

**ZAŁĄCZNIK NR 2**

**AUTOREFERAT**

**Dr Agata Burian**  
**Katedra Biofizyki i Morfogenezy Roślin**  
**Wydział Biologii i Ochrony Środowiska**  
**Uniwersytet Śląski w Katowicach**

**Katowice, 2017**

**1. Imię i nazwisko:** Agata Burian

**2. Wykształcenie, posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

- 10.2007 - Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach. Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Wpływ wzrostu modulowanego pH i naprężeniem na układ mikrotubul korykalnych w epidermie hipokotyła słonecznika”*, promotor – prof. dr hab. Zygmunt Hejnowicz, recenzenci – prof. dr hab. Maria Kwiatkowska (Uniwersytet Łódzki), prof. dr hab. Waldemar Karcz (Uniwersytet Śląski w Katowicach).
- 2003-2007 - Słuchaczka stacjonarnego studium doktoranckiego przy Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.
- 06.2003 - Magister biologii, Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach. Tytuł pracy magisterskiej: *„Wpływ pH i naprężenia na układ mikrotubul korykalnych w izolowanej epidermie hipokotyła słonecznika”*, promotor – prof. dr hab. Zygmunt Hejnowicz.
- 1998-2003 - Studia magisterskie na kierunku biologia, w zakresie biotechnologia roślin i mikroorganizmów na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

**3. Informacje o dotychczasowym przebiegu pracy zawodowej**

- 2007-obecnie - Adiunkt, Katedra Biofizyki i Morfogenezy Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.
- 06.2013-11.2016 – staż podoktorski, Institute of Plant Sciences, University of Bern, Szwajcaria.
- 2006-2007 – Asystent, Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

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

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

***Morfogeneza wierzchołka pędu: regulacja z udziałem czynników genetycznych i mechanicznych.***

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

(autorzy<sup>a</sup>, rok wydania, tytuły publikacji, wydawnictwo, tom, strony, IF<sup>b,c</sup>, MNiSW<sup>d</sup>, Cyt.: WoS<sup>e</sup>)

<sup>a</sup> Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znajdują się w Załączniku 5.

<sup>b</sup> Wartość IF wg JCR dla publikacji opublikowanych przed 2016 rokiem podano zgodnie z rokiem ich opublikowania.

<sup>c</sup> Dla publikacji opublikowanych w 2016 roku podano IF5-letni.

<sup>d</sup> Punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z punktacją określoną w wykazie czasopism naukowych obowiązującym na koniec roku kalendarzowego, w którym ukazała się publikacja.

<sup>e</sup> Dane z dnia: 03.04.2017 (liczba cytowań bez autocytowań).

4.1. \*Uyttewaal M, \***Burian A**, \*Alim K, Landrein B, Borowska-Wykręt D, Dedieu A, Peaucelle A, Ludynia M, Traas J, Boudaoud A, Kwiatkowska D, Hamant O. 2012. Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in Arabidopsis. *Cell* 149: 439-451. \* pierwszy autor

**IF<sub>2012</sub> = 31.957; MNiSW: 50 pkt; Cyt.: WoS 137 (110)**

*Mój udział procentowy szacuję na 20%. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w pracach eksperymentalnych (badanie przyżyciowe wierzchołka pędu Arabidopsis – metoda replik, obrazowanie in vivo mikrotubul kortykalnych i ekspresji genów w laserowym mikroskopie konfokalnym); analizie i opracowaniu wyników (analiza ilościowa orientacji i anizotropii układów mikrotubul, szybkości i anizotropii wzrostu, współczynników zmienności, krzywizny powierzchni); udziale w pisaniu publikacji.*

4.2. **Burian A**, Barbier de Reuille P, Kuhlemeier C. 2016. Patterns of stem cell divisions contribute to plant longevity. *Current Biology* 26: 1-10.

**IF<sub>5-letni</sub> = 9.733; MNiSW: 45 pkt; Cyt.: WoS 5 (5)**

*Mój udział procentowy szacuję na 57%. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań; przeprowadzeniu prac eksperymentalnych (badanie przyżyciowe wierzchołka Arabidopsis i Lycopersicon – obrazowanie w laserowym mikroskopie konfokalnym, eksperymenty mikrochirurgiczne); analizie i opracowaniu wyników (ilościowa i*

*jakościowa analiza ekspresji genów, wzrostu, krzywizny powierzchni, analiza klonalna, analiza sekwencji podziałów komórkowych); udziale w pisaniu publikacji.*

4.3. **Burian A**, Ludynia M, Uyttewaal M, Traas J, Boudaoud A, Hamant O, Kwiatkowska D. 2013. A correlative microscopy approach relates microtubule behaviour, local organ geometry, and cell growth at the Arabidopsis shoot meristem. *Journal of Experimental Botany* 64: 5753-5767.

**IF<sub>2013</sub> = 5.794; MNiSW: 45 pkt; Cyt.: WoS 12 (6)**

*Mój udział procentowy szacuję na 70%. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań; udziale w pracach eksperymentalnych (badanie przyżyciowe wierzchołka pędu Arabidopsis – metoda replik, obrazowanie in vivo mikrotubul kortykalnych w laserowym mikroskopie konfokalnym; analizie i opracowaniu wyników (ilościowa analiza wzrostu i krzywizny powierzchni, dynamiki mikrotubul, orientacji i anizotropii układów mikrotubul, analiza korelacji, współczynników zmienności); udziale w pisaniu publikacji; jestem również autorem korespondencyjnym.*

4.4. \***Burian A**, \*Raczyńska-Szajgin M, Borowska-Wykręt D, Piątek A, Mitsuhiro A, Kwiatkowska D. 2015. The CUP-SHAPED COTYLEDON2 and 3 genes have a postmeristematic effect on Arabidopsis thaliana phyllotaxis. *Annals of Botany* 115: 807-820.

\* pierwszy autor

**IF<sub>2015</sub> = 3.982; MNiSW: 40 pkt; Cyt.: WoS 2 (2)**

*Mój udział procentowy szacuję na 30%. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań; udziale w pracach eksperymentalnych (badanie przyżyciowe wierzchołka pędu oraz submerystematycznych części pędu Arabidopsis – metoda replik); analizie i opracowaniu wyników (ilościowa analiza wzrostu i krzywizny powierzchni, podziałów komórkowych, analiza przekrojów podłużnych); udziale w pisaniu publikacji.*

**Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 51.466**

**Sumaryczna liczba punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 180**

**Sumaryczna liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Web of Science (WoS): 156 (123)**

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

Wierzchołek pędu, którego integralną częścią jest merystem apikalny, stanowi niszę dla komórek inicjalnych, z których powstaje większość organów nadziemnych takich jak łodyga, liście, kwiaty czy merystemy pachwinowe. Na wierzchołku pędu określony zostaje plan budowy rośliny, a w szczególności ilość i tożsamość organów bocznych oraz ich przestrzenne ułożenie (filotaksja).

Funkcjonowanie merystemu apikalnego obejmuje procesy samo-odtworzenia merystemu oraz procesy związane z inicjowaniem i tworzeniem zawiązków nowych organów. W procesach samo-odtworzenia główną rolę odgrywa dystalna część merystemu – strefa centralna z komórkami inicjalnymi i komórkami potomnymi, natomiast organogeneza realizowana jest w proksymalnej części merystemu – tzw. strefie peryferycznej. Samo-odtworzenie komórek strefy centralnej jest regulowane genetycznie przez *WUSCHEL* i *CLAVATA*, które powiązane są ze sobą pętlami sprzężeń zwrotnych (Aichinger i wsp., 2012). Miejsca, w których powstają nowe organy w strefie peryferycznej, są znakowane przez lokalnie zwiększony poziom auksyny, na co wskazuje ekspresja genów związanych z jej transportem oraz sygnalizacją (Kuhlemeier, 2007). Wykształcaniu się nowych organów towarzyszy stopniowe rozdzielenie przestrzenne komórek wchodzących w skład nowego organu od komórek merystematycznych poprzez tworzenie się granic (partycja merystemu) (Aida i Tasaka, 2006).

Komórki roślinne są trwale połączone ze sobą systemem ścian komórkowych, dlatego dana struktura (organ) może ukształtować się tylko poprzez nieodwracalne odkształcenie ścian czyli wzrost. Zatem procesy morfogenetyczne u roślin nieodłącznie związane są ze wzrostem i podziałami komórek oraz wynikającą z nich zmianą geometrii danego organu. Merystem apikalny pędu jest silnie zróżnicowany pod względem szybkości wzrostu oraz częstości podziałów: w strefie centralnej komórki dzielą się rzadko i wolno rosną, zaś w strefie peryferycznej, szczególnie w miejscach powstawania zawiązków – wzrost komórek jest szybszy, czemu towarzyszy większa aktywność podziałowa komórek (Lyndon, 1998). Merystem apikalny wraz z powstającymi zawiązkami jest strukturą o skomplikowanej geometrii. Dystalna część merystemu, jak również wyrzuszające się zawiązki, charakteryzują się dodatnią krzywizną Gaussa (krzywizna w kierunkach głównych jest dodatnia), zaś granice

między merystemem a zawiązkiem - ujemną krzywizną Gausa (krzywizna w jednym z kierunków głównych jest dodatnia, w drugim – ujemna) (Kwiatkowska, 2004). Zróżnicowany wzrost lub/i wynikająca z niego geometria merystemu mogą generować naprężenia mechaniczne, które w połączeniu z działaniem genów mogą być istotnym czynnikiem regulującym morfogenezę merystemu (Green, 1999; Dumais i Steele, 2002; Hamant i wsp., 2008). Rola czynników biomechanicznych i ich związek z regulacją genetyczną były i są przedmiotem wielu badań u zwierząt (Ingber, 2003a; 2003b; Guillot i Leciut, 2013), natomiast u roślin problem ten jest słabiej poznany.

W ostatnich latach dzięki osiągnięciom biologii molekularnej nastąpił duży postęp w zrozumieniu genetycznych mechanizmów funkcjonowania wierzchołka pędu oraz jego morfogenezy. Analiza mutantów i linii transgenicznych pozwoliła na wyselekcjonowanie oraz poznanie funkcji kluczowych dla morfogenezy wierzchołka genów (Heisler i wsp., 2005; Yadav i wsp., 2014). Jednakże podstawowym problemem w tego typu badaniach jest zastosowanie metod przyżyciowych. Merystem apikalny pędu z powodu swoich niewielkich rozmiarów i lokalizacji pomiędzy zawiązkami liści lub kwiatów, jest trudno dostępny do bezpośredniej obserwacji, szczególnie u *Arabidopsis thaliana* – najczęściej badanej rośliny modelowej. Stąd też słabo poznane są efekty działania genów na poziomie procesów komórkowych (wzrost i podziały komórkowe), jakie mają miejsce podczas inicjowania i tworzenia nowych organów. Dana forma (kształt) może powstawać na drodze różnych wzorów wzrostu i podziałów komórek, dlatego też do zrozumienia mechanizmów morfogenezy niezbędne są badania przyżyciowe połączone z ilościową analizą geometrii danego organu oraz procesów komórkowych (wzrostu i podziałów). Merystem jest strukturą o zróżnicowanej geometrii, stąd do ilościowej analizy takich nie-płaskich obiektów konieczna jest rekonstrukcja w 3-D powierzchni wymagająca specjalnych protokołów obliczeniowych (Dumais i Kwiatkowska, 2002; Routier-Kierzkowska i Kwiatkowska, 2008; Barbier de Reuille i wsp., 2015).

Głównym celem badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego była analiza różnych aspektów morfogenezy wierzchołka pędu *Arabidopsis thaliana* oraz *Lycopersicon esculentum* (pomidor) z zastosowaniem metod przyżyciowych połączonych z ilościową analizą wzrostu komórek i ich aktywności podziałowej, wzorów ekspresji genów oraz innych czynników regulujących wzrost (mikrotubule kortykalne). Pytania, jakie stawiano w ramach poszczególnych projektów, dotyczyły roli regulacji genetycznej i udziału czynników

mechanicznych w funkcjonowaniu merystemów, w tworzeniu nowych organów oraz kształtowaniu architektury całej rośliny.

***W jaki sposób naprężenie mechaniczne koordynuje wzrost komórek i procesy morfogenetyczne w merystemie?***

W ramach międzynarodowego projektu badawczego „*Unraveling the link between plant architecture and the gene regulatory network: the role of the cytoskeleton*” pod kierownictwem prof. Doroty Kwiatkowskiej, brałam udział w badaniach, których celem było zbadanie zależności pomiędzy genami regulującymi organizację mikrotubul a morfogenezą merystemu apikalnego *A. thaliana*. Projekt był realizowany ze współpracą z dr Olivierem Hamantem i prof. Arezkim Boudaoud z Laboratoire de Reproduction et Développement des Plantes Lyon we Francji, gdzie zrealizowałam część badań. Laboratorium to specjalizuje się w badaniach wpływu czynników mechanicznych na rozwój roślin, którym towarzyszy komputerowe modelowanie procesów biologicznych. Przesłanką do tego projektu były wyniki innych badań pokazujące, że do wytworzenia określonej formy potrzebny jest skoordynowany wzrost poszczególnych komórek (Neufeld i wsp., 1998; Salvaldi-Goldstein i Chory, 2008). U zwierząt funkcję czynnika koordynującego w wielu procesach spełnia gradient biochemiczny (morfogen) (Wolpert, 1969) lub, jak pokazują ostatnie badania, czynniki biomechaniczne (Lecuit i Lenne, 2007). Wzrost komórek może generować naprężenia mechaniczne w tkance, które poprzez sprzężenie zwrotne mogą lokalnie koordynować wzrost komórek (Shraiman, 2005). U roślin wzrost komórek zależy między innymi od przestrzennej organizacji mikrofibryl celulozowych w ścianach komórkowych, a organizacja ta jest z kolei kontrolowana przez mikrotubule w przyściennej warstwie cytoplazmy (mikrotubule korytkalne) (Paredes i wsp., 2006; Baskin, 2005). Mikrotubule są strukturami dynamicznymi, których zachowanie jest regulowane przez czynniki biochemiczne (m.in. białka MAP, z ang. *Microtubule Associated Protein*) oraz biofizyczne (np. naprężenie) (Williamson, 1991; Wasteneys, 2002).

W w/w projekcie postawiono hipotezę, że naprężenie mechaniczne w ścianach komórkowych rosnącego merystemu apikalnego pędu, powstające na skutek lokalnych różnic w szybkości wzrostu komórek, jest czynnikiem koordynującym wzrost merystemu na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Kluczowym elementem tej zależności są mikrotubule, które z jednej strony są wrażliwe na bodźce mechaniczne (Hejnowicz i wsp., 2000; Hamant i wsp., 2008) a z drugiej – regulują anizotropię wzrostu komórki (Baskin, 2005).

Badania dotyczyły morfogenezy wierzchołka pędu kwiatostanowego *A. thaliana*, czyli tworzenia się zawiązków kwiatowych (Uyttewaal i wsp., 2012, Cell). Na potrzeby projektu wyselekcjonowano mutantą *atkn1*, który charakteryzuje się zaburzeniami w organizacji mikrotubul. Kataniny (KTN) to białka MAP mające zdolność do przecinania mikrotubul na mniejsze fragmenty tym samym ułatwiając zmianę ich orientacji (Bichet i wsp., 2001).

Moim osiągnięciem metodycznym w ramach tego projektu było połączenie techniki replik, umożliwiającej analizę wzrostu i geometrii wierzchołka, z obrazowaniem *in vivo* za pomocą laserowego mikroskopu konfokalnego. W efekcie zestawiałam wzory układów mikrotubul korykalnych (w linii transgeniczej MBD-GFP [z ang. *Microtubule Binding Domain*]) oraz ekspresji wybranych genów (np. CLV3) z krzywizną powierzchni merystemu i szybkością wzrostu poszczególnych komórek. Dzięki temu możliwe było badanie zależności pomiędzy procesami biochemicznymi na poziomie subkomórkowym i procesami na poziomie komórek, tkanek i całych organów z włączeniem regulacji z udziałem czynników biomechanicznych.

Przeprowadzona przeze mnie analiza ilościowa układów mikrotubul w merystemie pokazała, że w mutancie *atkn1* mikrotubule reorganizują się wolniej niż w typie dzikim oraz nie tworzą równoległych układów w obrębie komórki i ponadkomórkowych wzorów charakterystycznych dla typu dzikiego. Co więcej, układy mikrotubul w różnych komórkach merystemu mutantą są znacznie bardziej podobne do siebie (mniejsze lokalne zróżnicowanie układów) niż w typie dzikim, gdzie układy mikrotubul mogą się znacznie różnić nawet w sąsiadujących komórkach (większe lokalne zróżnicowanie układów). Zatem w mutancie *atkn1* przestrzenna organizacja mikrotubul jest zaburzona, co jest prawdopodobnie związane z ich obniżoną dynamiką.

Jeśli w mutancie organizacja mikrotubul korykalnych jest zmieniona, to można się spodziewać zmian również w anizotropii wzrostu komórek (anizotropia określa zróżnicowanie danej wielkości w różnych kierunkach). Zgodnie z tym przypuszczeniem, wykazałam, że istotnie w mutancie *atkn1* anizotropia wzrostu jest obniżona w porównaniu do typu dzikiego, co znajduje swoje odzwierciedlenie w zmienionej geometrii merystemu w strefie centralnej. Ponadto, badania innych współautorów projektu wykazały, że mikrotubule w komórkach merystemu mutantą w mniejszym stopniu reagują na zmiany naprężenia w ścianie komórkowej. Pozwoliło to na wyciągnięcie wniosku, że kataniny są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania mikrotubul, a te warunkują odpowiedź komórki na czynniki biomechaniczne.

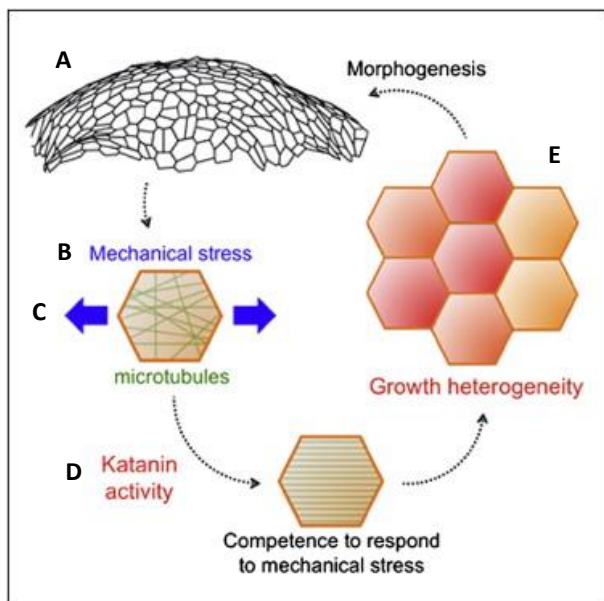


Kolejnym etapem moich badań była analiza zróżnicowania szybkości wzrostu. Przesłanką do tego typu analizy były inne badania pokazujące, że u zwierząt naprężenie mechaniczne może „wyrównywać” lokalne różnice we wzroście komórek, prowadząc tym samym do jednorodnego (homogennego) wzrostu całej tkanki (Shraiman, 2005). Jeśli jest to prawdziwe również dla roślin, to w komórkach, które charakteryzują się obniżoną reakcją na naprężenie (tak jak w mutancie *atkn1*), lokalne różnice we wzroście powinny być większe (heterogenny wzrost) niż w komórkach z normalną reakcją na naprężenie (jak w typie dzikim). Jednakże, analiza zróżnicowania wzrostu pokazała, że lokalne zróżnicowanie wzrostu w komórkach merystemu mutanta jest mniejsza niż w typie dzikim, czyli bardziej heterogenny wzrost dotyczy typu dzikiego, a nie mutanta jak początkowo zakładano. Ponadto, analiza wzrostu w kontekście całego merystemu wykazała, że największe lokalne zróżnicowanie wzrostu jest obserwowane w granicach pomiędzy rosnącym zawiązkiem kwiatu a merystemem, gdzie jednocześnie naprężenie w ścianach komórkowych jest silnie anizotropowe (Hamant i wsp., 2008). Tutaj także zróżnicowanie wzrostu jest mniejsze u mutanta niż w typie dzikim, czemu towarzyszą zmiany w geometrii samej granicy. Krzywizna powierzchni granicy w mutancie jest mniejsza niż w typie dzikim, co można interpretować jako opóźnienie w procesie jej tworzenia.

W związku z tym, że cały projekt miał charakter interdyscyplinarny, wyniki badań empirycznych zostały połączone z teoretycznym modelem komputerowym rosnącej tkanki, w której wzrost komórek był lokalnie regulowany przez naprężenie mechaniczne (model został opracowany przez fizyków z grupy partnerskiej RDP Lyon). W modelu tym zgodnie z poprzednimi badaniami u zwierząt (Shraiman, 2005), zróżnicowanie wzrostu początkowo ulega obniżeniu (mniej heterogenny wzrost) przy zwiększającym się sprzężeniu naprężenie-wzrost. Warunkiem tego sprzężenia jest odpowiedź komórki na naprężenie, w której pośredniczą mikrotubule. Jednakże przy dalszym zwiększaniu sprzężenia, wzrost staje się bardziej zróżnicowany (bardziej heterogenny). Wyniki te zatem dość dobrze opisują obserwowane przez mnie większe zróżnicowanie wzrostu w przypadku typu dzikiego (większe sprzężenie naprężenie-wzrost) i mniejsze zróżnicowanie – w przypadku mutanta *atkn1* (mniejsze sprzężenie naprężenie-wzrost).

Podsumowując wyniki w/w badań można stwierdzić, że w merystemie apikalnym pędu istnieją lokalne różnice w szybkości wzrostu (Ryc. 1A), które generują lokalne różnice w

naprężeniu mechanicznym w ścianach komórkowych (Ryc. 1B). Naprężenie to reguluje ułożenie mikrotubul kortykalnych (Ryc. 1C), których dynamika zależy również od dodatkowych czynników biochemicznych (Ryc. 1D). W pełni dynamiczne mikrotubule z kolei biorą udział we wzmacnianiu lokalnego zróżnicowania wzrostu (Ryc. 1E) i w rezultacie w merystemie powstają domeny różniące się wzrostem, które są podstawą procesów morfogenetycznych. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Cell*.



Ryc. 1. Rola naprężenia mechanicznego w koordynacji wzrostu komórek prowadzącego do morfogenezy w merystemie (Uyttewaal i wsp., 2012, *Cell*, zmienione).

W ramach projektu „Unraveling the link between plant architecture and the gene regulatory network: the role of the cytoskeleton” badałam również kierunkową zależność pomiędzy wzrostem, naprężeniem i mikrotubulami w kontekście procesów morfogenetycznych wierzchołka pędu kwiatostanowego *A. thaliana* (Burian i wsp., 2013, *Journal of Experimental Botany*). Celem badań było sprawdzenie dwóch hipotez: (1) mikrotubule układają się prostopadle do kierunku maksymalnego wzrostu komórki (Fischer i Schopfer, 1998); (2) mikrotubule układają się równolegle względem kierunku maksymalnego naprężenia w ścianie komórkowej (Hejnowicz i wsp., 2000, Hamant i wsp., 2008). Obie te hipotezy podparte były jedynie badaniami o charakterze jakościowym, które jednoznacznie nie rozstrzygnęły, czy czynnikiem regulującym organizację mikrotubul jest naprężenie czy wzrost. Dlatego wykorzystując protokół do ilościowej analizy procesów komórkowych *in vivo*, analizowałam korelację między orientacją mikrotubul a głównymi kierunkami wzrostu komórek i krzywizny powierzchni rosnącego merystemu. Było to pierwsze tego typu

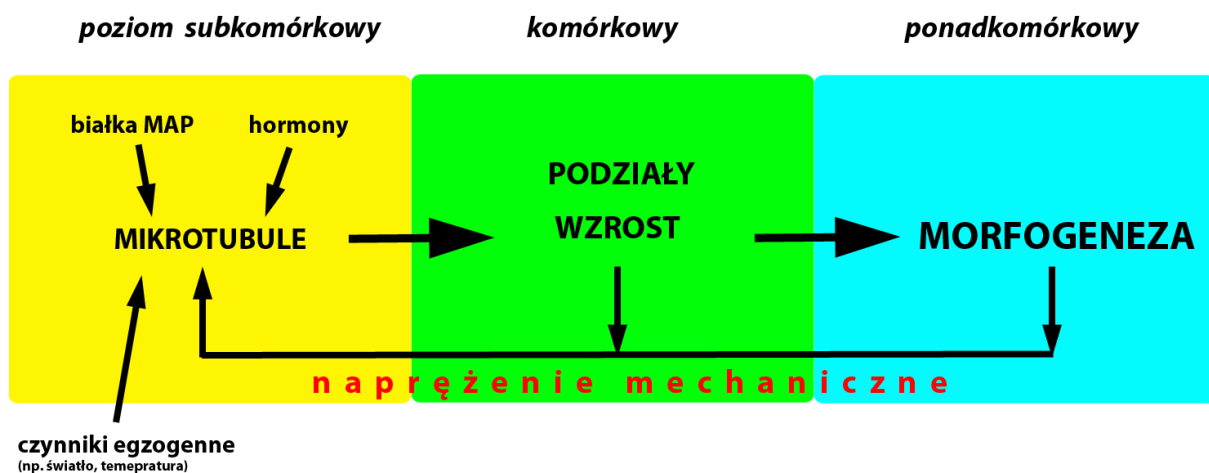
opracowanie dla wierzchołka pędu *A. thaliana*.

Analizując zależności pomiędzy orientacją mikrotubul a kierunkiem maksymalnego wzrostu komórek pokazałam, że w merystemie brak jest jednoznacznej korelacji pomiędzy tymi parametrami: mikrotubule mogą układać się równolegle lub prostopadle względem kierunku maksymalnego wzrostu w zależności od położenia w merystemie. W wolno rosnącej strefie centralnej układ mikrotubul jest chaotyczny (nieuporządkowany). W szybciej rosnącej strefie peryferycznej pomiędzy miejscami tworzenia się zawiązków, mikrotubule układają się prostopadle do kierunku maksymalnego wzrostu, zaś w miejscach, gdzie powstaje zawiązek, układ mikrotubul jest niestabilny i różnie zorientowany względem kierunku wzrostu (prostopadle, równoległe lub skośnie). Najbardziej stabilny układ jest w granicach pomiędzy powstałym zawiązkiem a merystemem, gdzie mikrotubule są równoległe do kierunku maksymalnego wzrostu. Wyniki te falsyfikują hipotezę (1), zakładającą że mikrotubule układają się prostopadle do kierunku maksymalnego wzrostu.

Następnie analizowałam zależność pomiędzy orientacją mikrotubul a kierunkiem maksymalnego naprężenia w ścianach komórkowych. Ponieważ nie jest znana metoda umożliwiająca bezpośrednią wizualizację naprężenia w żywych organach, do dedukcji głównych kierunków naprężenia może służyć krzywizna powierzchni merystemu (Dumais i Steele, 2000). Izotropowe naprężenie rozciągające (takie samo w różnych kierunkach) jest przewidywane w części dystalnej merystemu, naprężenie rozciągające z maksymalną wartością w kierunku obwodowym - w częściach peryferycznych merystemu, naprężenie rozciągające w kierunku obwodowym i ściskające w kierunku radialnym - w granicach pomiędzy zawiązkiem a merystemem (Hamant i wsp., 2008). Wynika z tego, że kierunek maksymalnego naprężenia pokrywa się z kierunkiem maksymalnej krzywizny merystemu. Zatem jeśli hipoteza (2) o orientacji mikrotubul równoległej do kierunku maksymalnego naprężenia jest prawdziwa, mikrotubule powinny być również równoległe do kierunku maksymalnej krzywizny w merystemie. Gdy rozpatrywane były wszystkie komórki merystemu, analiza nie wykazała korelacji pomiędzy orientacją mikrotubul a kierunkiem maksymalnej krzywizny. Jednakże, gdy brano pod uwagę tylko te obszary merystemu, gdzie krzywizna Gaussa jest ujemna (granice pomiędzy zawiązkiem a merystemem), mikrotubule były zorientowane równoległe do kierunku maksymalnej krzywizny, czyli do przewidywanego kierunku maksymalnego naprężenia w ścianach komórkowych. Obserwacja *in vivo* tworzenia granicy pozwoliła mi na wyciągnięcie wniosku, że naprężenie regulujące ułożenie mikrotubul

może być wynikiem nie tylko zmieniającej się krzywizny powierzchni (geometrii organu) lecz również zróżnicowanej szybkości wzrostu związanej z rosnącym zawiązkiem (szybkość wzrostu komórek zawiązka jest większa niż komórek otaczających).

Podsumowując, powyższe badania wskazują, że oprócz czynników egzogennych (np. światło, temperatura) lub endogennych czynników biochemicznych (np. regulacja genetyczna, hormonalna), czynniki biomechaniczne (napężenie) będące wynikiem procesów morfogenetycznych w danym organie mogą regulować orientację mikrotubul w komórce (Ryc. 2). Mikrotubule z kolei wpływając na przestrzenny układ celulozy w ścianie komórkowej regulują wzrost komórki i tworzenie nowych struktur. Potwierdza to istnienie sprzężeń zwrotnych w zależności pomiędzy procesami na poziomie subkomórkowym, komórkowym oraz ponadkomórkowym (tkanek i organów).



Ryc. 2. Biomechaniczna regulacja orientacji mikrotubul w kontekście sprzężeń zwrotnych pomiędzy procesami na różnych poziomach organizacji u roślin.

***Jaka jest rola genów CUP-SHAPED COTYLEDNOS w tworzeniu granic pomiędzy organami?***

Moja dalsza praca była prowadzona w ramach badań własnych Katedry Biofizyki i Morfogenezy Roślin pod kierownictwem prof. Doroty Kwiatkowskiej we współpracy z dr. Mitsuhiro Aidą (Nara Institute of Science and Technology, Japonia), który specjalizuje się w badaniach roli genów CUP-SHAPED COTYLEDNOS (CUC) w regulacji rozwoju kwiatu i merystemu apikalnego. W trakcie pracy kontynuowałam badanie morfogenezy wierzchołka pędu, a w szczególności formowania granic pomiędzy organami i regulacji genetycznej tego

procesu (**Burian i wsp., 2015, Annals of Botany**).

Geny z rodziny *CUC* kodują czynniki transkrypcyjne z domeną NAC i razem z genem *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* regulują tworzenie się merystemów pędu oraz granic pomiędzy organami (Aida i Tasaka, 2006). Silna ekspresja genów *CUC* jest obserwowana w merystemie apikalnym pędu w granicach pomiędzy merystemem a adaksjalną częścią zawiązków kwiatów lub liści (Aida i wsp., 1999, Hibara i wsp., 2006). Ekspresja *CUC* występuje również w podwierzchołkowych częściach pędu kwiatostanowego w rejonie węzła, a dokładniej w granicach pomiędzy adaksjalną częścią szypułki a łodygą.

Celem badań było sprawdzenie genyzy zaburzeń powstałych wskutek mutacji genów *CUC2* i *CUC3*. W podwójnym mutancie *cuc2 cuc3* nadziemne organy ulegają fuzji, co rzutuje na architekturę całego pędu. Na przykład, szypułki kwiatowe mutantu *cuc2 cuc3* są częściowo zrosnięte z łodygą, wskutek czego filotaksja w pędzie kwiatostanowym jest nieregularna w stosunku do typu dzikiego. Moje badania miały odpowiedzieć na pytanie, czy fenotyp mutantu *cuc2 cuc3* jest efektem zaburzeń w tworzeniu granic na poziomie merystemu, gdzie wzór filotaktyczny powstaje, czy też jest wynikiem postmerystematycznego rozwoju pędu. W tym celu analizowałam geometrię i wzrost powierzchni merystemu oraz submerystematycznych części pędu za pomocą metody replik (Dumais i Kwiatkowska, 2002; Routier-Kierzkowska i Kwiatkowska, 2008).

Silna ekspresja genów *CUC2* i *CUC3* w granicach pomiędzy merystemem a zawiązkami sugerowała, że zaburzenia rozwojowe spowodowane przez mutację tych genów powinny pojawić się już w merystemie, gdzie spodziewano się fuzji zawiązków lub problemów z ich uwypuklaniem i w następstwie - nieregularnej filotaksji. Moje badania pokazały jednak, że merystemy mutantu *cuc2 cuc3* wyglądają podobnie do merystemów typu dzikiego: zawiązki kwiatów wykształcają się normalnie i od strony adaksjalnej są wyraźnie odgraniczone od merystemu. Również układ zawiązków (filotaksja) jest regularny, podobnie jak w typie dzikim. Jednakże szczegółowa analiza ilościowa geometrii merystemu pokazała, że krzywizna powierzchni granic u mutantu jest nieco mniejsza niż w typie dzikim, co może świadczyć o niewielkim opóźnieniu w wykształcaniu się granicy. Chociaż analizując wzrost w merystemie nie zaobserwowałam większych różnic pomiędzy mutantem a typem dzikim, to możliwe jest, że w badanym interwale czasowym, dla którego wzrost był liczony, nie wychwycono subtelnych różnic, które w następstwie mogły spowodować wolniejsze wykształcanie się

granic.

Następnie analizowałam epidermę regionów submerystemetycznych pędu obejmujących węzły wraz z granicami pomiędzy adaksjalną częścią szypułki a łodygą, oraz międzywęźla. W granicach typu dzikiego szybkość wzrostu i częstość podziałów komórkowych jest silnie zahamowana w porównaniu do komórek międzywęźla, dzięki czemu rejony węzłów i międzywęźli są morfologicznie łatwo rozpoznawalne w łodydze. Co ciekawe, w granicach mutantów zlokalizowanych bliżej wierzchołka, wzrost i podziały są również zahamowane, wskutek czego węzły i międzywęźla są dobrze wyodrębnione. Jednak im dalej od wierzchołka, tym hamowanie wzrostu i podziałów w granicach jest mniejsze. Niezahamowany wzrost i podziały komórkowe w granicach mutantów powodują fuzję pomiędzy szypułką i łodygą a morfologiczne różnice pomiędzy węzłami i międzywęźlami się zacierają.

Przeprowadzone przez mnie analiza przekrojów podłużnych przez pęd potwierdziła zaburzenia wzrostu i podziałów również komórek z tkanek wewnętrznych mutantów (kora pierwotna). Zaburzenia te, podobnie jak w przypadku komórek epidermy, nasilają się wraz z odległością od wierzchołka.

Podsumowując, zaburzenia filotaksji na poziomie pędu kwiatostanowego będące wynikiem mutacji genów *CUC2* i *CUC3*, powstają głównie podczas postmerystematycznego rozwoju pędu, choć zostają zainicjowane już na poziomie merystemu. Istotnym wnioskiem płynącym z w/w badań jest to, że granice pomiędzy organami muszą być w trakcie ontogenezy pędu aktywnie utrzymywane poprzez hamowanie wzrostu i podziałów komórkowych, bowiem zaburzenia tego hamowania i kontynuacja wzrostu prowadzą do fuzji nawet dobrze oddzielonych organów.

### ***Jaka jest aktywność podziałowa komórek tworzących merystemy apikalne?***

Kolejny projekt, w którym brałam udział, był realizowany w Institute of Plant Sciences University of Bern w Szwajcarii, w laboratorium kierowanym przez prof. Crisę Kuhlemeiera specjalizującym się między innymi w badaniu roli auksyny w morfogenezie wierzchołka pędu. Projekt pt. "*PlantMechanix*" dotyczył wielokierunkowych badań morfogenezy pędu, a w szczególności powstawaniu określonych kształtów w wyniku wzrostu regulowanego przez kaskady genów, hormony oraz czynniki mechaniczne. Moje badania dotyczyły aktywności merystemów, a w szczególności komórek inicjalnych.

Granice pomiędzy organami nie tylko stanowią barierę oddzielającą organy o różnej tożsamości, są również miejscem, gdzie zachodzą procesy organogenezy (Wang i wsp., 2016). Na przykład w granicach pomiędzy merystemem a zawiązkiem liścia lub łodygą a liściem powstają merystemy pachwinowe, które z kolei stają się merystemami apikalnymi dla rozwijających się z nich odgałęzień bocznych. Zatem aktywność merystemów determinuje architekturę całej rośliny.

Każdy podział komórkowy wraz z poprzedzającą go replikacją DNA niesie ze sobą ryzyko mutacji. Im więcej podziałów komórkowych, tym większe prawdopodobieństwo mutacji. Czas życia roślin może być różny, od paru tygodni (*A. thaliana*) do setek lub tysięcy lat w przypadku niektórych drzew. Ten nieograniczony wzrost mógłby powodować akumulację somatycznych mutacji i w efekcie doprowadzić do obniżenia przeżywalności i do wyginięcia danej populacji (tzw. zapadka Muller'a, z ang. *Muller's ratchet*) (Felsenstein, 1974). Jednym ze sposobów uniknięcia akumulacji mutacji może być minimalizowanie liczby podziałów komórkowych. Na przykład wiele typów komórek macierzystych (z ang. *stem cells*) u zwierząt wykazuje niską aktywność podziałową, „chroniąc” tym samym materiał genetyczny przed niekorzystnymi mutacjami (Li i Clevers, 2010). W przypadku roślin, somatyczne mutacje powstające podczas ontogenezy w merystemie apikalnym pędu, szczególnie w strefie centralnej, gdzie znajdują się komórki inicjalne, mogą być przekazywane do merystemów pachwinowych i do kolejnych odgałęzień (np. u drzew) lub całych roślin rozmnażających się wegetatywnie (Klekowski, 1988).

Dlatego dla oszacowania prawdopodobieństwa mutacji kluczowe jest określenie aktywności podziałowej komórek inicjalnych i potomnych od momentu, kiedy znajdują się one w strefie centralnej merystemu apikalnego, do momentu wytworzenia merystemu pachwinowego w granicy. Wcześniejsze badania pokazały, że w granicach między organami podziały komórkowe są zredukowane (Kwiatkowska i Dumais, 2003; Burian i wsp., 2015), jednakże związek pomiędzy aktywnością podziałową a tworzeniem się merystemów pachwinowych w kontekście architektury całej rośliny i prawdopodobieństwa mutacji nie był bezpośrednio badany.

W podjętych badaniach postawiono pytanie, jaka jest aktywność podziałowa komórek inicjalnych tworzących merystemy pędu i czy może mieć ona znaczenie w minimalizacji

prawdopodobieństwa mutacji (**Burian i wsp., 2016, Current Biology**). W tym celu monitorowałam rozwój merystemów pachwinowych od momentu specyfikacji do etapu, w którym merystemy były morfologicznie identyfikowalne. Przedmiotem moich badań były *A. thaliana* i *L. esculentum* (pomidor) a otrzymane wyniki z wykorzystaniem modelowania komputerowego ekstrapolowano na rośliny drzewiaste. W badaniach wykorzystałam transgeniczne linie z markerami sygnalizacji auksyny (DR5-VENUS) oraz komórek inicjalnych (CLV3-GFP), laserowy mikroskop konfokalny umożliwiający długoterminowe monitorowanie rosnących wierzchołków, analizę klonalną, eksperymenty mikrochirurgiczne, oraz najnowsze narzędzie do analizy obrazów – program MorphoGraphX, umożliwiający jednoczesną analizę jakościową i ilościową ekspresji genów, wzrostu komórek oraz geometrii merystemów (Barbier de Reuille i wsp., 2015). Ten projekt miał również charakter interdyscyplinarny i przeprowadzone przeze mnie badania eksperymentalne zostały zestawione z teoretycznym modelem opracowanym przez jednego ze współautorów projektu.

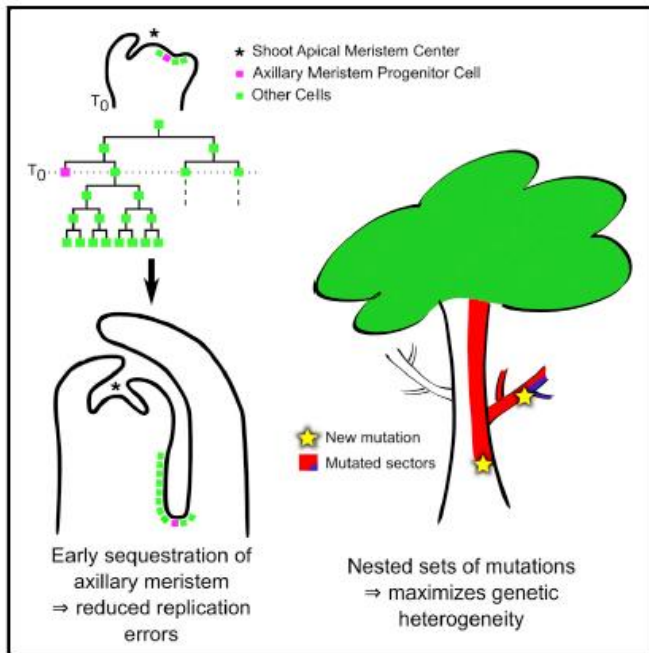
Pierwszym etapem moich badań było określenie, kiedy następuje specyfikacja merystemów pachwinowych: w merystemie apikalnym czy później w granicy pomiędzy wykształconą już łodygą a liściem? Badania ekspresji promotora odpowiedzi na auksynę DR5-VENUS u *A. thaliana* pokazały, że specyfikacja komórek tworzących merystem pachwinowy zachodzi wcześnie, bowiem już w merystemie apikalnym, prawie równocześnie z inicjacją zawiązka liściowego. Jednak podczas fazy wegetatywnej *A. thaliana* dalszy rozwój merystemu pachwinowego jest znacznie opóźniony w stosunku do specyfikacji: merystem jest widoczny jako wybrzuszenie w granicy dopiero około 11 plastochronów później w submerystematycznej części pędu (Long i Barton, 2000). Zaproponowano zatem hipotezę, że strefa centralna merystemu apikalnego pędu jest źródłem sygnału hamującego rozwój merystemu pachwinowego. W celu zweryfikowania tej hipotezy wykonałam szereg eksperymentów z mechaniczną ablacją strefy centralnej merystemu apikalnego połączoną z analizą klonalną. Jeśli hipoteza jest prawdziwa, usunięcie lub uszkodzenie strefy centralnej powinno doprowadzić do wykształcania merystemów pachwinowych już w wierzchołku. Rzeczywiście, po ablacji następowała aktywacja ekspresji CLV3-GFP (marker komórek inicjalnych) w strefie peryferycznej merystemu apikalnego i wykształcanie merystemów pachwinowych. Analiza klonalna wykazała, że komórki merystemu pachwinowego były komórkami potomnymi komórek znakowanych wcześniej przez ekspresję DR5-VENUS. Czyli specyfikacja merystemów pachwinowych zachodzi już w merystemie apikalnym prawie jednocześnie z inicjacją liścia, jednak dalszy ich rozwój podczas fazy wegetatywnej jest hamowany przez



sygnał ze strefy centralnej.

Kolejnym etapem moich badań było przeprowadzenie serii analiz klonalnych w celu określenia liczby podziałów komórkowych potrzebnych do wykształcenia merystemu pachwinowego w warunkach normalnych. W badaniach wykorzystałam wierzchołki *A. thaliana* podczas przejścia do fazy kwitnienia, kiedy merystemy pachwinowe widoczne są w niewielkiej odległości od merystemu apikalnego, oraz *L. esculentum* w fazie wegetatywnej, kiedy merystemy pachwinowe są widoczne dopiero poniżej kilku międzywęźli pędu. Jeśli merystemy pachwinowe pochodzą z komórek o obniżonej aktywności podziałowej, liczba podziałów prowadząca do wykształcenia merystemu pachwinowego powinna być taka sama u tych dwóch gatunków. Jeśli merystemy pachwinowe pochodzą z komórek o niezahamowanych podziałach ta liczba podziałów powinna być większa u *L. esculentum* niż u *A. thaliana*. Przeprowadzona przez mnie analiza wykazała, że aktywność podziałowa komórek tworzących merystem pachwinowy jest bardzo niska w porównaniu z innymi komórkami (liście lub międzywęźla) zarówno u *L. esculentum* jak i u *A. thaliana*. Większość podziałów komórkowych przypada na okres pomiędzy podziałami komórek inicjalnych w merystemie apikalnym a tworzeniem się granicy przy zawiązku liścia. W granicy aktywność mitotyczna komórek jest zahamowana i w jedynie niewielkiej grupie komórek pochodzących z tej puli następuje kilka kolejnych podziałów prowadzących do wybrzuszenia się merystemu pachwinowego. Czyli powstanie nowego merystemu związane jest z małą liczbą podziałów komórkowych w porównaniu do komórek tworzących liście lub łodygę.

Wczesna specyfikacja merystemów pachwinowych oraz ich pochodzenie z puli komórek o zahamowanej aktywności podziałowej może przyczynić się do redukcji prawdopodobieństwa akumulacji niekorzystnych mutacji. Symulacje komputerowe (opracowane przez współpracującego ze mną w tym projekcie dr Pierra Barbiera de Reuille) dzielących się komórek pokazały, że aktywność komórek inicjalnych i redukcja liczby podziałów prowadząca do wytworzenia merystemów pachwinowych sprzyjają powstawaniu zmienności genetycznej w obrębie rośliny i jednocześnie zapobiega akumulacji somatycznych mutacji, co z kolei może przyczynić się do zwiększenia czasu życia rośliny i zapobiegać efektowi zapadki Muller'a (Ryc. 3). Zatem lokalizacja merystemów pachwinowych w granicach ma swoje znaczenie adaptacyjne do nieorganicznego wzrostu pędu.



Ryc. 3. Aktywność podziałowa komórek inicjalnych i wczesna specyfikacja merystemów pachwinowych może prowadzić do zwiększenia zmienności genetycznej i zapobiegać akumulacji somatycznych mutacji (Burian i wsp., 2016, *Current Biology*).

Podsumowując, opracowane przeze mnie protokoły do badań przyżyciowych wierzchołka pędu umożliwiły badanie czasoprzestrzennych zależności pomiędzy czynnikami genetycznymi oraz biomechanicznymi a procesami na poziomie komórkowym i ponadkomórkowym, jakie mają miejsce podczas morfogenezy wierzchołka pędu.

### Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład osiągnięcia:

1. Wykazano istnienie naturalnego zróżnicowania (heterogenności) szybkości wzrostu komórek, która odgrywa istotną rolę podczas morfogenezy wierzchołka pędu. Pokazano, że prawidłowe funkcjonowanie mikrotubul jest kluczowe w odpowiedzi na naprężenie mechaniczne generowane przez heterogenny wzrost.

2. Wykazano brak korelacji pomiędzy orientacją mikrotubul a kierunkiem wzrostu lub naprężenia, gdy merystem apikalny był rozpatrywany globalnie. Jednak lokalnie w granicach pomiędzy organami, naprężenie mechaniczne wynikające z geometrii merystemu oraz ze zróżnicowanego wzrostu może być czynnikiem regulującym orientację mikrotubul.

3. Stwierdzono, że regulacja przez geny *CUC* procesu tworzenia granic między organami ma miejsce głównie podczas postmerystematycznego rozwoju pędu. Hamowanie wzrostu i podziałów komórkowych jest czynnikiem koniecznym do utrzymywania granic w czasie dojrzewania pędu.

4. Stwierdzono wczesną specyfikację merystemów pachwinowych i zredukowaną aktywność mitotyczną komórek inicjalnych prowadzącą do wytworzenia merystemów pachwinowych. Cechy te mogą zapobiegać akumulacji somatycznych mutacji szczególnie w przypadku długożyjących gatunków.

### Literatura:

- Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, Laux T. 2012. Plant stem cell niches. *Annual Review of Plant Biology* 63: 615-636.
- Aida M, Ishida T, Tasaka M. 1999. Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* 126: 1563-1570.
- Aida M, Tasaka M. 2006. Morphogenesis and patterning at the organ boundaries in the higher plant shoot apex. *Plant Molecular Biology* 60: 915-928.
- Barbier de Reuille P, Routier-Kierzkowska A-L, Kierzkowski D, Bassel GW, Schupbach T, Tauriello G, Bajpai N, Strauss S, Weber A, Kiss A, Burian A, Hofhuis H, Sapala A, Lipowczan M, Heimlicher MB, Robinson S, Bayer EM, Basler K, Koumoutsakos P, Roeder AHK, Aegerter-Wilmsen T, Nakayama, Tsiantis M, Hay A, Kwiatkowska D, Xenarios I, Kuhlemeier C, Smith RS. 2015. MorphoGraphX: A platform for quantifying morphogenesis in 4D. *eLife* e05864.
- Baskin TI. 2005. Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 203-222.
- Bichet A, Desnos T, Turner S, Grandjean O, Höfte H. 2001. BOTERO1 is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in Arabidopsis. *The Plant Journal* 25:137-148.
- Dumais J, Steele CR. 2000. New evidence for the role of mechanical forces in the shoot apical meristem. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 7-18.
- Dumais J, Kwiatkowska D. 2002. Analysis of surface growth in shoot apices. *The Plant Journal* 31: 229-241.
- Felsenstein J. 1974. The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78: 737-756.
- Fischer K, Schopfer P. 1998. Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically or phototropically stimulated maize coleoptiles. *The Plant Journal* 15: 119-123.
- Green PB. 1999. Expression of pattern in plants: combining molecular and calculus-based biophysical paradigms. *American Journal of Botany* 86: 1059-1076.
- Guillot C, Lecuit T. 2013. Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science* 340: 1185-1189.
- Hamant O, Heisler MG, Jönsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A, Meyerowitz EM, Couder Y, Traas J. 2008. Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis. *Science* 322: 1650-1655.
- Hejnowicz Z, Rusin A, Rusin T. 2000. Tensile tissue stress affects the orientation of cortical microtubules in the epidermis of sunflower hypocotyl. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 31-44.
- Hibara KI, Karim MR, Takada S, Taoka KI, Furutani M, Aida M, Tasaka M. 2006. Arabidopsis CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *The Plant Cell* 18: 2946-2957.
- Ingber DE. 2003a. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science* 116: 1157-1173.
- Ingber DE. 2003b. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks.

- Journal of Cell Science 116: 1397-1408.
- Klekowski EJ. 1988. Mutation, developmental selection, and plant evolution. Columbia University Press.
- Kuhlemeier C. 2007. Phyllotaxis. Trends in Plant Science 12: 143-150.
- Kwiatkowska D, Dumais J. 2003. Growth and morphogenesis at the vegetative shoot apex of *Anagallis arvensis* L. Journal of Experimental Botany 54: 1585-1595.
- Kwiatkowska D. 2004. Structural integration at the shoot apical meristem: models, measurements, and experiments. American Journal of Botany 91: 1277-1293.
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J. 2004. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. Development 131: 4311-4322.
- Lecuit T, Lenne P-F. 2007. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8: 633-644.
- Li L, Clevers H. 2010. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. Science 327: 542-545.
- Long J, Barton MK. 2000. Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis. Developmental Biology 218: 341-353.
- Lyndon RF. 1998. The shoot apical meristem: its growth and development. Cambridge University Press.
- Neufeld TP, de la Cruz AFA, Johnston LA, Edgar BA. 1998. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. Cell 93: 1183-1193.
- Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. Science 312: 1491-1495.
- Routier-Kierzkowska A-L, Kwiatkowska D. 2008. New stereoscopic reconstruction protocol for scanning electron microscope images and its application to in vivo replicas of the shoot apical meristem. Functional Plant Biology 35: 1034-1046.
- Savaldi-Goldstein S, Chory J. 2008. Growth coordination and the shoot epidermis. Current Opinion in Plant Biology 11: 42-48.
- Shraiman BI. 2005. Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 3318-3323.
- Wang Q, Hasson A, Rossmann S, Theres K. 2016. Divide et impera: boundaries shape the plant body and initiate new meristems. New Phytologist 209: 485-498.
- Wasteneys GO. 2002. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? Journal of Cell Science 115: 1345-1354.
- Williamson RE. 1991. Orientation of cortical microtubules in interphase plant cells. International Review of Cytology 129: 135-206.
- Wolpert L. 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. Journal of Theoretical Biology 25: 1-47.
- Yadav RK, Tavakkoli M, Xie M, Girke T, Reddy GV. 2014. A high-resolution gene expression map of the Arabidopsis shoot meristem stem cell niche. Development 141: 2735-2744.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### *Badanie funkcjonowania mikrotubul w komórkach roślinnych i roli w percepcji bodźców biofizycznych*

Moje pierwsze zainteresowania naukowe związane były z wpływem czynników biofizycznych na cytoszkielet w komórkach roślinnych. Badania przeprowadzałam w Katedrze Biofizyki i Biologii Komórki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod opieką prof. Zygmunta Hejnowicza. Wiadomo było, że cytoszkielet, a w szczególności mikrotubule korytkalne, odgrywają istotną rolę w rozwoju roślin poprzez wpływ na strukturę ściany komórkowej (Paredez i wsp., 2006). Mikrotubule są strukturami bardzo dynamicznymi, mogą zmieniać swoją orientację pod wpływem wielu czynników o charakterze

zarówno chemicznym, jak i fizycznym (Williamson, 1991; Hejnowicz i wsp., 2000). Związek mikrotubul z naprężeniem mechanicznym i wynikającym z niego wzrostem (odkształceniem plastycznym – nieodwracalnym) wydaje się być bardziej złożony niż z pozostałymi czynnikami z powodu prawdopodobnych sprzężeń zwrotnych (Fisher i Schopfer, 1998). Zaproponowano, że mikrotubule mogłyby być „sensorami” sygnałów o charakterze kierunkowym, do których należy m.in. naprężenie i odkształcenie, i mogłyby „przekazywać” te informacje na procesy komórkowe i morfogenetyczne (Williamson, 1991). Zgodnie z tą koncepcją w Katedrze Biofizyki i Biologii Komórki podjęto badania zależności pomiędzy mikrotubulami a czynnikami takimi jak naprężenie mechaniczne czy światło, które mogą być dla roślin ważnym źródłem informacji kierunkowych. W ramach tych badań w roku 2003 wykonałam pracę magisterską pt.: *„Wpływ pH i naprężenia na układ mikrotubul korykalnych w izolowanej epidermie hipokotyła słonecznika”* pod opieką naukową prof. Z. Hejnowicza. Obiektem moich badań był hipokotyl słonecznika (*Helianthus annuus*), który ze względu na swoje rozmiary, był bardzo dobrym modelem do badań wiążących się z izolacją epidermy z organu i jej mechaniczną stymulacją. Izolowana epiderma była nie tylko poddawana naprężeniu rozciągającemu, ale również działaniu buforów o różnym pH, ponieważ stężenie jonów wodorowych ma wpływ na właściwości mechaniczne ścian komórkowych powodując tzw. rozluźnienie ściany (Cosgrove, 2000). Wykonana przez mnie analiza znakowanych immunocytochemicznie mikrotubul korykalnych wykazała, że pH wpływa na orientację mikrotubul. Uzyskane wyniki były na tyle interesujące, że badania kontynuowałam w trakcie studiów doktoranckich na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach w latach 2003-2007.

Głównym celem moich badań w ramach doktoratu pt.: *„Wpływ wzrostu modulowanego pH i naprężeniem na układ mikrotubul korykalnych w epidermie hipokotyła słonecznika”* było sprawdzenie hipotezy, według której badany czynniki wpływają na orientację mikrotubul nie bezpośrednio, ale pośrednio - poprzez powodowanie zmian w szybkości wzrostu komórki. Czynniki zwiększające szybkość wzrostu miałyby prowadzić do poprzecznej orientacji mikrotubul względem osi komórki, czynniki hamujące wzrost – do podłużnej. W przeprowadzanych przeze mnie badaniach wzrost izolowanej epidermy był modulowany przez naprężenie rozciągające i pH: rozciąganie z odpowiednią siłą przy niskim pH zwiększa szybkość wzrostu izolowanej epidermy, izolowana epiderma nie naprężana lub inkubowana w wysokim pH nie rośnie (**Burian i Hejnowicz 2010, Plant Biology**). Obserwowane różnice we wzroście epidermy, mierzone za pomocą tensometru, nie miały jednak wpływu na mikrotubule,

a ich orientacja zależała bardziej od pozycji komórki epidermy względem wierzchołka.

Następnym etapem było badanie wpływu fuzikokcyny (toksyna wyizolowana z grzyba *Fusicoccum amygdali*), która jest substancją regulującą wzrost organów roślinnych poprzez bezpośrednią stymulację pomp protonowych ( $H^+$ ATP-azy) prowadzącą do obniżenia pH w ścianach komórkowych (Rayle i Cleland, 1992). Fuzikokcyna była używana w moich badaniach jako czynnik modulujący wzrost izolowanej epidermy: epiderma naprężana i traktowana fuzikokcyną rośnie, jednak samo naprężenie lub samo traktowanie nie powoduje wzrostu (**Burian i Hejnowicz 2011, Plant Biology**). Badania pokazały, że nie ma korelacji pomiędzy szybkością wzrostu epidermy i orientacją mikrotubul, jednak fuzikokcyna zmienia orientację mikrotubul niezależnie od wzrostu. Zatem zaproponowano alternatywną hipotezę, że fuzikocyna wpływa na mikrotubule poprzez generowanie różnicy potencjałów. Podsumowując, badania wykonane w ramach mojej pracy doktorskiej pokazały, że regulacja przestrzennego układu mikrotubul jest wieloczynnikowa i silnie zależy od badanego kontekstu.

Oprócz w/w badań, we współpracy z prof. Z. Hejnowiczem byłam zaangażowana w inne projekty naukowe obejmujące między innymi badania zmienności orientacji mikrotubul w kontekście ich „autonomicznej reorientacji” (**Hejnowicz Z, Burian A, Dobrowolska I, Kolano E. 2006, Acta Societatis Botanicorum Poloniae**). Mój wkład w ten projekt dotyczył ilościowej analizy orientacji mikrotubul w nietraktowanym hipokotyli słonecznika. W oparciu o analizę histogramów pokazujących rozkład kątów, pod jakimi mikrotubule są nachylone względem osi komórki, Hejnowicz wysunął hipotezę, że mikrotubule ulegają ciągłej reorientacji o charakterze rotacji niezależnej od działania czynników egzo- i endogennych (Hejnowicz, 2005). Hipoteza ta została potwierdzona eksperymentalnie przez inny zespół (zespół prof. Cliva Lloyd z John Innes Centre, Norwich, Wielka Brytania), który badał *in vivo* mikrotubule kortykalne w epidermie *A. thaliana* (Chan i wsp., 2007). Zgodnie z hipotezą Hejnowicza okazało się mikrotubule ulegają rotacji zgodnie lub przeciwnie do ruchów wskazówek zegara. Co więcej, później pokazano, że kierunek wędrówki enzymów syntetyzujących celulozę w błonie plazmatycznej również ulega rotacji zależnej od mikrotubul i ma to swoje odzwierciedlenie w helikoidalnej strukturze ściany komórkowej (Chan i wsp., 2010).

***Badanie roli mikrotubul w zjawiskach chiralnych***

Przeprowadzone przeze mnie badania mikrotubul dotyczyły również wpływu innych czynników fizycznych, w tym światła. Wiadomo było, że wpływ światła zależy silnie od długości fali: światło niebieskie i czerwone przeciwnie wpływają na orientację mikrotubul korykalnych (Zandomeni i Schopfer 1993). W wyniku badań pokazałam, że wpływ światła niebieskiego i czerwonego w hipokotyli słonecznika sprowadza się do wpływu na chiralność (skrętność) układów mikrotubul: naświetlanie hipokotyli światłem niebieskim prowadzi do zwiększenia ilości prawoskrętnych układów, natomiast światłem czerwonym - lewoskrętnych (**Burian, 2007, Acta Societatis Botanicorum Poloniae**). Co ciekawe, również w warunkach kontrolnych przeważały układy prawoskrętne.

Chiralność jest właściwością wielu struktur zarówno u roślin jak i u zwierząt, i może być zjawiskiem ściśle zdeterminowanym genetycznie (na przykład skręt łodygi w roślinach pnących) lub o charakterze stochastycznym (na przykład filotaksja helikalna). W komórkach roślinnych układ mikrotubul korykalnych determinuje układ mikrofibryl celulozowych, a ten (z powodu wysokiej wartości modułu Younga) ogranicza wzrost komórki w kierunku równoległym do orientacji mikrofibryl. Zatem można przyjąć, że szybkość wzrostu komórki jest maksymalna w kierunku prostopadłym do ułożenia mikrotubul lub mikrofibryl celulozowych. Jeżeli w komórkach przeważają układy mikrotubul/mikrofibryl o określonej skrętności, może to prowadzić do skośnego kierunku wzrostu i generować organy o przeciwnej skrętności w stosunku do skrętności mikrotubul/mikrofibryl. Przejawem takiego wzrostu jest najczęściej skręcona epiderma danego organu. Na przykład, przy lewoskrętnym układzie mikrotubul epiderma łodygi/korzenia jest skręcona na prawo, przy prawoskrętnych układach – epiderma jest skręcona na lewo. U *A. thaliana* typu dzikiego nie obserwuje się skręconych organów, jednak mutacje genów związanych z mikrotubulami (np. kodujących białka MAP lub tubulinę) mogą prowadzić do powstania skręconego fenotypu (Furutani i wsp., 2000; Thitamadee i wsp., 2002). W badanych przeze mnie hipokotylach słonecznika przeważały prawoskrętne układy mikrotubul (**Burian, 2007, Acta Societatis Botanicorum Poloniae**), zatem można było się spodziewać, że cały organ będzie lewoskrętny. Faktycznie zaobserwowałam, że epiderma w części hipokotyli jest skręcona na lewo. Obserwacja ta świadczy o naturalnej tendencji wzrostu organów słonecznika do określonej chiralności, której źródłem jest chiralność mikrotubul.

Doświadczenie uzyskane w trakcie badań mikrotubul hipokotyła słonecznika wykorzystywałam parę lat później do badania rośliny jednoliściennej - trawy *Eragrostis tef*, podczas dwupółletniego pobytu w Institute of Plant Sciences (University of Bern, w Szwajcarii), gdzie współpracowałam z grupą dr Zerihuna Tadele. Badania tej grupy skupiają się na *E. tef*, która jest podstawową rośliną uprawną w Etiopii. W związku z tym, że roślina ta jest podatna na łamanie pod wpływem deszczu lub wiatru, co powoduje znaczne obniżenie jej plonowania, celem badań grupy dr Z. Tadele jest generowanie roślin o większej wytrzymałości mechanicznej. Taką cechą charakteryzują się między innymi pół-karłowe odmiany. Oprócz hormonów (gibereliny, brassinostroidów, auksyny), do czynników regulujących wysokość roślin poprzez wpływ na wzrost elongacyjny, należą również mikrotubule (Wang i Li, 2008). Na przykład, mutanty *twisted dwarf 1* ryżu, *lefty* lub *spiral A. thaliana* odznaczają się mniejszymi rozmiarami, czemu towarzyszy skrzywienie organów (Sunohara i wsp., 2009; Thitamadee i wsp., Furutani i wsp., 2000). W Institute of Plant Sciences w Bernie otrzymano mutant *E. tef* o pół-karłowatym i prawoskrętnym fenotypie (mutant *kegne*, z jęz. amharskiego – prawa ręka) charakteryzującym się zwiększoną wytrzymałością na złamanie (Jöst i wsp., 2015, **Journal of Experimental Botany**). Mutacja dotyczyła genu kodującego  $\alpha$ -tubulinę, zatem należało sprawdzić, czy fenotyp mutant *E. tef* wynika ze zmienionej organizacji mikrotubul kortykalnych, tak jak ma to miejsce w przypadku skrzywionych mutantów *A. thaliana*. Moje badania polegały na immunocytochemicznym znakowaniu mikrotubul w koleoptylach *E. tef* i analizie ich układów. Zgodnie z oczekiwaniami obserwowałam przewagę lewoskrętnych układów mikrotubul w epidermie mutant *E. tef* o prawoskrętnych koleoptylach i liściach, podczas gdy w typie dzikim rosnącym prosto układy mikrotubul były albo poprzeczne do osi komórki albo skośne bez przeważającej skrętności (Jöst i wsp., 2015, **Journal of Experimental Botany**). Potwierdziło to hipotezę roboczą, że mutacja genu tubuliny powoduje zmiany w organizacji mikrotubul, które z kolei generują pół-karłowaty skrzywiony fenotyp roślin *E. tef* bardziej wytrzymałych mechanicznie. Badania te pozwoliły na przejście do kolejnego etapu prac związanego z wprowadzeniem roślin do uprawy polowej.

### ***Badanie związku pomiędzy mikrotubulami a strukturą ściany komórkowej***

Oprócz hipokotyła słonecznika, przedmiotem moich badań nad mikrotubulami i wzrostem była również epiderma liścia tulipana (*Tulipa sp.*) oraz włókna bawełny (*Gossypium herbaceum*). W badaniach tych oprócz układów mikrotubul, analizowałam układy mikrofibryl celulozowych w ścianach komórkowych za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego oraz polaryzacyjnego. Moje wyniki dotyczące włókien bawełny zostały później włączone do innych



badania mających na celu testowanie nowego narzędzia do analizy ilościowej struktur fibrylarnych w komórkach (**Boudaoud i wsp., 2014, Nature Protocols**).

Po obronie pracy doktorskiej zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Biofizyki i Morfogenezy Roślin Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. W ramach projektu MAESTRO „*Mechanika, struktura i zróżnicowany wzrost ściany komórkowej - morfogeneza roślin z perspektywy mechaniki*” pod kierownictwem prof. Doroty Kwiatkowskiej w Katedrze podjęto badania mające na celu poznanie struktury i mechaniki ścian komórkowych. Poszukiwano narzędzia pozwalającego na badanie w najmłodszych pokładach ściany komórkowej układów mikrofibryl celulozowych, struktur które mają decydujący wpływ na anizotropię ściany komórkowej i jej wzrost (Baskin, 2005). W tym celu zainicjowano współpracę z dr hab. Romanem Wrzaliakiem z Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego polegającą na wykorzystaniu mikroskopu sił atomowych (AFM, z ang. *Atomic Force Microscopy*) do uwidocznienia mikrofibryl celulozowych. Mój udział w tych badaniach polegał na opracowaniu protokołu do przygotowania próbek ze ścian komórkowych, tak aby możliwe było skanowanie powierzchni ściany za pomocą sondy AFM. Materiałem wyjściowym były komórki epidermalne cebuli (*Allium cepa*), w których odsłonięta została wewnętrzna część ściany komórkowej. Odpowiednio przygotowane próbki były następnie skanowane w AFM. Dzięki opracowanemu przeze mnie protokołowi udało się zobrazować różne układy mikrofibryl celulozowych a otrzymane obrazy były podstawą do analizy ilościowej. Obrazy otrzymane z AFM, jak również z mikroskopu fluorescencyjnego pokazujące mikrotubule i mikrofibryle celulozowe, były przeze mnie wykorzystywane do testowania narzędzia ‘FibrilTool’ do półautomatycznej analizy ilościowej orientacji i anizotropii różnych struktur fibrylarnych w komórkach (**Boudaoud i wsp., 2014, Nature Protocols**). Narzędzie to zostało opracowane przez prof. Arezki’ego Boudaoud w ramach międzynarodowego projektu badawczego „*Unraveling the link between plant architecture and the gene regulatory network: the role of the cytoskeleton*”, w którym brałam udział.

### ***Badanie związku pomiędzy ekspresją genów związanych z auksyną a wzrostem***

Kolejny projekt, w którym brałam udział, dotyczył analizy związku pomiędzy ekspresją genów związanych z auksyną a wzrostem prowadzącym do tworzenia zawiązków liści na merystemie apikalnym *Lycopersicon esculentum* (pomidor). Badania te realizowałam podczas trzymiesięcznego pobytu w Institute of Plant Sciences (University of Bern, w Szwajcarii) w grupie dr Richarda Smitha (Systems Biology/Developmental Modeling), która specjalizuje się

w opracowywaniu narzędzi do modelowania komputerowego oraz do ilościowej analizy procesów morfogenetycznych u roślin. Wiadomo było, że auksyna jest kluczowym regulatorem organogenezy a jej lokalny zwiększony poziom w merystemie (wydedukowany na podstawie ekspresji promotora odpowiedzi na auksynę DR5-YFP oraz białka transportującego PIN1-GFP) wyznacza pozycję i prowadzi do inicjacji zawiązka nowego organu (liścia lub kwiatu) (Reinhard i wsp., 2003; Heisler i wsp., 2005). Wiadomo również, że auksyna reguluje wzrost komórek poprzez wpływ na właściwości ściany komórkowej, zgodnie z tzw. hipotezą kwasowego wzrostu (Rayle i Cleland, 1992). Dlatego można przypuszczać, że tworzenie nowych organów jest związane z regulacją przez auksynę wzrostu prowadzącego do wybrzuszenia zawiązków. Zatem ekspresja DR5-YFP i PIN1-GFP powinna pokrywać się z obszarami zwiększonego wzrostu komórek w merystemie. Jednakże badania związku pomiędzy czasoprzestrzennym rozmieszczeniem auksyny a wzrostem komórek w merystemie nigdy nie zostały przeprowadzone. Moje badania polegały na obrazowaniu przyżyciowym rosnących wierzchołków pędu i kolejnych etapów tworzenia się liści przy pomocy konfokalnego laserowego mikroskopu skanującego. Wykorzystanie roślin transgeniczných umożliwiło mi jednoczesne śledzenie ekspresji genów, wzrostu i podziałów komórek oraz geometrii merystemu. Kluczowym elementem tych badań było wykorzystanie opracowanego przez zespół dr Richarda Smitha programu MorphoGraphX służącego do jakościowej i ilościowej analizy obrazów z mikroskopu konfokalnego. Zaskakującym wynikiem moich badań był brak korelacji pomiędzy wzrostem komórek prowadzącym do powstania zawiązka liścia a ekspresją DR5-YFP i PIN1-GFP. Na przykład, w szybko rosnących komórkach nie obserwowano zwiększonej ekspresji DR5-YFP, natomiast znaczna ekspresja DR5-YFP była zlokalizowana w granicy pomiędzy zawiązkiem liścia i merystemem. Wyniki te zostały włączone do publikacji prezentującej program MorphoGraphX jako nowe narzędzie do analizy procesów morfogenetycznych w 4D (Barbier de Reuille i wsp., 2015, eLife). Wykrycie ekspresji DR5 w granicy merystemu *L. esculentum* stanowiło przesłankę do podjęcia podobnych badań u *A. thaliana* ujętych w osiągnięciu naukowym (Burian i wsp., 2016).

### ***Obecne badania i plany naukowe***

Współpraca z dr Mitsuhiro Aida zapoczątkowana przez projekt o wpływie genów CUC na tworzenie się granic pomiędzy organami, jest obecnie kontynuowana w kolejnym projekcie skupiającym się na regulacji genetycznej i zależnościach rozwojowych pomiędzy merystemem kwiatowym *A. thaliana* a przysadką, czyli liściem wspierającym kwiatu wyrastającym u jego

podstawy. U *A. thaliana* typu dzikiego przysadka jest wykształcana w formie szczątkowej, dlatego wykrywana jest tylko za pomocą markerów genetycznych (na przykład gen *AINTEGUMENTA*, Long i Barton, 2000) lub poprzez szczegółową analizę wzrostu i geometrii we wczesnych etapach rozwojowych zawiązków (Kwiatkowska, 2006). Zahamowanie rozwoju przysadki odpowiedzialny jest gen *PUCHI*, którego mutacja powoduje wykształcenie się kwiatów z widocznymi przysadkami (Karim i wsp., 2009). Ponieważ geny *CUC* również mają wpływ na formowanie merystemów kwiatowych, moje obecne badania, które obejmują obrazowanie przyżyciowe wierzchołków pędu, analizę ilościową wzrostu i geometrii oraz traktowania eksperymentalne, dotyczą potrójnego mutantu *puchi cuc2 cuc3* (otrzymanego z laboratorium dr Mitsuhiro Aida, Nara Institute of Science and Technology, Japonia). Mutant ten charakteryzuje się niezwykle dziwnym fenotypem: w pędzie kwiatostanowym kwiaty nie są wykształcane lub wykształcają się rzadko, natomiast dobrze rozwinięte są przysadki. Wyszliśmy do hipotezy roboczej, że w typie dzikim powstające zawiązki kwiatowe hamują rozwój towarzyszącym im przysadkom. Gdy powstawanie zawiązków kwiatowych jest zaburzone, na przykład poprzez mutacje genów *PUCHI* i *CUC*, brak lub osłabienie hamującego wpływu powoduje, że rozwijają się makroskopowo rozróżnialne przysadki. Hipoteza ta wpisuje się w znany już wcześniej efekt „współzawodniczenia” organów (Nilsson i wsp., 1998). Moje obecne badania mają na celu weryfikację w/w hipotezy.

Kolejny projekt, w którym jestem obecnie zaangażowana jest związany z genezą kształtu liści i jej regulacją genetyczną. Projekt ten jest realizowany we współpracy z prof. Crisem Kuhlemeierem (Institute of Plant Sciences, University of Bern w Szwajcarii) oraz z prof. Marją Timmerman (Department of Developmental Genetics, Universität Tübingen, Niemcy) specjalizującą się w badaniu roli mobilnych niekodujących RNA w rozwoju liścia. Większość roślin posiada grzbieto-brzusnie spłaszczone liście. Wykształcenie się płaskiej blaszki liściowej związane jest z określeniem w zawiązku liściowym domeny adaksjalnej i abaksjalnej, które różnią się położeniem względem merystemu apikalnego pędu oraz ekspresją genów (Waites i Hudson, 1995). Geny z rodziny HD-ZIP III ulegają ekspresji w adaksjalnej domenie zawiązka, natomiast *KANADI* i *YABBY* - w abaksjalnej (Kuhlemeier i Timmermans, 2016). Jednym z czynników regulujących ekspresję specyficznych dla danej domeny genów jest gradient mikroRNA, który bardzo wcześnie w rozwoju liścia determinuje tożsamość domeny abaksjalnej (Chitwood i wsp., 2007). Jeśli tożsamość jednej z domen zostanie zaburzona, na przykład poprzez mutację genu specyfikującego daną domenę, w liściu zaczyna dominować druga domena, co związane jest ze zmianą kształtu liścia. Liść nie jest spłaszczony,

lecz przyjmuje wałeczkowaty kształt (McConnel i wsp., 2001). Moje badania mają odpowiedzieć na pytanie, jakie są genetyczne i mechaniczne mechanizmy powstawania płaskiego liścia, ze szczególnym uwzględnieniem roli mikroRNA.

Moje najbliższe plany naukowe związane są z realizacją kierowanego przez mnie projektu „*Rola systemu waskularnego w tworzeniu się wzorów u roślin*”, który uzyskał finansowanie w ramach konkursu SONATA BIS 6 ogłoszonego przez Narodowe Centrum Nauki. Zadaniem tego konkursu jest powołanie nowego zespołu naukowego na realizowanie badań podstawowych. Głównym celem w/w projektu jest badanie mechanizmów tworzenia się wzorów u roślin, w szczególności wzoru filotaktycznego na wierzchołku pędu oraz różnych wzorów unerwienia w liściach. W projekcie zastosowane zostaną badania *in vivo* i *in silico* procesów organogenezy i powstawania waskularnych wzorów u gatunków roślin jedno- i dwuliściennych. Te pierwsze będą obejmowały: wysokorozdzielcze obrazowanie w 3-D systemu waskularnego pędu z użyciem laserowej mikroskopii konfokalnej, techniki mikrochirurgiczne (ablacja laserowa i mechaniczna), chemiczne traktowania inhibitorami polarnego transportu auksyny, lokalną mikroaplikację auksyny, analizę ilościową ekspresji genów i procesów komórkowych. Wyniki badań biologicznych będą wdrażane do fizyczno-matematycznych modeli i symulacji komputerowych opracowywanych przez zespół dr. Wojciecha Pałubickiego (Wydział Matematyki i Informatyki, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu) w celu zbadania związków pomiędzy sygnałami a wzrostem na poziomie komórek, tkanek i organów prowadzącym do wykształcania się różnych wzorów.

### **Literatura:**

- Baskin TI. 2005. Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 203-222.
- Burian A, Raczyńska-Szajgin M, Borowska-Wykręt D, Piątek A, Mitsuhiro A, Kwiatkowska D. 2015. The CUP-SHAPED COTYLEDON2 and 3 genes have a postmeristematic effect on *Arabidopsis thaliana* phyllotaxis. *Annals of Botany* 115: 807-820.
- Burian A, Barbier de Reuille P, Kuhlemeier C. 2016. Patterns of stem cell divisions contribute to plant longevity. *Current Biology* 26: 1-10.
- Chan J, Calder G, Fox S, Lloyd C. 2007. Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. *Nature Cell Biology* 9: 171-175.
- Chan J, Crowell E, Eder M, Calder G, Bunnell S, Findlay K, Vernhettes S, Höfte H, Lloyd C. 2010. The rotation of cellulose synthase trajectories is microtubule dependent and influences the texture of epidermal cell walls in *Arabidopsis* hypocotyls. *Journal of Cell Science* 123: 3490-3495.

- Cosgrove DJ. 1998. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology* 118: 333-339.
- Fischer K, Schopfer P. 1998. Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically or phototropically stimulated maize coleoptiles. *The Plant Journal* 15: 119-123.
- Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T. 2000. The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127: 4443-4453.
- Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, Long JA, Meyerowitz EM. 2005. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology* 15: 1899-1911.
- Hejnowicz Z, Rusin A, Rusin T. 2000. Tensile tissue stress affects the orientation of cortical microtubules in the epidermis of sunflower hypocotyl. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 31-44.
- Hejnowicz Z. 2005. Autonomous changes in the orientation of cortical microtubules underlying the helicoidal cell wall of the sunflower hypocotyl epidermis: spatial variation translated into temporal changes. *Protoplasma* 225: 243-256.
- Karim MR, Hirota A, Kwiatkowska D, Tasaka M, Aida M. 2009. A role for *Arabidopsis* PUCHI in floral meristem identity and bract suppression. *The Plant Cell* 21: 1360-1372.
- Kwiatkowska D. 2008. Flowering and apical meristem growth dynamics. *Journal of Experimental Botany* 59: 187-201.
- Long J, Barton MK. 2000. Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Developmental Biology* 218: 341-353.
- Nilsson O, Wu E, Wolfe DS, Weigel D. 1998. Genetic ablation of flowers in transgenic *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 15: 799-804.
- Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312: 1491-1495.
- Rayle DL, Cleland RE. 1992. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271-1274.
- Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C. 2003. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255-260.
- Sunohara H, Kawai T, Shimizu-Sato S, Sato Y, Sato K, Kitano H. 2009. A dominant mutation of TWISTED DWARF 1 encoding an  $\alpha$ -tubulin protein causes severe dwarfism and right helical growth in rice. *Genes & Genetic Systems* 84: 209-218.
- Thitamadee S, Tsuchihara K, Hashimoto T. 2002. Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* 417: 193-196.
- Wang Y, Li J. 2008. Molecular basis of plant architecture. *Annual Review of Plant Biology* 59: 253-279.
- Williamson RE. 1991. Orientation of cortical microtubules in interphase plant cells. *International Review of Cytology* 129: 135-206.
- Zandomeni K, Schopfer P. 1993. Reorientation of microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles by phytochrome, blue-light photoreceptor, and auxin. *Protoplasma* 173: 103-112.

**Wykaz opublikowanych prac niewchodzących w skład osiągnięcia:**

1. Hejnowicz Z, **Burian A**, Dobrowolska I, Kolano E. 2006. Orientational variability of parallel arrays of cortical microtubules under the outer cell wall of the *Helianthus* hypocotyl epidermis. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 75: 201-206.

**IF<sub>2006</sub>= 0.148; MNiSW: 13 pkt; Cyt.: WoS 1 (1)**

2. **Burian A**. 2007. Chiral changes of cortical microtubule orientations in epidermis of sunflower hypocotyls. The effect of blue and red light. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 76: 269-275.

**IF<sub>2007</sub>= 0.238; MNiSW: 13 pkt; Cyt.: WoS 0 (0)**

3. **Burian A**, Hejnowicz Z. 2010. Strain rate does not affect cortical microtubule orientation in the isolated epidermis of sunflower hypocotyls. *Plant Biology* 12:459-468.

**IF<sub>2010</sub>= 2.409; MNiSW: 32 pkt; Cyt.: WoS 3 (2)**

4. **Burian A**, Hejnowicz Z. 2011. Fusicoccin affects cortical microtubule orientation in the isolated epidermis of sunflower hypocotyls. *Plant Biology* 13:201-208.

**IF<sub>2011</sub>= 2.395; MNiSW: 32 pkt; Cyt.: WoS 0 (0)**

5. Boudaoud A, **Burian A**, Borowska-Wykręt D, Uyttewaal M, Wrzalik R, Kwiatkowska D, Hamant O. 2014. FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. *Nature Protocols* 9: 457-463.

**IF<sub>2014</sub>= 9.673; MNiSW: 50 pkt; Cyt.: WoS 40 (35)**

6. Barbier de Reuille P, Routier-Kierzkowska A-L, Kierzkowski D, Bassel GW, Schupbach T, Tauriello G, Bajpai N, Strauss S, Weber A, Kiss A, **Burian A**, Hofhuis H, Sapala A, Lipowczan M, Heimlicher MB, Robinson S, Bayer EM, Basler K, Koumoutsakos P, Roeder AHK, Aegerter-Wilmsen T, Nakayama, Tsiantis M, Hay A, Kwiatkowska D, Xenarios I, Kuhlemeier C, Smith RS. 2015. MorphoGraphX: A platform for quantifying morphogenesis in 4D. *eLife* e05864.

**IF<sub>2015</sub>= 8.282; MNiSW: 45 pkt; Cyt.: WoS 28 (21)**

7. Jöst M, Esfeld K, **Burian A**, Cannarozzi G, Chanyalew S, Kuhlemeier C, Assefa K, Tabela Z. 2014. Semi-dwarfism and lodging tolerance in tef (*Eragrostis tef*) is linked to a mutation in the  $\alpha$ -Tubulin 1 gene. *Journal of Experimental Botany* 66: 933-944.

**IF<sub>2014</sub>= 5.526; MNiSW: 45 pkt; Cyt.: WoS 4 (4)**

8. Robinson S, **Burian A**, Couturier E, Landrein B, Louveaux M, Neumann ED, Peaucelle A, Weber A, Nakayama N. 2013. Mechanical control of morphogenesis at the shoot apex. *Journal of Experimental Botany* 64: 4729-4744.

**IF<sub>2013</sub>= 5.794; MNiSW: 45 pkt; Cyt.: WoS 16 (15)**

### *rozdziały w monografii*

1. Kwiatkowska D, **Burian A**. 2014. Sequential replicas for in vivo imaging of growing organ surfaces. *Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Žárský V, Cvrčková F (eds), Springer Science+Business Media New York, vol 1080: 99-110.

**MNiSW: 5 pkt; Cyt.: WoS 1 (0)**

2. Hamant O, Das P, **Burian A**. 2014. Time-lapse imaging of developing meristems using confocal laser scanning microscope. *Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Žárský V, Cvrčková F (eds), Springer Science+Business Media New York, vol 1080: 111-120.

**MNiSW: 5 pkt; Cyt.: WoS 6 (1)**

**Podsumowanie dorobku naukowego:**

**Tab.1.** Liczba publikacji naukowych, ich wskaźniki IF oraz punkty MNiSW (podano wartości dla czasopism z roku wydania publikacji), liczba cytowań i liczba cytowani bez autocytowań (na podstawie bazy Web of Science z 03.04.2017 r.).

Okres	Charakter publikacji	Liczba	IF	Punkty MNiSW	Liczba cytowań	Liczba cytowań bez autocytowań
Przed doktoratem	Prace oryginalne	2	0.386	26	1	1
Po doktoracie	Osiągnięcia naukowe (prace oryginalne)	4	51.466	180	156	123
	Pozostałe publikacje (prace oryginalne)	5	28.285	204	75	62
	Prace przeglądowe	1	5.794	45	16	15
	Rozdziały w monografi	2	-	10	7	1
<b>SUMA</b>		<b>14</b>	<b>85.931</b>	<b>465</b>	<b>255</b>	<b>202</b>

Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): 6

Kobule, 11.04.2017

Agata Baran