeśli weźmiemy pod uwagę czas trwania poszczególnych faz spermiogenezy. Okres, w jakim zachodzą przemiany w pierwszych czterech stadiach (I-IV) jest dość długi i wynosi ok. 5 dni. Kolejne etapy są już znacznie krótsze. Stadia V-IX trwają jedynie 5-7 godz., a ostatnie X stadium - ok. 17 godz. Podczas 120 min postinkubacji komórki, które były w V stadium, przeszły do kolejnych faz: VI i VII – stąd wyraźny wzrost wyznakowania jąder w tym okresie. Ponadto, porównawcze analizy

całkowitego wyznakowania jąder w stadiach od V do VIII po 0 min oraz 120 min postinkubacji wykazały 50% silniejsze znakowanie w tym drugim przypadku. Oznacza to, że po 120 min postinkubacji transport białek typu protamin był kontynuowany z cytoplazmy do jądra (**Popłońska i wsp. 2009**).

Wykonano także porównawcze analizy gęstości znakowania złotem koloidalnym jąder spermatyd z V oraz VIII stadium spermiogenezy. Zaobserwowano, że podczas kolejnych etapów (od V do VIII) nastąpił ponad 3-krotny wzrost gęstości upakowania w jądrze białek typu protamin (**Popłońska i wsp. 2009**).

W świetle ER panują optymalne warunki do fałdowania i dojrzewania białek. Znajdują się tam duże ilości rozpuszczonych białek enzymatycznych i chaperonów molekularnych określanych łącznie jako retikuloplazminy, do których należy między innymi kalretikulina (CRT), białko opiekuńcze, występujące zarówno w komórkach zwierzęcych (Person i wsp. 2002, Park i wsp. 2001) jak i roślinnych (Šamaj i wsp. 2008, Lenartowska i wsp. 2009, Jia i wsp. 2009).

Celem kolejnej pracy (**Popłońska 2012**) było więc sprawdzenie 1) czy w czasie spermiogenezy u *C. vulgaris* w silnie rozbudowanym systemie ER występuje CRT; 2) w jakich domenach ulega ona kumulacji; 3) czy w systemie ER CRT może współuczestniczyć w przemieszczaniu się protamin do jądra. Do analiz techniką Western blot użyto przeciwciała przeciw ludzkiej CRT. W ekstrakcie z anterydiostanów *C. vulgaris* będących w V stadium spermiogenezy wykryto 2 izoformy CRT. Badania z zastosowaniem techniki immunogold pozwoliły na określenie czasu i miejsca występowania CRT podczas spermiogenezy u *Chara vulgaris* (**Popłońska 2012**). Stwierdzono, że białko to występuje obficie w ER jedynie wtedy, gdy rozpoczyna się proces wymiany nukleohistonów na nukleoprotaminy. Na terenie ER CRT współuczestniczy także w fałdowaniu nowo zsyntezowanych białek (Michalak i wsp. 1999, Trombetta 2003). Obserwacje EM z zastosowaniem metody podwójnego znakowania techniką immunogold (z użyciem przeciwciał dla „Charowych” białek typu protamin oraz dla CRT) sugerują, że CRT może uczestniczyć w transporcie nowo zsyntetyzowanych białek typu protamin do jądra spermatyd u *C. vulgaris* w V stadium spermiogenezy (**Popłońska 2012**). Świadczy o tym wyraźna kolokalizacja tych obu białek w jądrze, otoczce jądrowej i w silnie rozwiniętym systemie cystern i pęcherzyków ER transportujących je do jądra. Wyznakowanie złotem koloidalnym, pochodzące od obu przeciwciał, w stadium V bardzo wyraźnie kumuluje się w jądrze, zwłaszcza w jego części peryferycznej, gdzie występuje chromatyna skondensowana. Ponadto w prawie każdym z badanych rejonów komórki procentowy udział kolokalizacji protamin

z CRT był znacząco wyższy niż samych protamin. U *Chara*, zaobserwowano również wyznakowanie diktiosomów i pęcherzyków aparatu Golgiego (**Popłońska 2012**). Nie jest to zaskakujące, gdyż już wcześniej u roślin CRT została stwierdzona w tych przedziałach komórki (Borisjuk i wsp. 1998, Navazio i wsp. 2002, Nardi i wsp. 2006). Ponadto u *Chara* zaobserwowano kolokalizację protamin i CRT w tym organellum (**Popłońska 2012**). **W przyszłości będą prowadzone dalsze badania koncentrujące się na roli aparatu Golgiego w procesie wymiany białek w czasie spermiogenezy u *Chara*.**

Podczas spermiogenezy u zwierząt obserwuje się przejściowe pęknięcia w obrębie DNA, potrzebne dla wyeliminowania nukleosomowych superzwojów DNA w dojrzałych spermatydach (Risley i wsp. 1986, Ward 1994). Z uwagi na to, że w spermiogenezie *Chara* znana jest sekwencja zmian ultrastruktury jądra, której towarzyszy wymiana białek jądrowych, uznano, iż jest to także odpowiedni model dla badań endogennych podwójnych pęknięć DNA. Zastosowano metodę ujawniania obecności tych pęknięć techniką immunocytochemiczną z użyciem przeciwciał przeciwko ufosforylowanemu histonowi H2AX, ponieważ pęknięcia te indukują fosforylację tego histonu (Rogakou i wsp. 1998, Tadokoro i wsp. 2003). We wczesnej spermiogenezie wykazano brak foci, świadczących o braku podwójnych pęknięć DNA (**Wojtczak i wsp. 2008**). Stadia te odpowiadają okrągłym spermatydom myszy i człowieka (Laberge i Boissonneault 2005, Leduc i wsp. 2008) oraz u *Drosophila* (Rathke i wsp. 2007), w których, podobnie jak u *Chara*, występują jedynie nukleohistony. Charakterystyczne dla ufosforylowanego histonu H2AX sygnały pojawiają się u *Chara* w stadium V. Taką samą sytuację obserwowano m.in. u myszy (Leduc i wsp. 2008) i *Drosophila* (Rathke i wsp. 2007), przy czym odnoszono ją do stadium, w którym następuje likwidacja superzwojów DNA związanych ze strukturą nukleosomową. Wydaje się, że występowanie nielicznych pęknięć DNA w tej fazie spermiogenezy *Chara* nie prowadzi do głębokiego remodelingu chromatyny, gdyż stadium VI charakteryzuje się nadal obecnością chromatyny skondensowanej i luźnej, lecz o zmienionym układzie w stosunku do stadium V. Dalsze drastyczne zmiany zachodzą nieco później (VI–VII) i związane są z likwidacją nukleosomów i pojawianiem się fibryli DNA, które w końcowych fazach spermiogenezy połączone są z białkami typu protamin. Stadia te usiane są świecącymi, drobnymi foci (**Wojtczak i wsp. 2008**). Przypuszcza się, że pęknięcia DNA znoszą naprężenia w cząsteczce DNA i ułatwiają prawidłowe jej połączenie z protaminami (Marcon i Boissonneault 2004, Leberge i Boissonneault 2005, Leduc i wsp. 2008). U *Chara* począwszy od VIII stadium, w związku z końcowym etapem usuwania histonów i zanikaniem nukleosomów, nie obserwuje się już foci świadczących o pęknięciach DNA. W końcowym stadium

spermiogenezy (X) przy powiększeniu ok. 300 000x w chromatynie można zobaczyć fibryle (Kwiatkowska i Popłońska 2002, Wojtczak i Kwiatkowska 2008), przypominające schematyczny obraz cząsteczki DNA połączonej z protaminami (Ward i Coffey 1991, Ward 1994, 2010, **Wojtczak i wsp. 2008**). Nasze badania po raz pierwszy pokazują istnienie pęknięć DNA w relacji do zmieniającej się struktury chromatyny w jądrze podczas spermiogenezy.

Na zakończenie pragnę przedstawić proces degradacji nukleohistonów podczas spermiogenezy, odbywający się przy udziale systemu ubikwityna/proteasom, który stanowi główny trakt dla selektywnej proteolizy. Przyłączanie ubikwityny do białek przeznaczonych do degradacji uzyskuje się na drodze kaskad enzymatycznych zależnych od ATP, powodujących ich poliubikwitynację (Vierstra 1996, Tanaka 1998). W ten sposób białka są znaczone dla ATP-zależnej degradacji odbywającej się w proteasomie 26S, występującym u wszystkich badanych eukariota. Agell wraz z współpracownikami (1983) sugerowali, że ubikwitynacja histonów może odgrywać bardzo ważną rolę podczas wymiany nukleohistonów na nukleoprotaminy. Naszym celem było zlokalizowanie, przedstawienie dystrybucji oraz wyjaśnienie roli ubikwityny i proteasomów podczas kolejnych faz dyferencjacji spermatyd *C. vulgaris* (**Popłońska i wsp. 2004**). Dokonano tego przy pomocy metody immunocytochemicznej, stosując przeciwciała przeciwko ubikwitynie oraz dla części rdzeniowej proteasomu 20S.

Szczególnie intensywne znakowanie jąder obserwowano w fazach VII i VIII, co dowodzi obfitości zarówno ubikwityny jak i proteasomów, podczas wymiany histonów na białka typu protamin oraz istotnego w tym czasie remodelingu chromatyny. W tym okresie ubikwityna wiąże się z histonami powodując rozluźnienie chromatyny i zezwala na powiązanie się DNA z zsyntetyzowanymi protaminami. Obfite immunosygnale, wskazujące na obecność zarówno ubikwityny jak i proteasomów, zostały stwierdzone także we wczesnej i środkowej spermiogenezie (fazy I–IV), zarówno w cytoplazmie, jak również słabiej widoczne w jądrze, kiedy występują jedynie histony bez białek typu protamin. Jest to okres, kiedy odbywa się jedynie subtelna reorganizacja chromatyny oraz synteza białek włączających prekursorów aminokwasów (^3H -lizynę i ^3H -argininę) do spermatyd. W tym czasie odbywa się także przejściowa demetylacja genów odpowiedzialnych za włączanie procesu dyferencjacji spermatyd (Olszewska i wsp 1997). Wydaje się więc, że system ubikwityna/proteasom bierze udział w degradacji kaskady krótko żyjących białek, mogących pośredniczyć w syntezie innych białek niezbędnych dla uruchomienia genów, biorących

udział w dalszych etapach spermiogenezy (**Popłońska i wsp. 2004**). Ta hipoteza została także potwierdzona naszymi eksperymentami z epoksomycyną – inhibitorem aktywności proteolitycznej proteasomów (**Kwiatkowska i wsp. 2003**), gdzie obserwowano blokowanie spermiogenezy właśnie we wczesnych jej stadiach (I–III), to znaczy w tym okresie, kiedy antygenowe sygnały ujawniały w spermatydach obecność zarówno ubikwityny jak i proteasomów (**Popłońska i wsp. 2004**). Taka ATP-zależna proteoliza krótko żyjących białek z udziałem systemu ubikwityna/proteasom 26S jest znana podczas licznych procesów zarówno u ssaków, drożdży jak i u roślin (Shanklin i wsp. 1987, Glotzer i wsp. 1991, Hochstrasser i wsp. 1991, Jentsch i Schlenker 1995, Vierstra 1996, Genschik i wsp. 1998, Osterlund i wsp. 2000, Ramos i wsp. 2001).

Uzyskane wyniki skłaniają mnie do sformułowania następujących wniosków:

- 1) U obu gatunków *Chara* proces spermiogenezy odbywa się według tego samego schematu i stanowi system porównywalny, w pewnym stopniu, ze spermiogenezą u zwierząt i człowieka ponieważ wykazują one wiele cech wspólnych.
- 2) W spermiogenezie u *Chara* odbywa się proces wymiany białek histonowych na białka typu protamin, bez występowania białek przejściowych – TP.
- 3) Szorstkie retikulum endoplazmatyczne jest miejscem syntezy białek typu protamin niezbędnych do powstania prawidłowego, dojrzałego spermatozoidu. Białka te zostają natychmiast przetransportowane bezpośrednio do otoczki jądrowej i drogą endocytozy poprzez wpuklanie błony wewnętrznej otoczki jądrowej tworzącej tzw. wewnątrzjądrowe retikulum (NR), dostają się do miejsca przeznaczenia - jądra.
- 4) W procesie transportu nowosyntezy białek typu protamin do jądra może uczestniczyć kalretikulina – chaperon rezydujący w ER.
- 5) Podczas spermiogenezy u *Chara* występują przejściowe pęknięcia w obrębie DNA, związane z eliminacją znacznej części nukleosomowych superzwojów DNA w dojrzałych spermatydach.
- 6) System ubikwityna/proteasom jest nieodzowny dla usuwania zbędnych histonów po ich zastąpieniu przez białka typu protamin oraz konieczny dla prawidłowego przekształcania nukleohistonów w nukleoprotaminy.

Wszystkie powyższe wnioski dowodzą ogromnego podobieństwa mechanizmów biorących udział w procesie spermiogenezy u zwierząt i *Chara*. Sądzę, że obiekt moich badań może być układem modelowym, a uzyskane wyniki mogą inspirować także badaczy spermiogenezy u zwierząt i człowieka, a przez to mieć znaczenie ogólnobiologiczne.

Literatura

- Agell N, Chiva M, Mezquita C (1983) Changes in nuclear content of protein conjugate histone H2A– ubiquitin during rooster spermatogenesis. *FEBS Lett* 155:209-212
- Ausio J, Eirin-Lopez JM, Frehlick LJ (2007) Evolution of vertebrate chromosomal sperm proteins: implications for fertility and sperm competition. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 63-79
- Balhorn R (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 8:227 (doi:10.1186/gb-2007-8-9-227)
- Borisjuk N, Sitailo L, Adler K, Malysheva L, Tewes A, Borisjuk L, Manteuffel R (1998) Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta* 206:504-514
- Daban JR (2000) Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin structures. *Biochem* 39:3861-3866
- Dadoune J-P (2003) Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 61: 56-75
- Genschik P, Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Fleck J (1998) Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* 10:2063-2075
- Glotzer M, Murray A, Kirschner M (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132-138
- Hecht N, Behr R, Hild A, Bergmann M, Weidner W, Steger K (2009) The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for histone and protamine expression during human spermatogenesis. *Hum Reprod* 24:536-545
- Hochstrasser M, Ellison MJ, Chau V, Varshavsky A (1991) The short-lived MAT-2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4606-4610
- Jentsch S, Schlenker S (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* 82:881-884
- Jia XY, He LH, Jing RL, Li RZ (2009) Calreticulin: conserved protein and diverse functions in plants. *Physiol Plant* 136:127-138
- Kurtz K, Saperas N, Ausio J, Chiva M (2009) Spermiogenesis nuclear protein transitions and chromatin condensation. Proposal for an ancestral model of nuclear spermiogenesis. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 312B:149-163
- Kwiatkowska M (1996) Changes in ultrastructure of cytoplasm and nucleus during spermiogenesis in *Chara vulgaris*. *Folia Histochem Cytobiol* 34:41-56

- Kwiatkowska M, Kaźmierczak A, Popłońska K (2002)** Ultrastructural, autoradiographic and electrophoretic examinations of *Chara tomentosa* spermiogenesis. *Acta Soc Bot Pol* 71:201-209
- Kwiatkowska M, Popłońska K (2002) Further ultrastructural research of *Chara vulgaris* spermiogenesis: endoplasmic reticulum, structure of chromatin, ³H-lysine and ³H-arginine incorporation. *Folia Histochem Cytobiol* 40:85-97
- Kwiatkowska M, Popłońska K (2003)** RER and protamine-type proteins during *Chara tomentosa* L. spermiogenesis. *Acta Soc Bot Pol* 72:5-9
- Kwiatkowska M, Wojtczak A, Popłońska K, Teodorczyk M (2003)** The influence of epoxomicin, inhibitor of proteasomal proteolytic activity, on spermiogenesis in *Chara vulgaris*. *Folia Histochem Cytobiol* 41:51-54
- Laberge R-M, Boissonneault G (2005) On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 73:289–296
- Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G (2008) DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 78:324-332
- 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* 231:67-77
- Marcon L, Boissonneault G (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 70:910–918
- Mayer W, Fundele R, Haaf T (2000) Spatial separation of parental genomes during mouse interspecific (*Mus musculus M. spretus*) spermiogenesis. *Chromosome Res* 8:555-558
- Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M (1999) Calreticulin: One protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344:281-292
- Miller D, Brinkoworth M, Iles D (2010) Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139:287-301
- Nardi CN, Feron R, Navazio L, Mariani P, Pierson E, Wolters-Arts M, Knuiman B, Mariani C, Derksen J (2006) Expression and localization of calreticulin in tobacco anthers and pollen tubes. *Planta* 223:1263-1271
- Navazio L, Miuzzo M, Royle L, Baldan B, Varotto S, Merry AH, Hervey DJ, Dwek RA, Rudd PM, Mariani P (2002) Monitoring endoplasmic reticulum – to – Golgi traffic of a plant calreticulin by protein glycosylation analysis. *Biochemistry* 41:14141-14149
- Olszewska MJ, Gernand D, Godlewski M, Kunachowicz A (1997) DNA-methylation during antheridial filament development and spermiogenesis in *Chara vulgaris* (Charophyceae)

- analysed by in situ nick-translation driven by methylationsensitive restriction enzymes. *Eur J Phycol* 32:287-291
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wie N, Deng XW (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405:462-466
- Park BJ, Lee DG, Yu JR, Jung SK, Choi K (2001) Calreticulin, a calcium-binding molecular chaperone, is required for stress response and fertility in *Caenorabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 12:2835-2845
- Persson S, Rosenquist M, Sommarin M (2002) Identification of the novel calreticulin isoform (Crt2) in human and mouse. *Gene* 297:151-158
- Pogany GC, Corzett M, Feston S, Balhorn R (1981) DNA and protein content of Mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 136:127-136
- Popłońska K (2002) Cytochemical studies on histone-type and protamine-type proteins during spermiogenesis in *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. *Folia Histochem Cytobiol* 40:233-234
- Popłońska K (2012)** Occurrence of calreticulin during the exchange of nucleohistones into protamine-type proteins in *Chara vulgaris* spermiogenesis. *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-011-0370-6
- Popłońska K, Kwiatkowska M, Stępiński D, Gosek A, Wojtczak A (2004)** Immunocytochemical localization of ubiquitin and proteasomes in spermatids during spermiogenesis of *Chara vulgaris* (Charophyceae). *Eur J Phycol* 39:309-315
- Popłońska K, Kwiatkowska M, Wojtczak A, Polit J (2009)** Immunogold evidence suggests that endoplasmic reticulum is the site of protamine type protein synthesis and participates in translocation of these proteins into the nucleus during *Chara vulgaris* spermiogenesis. *Biol Reprod* 80:572-580
- Popłońska K, Wojtczak A, Kwiatkowska M, Kaźmierczak A (2007)** Cytochemical and immunocytochemical studies of the localization of histones and protamine-type proteins in spermatids of *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. *Folia Histochem Cytobiol* 45: 367-374
- Ramos JA, Zenser N, Leyser O, Callis J (2001) Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell* 13:2349-2360
- Rathke C, Baarends WM, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R, Renkawitz-Pohl R (2007) Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sc* 120:1689-1700
- Reynolds WF, Wolfe SL (1978) Changes in basic proteins during sperm maturation in a plant, *Marchantia polymorpha*. *Exp Cell Res* 116:269-273
- Reynolds WF, Wolfe SL (1984) Protamines in plant sperm. *Exp Cell Res* 152:443-448

-
- Risley MS, Einheber S, Bumcrot DA (1986) Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma* 94:217–227
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858–5868
- Šamaj J, Salaj J, Obert B, Baluška F, Menzel D, Volkmann D (2008) Calreticulin mRNA and protein are localized to protein bodies in storage maize callus cells. *Plant Cell Rep* 27: 231-239
- Shanklin J, Jabben M, Vierstra RD (1987) Red light induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: Identification of possible intermediates of phytochrome degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:359-363
- Steger K (1999) Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol* 199:471-487
- Tadokoro Y, Yomogida K, Yagura Y, Yamada S, Okabe M, Nishimune Y (2003) Characterization of histone H2AX expression in testis and specific labeling of germ cells at the commitment stage of meiosis with histone H2A.X promoter-enhanced green fluorescent protein transgene. *Biol Reprod* 69:1325–1329
- Tanaka K (1998) Proteasomes: structure and biology. *J Biochem* 123:195-204
- Trombetta ES (2003) The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* 13:77R-91
- Vierstra RD (1996) Proteolysis in plants: mechanism and functions. *Plant Mol Biol* 32: 275-302
- Ward WS (1994) The structure of the sleeping genome: implication of sperm DNA organization for somatic cells. *J Cell Biochem* 55:77-82
- Ward WS (2010) Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 16:30-36
- Ward WS, Coffey DS (1991) DNA packing and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44:569-574
- Wojtczak A, Kwiatkowska M (2008) Immunocytochemical and ultrastructural analyses of the function of ubiquitin–proteasome system during spermiogenesis with the use of the inhibitors of proteasome proteolytic activity in algae *Chara vulgaris*. *Biol Reprod* 78: 577-585
- Wojtczak A, Popłońska K, Kwiatkowska M (2008)** Phosphorylation of H2AX histone as indirect evidence for double-stranded DNA breaks related to the exchange of nuclear proteins and chromatin remodeling in *Chara vulgaris* spermiogenesis. *Protoplasma* 233: 263-267

Worawittayawong P, Leigh C, Weerachayanukul W, Manochantr S, Sobhon P, Breed WG, Sretarugsa P (2008) Changes in distribution of basic nuclear proteins and chromatin organization during spermiogenesis in the greater bandicoot rat, *Bandicota indica*. Cell Tissue Res 334:135-144

Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautière P (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. Biochimie 80:117-128

* Literatura wyboldowana stanowi cykl prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej.

c) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:

Mój kontakt z nauką rozpoczął się podczas studiów na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego. Na trzecim roku studiów w 1986r. zostałam zatrudniona w Pracowni Cytofizjologii na etacie technicznym. Pracę magisterską pt. „Wpływ pory roku na: poziom endoreplikacji w komórkach manubriów oraz wielkość i produktywność anterydiostanów *Chara vulgaris*” wykonałam w 1988r. pod kierunkiem pani prof. dr hab. Marii Kwiatkowskiej. W pracy tej stwierdziłam, że sezonowość ma duży wpływ na wielkość manubriów oraz zawartość ich jądrowego DNA, a także wielkość i produktywność plemniostanów. Wiosną, w sprzyjających warunkach fizjologicznych, wyższy poziom DNA w manubriach może stanowić czynnik limitujący wyższą produkcję substancji odżywczych i regulatorowych, umożliwiając wytworzenie i rozwój większej liczby spermatozoidów w odpowiednio większym obszarze plemniostanu. Wysunęłam także przypuszczenie, iż endoreplikacja determinuje intensywność wzrostu oraz dynamikę syntezy czynników regulatorowych, które wpływają na rozwój komórek poliploidalnych – manubriów oraz niepoliploidalnych – spermatyd. Praca magisterska została bardzo dobrze oceniona, a wyniki moich badań opublikowane w 1990r. w czasopiśmie Protoplasma (Kwiatkowska i wsp. 1990)

W 1991r. zostałam asystentem w Katedrze Cytofizjologii Uniwersytetu Łódzkiego. Wraz z zespołem pani prof. dr hab. Marii Kwiatkowskiej zajęliśmy się przeprowadzeniem charakterystyki procesów różnicowania nierozrodczych komórek anterydiostanów *Chara vulgaris* – manubriów, tarczki i komórek główkowatych oraz określeniem związków między wzrostem zawartości jądrowego DNA tychże komórek, osiąganym na drodze endoreplikacji (Kwiatkowska i wsp. 1990, 1998), a ich poziomem aktywności transkrypcyjnej i translacyjnej (Kwiatkowska i wsp. 1992, 1995, 1999) oraz produktywności anterydiostanów wyrażonej liczbą powstających w nich plemników (Kwiatkowska i wsp. 1990). W 1995r. za cykl publikacji dotyczących regulacji morfogenezy na przykładzie *Chara sp.* otrzymałam Nagrodę Zespołowa II^o Rektora Uniwersytetu Łódzkiego.

Rozprawę doktorską na temat „Cytochemiczne, autoradiograficzne i ultrastrukturalne badania procesu spermiogenezy *Chara spp*” obroniłam w 1999r. Promotorem w przewodzie doktorskim była prof. dr hab. Maria Kwiatkowska, a recenzentami: prof. dr hab. Zofia Bielańska-Osuchowska z Katedry Histologii i Embriologii Wydziału Weterynaryjnego Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie i prof. dr hab. Maria J. Olszewska z Katedry Cytologii i Cytochemii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Głównymi osiągnięciami mojej dysertacji było:

1. Na podstawie analiz ultrastrukturalnych wyodrębnić dziesięć faz spermiogenezy u *Chara vulgaris* i określić przybliżony czas ich trwania.
2. Pokazanie przemian ultrastrukturalnych podczas spermiogenezy, które są bardziej skomplikowane, niż można było sądzić na podstawie wcześniejszych obserwacji, szczególnie w okresie przejścia ze struktury jądra typu somatycznego, do uszpiętego genetycznie jądra fibrylarnego.
3. Stwierdzenie najbardziej głębokich zmian, dokonujących się w różnicujących spermatydach, które trwają niezwykle krótko.
4. Ujawnienie faktu, że zanim rozpocznie się formowanie struktury fibrylarnego jądra, spermatydy podlegają wielokrotnym przemianom ultrastrukturalnym oraz okresowemu uaktywnieniu translacji, najpierw białek o krótkim okresie półtrwania, a w środkowym stadium spermiogenezy – białek długo żyjących, przemieszczających się do jądra i zachowujących się w nim przez okres 2-godz. postinkubacji. Proces ten zbiega się w czasie z występowaniem RER wypełnionego gęstą zawartością, która jest obecna również w przestrzeni perinuklearnej oraz zanikaniem reakcji na histony i pojawianiem się zabarwienia charakterystycznego dla białek protaminowych.
5. Zaobserwowane fakty podtrzymują słuszność wcześniej wysuniętego przypuszczenia o roli RER w syntezie i transporcie jądrowych białek generatywnych. Dla rozstrzygnięcia tego problemu zaproponowałam podjęcie dalszych badań mikroskopowo-elektronowych, szczególnie faz przejściowych spermiogenezy oraz zastosowanie metod biochemicznych i immunocytochemicznych, umożliwiających wykrywanie histonów i protamin.
6. Zasugerowałam, iż jednym z istotnych zagadnień, wymagających dalszych badań immunocytochemicznych i ultrastrukturalnych jest wyjaśnienie przebiegu usuwania histonów podczas spermiogenezy i określenie roli proteasomów i ubikwityny, w związku z wymianą białek somatycznych na generatywne.
7. Niezwykła złożoność przeobrażeń spermatyd w spermatozooidy, zarówno u zwierząt jak i u roślin, sprawia, iż wiele problemów jest nadal nierozwiązanych. W związku

z kluczową rolą spermatozoidów w biologii i medycynie wyraziłam konieczność kontynuacji badań na temat tego skomplikowanego procesu morfogenezy, którego dogodnym układem modelowym może być spermatogeneza u *Chara*.

Obrona mojego doktoratu została bardzo dobrze oceniona i wnioskowano o wyróżnienie mojej pracy doktorskiej nagrodą Jego Magnificencji Rektora Uniwersytetu Łódzkiego. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Folia Histochemica et Cytobiologica* (Popłońska 2002, Kwiatkowska i Popłońska 2002).

Po doktoracie równolegle z opisanymi wyżej badaniami, dotyczącymi głównego nurtu moich zainteresowań - wymiany białek podczas spermiogenezy u 2 gatunków *Chara*, prowadziłam, wraz z zespołem Pani prof. Kwiatkowskiej, analizy lipotubuloidów w skórcie załązki i przykwiatków u *Ornithogalum umbellatum*.

Na podstawie badań cytochemicznych i ultrastrukturalnych epidermy załązki *O. umbellatum* prof. Kwiatkowska (2004) stwierdziła, że „elajoplasty” opisane przez Wakkera w 1888r. nie są plastydami, lecz rodzajem domeny cytoplazmy, w której skupione są kuleczki osmofilne oplecione systemem mikrotubul biegnących w różnych kierunkach i tworzących rodzaj koszyczka wokół każdej tej struktury. Kuleczki te zidentyfikowała jako kule lipidowe (lipid bodies), ponieważ otacza je specyficzna tylko dla nich połówka błony elementarnej (monowarstwa fosfolipidowa). Dla tych domen prof. Kwiatkowska zaproponowała nazwę lipotubuloidy, ze względu na to, że zawierają one lipidy i mikrotubule. W lipotubuloidach oprócz tego występują liczne rybosomy, cysterny i pęcherzyki ER, a także nieliczne mitochondria, struktury Golgiego i mikrociała, a w starszych stadiach rozwojowych wakuole autolityczne (Kwiatkowska 2004, Kwiatkowska i wsp. 2005, 2007, 2009a, 2010, 2012a)

Pomiary mikrotubul w przekroju podłużnym i poprzecznym wykazały, że ich średnica może ulegać zmianom związanym ze stanem ruchu obrotowego lipotubuloidów. Analiza struktury ścianek mikrotubul wykazała, że zmiany średnicy mikrotubul (Kwiatkowska i wsp. 2006) są skutkiem zmienności wielkości monomerów tubuliny i dystansu pomiędzy nimi (Kwiatkowska i wsp. 2009b). Wysłunięto przypuszczenie, że zmiany w strukturze mikrotubul wskazują na możliwość ich uczestniczenia w generowaniu ruchu lipotubuloidów z udziałem mikrofilamentów aktynowych, których obecność ujawniono na zdjęciach EM (Kwiatkowska i wsp. 2005). Sugerowano, że interakcja filamentów aktynowych z mikrotubulami może determinować transformację mikrotubul węższych w szersze i odwrotnie. Przypuszczamy ponadto, że zmiany średnicy mikrotubul lipotubuloidów mogą być źródłem siły motorycznej ich autonomicznych ruchów obrotowych (Kwiatkowska i wsp. 2009b). Należy podkreślić, że

ruch postępowy i obrotowy lipotubuloidów spełnia istotną rolę w wymianie substancji między nimi i komórką.

Ponadto w skórcie załązni *O. umbellatum* ujawniono różną stabilność mikrotubul, nawet w tej samej komórce (Kwiatkowska i wsp. 2011b), co jest znanym zjawiskiem powodowanym m. in. przez post-translacyjne modyfikacje tubuliny.

Ostatnio, w związku z uzyskaniem **grantu MNiSW nr N N303 359035** nasz zespół koncentrował się na wyjaśnieniu roli kul lipidowych i mikrotubul w syntezie lipidów (Kwiatkowska i wsp. 2009a, 2012a). Stwierdziliśmy, że lipotubuloidy występują także u innych roślin (*Haemanthus albiflos*, *Vanilla planifolia*, *Funkia Sieboldiana*, *Althaea rosea*) (Kwiatkowska i wsp. 2010, 2011a). Mikrotubule są także związane z kulami lipidowymi nie tworzącymi lipotubuloidów np. u *Arabidopsis thaliana* (Kwiatkowska i wsp. 2012c). Obserwacje te potwierdzone zostały metodą immunozłota z zastosowaniem przeciwciał do tubuliny α (Kwiatkowska i wsp. 2010, 2011a, 2012c). Wykrycie techniką immunozłota enzymu DGAT (DAG acyltransferaza) przekształcającego DAG (diacylglicerol) w TAG (triacylglicerol) w kulach lipidowych (Kwiatkowska i wsp. 2011c, 2012a,c) potwierdziło wcześniejszą sugestię opartą na badaniach autoradiograficznych na poziomie mikroskopu świetlnego, że są one miejscem syntezy lipidów. W przypadku lipotubuloidów *O. umbellatum* bezpośrednim dowodem świadczącym o tym, że synteza lipidów rzeczywiście zachodzi w zewnętrznej strefie dojrzałych kul lipidowych, są wyniki badań autoradiograficznych z zastosowaniem ^3H -kwasu palmitynowego na poziomie ultrastrukturalnym (Kwiatkowska i wsp. 2011c).

Związek funkcjonalny mikrotubule/kule lipidowe ma charakter bardziej ogólny, chociaż dotychczas nie był on odnotowywany w literaturze. Mikrotubule biorą udział w syntezie lipidów jako transmitery prekursorów lipidów i enzymów nieodzownych do ich syntezy (Kwiatkowska i wsp. 2009a, 2012a) Fakt ten został stwierdzony dzięki znakowaniu się najpierw mikrotubul po krótkiej inkubacji w środowisku z izotopem (kwasem ^3H -palmitynowym), natomiast kule lipidowe są wyznakowane dopiero po 2 godz. (Kwiatkowska i wsp. 2012a). Zaproponowano hipotezę, że mikrotubule wychwytyją prekursor lipidów, w tym również radioaktywne cząsteczki i są ich transmiterami do miejsca włączenia. Ponadto, badania z zastosowaniem metody immunogold wykazały, że ziarna złota świadczące o obecności enzymów: DGAT1 i DGAT2 oraz fosfolipazy D, również nieodzownej dla syntezy lipidów, znakują ścianki mikrotubul (Kwiatkowska i wsp. 2012a). Istotnym dowodem wskazującym na udział mikrotubul w syntezie lipidów są wyniki badań eksperymentalnych z zastosowaniem inhibitorów syntezy lipidów. U *O. umbellatum*

propyzamid powoduje częściowy rozpad mikrotubul i zmienia ich strukturę, osadzając na ich ściankach ciemne złogi widoczne w mikroskopie elektronowym. Prawdopodobnie uniemożliwiają one funkcjonowanie mikrotubul jako drogi transportu. W efekcie następuje zablokowanie syntezy nowych lipidów, przejawiające się zahamowaniem włączania ^3H -kwasu palmitynowego do lipotubuloidów, co jest kolejnym potwierdzeniem udziału mikrotubul w syntezie lipidów (Kwiatkowska i wsp. 2012a).

Powstawanie kul lipidowych w lipotubuloidach *O. umbellatum* następuje przy udziale retikulum endoplazmatycznego, w wyniku akumulacji lipidów pomiędzy listkami dwuwarstwy fosfolipidowej (Kwiatkowska i wsp. 2012a). Proces ten można obserwować w lipotubuloidach zwiększających swoje rozmiary wskutek powstawania *de novo* w ich wnętrzu kul lipidowych, podczas intensywnego wzrostu epidermy zalążni. Charakterystyczną cechą komórek epidermy zalążni jest intensywny wzrost bez podziałów mitotycznych, w rezultacie którego powiększają się one ok. 30-krotnie. Wzrost ten jest w dużym stopniu zależny od procesu endoreduplikacji DNA jądrowego (Kwiatkowska i wsp. 2007). Jest on ponadto ściśle skorelowany ze wzrostem lipotubuloidów (współczynnik korelacji 0,98), co wskazuje na znaczącą rolę tych struktur dla komórki (Kwiatkowska i wsp. 2011c).

Badania z zastosowaniem techniki immunogold z wykorzystaniem przeciwciał do lipazy wykazały, że enzym ten znajduje się również blisko powierzchni kul lipidowych (Kwiatkowska i wsp. 2011c).

Dojrzałe kule lipidowe dzięki utrzymywaniu dynamicznej równowagi między syntezą tłuszczów i lipolizą zachowują, mimo aktywnej syntezy lipidów, w przybliżeniu stałe rozmiary (w granicach 0,1 do 0,4 μm) podczas rozwoju zalążni, zwiększa się natomiast ich liczba w lipotubuloidach, których rozmiary znacznie się powiększają (Kwiatkowska i wsp. 2007). Utrzymywanie się stałej wielkości kul lipidowych podczas rozwoju epidermy zalążni wynika z faktu, że nowosyntetyzowane tłuszcze znajdujące się najbliżej lipazy ulegają lipolizie w pierwszej kolejności.

Kolejnym etapem naszych dociekań było rozstrzygnięcie problemu, czy istnieje związek pomiędzy lipotubuloidami, a syntezą kutikuli. Badania autoradiograficzne lipotubuloidów *O. umbellatum* wykazały, że po 2 godz. inkubacji w kwasie ^3H -palmitynowym i 6 godz. postinkubacji w środowisku pozbawionym izotopu, skupienie ziaren autoradiograficznych z nad lipotubuloidu rozprasza się na obszar całej komórki. Ponadto po okresie postinkubacji ubywa ziaren autoradiograficznych o ok. 70%, co oznacza, że w ciągu 6 godz. znaczna część lipidów została zmetabolizowana. Pozostałe ziarna autoradiograficzne po ekstrakcji lipidów nie zanikają, chociaż zmniejsza się ich liczba. Ta część rozproszonych ziaren

autoradiograficznych po 6 godz. postinkubacji, o którą wyznakowanie epidermy uległo zmniejszeniu po ekstrakcji lipidów, może odpowiadać woskom, które są łatwo rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Wysłunięto przypuszczenie, że około 30% lipidów zawartych w lipotubuloidach przekształca się w składniki kutikuli (Kwiatkowska i wsp. 2011c). Problem godnym podjęcia jest sprawdzenie, czy te przemiany dokonują się na terenie lipotubuloidów, czy też w innych miejscach komórki i zamierzamy podjąć to zadanie w najbliższej przyszłości.

Zwieńczeniem wszystkich powyżej opisanych analiz było opublikowanie ich wyników w rozdziale do książki: Lipotubuloids – structure and function; in *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, Ed. Montanaro and Dichio; Intech (Kwiatkowska i wsp. 2012b).

Ponadto, nawiązaliśmy współpracę z zespołem prof. Antonio Heredia (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular; Facultad de Ciencias; Universidad de Málaga; Campus de Teatinos; 29071 Málaga, Spain), zajmującym się występowaniem w komórce specyficznych struktur – kutinsomów. Podobne struktury zostały także dostrzeżone przez nasz zespół w skórcie załąźni *O. umbellatum*. Kumulowanie się i łączenie kutinsomów po zewnętrznej stronie ściany komórkowej skórki od strony powietrznej jest prawdopodobnie mechanizmem dla wczesnego powstawania kutikuli. Nasze badania prowadzone wraz z zespołem hiszpańskich badaczy za pomocą techniki immunogold z wykorzystaniem przeciwciał przeciw kutinsomom wydają się wskazywać, że w procesie formowania kutyny w skórcie załąźni *O. umbellatum* pośredniczą kutinsomy. Mamy nadzieję, że ta międzynarodowa współpraca zaowocuje publikacjami o wysokim IF.

*Literatura cytowana w tej części autoreferatu zawarta jest w załączniku nr 3

Na posiedzeniu Rady Instytutu Fizjologii, Cytologii i Cytogenetyki Uniwersytetu Łódzkiego w dniu 19. 05 2012r. przedstawiłam tezy mojej rozprawy habilitacyjnej, które zostały przyjęte jednomyślnie.

Udział w konferencjach

W okresie po doktoracie brałam udział w 8 konferencjach międzynarodowych (wyboldowane) i 18 konferencjach krajowych, co zaowocowało 30 komunikatami zjazdowymi. W całej mojej karierze naukowej wygłaszałam 2 referaty na konferencjach międzynarodowych oraz jestem współautorką 4 referatów na konferencjach krajowych.

- 2000r.** – XXIV Conference on Embryology. Plants, Animals, Humans; Podlesice
– XXXV Sympozjum Postępy technik biologii komórkowej i molekularnej, Poznań
- 2001r.** – XXXVII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików.
40-lecie PTHC Kraków
– 52 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego (PTB). Botanika w dobie biologii molekularnej, Poznań
- 2002r.** – The XXVth Conference on Embryology, Wrocław
– VIII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki, Wrocław
– **XVIIth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Sexual Plant Reproduction in Nature and the Laboratory, Lublin**
- 2003r.** – XXXIX Sympozjum PTHC, Wrocław
– **13th Meeting of the European Charophytologists Group (GEC), Iffeldorf – Germany**
- 2004r.** – XXVI Konferencja Embriologiczna, Łódź
– Przyroda Polski w Europejskim dziedzictwie dóbr natury; 53 Zjazd PTB, Toruń-Bydgoszcz
– **46th Symposium of the Society for Histochemistry, Praga, Czechy**
- 2005r.** – IX Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki, Łódź
- 2006r.** – XXVII Konferencja Embriologiczna, Zakopane
– **14th Meeting of the European Charophytologists Group (GEC), Barcelona, Hiszpania**
- 2007r.** – 3rd Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology, Warszawa
– Botanika w Polsce – sukcesy, problemy, perspektywy. 54 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Szczecin
– **15th Meeting of the European Charophytologists Group (GEC), Belgrad, Serbia**
- 2008r.** – The Congress of Biochemistry and Cell Biology the 43rd Meeting of the Polish Biochemical Society and the 10th Conference of the Polish Cell Biology Society, Olsztyn

- XXVIII Conference on Embryology; Plants, Animals, Humans; Wisła
- 2009r.** – The proceedings of the Conference on The Challenges of Contemporary Cell Biology. Molecular Genetics, System Biology, Bioinformatics, Łódź
- 2010r.** – XXIX Conference on Embryology; Plants, Animals, Humans; Toruń – Ciechocinek
- 2011r.** – **5th European Symposium on Plant Lipids Euro Fed Lipid, Gdańsk**
- **The 5th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology Experimental Plant Biology in 3P: Past, Present, Perspectives, Wrocław (ranga konferencji międzynarodowej)**
 - **The 18th meeting of the European Charophytologists Group (GEC), Poznań i Słubice**
- 2012r.** – XXX Conference on Embryology; Plants, Animals, Humans; Jurata
- *Dokładne dane zostały zamieszczone w Załączniku nr 3

Udział w realizacji grantów

Byłam i jestem głównym wykonawcą 4 projektów badawczych finansowanych przez KBN/MNiSW.

Obecnie jestem głównym wykonawcą projektu badawczego finansowanego przez MNiSW nr N N303 359035 „**Rola kul lipidowych w syntezie lipidów**”, którego zakończenie przypada w 2012 r.

Byłam kierownikiem 3 projektów badawczych realizowanych w ramach badań własnych – wniosków habilitacyjnych, finansowanych przez UŁ.

Uczestniczyłam także w realizacji kilkunastu tematów w ramach badań własnych i statutowych UŁ.

Wraz z Zespołem czekamy na rozstrzygnięcie konkursu, na który został zgłoszony projekt grantu na temat „Lipotubuloids – structure and function in synthesis of lipids and formation of cuticle on aerial epidermis”.

*Dokładne dane zostały zamieszczone w Załączniku nr 4

Działalność w krajowych i zagranicznych organizacjach naukowych.

- Od **1993r.** członek Europejskiej Grupy Charophytologów (GEC)
- Sekretarz Łódzkiego Oddziału PTBK w latach **2006-2011**

- Od **2007r.** Członek Sieci Naukowej Mechanizmy Ruchów Komórkowych MOBILITAS z siedzibą w Instytucie Biologii Doświadczalnej PAN im. Nenckiego w Warszawie

Praca dydaktyczno-wychowawcza

Do tej pory prowadziłam ćwiczenia z botaniki ogólnej, biologii komórki, z wybranych problemów biologii eksperymentalnej zarówno dla studiów stacjonarnych jak i niestacjonarnych. Ponadto byłam opiekunem naukowym ponad 20 prac magisterskich, oraz opiekunem praktyk studenckich dla 5 studentów. W roku akademickim **1999/2000** byłam także opiekunem studentów I roku.

*Dokładne dane zostały zamieszczone w Załączniku nr 4

Łódź, dnia 30. czerwca 2012r....

Podpis

Katarzyna Popkowska