

# **AUTOREFERAT**

dr Jolanta Kwaśniewska  
Katedra Cytologii i Anatomii Roślin  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. Jagiellonska 28, 40-032 Katowice

Katowice, 2014

**1. Imię i nazwisko:** Jolanta Kwaśniewska

**Nazwisko panieńskie:** Juchimiuk

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

- 4 lipiec 1997 - Dyplom ukończenia 5-letnich studiów wyższych na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach na kierunku 'Biologia' w zakresie biologii ogólnej (z tytułem magistra)  
„System przewodzący i aberracje w budowie organów kwiatowych mutantu *pistillata Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.”  
Promotor: prof. dr hab. Jolanta Maluszyńska
- 20 wrzesień 2002 - Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie cytogenetyki roślin, nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach  
„Wrażliwość komórek *Crepis capillaris* na działanie czynników mutagennych”.  
Promotor: prof. dr hab. Jolanta Maluszyńska

**• Informacje o dotychczasowym przebiegu pracy zawodowej**

- 1.10.1997 - 30.09.1998 - Asystent. Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- 1.10.1998 - 30.09.2002 - Słuchaczka stacjonarnego studium doktoranckiego przy Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
- 1.10.1998 - 30.09.2002 - Asystent, ½ etatu. Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- 1.10.2002 – obecnie - Adiunkt. Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (w tym przerwa w okresie od 01.2008- 06.2009 - urlop macierzyński i wychowawczy)

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

**A) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Problematyka opisywana w cyklu publikacji na temat:**

**Wrażliwość genomu roślinnego na działanie czynników mutagennych**

**B) Autor/autorzy, tytuł/tytuły, rok wydania, nazwa wydawnictwa**

- [1] **Juchimiuk J**, Hering B, Maluszynska J. 2007. Multicolor FISH in analysis of chromosome aberrations in barley cells induced by MH and MNU. Journal of Applied Genetics 48(20): 99-106.

**IF – 0,967, Pkt MNiSW – 20**

*Indywidualny wkład: 70%; sformułowanie koncepcji badawczej, udział w pracach eksperymentalnych, analiza i opracowanie wyników, opracowanie dokumentacji zdjęciowej i napisanie/redagowanie publikacji, autor korespondencyjny publikacji.*

- [2] **Juchimiuk-Kwasniewska J**, Brodziak L, Maluszynska J. 2011. FISH in analysis of gamma ray-induced micronuclei formation in barley. Journal of Applied Genetics 51(1): 23-29.

**IF - 1,324, Pkt MNiSW - 20**

*Indywidualny wkład: 70%; sformułowanie koncepcji badawczej, udział w badaniach laboratoryjnych, interpretacja i opracowanie wyników, opracowanie dokumentacji zdjęciowej i napisanie/redagowanie publikacji, autor korespondencyjny publikacji.*

- [3] **Kwasniewska J**, Grabowska M, Kwasniewski M, Kolano B. 2012. Comet-FISH using rDNA probes in analysis of mutagen-induced DNA damage in plant cells. Environmental and Molecular Mutagenesis 53(5): 369-375.

**IF - 3,708, Pkt MNiSW – 35**

*Indywidualny wkład: 65%; sformułowanie koncepcji badawczej, udział w badaniach laboratoryjnych, interpretacja i opracowanie wyników, opracowanie dokumentacji zdjęciowej i napisanie/redagowanie publikacji, autor korespondencyjny publikacji.*

- [4] **Kwasniewska J**, Kwasniewski M. 2013. Comet-FISH for the evaluation of plant DNA damage after mutagenic treatments. *Journal of Applied Genetics* 54 (4) 407-415.

**IF - 1, 847, Pkt MNiSW – 20**

*Indywidualny wkład: 95%; sformułowanie koncepcji badawczej, udział w badaniach laboratoryjnych, interpretacja i opracowanie wyników, opracowanie dokumentacji zdjęciowej i napisanie/redagowanie publikacji, autor korespondencyjny publikacji.*

- [5] **Kwasniewska J**, Mikolajczyk A. 2014. Influence of the presence of B chromosomes on DNA damage in *Crepis capillaris*. *PLOS ONE* 9(1): e87337.

**IF - 3,73, Pkt MNiSW – 40**

*Indywidualny wkład: 75%; sformułowanie koncepcji badawczej, udział w badaniach laboratoryjnych, interpretacja i opracowanie wyników, opracowanie dokumentacji zdjęciowej i napisanie/redagowanie publikacji, autor korespondencyjny publikacji.*

- [6] **Kwasniewska J**. 2014 (data publikacji: 2014/06/01\*). Mutagenic effects at DNA and chromosome level. In: *Mutagenesis: exploring novel genes and pathways*. Eds: Tomlekova N, Kozgar I and Wani R. Chapter 17, 333-354. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, Enfield Pub & Distribution Co. DOI 103920/978-90-8686-787-5\_17

**IF - nie dotyczy, Pkt MNiSW – 7**

\*oświadczenie edytora oraz oryginalna informacja Wageningen Academic Publishers o dacie publikacji w załączniku 6.6.1.

### **Sumaryczny Impact Factor wymienionych publikacji - 11,576.**

Wartości IF podano zgodnie z rokiem opublikowania

### **Sumaryczna liczba punktów MNiSW wymienionych publikacji - 142.**

Punktacje MNiSW podano zgodnie z rokiem opublikowania dla poszczególnych komunikatów MNiSW, dotyczących list czasopism punktowanych, tj. z 2010, 2012 i 2013 roku.

Oświadczenia wszystkich współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac, znajdują się w załączniku nr 5.

### **C) Cele naukowe oraz wyniki zawarte w pracach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

Cząsteczka DNA jest docelowym miejscem działania mutagenów fizycznych i chemicznych. Po traktowaniu mutagenicznym obserwowane są uszkodzenia materiału genetycznego, wykrywane na poziomie chromosomów lub DNA, oraz zaburzenia cyklu komórkowego. Najczęstszym rodzajem uszkodzeń DNA są pęknięcia nici DNA, które mogą prowadzić do powstania zmian w strukturze chromosomu - aberracji chromosomowych. Aberracje chromosomowe mogą być analizowane w cyklu mitotycznym komórek merystematycznych roślin pokolenia M1 lub w komórkach mejotycznych, jak w teście mikrojąder *Tradescantia sp.* (Ma i wsp. 1994). Zagadnienia związane z badaniem efektu działania mutagenów w genomie roślinnym szczegółowo opisałam w pracy przeglądowej, powstałej na zaproszenie redaktorów książki, w której praca ta stanowi jeden z rozdziałów, zatytułowany „Mutagenic effects at DNA and chromosome level” (Kwasniewska, 2014).

Pęknięcia DNA są pierwotnym, kluczowym rodzajem uszkodzenia, powodowanego zarówno przez mutageny fizyczne jak i chemiczne. Spośród metod detekcji i jakościowej oceny działania mutagenów na poziomie molekularnej organizacji DNA szerokie zastosowanie znalazła metoda elektroforezy pojedynczych komórek, tzw. test kometowy (Collins i wsp. 2002; Tice i wsp. 2000). Technika ta oparta jest na elektroforezie izolowanych jąder komórkowych zatopionych w agarozie. Jądra komórkowe charakteryzujące się obecnością uszkodzeń DNA tworzą charakterystyczne obrazy, przypominające komety złożone z głowy i ogona. Ogony powstają wskutek migracji wolnych fragmentów DNA, tworzących się w wyniku pęknięć DNA oraz rozciągania łańcuchów zakotwiczonych w głowie komety. Jedną z zalet testu kometowego jest możliwość oceny uszkadzającego DNA działania w komórkach dzielących się. Jednym z rodzajów uszkodzeń wykrywanych w teście kometowym, obok pojedynczych pęknięć nici DNA i miejsc alkali-labilnych, są podwójne pęknięcia nici DNA (double strand breaks - DSB), które są priorytetowym uszkodzeniem prowadzącym do powstania aberracji chromosomowych (Pfeiffer i wsp. 1996; Schubert i wsp. 2004). Końcowy efekt działania mutagenu jest wynikiem pierwotnego uszkodzenia DNA i procesów jego naprawy. Możliwa jest analiza efektywności naprawy DNA poprzez zastosowanie różnych czasów postinkubacji po traktowaniu mutagenem, a następnie analizę poziomu uszkodzeń DNA.

Test kometowy początkowo stosowany był tylko dla limfocytów, gdyż obecność ściany komórkowej komórek roślinnych długo stanowiła ograniczenie dla jego przeprowadzenia. Opracowanie procedury izolacji jąder z komórek roślinnych, która nie powoduje pęknięć nici jądrowego DNA otworzyło możliwości wykorzystania tej techniki w badaniach uszkodzeń DNA w komórkach roślinnych (Gichner, Plewa, 1998). Ze względu na szybkość, możliwość oceny uszkodzeń DNA w dużej liczbie komórek oraz niewielkie koszty metoda testu kometowego znalazła stosunkowo szerokie zastosowanie w analizie efektu genotoksycznego w komórkach roślinnych. Najbardziej dogodnym materiałem do testu kometowego są liście, ale przeprowadzono również izolację jąder komórkowych dla innych organów (korzeni) jak i tkanki kalusowej.

Test kometowy był szeroko wykorzystywany w badaniu uszkodzeń całkowitego genomowego DNA w komórkach roślinnych. Analizowano poziom pęknięć DNA i efektywność ich naprawy po działaniu różnych czynników chemicznych i fizycznych m.in.: N-nitrozometylomocznika, mitomycyny C, bleomycyny, hydrazydu kwasu maleinowego, metanosulfonianu etylu, promieniowania gamma (Georgieva i Stoilov, 2008; Gichner i Plewa, 1998; Menke i wsp. 2001).

Różne obszary DNA mogą być mniej lub bardziej wrażliwe na działanie mutagenów. Badania z wykorzystaniem tradycyjnych metod cytogenetyki wskazują, że miejsca występowania aberracji chromosomowych nie są przypadkowe. Wykazano preferencyjną lokalizację aberracji w obszarach heterochromatyny lub na styku heterochromatyny i euchromatyny (Cann and Delleire, 2011). Dynamiczny rozwój metod cytogenetyki molekularnej w ostatnich latach daje nowe możliwości badania lokalizacji zmian indukowanych mutagenami w genomie jądrowym na poziomie DNA, a tym samym porównania wrażliwości różnych sekwencji DNA lub chromosomów/ich regionów (Natarajan, 2005). Możliwość badania wrażliwości poszczególnych regionów chromosomów lub genów, umożliwiającą tym samym wykrywanie prawdopodobnych "gorących miejsc" powstawania uszkodzeń DNA w formie pęknięć DNA w genomie jądrowym, powstała dzięki opracowaniu metody comet-FISH (Santos i wsp. 1997; Olive, 2002; Volpi i wsp. 2008). Metoda ta jest kombinacją fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) zastosowanej na preparatach z zatopionymi w agarozie jądrami komórkowymi, otrzymanymi w wyniku testu kometowego. Analizowane jest rozmieszczenie specyficznych regionów chromosomów lub sekwencji DNA w obrębie głowy lub ogona komety, co umożliwia określenie wrażliwości tych regionów na działanie mutagenów powodujących pęknięcia DNA. Metoda ta wprawdzie umożliwia

analizę uszkodzeń DNA oraz efektywności naprawy w obrębie określonych genów, domen chromosomowych oraz całych chromosomów, jednak ograniczona dostępność specyficznych chromosomowo sond u roślin sprawia, że badania te wciąż nie są zaawansowane. Obecnie znane są tylko pojedyncze przykłady wykorzystania metody comet - FISH w systemach roślinnych (Menke i wsp. 2000). Istnieje natomiast wiele przykładów zastosowania tej metody w badaniach komórek zwierząt i człowieka, wynika to przede wszystkim ze zdecydowanie większej dostępności specyficznych sond DNA, podobnie jak ma to miejsce w standardowej technice FISH (Shaposhnikov i wsp. 2009; Hovhannisyany, 2000). Badania udziału wybranych regionów chromosomów lub sekwencji DNA w tworzeniu pęknięć DNA, szczególnie tych powstających w obu niciach DNA, jest szczególnie istotne biorąc pod uwagę fakt, że uszkodzenia te prowadzą do powstania aberracji chromosomowych. Badania udziału wybranych sekwencji DNA lub regionów chromosomów w powstawaniu uszkodzeń DNA, mogących świadczyć o ich zwiększonej wrażliwości na działanie mutagenów mogą być również prowadzone na poziomie chromosomu, dzięki zastosowaniu FISH z testami aberracji chromosomowych. Możliwa jest nie tylko analiza wrażliwości regionów chromosomów lub genów, ale również wykrywanie małych rearanżacji chromosomowych. Hybrydyzacja *in situ* może być szczególnie przydatna w badaniach morfologii chromosomów oraz przemian strukturalnych chromosomów u gatunków z małymi i słabo zróżnicowanymi chromosomami. Możliwe jest również porównanie udziału wybranych sekwencji DNA w powstawaniu pęknięć DNA oraz pęknięć chromosomów, których następstwem są aberracje chromosomowe. Ponadto możliwe jest określenie miejsc efektywnej naprawy DNA, jeśli aberracja chromosomowa nie występuje w obrębie danego regionu DNA, a brała udział w tworzeniu ogona komety. Badania aberracji chromosomowych z wykorzystaniem FISH u ssaków i człowieka są szeroko stosowane w diagnostyce klinicznej człowieka oraz znalazły zastosowanie w analizie genotoksyczności związków chemicznych oraz fizycznych. Sekwencje, które znalazły najszersze zastosowanie w cytogenetyce roślin, jako sondy do FISH to sekwencje wysoko powtarzalne, takie jak rDNA, sekwencje telomerowe oraz inne sekwencje powtarzalnego DNA (Bolzan i Bianchi, 2006). Szczególnie dogodnym markerem cytogenetycznym są geny kodujące rybosomalne RNA: 18S-5,8S-25S rRNA (45S rDNA) i 5S rRNA (5S rDNA). Z sekwencji niekodujących, jako sondy do FISH stosowane są sekwencje telomerowe DNA, stabilizujące końce chromosomów oraz sekwencje centromerowe DNA. Przykładowo FISH z telomerowymi sekwencjami DNA jako

sondami umożliwia wykrycie niewielkiej terminalnej delecji – brak sekwencji telomerowych w fizycznych końcach chromosomów jest jednoznacznym dowodem na zajście tej aberracji chromosomowej (Jovtchev i wsp. 2002).

Metoda FISH stwarza ponadto możliwość wykorzystania jej w badaniach przemian chromosomowych w komórkach nie dzielących się, jest to tzw. „cytogenetyka jądra interfazowego” (Maluszynska i wsp. 2003). Jest to szczególnie istotne biorąc pod uwagę fakt, że większość stosowanych czynników mutagennych obniża aktywność mitotyczną komórek, utrudniając tym samym analizę aberracji chromosomowych podczas mitozy. W takim przypadku lokalizacja sekwencji DNA w niedzielącym się jądrze komórkowym jest jedynym sposobem detekcji przemian chromosomowych.

Nieliczne dane literaturowe, dotyczące różnic we wrażliwości regionów chromosomów lub sekwencji DNA na działanie mutagenów w komórkach roślinnych, skłoniły mnie do podjęcia szerszych badań w tym zakresie z wykorzystaniem gatunków modelowych, takich jak *Hordeum vulgare* ( $2n=14$ ) i *Crepis capillaris* ( $2n=6$ ). Gatunki te charakteryzują się dogodnymi cechami genomu, takimi jak niewielka liczba chromosomów i ich stosunkowo duże rozmiary oraz wysoką wrażliwością na działanie mutagenów, co potwierdza wykorzystywanie ich w roślinnych testach genotoksyczności (Gecheff 1996, Grant i Owens 1998).

Podjęte przeze mnie badania były pionierskimi w zakresie analiz wrażliwości wybranych regionów chromosomów i genów na działanie mutagenów. Badania przeprowadzono analizując udział wybranych sekwencji DNA, charakterystycznych dla poszczególnych regionów chromosomów, w powstawaniu uszkodzeń, zarówno na poziomie DNA jak i chromosomów.

W celu określenia wrażliwości wybranych regionów chromosomów na działanie mutagenów zastosowano kombinację testu mikrojąder z FISH. Spośród wielu testów aberracji chromosomowych, test mikrojąder jest szeroko rekomendowany w ocenie genotoksycznego działania czynników fizycznych i chemicznych. Test ten stosowany jest przeważnie z zastosowaniem nieróżnicujących metod barwienia chromosomów lub, ostatnio, fluorochromów. Zastosowanie FISH z sekwencjami DNA specyficznymi dla poszczególnych chromosomów lub ich ramion, jako sondami umożliwia ustalenie pochodzenia mikrojąder. Kompletna identyfikacja wszystkich fragmentów chromosomowych w mikrojądrach z wykorzystaniem FISH wciąż nie jest możliwa w komórkach większości roślin. Jakościową analizę mikrojąder indukowanych działaniem dwóch modelowych mutagenów chemicznych: hydrazynu kwasu maleinowego (MH)



oraz nitrozo-metylo-mocznika (MNU), charakteryzujących się innym mechanizmem działania przeprowadzono w komórkach *H. vulgare*. Zastosowane mutageny działają w różnych fazach cyklu komórkowego: MH w fazie S, podczas, gdy MNU w fazie G2. MH jest związkiem klastogennym, powodującym pęknięcia chromosomu, ale wiadomo również, że prowadzi do zaburzeń wrzeciona podziałowego. W badaniach zastosowano FISH z 5S rDNA i 25S rDNA oraz telomerowym i centromerowym DNA jako sondami, z wykorzystaniem 2 eksperymentów hybrydyzacji wykonanych na tych samych preparatach chromosomowych, czyli tzw. hybrydyzacji sekwencyjnej („reprobing”). Badano udział specyficznych chromosomów lub ich fragmentów w tworzeniu mikrojąder na podstawie analizy lokalizacji sygnałów sond DNA zastosowanych w badaniach. Zastosowanie rDNA jako sond do FISH pozwoliło na analizę udziału chromosomów z 5S rDNA i 25S rDNA w tworzeniu mikrojąder. Z kolei zastosowanie telomerowego i centromerowego DNA jako sondy do FISH pozwoliło ustalić, czy całe chromosomy lub ich fragmenty są zaangażowane w tworzenie mikrojąder. W wymiarze metodycznym, przeprowadzone badania są pierwszym przykładem zastosowania „reprobingu” preparatów chromosomowych podczas FISH dla analizy aberracji chromosomowych. Wykazano, że zastosowanie reprobingu nie wpłynęło na utratę chromatyny i jakość sygnałów hybrydyzacyjnych w mikrojądrach. Na podstawie analizy sygnałów hybrydyzacyjnych wyróżniono 8 kategorii mikrojąder. Te same typy mikrojąder wyróżniono zarówno po traktowaniu MH jak i MNU, jednak wykazano różnice w częstotliwości poszczególnych typów mikrojąder powstałych po różnym traktowaniu. W przypadkach zarówno jednego jak i drugiego mutagenu najczęściej obserwowano mikrojądra z 2 sygnałami: sygnałem telomerowego DNA oraz 25S rDNA, jednak z różną częstotliwością: 46% po traktowaniu MH, 37% po traktowaniu MNU. Większe różnice w częstotliwości mikrojąder indukowanych działaniem MH i MNU obserwowano w przypadku mikrojąder tylko z sygnałami telomerowego DNA: 10% dla mikrojąder indukowanych działaniem MH, 28% - MNU. Wyniki te wskazują, że mikrojądra indukowane MNU powstają przeważnie z dystalnych fragmentów acentrycznych chromosomów, a mikrojądra indukowane MH - z dużych fragmentów acentrycznych, obejmujących loci rDNA położone interstycjalnie lub w pobliżu centromeru. Obecność mikrojąder z sygnałami telomerowego i centromerowego DNA obserwowano ze stosunkowo wysoką częstotliwością (12% - MH, 16% - MNU). Świadczyć to może o zaangażowaniu całych chromosomów w tworzenie mikrojąder. Wynik ten potwierdzał aneugeniczne działanie MH, znane z wcześniejszych badań, ale był dość zaskakujący dla

MNU. Z kolei obecność sygnałów rDNA wskazuje na możliwość udziału każdego z chromosomów jęczmienia, za wyjątkiem chromosomu nr 5 (nieposiadającego genów rRNA), w tworzenie mikrojąder. Przedstawione badania są jednym z niewiele przykładów analizy pochodzenia mikrojąder w komórkach roślinnych. Podsumowując, wykazano różnice w częstotliwości indukowanych działaniem MH i MNU mikrojąder, z poszczególnymi sekwencjami DNA, które mogą wskazywać na fakt, że pęknięcia chromosomów mogą być indukowane w innych specyficznych dla mutagenu miejscach chromosomów (**Juchimiuk i wsp. 2007**, Journal of Applied Genetics).

Spośród wiele czynników, które wpływają na cytogenetyczny efekt działania mutagenów, jest rodzaj mutagenu. Poprzednie badania wykazały, że pęknięcia chromosomów indukowane działaniem różnych mutagenów chemicznych powstają w specyficznych dla danego mutagenu miejscach chromosomów. Wyniki te skłoniły do podjęcia kolejnych badań, w których analizowano częstotliwości mikrojąder z określonymi sygnałami sond, indukowanych działaniem mutagenu fizycznego. W celu porównania pochodzenia mikrojąder indukowanych działaniem mutagenów chemicznych oraz fizycznych przeprowadzono test mikrojąder w kombinacji z FISH z 5S/25S rDNA oraz centromerowym/telomerowymi DNA jako sondami w komórkach merystematycznych korzeni jęczmienia po napromieniowaniu nasion promieniowaniem gamma (**Juchimiuk-Kwasniewska i wsp. 2011**, Journal of Applied Genetics). Mikrojądra indukowane działaniem promieniowania gamma pochodziły z fragmentów acentrycznych chromosomów lub z całych chromosomów opóźnionych jako wynik zaburzeń wrzeciona podziałowego. Nie obserwowano mikrojąder, które zawierały tylko sygnały centromerowego DNA, co mogłoby świadczyć o zajściu dwóch pęknięć DNA obejmujących centromer. Zastosowanie 5S rDNA i 25S rDNA jako sondy do FISH pozwoliło wykazać, że chromosomy niosące 5S rDNA są zaangażowane w tworzenie mikrojąder częściej, niż chromosomy z organizatorem jąderkowym (NOR). Wykazano różnice w częstotliwości mikrojąder z określonymi sygnałami po działaniu mutagenów fizycznych i chemicznych, co potwierdza wyniki badań poprzedniej pracy. Badania porównawcze udziału poszczególnych chromosomów lub ich fragmentów w tworzeniu mikrojąder indukowanych działaniem MNU lub MH oraz promieniowaniem gamma wykazały jednak pewne reguły w pochodzeniu mikrojąder, pomimo odmiennego mechanizmu działania zastosowanych mutagenów. Wykazano, że mikrojądra pochodziły głównie z terminalnych fragmentów chromosomów (po działaniu promieniowania i MH/MNU ok. 80% mikrojąder charakteryzowało się obecnością tylko sygnałów sondy

telomerowej). Tylko około 15% mikrojąder posiadało sygnały zarówno sondy centromerowej, jak i telomerowej, co może świadczyć o ich pochodzeniu z całych chromosomów, prawdopodobnie w wyniku zaburzeń wrzeciona podziałowego.

Pęknięcia DNA, które nie zostają naprawione, prowadzą do powstawania aberracji chromosomowych. Interesujące jest, czy preferencyjny udział wybranych sekwencji DNA reprezentujących określone regiony chromosomów w powstawaniu aberracji chromosomowych będzie również obserwowany na poziomie DNA jako preferencyjny udział tych sekwencji w powstawaniu pęknięć DNA. Zastosowanie kombinacji testu kometowego z FISH umożliwiło analizę udziału wybranych regionów chromosomów w pęknięciach DNA. Pozwoliło to następnie na porównanie czy wykazane różnice we wrażliwości tych regionów na działanie mutagenów, jeśli analizowane są na poziomie chromosomów i DNA, są podobne. W badaniach, jako gatunek modelowy wykorzystano *Crepis capillaris*, którego kariotyp charakteryzuje się tylko 3 parami chromosomów ( $2n=6$ ), z których tylko jedna wyróżnia się obecnością 5S rDNA i 25S rDNA. Celem badań było ustalenie, czy geny rRNA są preferencyjnie zaangażowane w tworzenie ogona komety po działaniu mutagenu chemicznego - hydrazynu kwasu maleinowego. Podjęto również próbę analizy efektywności procesów naprawy DNA w obrębie obszarów rDNA dzięki zastosowaniu 24h czasu postinkubacji (**Kwasniewska i wsp. 2012**, Environmental and Molecular Mutagenesis). Wykazano obecność sygnałów 5S rDNA i 25S rDNA w ogonie komety zarówno w komórkach kontrolnych jak i po traktowaniu. Obserwowano 2 rodzaje sygnałów, w postaci włókien chromatynowych oraz pojedynczych sygnałów punktowych. Nie analizowano liczby sygnałów FISH w ogonie, jednak zaobserwowano, że były one dużo liczniejsze po traktowaniu mutagenem, niż w komórkach kontrolnych. Wskazuje to na fakt, że rDNA podlega silnej fragmentacji w wyniku działania mutagenu. W przeprowadzonych badaniach komety zakwalifikowano do 5 kategorii, ustalonych na podstawie rozmieszczenia sygnałów FISH oraz morfologii komet. Wykazano zróżnicowaną wrażliwość sekwencji rDNA w odpowiedzi na traktowanie MH: 5S rDNA było częściej zaangażowane w tworzenie ogona komet niż 25S rDNA. Różnica w odpowiedzi 5S rDNA i 25S rDNA na działanie mutagenu może wynikać z lokalizacji tych sekwencji w obrębie regionów chromatyny o różnej strukturze. Geny 45S rRNA, złożone z tandemowych powtórzeń 18S-5,8S-25S rDNA, tworzą jąderko, co w konsekwencji może wpływać na ich migrację w polu elektrycznym podczas elektroforezy. Ponadto, około 70-90% powtórzeń 18S-5,8S-25S rDNA położone jest w obrębie heterochromatyny NOR. W przeciwieństwie do 25S rDNA, 5S rDNA jest w

całości zlokalizowane w obrębie euchromatyny. Różnice we wrażliwości euchromatyny i heterochromatyny na działanie mutagenów są dobrze znane. Ponadto, związek sekwencji DNA z błoną jądrową lub matriks jądrowym ogranicza zdolność migracji DNA z głowy do ogona, co wykazano między innymi dla sekwencji telomerowych DNA (Arutyunyan i wsp. 2004). Analiza częstotliwości komet poszczególnych kategorii w 0 i 24h postinkubacji wykazała, że uszkodzenia DNA indukowane działaniem MH, obejmujące 5S rDNA i 25S rDNA, są naprawiane. Badania te potwierdziły wyniki wcześniejszych analiz z wykorzystaniem testu mikrojąder w kombinacji z FISH, w których wykazano, że 25S rDNA często bierze udział w tworzeniu tych aberracji. Podsumowując, zastosowanie comet-FISH umożliwiło porównanie udziału różnych sekwencji DNA w powstawaniu bezpośrednich uszkodzeń DNA. Comet-FISH może być wykorzystany w wyjaśnieniu zależności pomiędzy strukturą chromatyny, a lokalizacją uszkodzeń DNA w genomie roślin. Wyniki badań znalazły szerokie zainteresowanie, wyrażone cytowaniem publikacji, w takich czasopismach jak *Chemosphere*, *Methods in Molecular Biology*, czy *Oncology Reports*, przez naukowców wykorzystujących w badaniach komórki człowieka.

Niezwykle istotny wynik powyższych badań skłonił do podjęcia kolejnych analiz, których celem było sprawdzenie, czy wyższa wrażliwość genów 5S rRNA w porównaniu do genów 25S rRNA wykazana u *C. capillaris* jest gatunkowo specyficzna lub wynika z liczby loci tych genów u tego gatunku. Ponadto badania rozszerzono wykorzystując inne, niż MH mutageny, zarówno fizyczne jak i chemiczne. Metoda comet-FISH opracowana dla gatunku modelowego *Crepis capillaris* została wykorzystana w porównawczych badaniach efektu działania trzech mutagenów, stosowanych we wcześniejszych badaniach: hydrazynu kwasu maleinowego (MH), nitrozo-metylomocznika (MNU) oraz promieniowania gamma w komórkach *Hordeum vulgare* (Kwasniewska i wsp. 2013, *Journal of Applied Genetics*). Z wykorzystaniem comet-FISH z 5S/25S rDNA oraz telomerowym/centromerowym DNA jako sondami analizowano uszkodzenia DNA oraz kinetykę naprawy DNA w obrębie tych sekwencji. Analiza rozmieszczenia sygnałów FISH o obrębie komet wykazała, że zaangażowanie poszczególnych sekwencji DNA w tworzenie ogonów komet było różne w zależności od zastosowanego mutagenu. Jednak wyniki badań udziału poszczególnych sekwencji DNA w tworzeniu ogonów komet po działaniu MH, MNU i promieniowania gamma potwierdziły wcześniejsze wyniki, stwierdzające wyższą wrażliwość 5S rDNA niż 25S rDNA na działanie MH w komórkach *C. capillaris*. Pozwoliło to na stwierdzenie, że wyższa wrażliwość 5S rDNA

niż 25S rDNA na działanie mutagenów nie jest gatunkowo specyficzna ani nie zależy od rodzaju mutagenu. Wykazano natomiast różnice we wrażliwości 25S rDNA na rodzaj zastosowanego mutagenu, mianowicie 25S rDNA było bardziej wrażliwe na działanie mutagenów chemicznych, niż promieniowania gamma. Comet-FISH z telomerowym i centromerowym DNA jako sondami wykazała, że sekwencje telomerowe DNA są częściej zaangażowane w tworzenie ogonów komet, niż sekwencje centromerowe, wskazujące tym samym, że pęknięcia DNA występują preferencyjnie w pobliżu terminalnych regionów chromosomów. Taka lokalizacja miejsc pęknięć DNA może wynikać z istnienia tzw. 'hot spots' w pobliżu sekwencji telomerowych. Wyniki badań udziału wybranych regionów DNA w powstawanie pęknięć DNA potwierdziły rezultaty wcześniejszych badań ich zaangażowania w powstawanie aberracji chromosomowych. Podsumowując, potwierdzono, że comet-FISH jest czułą techniką szczegółowej analizy uszkodzeń DNA i jego naprawy w obrębie specyficznych sekwencji DNA, i może być stosowany do stosowania w mutagenezie roślin do szczegółowej oceny efektu działania mutagenów.

Istnieje wiele czynników, które wpływają na cytogenetyczny efekt działania mutagenów. Efekt ten determinowany jest przez kilka czynników, takich jak zdolność mutagenów do penetracji tkanek, komórek i jądra komórkowego, czy rodzaj i dawka mutagenu. Efekt genetyczny działania mutagenu jest różny dla różnych gatunków roślin, a nawet odmian. Gatunkowe różnice we wrażliwości na działanie mutagenów wydają się być związane z wielkością jądra komórkowego i zawartości DNA. Istotną rolę w odpowiedzi gatunku na mutagen odgrywa stopień kondensacji chromatyny i wielkość genomu jądrowego (Underbrink i wsp. 1968). Z wpływem tych czynników na genetyczny efekt działania mutagenu związane są dwie teorie: teoria „bodyguard” (Hsu, 1975) oraz teoria „ABCW” (Plewa i wsp. 1983). Według pierwszej z tych teorii heterochromatyna konstytutywna może chronić euchromatynę przed działaniem mutagenów. Heterochromatyna podczas interfazy jest zlokalizowana w pobliżu błony jądrowej pełniąc tym samym funkcję absorbującą działanie mutagenu. Teoria „ABCW” głosi, że częstotliwość mutacji indukowana mutagenami jest proporcjonalna do zawartości DNA. Szczególnie odpowiednimi modelami do weryfikacji powyższych teorii są gatunki roślin, które charakteryzują się obecnością chromosomów B. Dotychczasowe badania dotyczące chromosomów B wykazały, że wpływają one na wiele procesów, m.in. kondensację chromatyny, aktywność transkrypcyjną i inne, jednak badania wpływu ich obecności na poziom uszkodzeń DNA w formie pęknięć nie jest znany. Prowadzone przed kilku laty

badania wpływu chromosomów B *Zea mays* na częstotliwość mutacji punktowych indukowanych działaniem metanosulfonianu etylu (EMS) wykazały, że obecność chromosomów dodatkowych zwiększa wrażliwość komórek na działanie mutagenu (Weber i wsp. 2007).

W ramach kontynuacji badań dotyczących wrażliwości jądrowego genomu roślinnego na działanie mutagenów przeprowadzono badania wrażliwości genomu w obecności chromosomów B. Badania te są pierwszym przykładem analizy korelacji pomiędzy obecnością chromosomów B i bezpośrednimi uszkodzeniami DNA powodowanymi przez mutageny. Analizy przeprowadzono w modelowym układzie eksperymentalnym: obiektem badań był *Crepis capillaris* ( $2n=6$ ), z różną liczbą chromosomów B, od 0 do 3, a uszkodzenia DNA indukowane były działaniem mutagenu chemicznego - MH. Analizę poziomu uszkodzeń genomowego DNA analizowano w alkalicznej wersji testu kometowego. Podjęto również badania udziału genów 25S rRNA w uszkodzeniach DNA z wykorzystaniem techniki comet-FISH (**Kwasniewska i wsp. 2014**, PLOS ONE). Wykazano, że obecność chromosomów B ma znaczący wpływ na poziom uszkodzeń DNA indukowanych działaniem MH. Poziom uszkodzeń DNA był skorelowany z liczbą chromosomów B – znaczący wzrost poziomu uszkodzeń DNA obserwowano u roślin z 3 chromosomami B. Wyniki te potwierdzają istnienie zależności pomiędzy efektem działania mutagenu, a zawartością jądrowego DNA. W badaniach nie potwierdzono założeń teorii, głoszącej, że heterochromatyna konstytutywna stanowi barierę dla mutagenów, chroniącą euchromatynę. Obecność chromosomów B w komórkach somatycznych *C. capillaris* zwiększa całkowitą zawartość heterochromatyny, ale fakt ten nie wpływa na zmiany w powstawaniu uszkodzeń DNA. Analiza uszkodzeń DNA obejmujących region 25S rDNA wykazała fragmentację w obrębie lub w pobliżu loci tych genów, zlokalizowanych zarówno w chromosomach A, jak i w chromosomach B. Badania wykazały, że obecność chromosomów B w komórkach *C. capillaris* wpływa na poziom uszkodzeń DNA obejmujący obszar 25S rDNA. Wyższą stabilność 25S rDNA stwierdzono w komórkach bez chromosomów B, niż w komórkach z chromosomami B. W ocenie i porównaniu efektu działania różnych mutagenów, o różnych dawkach zastosowanych dla traktowania różnych gatunków i tkanek, jak i w badaniach genotoksyczności czynników środowiskowych, wykorzystywane były do tej pory testy aberracji chromosomowych oraz testy oceny bezpośrednich uszkodzeń DNA (Grant i wsp. 1994; Ma, 1999; Maluszynska, Juchimiuk, 2005; Natarajan 2005). Częstotliwość przemian chromosomowych dotychczas analizowano jedynie z zastosowaniem prostych

nieróżnicujących barwień chromosomów, takich jak barwienie odczynnikami Giemsy, acetoorceiną lub metoda Feulgena. Opracowanie w trakcie moich badań cytomolekularnych narzędzi analizy zmian w DNA i chromosomach indukowanych mutagenami w materiale roślinnym, oprócz znaczenia na gruncie badań podstawowych stwarza także potencjalną możliwość ich wykorzystania aplikacyjnego w charakterze czułych testów wczesnego wykrywania i oceny efektu działania środowiskowych czynników genotoksycznych.

**Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników można sformułować następujące wnioski:**

1. Miejsca powstawania pęknięć chromosomów w komórkach roślinnych mogą być specyficzne dla różnych mutagenów i zależeć od mechanizmu ich działania.
2. Sekwencje DNA charakteryzują się zróżnicowaną wrażliwością na działanie poszczególnych mutagenów.
3. Istnieją różnice we wrażliwości 5S rDNA i 25S rDNA na działanie mutagenów. Chromosomy charakteryzujące się obecnością loci 5S rDNA są zaangażowane w tworzenie mikrojąder częściej, niż chromosomy z 25S rDNA. Istnieją różnice we wrażliwości sekwencji 5S rDNA i 25S rDNA w odpowiedzi na traktowanie mutagenem: geny 5S rRNA częściej podlega fragmentacji niż geny 45S rRNA. Wyższa wrażliwość 5S rDNA niż 25S rDNA na działanie mutagenów nie jest gatunkowo specyficzna i nie zależy od rodzaju mutagenu. Uszkodzenia DNA w formie pęknięć, indukowane działaniem MH obejmujące 5S i 25S rDNA, ulegają naprawie.
4. Udział wybranych sekwencji DNA w powstawaniu uszkodzeń DNA w formie pęknięć oraz powstawaniu aberracji chromosomowych jest podobny.
5. W obecności chromosomów B poziom uszkodzeń DNA indukowanych działaniem mutagenu wzrasta. Podobnie, wrażliwość obszarów 25S rDNA była wyższa w komórkach z chromosomami B.

Najważniejszym wynikiem poznawczym badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe jest stwierdzenie, że wrażliwość genomu roślinnego na działanie mutagenów zależy od rodzaju sekwencji DNA, w obrębie której powstaje uszkodzenie DNA oraz od rodzaju czynnika mutagennego.

Z kolei najważniejszym wynikiem metodycznym jest opracowanie metody comet-FISH dla komórek roślinnych różnych gatunków oraz wykorzystanie jej w zainicjowanych cytomolekularnych badaniach uszkodzeń DNA w komórkach roślinnych.

## Literatura

Arutyunyan R, Gebhart E, Hovhannisyany GG, Greulich KO, Rapp A. 2004. Comet-FISH using peptide nucleic acid probes detects telomeric repeats in DNA damaged by bleomycin and mitomycin C proportional to general DNA damage. *Mutagenesis* 19: 403–408.

Bolzan AD, Bianchi MS. 2006. Telomeres, interstitial repeat sequences and chromosomal aberrations. *Mutat Res* 612: 189-214.

Cann KL and Dellaire G. 2011. Heterochromatin and DNA damage response: The need to relax. *Biochem Cell Biol* 89: 45–60.

Collins AR. 2002. The comet assay. Principles, applications and limitations. *Methods Mol Biol* 203: 163-77.

Gecheff KI. 1996. Production and identification of new structural chromosome mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 92: 777-81.

Georgieva M and Stoilov L. 2008. Assessment of DNA strand breaks induced by bleomycin in barley by the comet assay. *Environ Mol Mutagen* 49(5): 381-387.

Gichner T, Plewa MJ. 1998. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutat Res* 401: 143-152.

Grant WF, Salamone MF. 1994. Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutat Res* 310: 187-209.

Grant WF, Owens ET. 1998. Chromosome aberration assays in *Crepis* for the study of environmental mutagens. *Mutat Res* 410: 291-307.

Hovhannisyany GG. 2000. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Mol Cytogenet* 3: 1-17.

Hsu TS. 1975. A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics* 79: 137-150.

Jovtchev G, Stergios M, Schubert I. 2002. A comparison of N-methyl-N-nitrosourea-induced chromatid aberrations and micronuclei in barley meristems using FISH techniques. *Mutat Res* 517: 47-51.

**Juchimiuk J**, Hering B, Maluszynska J. 2007. Multicolor FISH in analysis of chromosome aberrations in barley cells induced by MH and MNU. *J App Genet* 48(20): 99-106.

**Juchimiuk-Kwasniewska J**, Brodziak L, Maluszynska J. 2011. FISH in analysis of gamma ray-induced micronuclei formation in barley. *J App Genet* 51(1): 23-29.



- Kwasniewska J**, Grabowska M, Kwasniewski M, Kolano B. 2012. Comet-FISH using rDNA probes in analysis of mutagen-induced DNA damage in plant cells. *Environ Mol Mutagen* 53(5): 369-375.
- Kwasniewska J**, Kwasniewski M. 2013. Comet-FISH for the evaluation of plant DNA damage after mutagenic treatments. *J App Genet* 54 (4): 407-415.
- Kwasniewska J**, Mikolajczyk A. 2014. Influence of the presence of B chromosomes on DNA damage in *Crepis capillaris*. *PLOS ONE* 9(1): e87337.
- Kwasniewska J**. 2014 (publication date: 2014/06/01). Mutagenic effects at DNA and chromosome level. In: *Mutagenesis: exploring novel genes and pathways*. Eds: Tomlekova N, Kozgar I and Wani R. Chapter 17, 333-354. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, Enfield Pub & Distribution Co. DOI 103920/978-90-8686-787-5\_17
- Ma TH, Cabrera GL, Gill BS, Sandhu SS, Vandenberg AL, Salamone MF. 1994. Tradescantia micronucleus bioassay. *Mutat Res* 310: 221-30.
- Ma TH. 1999. The role of plant systems for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 437: 97-100.
- Maluszynska J, Juchimiuk J, Wolny E. 2003. Chromosomal aberrations in *Crepis capillaris* cells detected by FISH. *Folia Histochem Cytobiol* 41: 101–104.
- Maluszynska J and Juchimiuk J. 2005. Plant genotoxicity. Molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arch Ind Hyg Toxicol* 56: 177-184.
- Menke M, Angelis KJ, Schubert I. 2000. Detection of specific DNA lesions by a combination of comet assay and FISH in plants. *Environ Mol Mutagen* 35: 132-138.
- Menke, M., Chen, I.-P., Angelis, K.J., Schubert, I., 2001. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutat Res* 493: 87-93.
- Natarajan AT. 2005. Chromosome aberrations: plants to human and Feulgen to FISH. *Curr Sci* 89: 335-340.
- Olive PL. 2002. The comet assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol* 203: 179-194.
- Pfeiffer P, Gottlich B, Reichenberger S, Feldmann E, Daza P, Ward JF, Milligan JR, Mullendres LHF, Natarajan AT. 1996. DNA lesions and repair. *Mutat Res* 366: 69-80.
- Plewa MJ, Dowd PA, Schy WE, Wagner ED. 1983. Induced forward mutation at the yg2 locus in *Zea mays* and comparison with the ABCW relationship. *Maize Gen Coop Newsl* 57: 147-149.
- Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT. 1997. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp Cell Res* 232: 407-411.
- Schubert I, Pecinka A, Meister V, Klatt M, Jovtchev G. 2004. DNA damage processing and aberration formation in plants. *Cytogenet Genome Res* 104: 104-108.
- Shaposhnikov S, Frengen E, Collins AR. 2009. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization – a review. *Mutagenesis* 24(5): 383-389.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221.

Underbrink AG, Sparrow RC, Pond DV. 1968. Chromosome and cellular radiosensitivity II. Use of interrelationships among chromosome volume, nucleotide content and dose of 120 diverse organisms in predicting radiosensitivity. *Radiat Bot* 8: 205-237.

Weber DF, Plewa MJ, Freazel R. 2007. Effect of B chromosomes on induced and spontaneous mutation frequencies in maize. *Maydica* 52: 109-115.

Volpi EV, Bridger JM. 2008. FISH Glossary an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques* 45 (4): 385-409.

## D) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Działalność naukową rozpoczęłam w ramach pracowni magisterskiej w 1995 roku, jako studentka IV roku Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Pracę magisterską wykonywałam pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Małuszyńskiej w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin. W ramach pracy badałam morfologię kwiatu i strukturę systemu przewodzącego w elementach kwiatu mutantu *pistillata Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* jest modelowym obiektem badań nad genetyczną regulacją morfogenezy kwiatu i innych organów. Rozmieszczeniu i strukturze tkanek przewodzących w kwiecie przypisuje się, jako cechom konserwatywnym ewolucyjnie, szczególne znaczenie w określaniu tożsamości organów kwiatu. Poznano kilkadziesiąt genów biorących udział w regulacji rozwoju kwiatu, w tym gen *PISTILLATA 1 (PII)*, w którym mutacja prowadzi do braku pręcików. Praca była próbą pełnego opisu aberracji w budowie kwiatu roślin mutantu *pistillata 1-1* oraz zrozumienia zależności między morfologią organów kwiatu i ich wzorami tkankowymi, z uwzględnieniem zmienności w budowie na poziomie osobnika, jak i kwiatostanu. Wyniki badań przedstawiłam w pracy magisterskiej „System przewodzący i aberracje w budowie organów kwiatowych mutantu *pistillata Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.”, którą obroniłam 4 lipca 1997 roku z wynikiem bardzo dobrym.

Po uzyskaniu stopnia magistra zostałam zatrudniona na okres 1 roku na etacie asystenta w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. W tym okresie rozpoczęłam wstępne badania dotyczące efektów działania mutagenów w genomie roślinnym.

1 października 1998 roku zostałam przyjęta na stacjonarne studium doktoranckie przy Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Równocześnie zostałam zatrudniona w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin na ½ etatu asystenta. Jako doktorantka rozpoczęłam badania w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Małuszyńskiej nad wrażliwością komórek roślinnych na działanie czynników mutagennych.

W czasie realizacji pracy doktorskiej podjęłam współpracę z Zakładem Biologii Radiacyjnej i Środowiskowej, Instytutu Fizyki Jądrowej im. H. Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, kierowanego przez prof. dr hab. Antoninę Cebulską-Wasilewską. W ramach współpracy podjęłam badania dotyczące optymalizacji dawek promieniowania X dla komórek *C. capillaris*. Współpraca została również

nawiązana w celu wzbogacenia warsztatu badawczego obejmującego mutagenezę roślin *Tradescantia*: testu włosków pręcikowych (Trad-SHM), oraz testu mikrojąder (Trad-MCN).

Rada Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska otworzyła przewód doktorski 19 września 2000 roku. Temat pracy doktorskiej brzmiał "Wrażliwość komórek *Crepis capillaris* ma działanie czynników mutagennych". Realizowany w ramach pracy doktorskiej projekt został zgłoszony do Komitetu Badań Naukowych oraz zakwalifikowany do realizacji, jako grant promotorski (Grant KBN nr 6PO4C 067 21, 2001-2003). Praca doktorska przedstawia wyniki badań dotyczących wrażliwości komórek *Crepis capillaris*, w różnych układach *in vivo* i *in vitro*, na mutageny chemiczne i fizyczne. W pracy badano, czy na efekt działania egzogennych czynników w komórce ma wpływ fakt, że badana komórka jest częścią składową rośliny, izolowanego organu, czy odróżnicowanej tkanki kalusowej. Do badań wybrano trzy typy czynników różniących się mechanizmem działania:

- hydrazyd kwasu maleinowego (MH) – mutagen charakteryzujący się działaniem w fazie S cyklu komórkowego
- promieniowanie X – mutagen fizyczny powodujący pęknięcia nici DNA
- oryzalinę – związek stosowany jako herbicyd, działający na mikrotubule w wyniku czego mogą powstawać komórki poliploidalne i aneuploidalne.

Efekt działania tych czynników badano w komórkach merystematycznych wierzchołków korzeni pierwotnych (uzyskanych z traktowanych nasion lub siewek), w komórkach merystematycznych wierzchołków korzeni hodowanych *in vitro* tzw. *hairy roots* oraz tkanki kalusowej. Efekt działania stosowanych czynników analizowano wykorzystując proste, tradycyjne testy roślinne (test aberracji chromosomowych i mikrojąder, test wymiany siostrzanych chromatyd - SCE) oparte na tradycyjnych metodach barwień chromosomów oraz inne, nowoczesne techniki takie jak elektroforeza pojedynczych komórek - test kometowy, test TUNEL, badania fazy S cyklu komórkowego z wykorzystaniem immunocytochemicznego wykrywania zaincorporowanej bromodeoksyurydyny, badania układu mikrotubul, oraz fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH). Badanie cytologicznego efektu działania mutagenów uzupełniono obserwacjami morfologicznymi w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM). Badania porównawcze dotyczące wpływu badanych czynników na komórki *Crepis capillaris* wykazały istnienie różnic w ich wrażliwości. Najwyższą wrażliwością charakteryzowały się komórki kalusa, następnie korzeni hodowanych *in*

*vitro*, najniższą - korzeni roślin. Wrażliwość korzeni będących integralną częścią całej rośliny zależała od sposobu traktowania: efekt działania był większy po traktowaniu siewek, niż zarodków w nasieniu. Wykazana wysoka drażliwość korzeni transgenicznych hodowanych *in vitro* pozwala na wykorzystanie ich w badaniach nad przebiegiem cyklu komórkowego i przemianami chromosomowymi powstającymi pod wpływem czynników mutagennych i stresowych, jak również w testach szacowania szkodliwości czynników genotoksycznych.

Zastosowane testy do oceny efektów działania stosowanych czynników wykorzystujące metody cytogenetyki molekularnej pozwoliły nie tylko na szczegółową analizę powstałych uszkodzeń komórkowych, ale okazały się znacznie czulsze niż tradycyjne testy. Test TUNEL, stosowany dotychczas jedynie w badaniach apoptozy, znalazł zastosowanie w szybkim szacowaniu poziomu uszkodzeń DNA w formie pęknięć powstających w wyniku działania mutagenów lub kultury *in vitro*. Technika FISH, dotychczas rzadko stosowana w mutagenezie roślin, umożliwiła detekcję niewielkich aberracji chromosomowych oraz ich szczegółową analizę w komórkach dzielących się oraz w jądrach interfazowych.

Recenzentami w przewodzie doktorskim były: prof. dr hab. Maria Olszewska (Uniwersytet Łódzki) i prof. dr hab. Maria Charzyńska (Uniwersytet Warszawski). Obrona pracy doktorskiej odbyła się 18 września 2002 roku. Stopień doktora nauk biologicznych został zatwierdzony 20 września 2002 roku. Rada Wydziału Biologii Ochrony Środowiska jednomyślnie przyjęła wniosek obydwu Recenzentów o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. W 2003 roku praca doktorska została wyróżniona przez JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach nagrodą dla najlepszej pracy doktorskiej. Poster prezentujący wyniki badań pracy doktorskiej został nagrodzony przez Komitet Naukowy podczas I Konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin w 2003 roku (zajęcie I miejsca w konkursie na najlepsze doniesienie plakatowe). Wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej zostały opublikowane w roku 2005 w *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (Juchimiuk, Maluszynska, 2005).

Po przeprowadzeniu postępowania konkursowego, od 1 października 2002 zostałam zatrudniona w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach na etacie adiunkta i kontynuowałam pracę naukową pod kierunkiem prof. dr. hab. Jolanty Małuszyńskiej.

Jednym z kierunków badań realizowanych przeze mnie po uzyskaniu stopnia doktora były badania, stanowiące kontynuację prac prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, dotyczące efektu działania mutagenów w genomie roślinnym, obejmujące analizę bezpośrednich uszkodzeń DNA oraz rearanżacji chromosomowych. Drugi z realizowanych kierunków prowadzonych przeze mnie badań obejmował analizę zmian w genomie roślinnym w warunkach kultury *in vitro* jako czynnika stresowego. Istotny kierunek moich zainteresowań naukowych związany jest z oceną genotoksyczności czynników środowiskowych na podstawie badań zmian w chromosomach i DNA komórek roślinnych.

### **Badania efektu działania mutagenów chemicznych i fizycznych na genom jądrowy roślin i DNA**

Wstępne badania dotyczące efektu działania mutagenów chemicznych i fizycznych na chromosomy i DNA prowadzone przeze mnie dotyczyły wykorzystania techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w szczegółowej analizie aberracji chromosomowych w komórkach *C. capillaris*, indukowanych działaniem mutagenów. Technika FISH, dotychczas powszechnie stosowana w badaniach Katedry Anatomii i Cytologii Roślin dotyczących struktury i ewolucji genomu roślinnego została wprowadzona do analiz aberracji chromosomowych indukowanych mutagenami. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w 2003 roku w czasopiśmie *Folia Histochemica et Cytobiologica* (Maluszynska i wsp. 2003). W pracy przedstawiono przykłady detekcji i szczegółowej analizy mikrojąder oraz aberracji chromosomowych w komórkach dzielących się z wykorzystaniem FISH z telomerowym DNA oraz rDNA jako sondami. Podsumowanie tych prac na tle aktualnej literatury było prezentowane na międzynarodowej konferencji – 3rd Croatian Congress of Toxicology, Plitvice, Croatia, 26-29 maj 2004, a następnie opublikowane w 2005 roku w *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* (Maluszynska, Juchimiuk, 2005).

W latach 2002 i 2003 odbyłam miesięczne staże w Laboratory of Mutation Genetics, Institute of Experimental Botany w Pradze, kierowanym przez dr Tomasa Gichnera, wybitnego eksperta w zakresie mutagenyzy roślin, w tym techniki testu kometowego w komórkach roślinnych. Staże te pozwoliły mi udoskonalić technikę testu kometowego, a szczególnie etap izolacji jąder komórkowych oraz analizy wyników, następnie zaś umożliwiły jej stosowanie dla różnego rodzaju materiału roślinnego, takiego jak zarodki, korzenie, liście oraz kalus. Szerokie doświadczenie w z zakresie testu

kometowego zdobyte w ramach powyższych stażów ułatwiło mi również adaptację oraz wdrożenie testu kometowego dla komórek zwierzęcych – neuroblastów koników polnych *Chorthippus brunneus*. Zaadaptowaną metodę badawczą wykorzystałam w realizacji grantu KBN nr 2 P04G 006 27 „Wiek matki oraz stopień zanieczyszczenia środowiska a możliwości detoksykacyjne potomstwa koników z rodziny *Acrinida*” w ramach współpracy z Katedrą Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach w latach 2004-2007. W wymienionym powyżej grantie pełniłam rolę wykonawcy, a w ramach realizowanego przeze mnie zadania badawczego analizowałam poziom uszkodzeń DNA w komórkach neuroblastów koników polnych z terenów zanieczyszczonych cynkiem w wyniku działalności przemysłowej oraz terenów nieskażonych. W celu zbadania wpływu procesu adaptacji na poziom uszkodzeń DNA, koniki te dodatkowo poddawano działaniu cynku w warunkach laboratoryjnych. Badania nie wykazały istotnych różnic w poziomie uszkodzeń DNA w komórkach koników z rejonów czystych oraz zanieczyszczonych związkami cynku, jednak pęknięcia DNA powstawały w wyniku działania cynku, na który koniki narażone były w warunkach laboratoryjnych. Po ekspozycji na cynk w tych samych dawkach w warunkach laboratoryjnych poziom uszkodzeń DNA był niższy w komórkach koników z terenów czystych, niż zanieczyszczonych, pomimo podobnego poziomu przed podaniem cynku. W świetle otrzymanych wyników dyskutowano w aspekty molekularnych mechanizmów obronnych u owadów podczas adaptacji na działanie metali ciężkich. W eksperymentach, w których koniki ekspozowano na cynk w warunkach laboratoryjnych wykazano zależność pomiędzy stężeniem tego metalu, jego zawartością w komórkach neuroblastów i poziomem uszkodzeń DNA. Wykazano, że poziom uszkodzeń DNA mierzony w komórkach neuroblastów koników polnych jest odpowiednim parametrem oceny ekspozycji owadów na działanie metali ciężkich. Wyniki badań realizowane w ramach grantu zostały opublikowane w czasopiśmie *Comparative Biochemistry and Physiology* (Augustyniak i wsp. 2006) oraz zaprezentowane na konferencjach zagranicznych.

Doświadczenie zdobyte w pracy z komórkami bezkręgowców ułatwiły adaptację metody testu kometowego dla komórek człowieka. Przeprowadziłam analizę porównawczą wrażliwości komórek roślinnych oraz człowieka. W prowadzonych dotychczas badaniach porównawczych wrażliwości komórek roślin i człowieka mutagenem traktowano komórki roślinne lub całe rośliny. W przeprowadzonych przez mnie badaniach wykorzystałam subkomórkową wersję testu kometowego, w której

traktowaniu mutagenicznemu poddano izolowane jądra komórkowe liści *Nicotiana tabacum* oraz leukocyty. Wykazano wyższą wrażliwość jąder komórkowych człowieka niż komórek roślinnych, co związane jest prawdopodobnie z różnicami w wielkości i innych cechach genomu, przykładowo takimi jak stosunek zawartości heterochromatyny do euchromatyny. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w czasopiśmie *Folia Histochemica et Cytobiologica* (Juchimiuk i wsp. 2006).

Wyniki dotychczasowych badań i znajomość opracowanych technik zaowocowały zaproszeniem do współpracy w ramach międzynarodowego grantu “Physical mapping technologies for the identification and characterization of mutated genes contributing to crop quality”, którego celem było uzupełnienie prowadzonych od wielu lat programów hodowlanych zbóż dla ulepszenia ich jakości o charakterystykę mutantów z zastosowaniem technologii fizycznego mapowania genów i innych technik, takich jak markery molekularne. Poznanie ekspresji genów i ich fizycznej lokalizacji w chromosomach miało umożliwić selekcję dogodnych genotypów mutantów otrzymanych w wyniku mutagenyzy fizycznej i chemicznej. Grant ten, realizowany w latach 2002-2008, finansowany był przez Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. W grantie pełniłam funkcję kierownika i jednego z wykonawców. W ramach grantu realizowano zadanie badawcze „Mutagenesis and physical mapping of genes in crops with small chromosomes”, w ramach, którego charakteryzowano efekt działania mutagenów chemicznych i fizycznych w genomie roślinnym z zastosowaniem nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej. W ramach badań analizowano korelacje pomiędzy poziomem pęknięć DNA a częstotliwością aberracji chromosomowych po traktowaniu mutagenami fizycznymi (promieniowaniem gamma) i chemicznymi (MH i MNU) w komórkach korzeni *H. vulgare*. Wykazano istnienie korelacji pomiędzy wynikami testów: kometowego i aberracji chromosomowych po działaniu promieniowania gamma, podczas gdy po traktowaniu mutagenami chemicznymi nie obserwowano wyraźnej zależności pomiędzy poziomem uszkodzeń DNA i częstotliwością aberracji chromosomowych. Wyniki wskazują, że test kometowy może stanowić alternatywę dla testu aberracji chromosomowych w celu oceny uszkodzeń DNA w genomie roślinnym po działaniu czynników fizycznych. Ponadto, opracowano metody analizy poziomu pęknięć DNA w teście kometowym i częstotliwości jąder komórkowych z pęknięciami DNA w teście TUNEL w komórkach zarodków jęczmienia, w celu wykorzystania ich w ocenie działania mutagenów na wczesnych etapach rozwoju rośliny. Podjęte badania miały również na celu stworzenie map cytogenetycznych dla



gatunków roślin z małymi chromosomami, takimi jak gatunki z rodzaju *Chenopodium* i *Brassica*, z wykorzystaniem FISH z różnymi sekwencjami DNA: klonami BAC oraz sekwencjami DNA podobnymi do retroelementów i transpozonów jako sondami. W ramach projektu uczestniczyłam w czterech “Coordinating Meetings” w: Wiedniu (2 spotkania), Reykjavíku i Cordobie (Argentyna) prezentując w formie ustnych wystąpień rezultaty badań członków zespołu realizującego grant. Wyniki projektu zostały opublikowane w cyklicznie ukazującym się wydawnictwie IAEA (Juchimiuk-Kwasniewska i wsp. 2011). W ramach projektu w 2003 roku uczestniczyłam w tygodniowym kursie “Fluorescent *in situ* hybridization” w IAEA Laboratories w Seibersdorfie organizowanym przez International Atomic Energy Agency, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Uczestnictwo w kursie pozwoliło mi udoskonalić techniki cytogenetyki molekularnej, a szczególnie fluorescencyjną hybrydyzację *in situ*.

W trakcie trwania projektu “Mutagenesis and physical mapping of genes in crops with small chromosomes” nawiązałam współpracę z Multidisciplinary Institute of Plant Biology (Imbiv) w Cordobie (Argentyna). Podjęte wspólne badania dotyczyły określenia somatycznego i genetycznego efektu działania promieniowania jonizującego w komórkach *Capsicum baccatum* w celu określenia optymalnych dawek tego mutagenu dla otrzymania korzystnych linii hodowlanych tego gatunku w programach opartych o mutagenezę fizyczną. Spośród zastosowanych dawek promieniowania jonizującego: 20 Gy z poprzedzającym napromieniowanie moczeniem nasion w wodzie, 100, 200 oraz 300 Gy, dawka najniższa z moczeniem nasion powodowała w roślinach *C. baccatum* pokolenia M1 najslabszy efekt somatyczny oraz indukowała uszkodzenia DNA w formie pęknięć i aberracje chromosomowe z najwyższą częstotliwością w porównaniu do innych dawek. W związku z otrzymanymi wynikami dawka 20 Gy promieniowania jonizującego, z poprzedzającym napromieniowanie moczeniem nasion w wodzie była rekomendowana, jako optymalna dla planowanych programów hodowlanych *C. baccatum*. Wyniki wspólnych badań zostały opublikowane w Applied Radiation and Isotopes (Scaldaferro i wsp. 2013).

W roku 2012 zostałam włączona, jako wykonawca w prace prowadzone w zespole prof. dr hab. Roberta Hasteroka w ramach projektu badawczego Maestro (NCN, DEC-2012/04/A/NZ3/00572, 2012-2017) dotyczącego organizacji roślinnego genomu jądrowego z perspektywy badań cytomolekularnych. Głównym celem całego projektu jest kompleksowa analiza struktury, dynamiki i ewolucji roślinnego genomu jądrowego

na poziomie cytogenetycznym i molekularnym, wykorzystująca do tego celu układ modelowy, obejmujący wybrane gatunki *Brachypodium* ze szczególnym uwzględnieniem *B. distachyon*. W badaniach planowane jest zastosowanie *B. distachyon*, jako organizmu modelowego w analizach stabilności genomu roślinnego poddanego działaniu fizycznych i chemicznych czynników mutagenicznych. Możliwość zastosowania zaawansowanych narzędzi badawczych, umożliwiających wykorzystanie dobrze scharakteryzowanych specyficznych chromosomowo markerów cytogenetycznych (przykładowo, zawierających sekwencje unikatowe dużych wstawek jądrowego DNA w klonach BAC), dotyczy jedynie znikomej liczby gatunków, stąd też badania mają charakter pionierski. Dostępna dla *B. distachyon* zaawansowana infrastruktura metodyczna, w połączeniu z niską u tego gatunku liczbą chromosomów oraz niewielkim, zsekwencjonowanym genomem jądrowym stwarza możliwość szczegółowych analiz aberracji chromosomowych oraz mikrojąder, będących efektem działania mutagenów. W przypadku *B. distachyon* powinno to pozwolić nie tylko na identyfikację nawet bardzo małych, niemożliwych do wykrycia w przypadku innych roślinnych testów aberracji chromosomowych, ale być może także przyczynić się do precyzyjnej lokalizacji w chromosomach miejsc szczególnie wrażliwych (tzw. *hot spots*) na działanie określonych mutagenów. Wyniki mogą mieć istotne znaczenie dla dogłębnego poznania mechanizmów działania zastosowanych mutagenów na genom roślinny. Wstępne wyniki tych badań, stwierdzające porównywalnie wysoką wrażliwość komórek *B. distachyon* z komórkami innych gatunków roślin (przykładowo *C. capillaris*) zostały zaprezentowane w formie komunikatów ustnych oraz posterowych na konferencjach międzynarodowych, a kolejne badania z wykorzystaniem techniki BAC-FISH są w toku. W ramach kontynuacji badań dotyczących badan wrażliwości genomu *Brachypodium* i jego wykorzystania w testach genotoksyczności złożyłam do Narodowego Centrum Nauki projekt OPUS „Wrażliwość genomu *Brachypodium distachyon* na działanie mutagenów”, który obecnie jest rozpatrywany. Rozpoczęte badania w ramach projektu Maestro obejmują analizy efektów działania mutagenów na chromosomy, podczas gdy celem planowanego kolejnego projektu jest określenie wrażliwości genomu jądrowego *B. distachyon* na działanie czynników mutagenicznych na podstawie ilościowej analizy poziomu uszkodzeń DNA w postaci pęknięć oraz sprawności systemów naprawczych z wykorzystaniem testu kometowego. Ponadto planowana jest jakościowa analiza uszkodzeń DNA z wykorzystaniem metody comet-BAC-FISH w celu zbadania ewentualnego preferencyjnego udziału poszczególnych całych chromosomów lub ich

fragmentów w powstawaniu uszkodzeń DNA po działaniu mutagenów fizycznych i chemicznych.

### **Badania zmian w genomie roślinnym w warunkach kultury *in vitro* jako czynnika stresowego**

Równoległe z opisanymi wyżej badaniami, należącymi do głównego nurtu moich zainteresowań naukowych, prowadziłam badania zmian w genomie roślinnym w kulturze *in vitro*, jako czynnika stresowego, powodującego uszkodzenia DNA oraz chromosomów. Tkankowe i komórkowe kultury *in vitro* są szeroko stosowane nie tylko w hodowli i produkcji roślin, ale również mają duże znaczenie w badaniach podstawowych dotyczących regulacji funkcji genów oraz struktury genomu. W związku z tym istnieje potrzeba szczegółowych badań, prowadzących do poznania mechanizmów powstawania przemian w genomach jądrowych komórek w kulturach *in vitro*. Obiektami modelowymi w prowadzonych badaniach są *A. thaliana* i *C. capillaris*. Pierwszy z wymienionych gatunków charakteryzuje się niestabilnością chromosomową oraz wysokim poziomem ploidalności komórek kalusa w bardzo wczesnych etapach kultury, podczas gdy kalus *C. capillaris* pozostaje diploidalny w trakcie długiego czasu kultury, pomimo występowania przemian w strukturze chromosomów. W latach 2005-2007 brałam udział, jako wykonawca, w realizacji grantu "Mechanizmy poliploidyacji w komórkach *Arabidopsis thaliana*" (grant KBN 2PP4C 088). W ramach projektu przeprowadzono badania dotyczące poliploidyacji i innych przemian zachodzących w genomie podczas kultury *in vitro* kalusa wyprowadzonego z liści diploidalnych i tetraploidalnych roślin *A. thaliana*. Badania obejmowały określenie zależności pomiędzy wzorem endoreduplikacji eksplantatu liściowego, a wzorem poliploidyacji otrzymanego kalusa. Analizowano poziom poliploidalności na poszczególnych etapach kultury kalusa w oparciu o badania zawartości DNA w jądrach izolowanych z wykorzystaniem cytometru przepływowego, liczby chromosomów w komórkach mitotycznych, liczby chromocentrów i sygnałów FISH z sondą centromerową pAL1 w jądrach interfazowych. Badania obejmowały również analizę przebiegu zaburzeń mitozy w komórkach kalusa na podstawie obserwacji wrzeciona kariokinetycznego i cytokinetycznego. W ramach prowadzonych przeze mnie badań podjęłam próbę wyjaśnienia, czy programowana śmierć komórkowa jest zjawiskiem występującym w kalusie, i czy zachodzi częściej w komórkach poliploidalnych, prowadząc do ich eliminacji. Opracowanie metod badania uszkodzeń DNA w formie pęknięć - testu kometowego i testu TUNEL dla komórek liści i

kalusa *A. thaliana* umożliwiło szacowanie częstotliwości jąder komórkowych z pęknięciami DNA oraz analizę poziomu fragmentacji DNA. Analizie poddano komórki eksplantatów liściowych diploidalnych i tetraploidalnych roślin oraz powstającego kalusa. Badania wykazały wzrost poziomu uszkodzeń DNA oraz wzrost częstotliwości jąder komórkowych z uszkodzeniami DNA po wyłożeniu eksplantatu na pożywkę indukującą powstawanie kalusa w pierwszym tygodniu kultury - do 7 dnia, w porównaniu do wyjściowej tkanki liścia. W kolejnych dniach kultury obserwowano wyraźne obniżenie poziomu uszkodzeń DNA w komórkach eksplantatu i powstającego kalusa, w porównaniu do poziomu obserwowanego w pierwszym tygodniu kultury. W celu sprawdzenia obecności komórek podlegających programowanej śmierci komórkowej (PCD) w trakcie kultury *in vitro* przeprowadzono analizę komórek eksplantatu oraz tworzącego się kalusa z zastosowaniem metody z wykorzystaniem aneksyny V z jednoczesnym barwieniem jodkiem propidyny. Wykazano, że większość komórek eksplantatu i powstającego kalusa, pomimo występowania uszkodzeń DNA była żywa i tylko pojedyncze komórki podlegały PCD. Sporadycznie obserwowano komórki nekrotyczne. Wyniki badań zostały opublikowane w roku 2007 w Plant Cell Reports (Fras i wsp. 2007).

W przeciwieństwie do kultury *A. thaliana*, komórki kalusa *C. capillaris* przez jeden rok trwania kultury *in vitro* charakteryzują się stabilnością na poziomie diploidalnym. Badania zachowania komórek tego gatunku w kulturze *in vitro* dotyczyły analizy aberracji chromosomowych oraz poziomu ploidalności i dotychczas nieprzewodzonych badań bezpośrednich uszkodzeń DNA w formie pęknięć w komórkach tego kalusa. Prowadzone przez mnie badania wykazały, że poziom uszkodzeń DNA w komórkach kalusa *C. capillaris* analizowany w teście kometowym wzrastał istotnie w 4 miesiącu kultury. Wynik ten w świetle wcześniejszych rezultatów może wskazywać, że nie wszystkie powstające pęknięcia DNA były naprawiane i w związku z tym prowadziły do powstania aberracji chromosomowych, obserwowanych we wcześniejszych badaniach. W związku z tym, że komórki *C. capillaris* są stosunkowo stabilne genetycznie w trakcie kultury *in vitro*, mogą one stanowić dogodny obiekt badań wpływu różnych warunków kultury, w tym wpływu regulatorów wzrostu na ich stabilność. Przeprowadzono szczegółowe badania analizy poziomu uszkodzeń DNA, aktywności mitotycznej oraz poziomu ploidalności kalusa *C. capillaris* hodowanego na pożywkach o różnej koncentracji regulatorów wzrostu: auksyny – NAA (kwasu naftylo-1-octowego) i cytokininy – kinetyny. Zastosowano trzy pożywki o różnej kombinacji regulatorów

wzrostu: 6,0 mg/dm<sup>-3</sup> NAA i 0,6 mg/dm<sup>-3</sup> kinetyny (skład standardowy), 6,0 mg/dm<sup>-3</sup> NAA i 1,2 mg/dm<sup>-3</sup> kinetyny, 0 mg/dm<sup>-3</sup> NAA i 1,2 mg/dm<sup>-3</sup> kinetyny. Poziom uszkodzeń DNA w komórkach kalusa zależał od koncentracji regulatorów wzrostu. Modyfikacje regulatorów wzrostu powodowały zmiany w poziomie uszkodzeń DNA w stosunku do kalusa hodowanego na pożywce o standardowym zawartości regulatorów wzrostu: 6,0 mg/dm<sup>-3</sup> NAA i 0,6 mg/dm<sup>-3</sup> kinetyny. Komórki kalusa o najwyższym poziomie uszkodzeń DNA obserwowano w obecności wysokich stężeń cytokininy przy braku auksyny. Potwierdza to uszkadzające DNA działanie cytokininy w komórkach roślinnych, opisywane wcześniej w literaturze. Wysokiemu poziomowi uszkodzeń DNA w komórkach kalusa towarzyszyło obniżenie aktywności mitotycznej komórek kalusa. Wykazano, że kalus krótkoterminowy jest bardziej wrażliwy na zmiany w zawartości auksyny i cytokininy, niż kalus długoterminowy, co przejawiało się wyższym poziomem uszkodzeń DNA. Wynik ten można tłumaczyć występowaniem zjawiska habituacji. Wszystkie zmiany w standardowych koncentracjach auksyny i cytokininy prowadziły do zmian poziomu ploidalności komórek kalusa, przejawiających się zwiększeniem liczby pików na histogramach uzyskanych w wyniku analizy w cytometrze przepływowym. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano przydatność kultury kalusa *C. capillaris*, jako modelu w badaniach wpływu warunków kultury na stabilność genomu roślinnego w warunkach kultury *in vitro*. Wyniki badań zostały opublikowane w Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica (Kwasniewska i wsp. 2012).

### **Badania zmian w genomie roślinnym w ocenie genotoksyczności czynników środowiskowych**

Nowe techniki, wykorzystywane dotychczas w badaniach zmian w genomie roślinnym indukowanych działaniem różnych czynników stresowych, obejmujących związki mutagenne i warunki kultur *in vitro*, zastosowano do opracowania molekularnych testów badania genotoksyczności. Testy te, wraz z tradycyjnymi metodami badania chromosomów, wykorzystywał w ocenie genotoksyczności czynników środowiskowych. W ramach prowadzenia badań związanych z monitoringiem czynników środowiskowych z wykorzystaniem testów roślinnych nawiązałam współpracę z kilkoma krajowymi instytutami i ośrodkami naukowymi: Głównym Instytutem Górniczym (GIG) w Katowicach, Instytutem Ekologii Terenów Uprzemysłowionych (IETU) w Katowicach, Zakładem Badań Środowiska Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, oraz Górnośląskim Przedsiębiorstwem Wodociągów w Katowicach.

Współpraca z Górnośląskim Przedsiębiorstwem Wodociągów w Katowicach została nawiązana w celu określenia potencjalnej genotoksyczności wód Zbiornika Goczałkowice, rezerwuaru wody pitnej dla obszaru Górnego Śląska oraz rzeki Rawy (Kwasniewska i wsp. 2013). W badaniach wykorzystano test mikrojąder *Tradescantia* oraz test *C. capillaris* z zastosowaniem korzeni hodowanych *in vitro* - *hairy roots*, których wysoką wrażliwość na działanie mutagenów wykazano w pracy doktorskiej.

W ramach współpracy z GIG w Katowicach w 2011 roku wykonałam badania dotyczące cyto- i genotoksycznego efektu działania osadów glebowych w komórkach wybranych gatunków roślin z rejonów Górnego Śląska o dużym zanieczyszczeniu radem oraz terenów referencyjnych. Wykazano cyto- i genotoksyczny efekt działania badanych próbek osadów glebowych z terenów pokopalnianych, charakteryzujących się różnym stopniem skażenia Ra226 i Ra228. Wyniki badań wskazują, że występujące na Górnym Śląsku radioaktywne skażenia środowiska, wywołane działalnością przemysłową, wciąż mogą stanowić zagrożenia dla organizmów żywych. Potwierdzono wyniki wcześniejszych badań prowadzonych między innymi w badaniu wpływu skażeń radioaktywnych na genom roślinny po katastrofie w Czarnobylu, wskazujące, że zastosowany w badaniach test *Allium* jest czułą metodą oceny genotoksyczności i cytotoksyczności skażeń promieniotwórczych. Test *Allium* może być również stosowany w ocenie wpływu niskich dawek promieniowania, występujących na Górnym Śląsku, jako skażenie poprzemysłowe. Analizy przeprowadzono w ramach projektu PORANO „Survey of the impact of enhanced natural radioactivity on human and natural environment” (No. PNR-F-192-AI-1/07) koordynowanego przez GIG.

W tym samym roku nawiązałam współpracę z Instytutem Ekologii Terenów Uprzemysłowionych (IETU) w Katowicach oraz Zakładem Badań Środowiska Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Przeprowadzone wspólne badania dotyczyły oceny toksyczności odcieków komunalnych oraz wód powierzchniowych z rejonu Górnego Śląska, oraz porównania wrażliwości testów bakteryjnych i roślinnych w środowiskowych badaniach genotoksyczności. Prowadzone przeze mnie badania naukowe obejmowały analizy cytologiczne efektu cytotoksycznego oraz klastogennego z wykorzystaniem roślinnych testów środowiskowych. Obok tradycyjnych metod barwienia chromosomów w przeprowadzonych analizach genotoksyczności badanych związków wykorzystano również metody cytogenetyki molekularnej, takie jak test TUNEL. Na podstawie przeprowadzonych analiz genotoksyczności odcieków wykazano wyższą wrażliwość testu roślinnego – testu *Allium* niż testów bakteryjnych: testu Ames i

testu *umu*. Wskazuje to na bardzo wysoką wrażliwość testu *Allium* oraz uzasadnia jego wykorzystanie w badaniach ciekłych zanieczyszczeń miejskich i przemysłowych. Pomimo różnic we wrażliwości wykazano korelację wyników testu bakteryjnego Ames i testu *Allium* – obydwie testy wskazują na bardzo wysoką genotoksyczność jednego z dwudziestu dwóch analizowanych odcieków. W pracy wykazano zależność pomiędzy chemicznym składem odcieków a obserwowanym efektem genotoksycznym, co wskazuje na fakt, że analizy chemiczne i badania efektu na poziomie genomu powinny być jednocześnie stosowane w monitoringu środowiska. Współpraca z tymi dwoma instytucjami naukowymi zaowocowała publikacją naukową w *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Kwasniewska i wsp. 2012) oraz doniesieniem konferencyjnym. Inne wspólne badania dotyczyły oceny chemicznej, mikrobiologicznej oraz toksykologicznej podziemnych kopalnianych wód poprocesowych poddawanych procesowi gazyfikacji, z wykorzystaniem mikroorganizmów oraz roślin. Wody poprocesowe zawierają w swoim składzie wiele związków toksycznych, organicznych i nieorganicznych. Wykazano silną toksyczność tych wód w testach roślinnych - teście *Vicia*, oraz testach bakteryjnych - Microtox®, Spirotox, i teście *Daphnia magna*. Praca przedstawia możliwości oceny zagrożenia środowiskowego dla organizmów żywych, powodowanego przez wody pokopalniane. Stosowana dotychczas ocena zagrożenia oparta była tylko na analizach chemicznych. Zintegrowane zastosowanie metod charakterystyki chemicznej, mikrobiologicznej oraz toksykologicznej pozwala ocenić zagrożenie wynikające z obecności wód poprocesowych w środowisku. Wyniki badań zebrane zostały w formie publikacji zatytułowanej "Assessment of chemical, microbiological and toxicological aspects of post-processing waters from underground coal gasification process", wysłanej do recenzji do czasopisma *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Współpraca ta jest nadal kontynuowana - obecnie prowadzone są wieloletnie cykliczne badania genotoksyczności wód ze zbiornika wodnego Kalina z rejonu Górnego Śląska, charakteryzujących się przekroczeniami wszystkich parametrów chemicznych, a w szczególności fenoli, i poddawanego obecnie wieloletniej rekultywacji. Coroczna ocena genotoksyczności wód pozwoli oszacować postęp prowadzonej rekultywacji zbiornika.

Wiedzę i doświadczenie w zakresie badań zmian w genomie roślinnym powstających w wyniku działania środowiska wykorzystywałam w przygotowaniu wykładu popularyzacyjnego naukę zatytułowanego „Obraz genomu roślin zwierciadłem stanu naszego środowiska”, który wygłosiłam w 2004 roku w ramach cyklicznych

interdyscyplinarnych wykładów „Problemy środowiska i jego ochrony” organizowanych przez Centrum Studiów nad Człowiekiem i Środowiskiem Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Prezentowane zagadnienia zostały opublikowane w cyklicznym wydawnictwie Uniwersytetu Śląskiego (Maluszynska, Juchimiuk, 2004).

Szczegółowe protokoły roślinnych testów badania genotoksyczności czynników środowiskowych wraz z aktualnym przeglądem dostępnej literatury opublikowano w „Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health” (2003, eds. Maluszynska J, Plewa M). Książka ta ukazała się w rezultacie workshopu zorganizowanego w ramach 5 Ramowego Programu „Confirming the International Role of Community Research” – INCO, oraz programu badawczego „Improving the quality of life and management of living resources”. Dwa spośród rozdziałów części metodycznej są mojego współautorstwa: „Sister chromatid exchanges test (SCE)” (Juchimiuk, Maluszynska, 2003a) oraz „Detection of DNA fragmentation caused by chemical mutagens in TUNEL test” (Juchimiuk, Maluszynska, 2003b).

Zupełnie nowy kierunek podjętych przeze mnie badań związany był z realizacją Grantu JM Rektora UŚ we współpracy z Katedrą Genetyki UŚ, przyznanego w roku 2006, którego celem była adaptacja metody hybrydyzacji RNA-RNA *in situ* do badań z zakresu genomiki funkcjonalnej roślin. Projekt miał na celu adaptację metody hybrydyzacji RNA-RNA *in situ* do badań z zakresu genomiki funkcjonalnej roślin prowadzonych w Katedrze Genetyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŚ. Prowadzone dotychczas badania związane z analizą ekspresji genów podczas procesów morfogenezy roślin limitowane były koniecznością pracy na RNA izolowanym z całych organów. Technika hybrydyzacji RNA-RNA *in situ* pozwala na dokładną lokalizację transkryptów genów na poziomie tkankowym i komórkowym. W toku prowadzonych wcześniej badań dotyczących identyfikacji genetycznych podstaw morfogenezy włośników jęczmienia zidentyfikowano i sklonowano gen *HvEXPB1* oraz wykazano jego rolę w procesie inicjacji ich rozwoju. Wyniki hybrydyzacji RNA-RNA *in situ* pozwoliły na jednoznaczne stwierdzenie, że ekspresja genu ogranicza się wyłącznie do komórek włośnikowych a tym samym potwierdzenie roli genu *HvEXPB1* w procesie morfogenezy włośników jęczmienia. Opracowane standardy metody hybrydyzacji RNA-RNA *in situ* pozwoliły na zapoczątkowanie badań dotyczących genomiki funkcjonalnej roślin z analizą ekspresji genów na poziomie komórki i organu. Wyniki badań zostały opublikowane w Journal of Plant Physiology (Kwasniewski i wsp. 2013).



Część przedstawionych powyżej badań była realizowana w ramach 8 grantów finansowanych ze źródeł krajowych: Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Komitetu Badań Naukowych oraz Narodowego Centrum Nauki, oraz źródeł zagranicznych. W dwóch grantach pełniłam rolę kierownika projektu.

1. Grant KBN nr 6PO4C 067 21– (promotorski) - Wrażliwość komórek *Crepis capillaris* na działanie czynników mutagennych. Czas realizacji 2001-2003 – główny wykonawca
2. Dotacja KBN w ramach SPB do projektu - Mutagenesis and physical mapping of genes in crops with small chromosomes. Czas realizacji 2002-2006 – wykonawca
3. Grant Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture - Mutagenesis and physical mapping of genes in crops with small chromosomes. Czas realizacji 2002-2008 - kierownik projektu i wykonawca
4. Grant KBN 2PP4C 088 - Mechanizmy poliploidyzacji w komórkach *Arabidopsis thaliana*. Czas realizacji 2005-2007 – wykonawca
5. Grant KBN nr 2 P04G 006 27 - Wiek matki oraz stopień zanieczyszczenia środowiska a możliwości detoksykacyjne potomstwa koników z rodziny *Acrinida*. Czas realizacji 2004-2007 – wykonawca
6. Grant MNiSW nr 3178/B/P01/2011/40 - Cyto-molekularne testy roślinne w analizie efektu genotoksycznego po działaniu czynników abiotycznych. Czas realizacji 2011-2014 - kierownik projektu
7. Projekt PORANO we współpracy z Głównym Instytutem Górniczym w Katowicach – Survey of the impact of enhanced natural radioactivity on human and natural environment. Czas realizacji 2011- zamówienie w ramach pracy usługowej dla Uniwersytetu Śląskiego zatytułowanej „Analiza cyto- i genotoksycznego efektu działania osadów z rejonu Górnego Śląska w komórkach roślinnych”.
8. Grant NCN nr 2012/04/A/NZ3/00572 Maestro - Struktura, dynamika i ewolucja roślinnego genomu jądrowego z perspektywy badań cytomolekularnych. Czas realizacji 2012-2016 – wykonawca

Moja praca naukowa została nagrodzona przez JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach oraz Polskie Towarzystwo Biologii Eksperymentalnej Roślin:

- 2003 Nagroda Naukowa Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za wyróżniającą się pracę doktorską „Wrażliwość komórek *Crepis capillaris* na działanie czynników mutagennych”
- 2003 Indywidualna Nagroda Rektora Uniwersytetu Śląskiego II stopnia za działalność naukowo-badawczą
- 2003 Nagroda za zajęcie I miejsca w konkursie na Najlepsze doniesienie Plakatowe na I Konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin za badania o tematyce „Wrażliwość komórek *Crepis capillaris* na działanie czynników mutagennych”
- 2006 Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach I stopnia za działalność naukowo- badawczą
- 2007 Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach I stopnia za działalność naukowo- badawczą
- 2008 Indywidualna Nagroda Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach II stopnia za działalność naukowo- badawczą
- 2013 Indywidualna Nagroda Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach II stopnia za działalność naukowo- badawczą

Zdobyty w trakcie pracy naukowej warsztat badawczy był następnie wykorzystany w działalności dydaktycznej i organizacyjnej. W latach 2001-2014 byłam opiekunem naukowym łącznie 13 studentów wykonujących prace magisterskie, oraz promotorem 8 prac licencjackich. Byłam również opiekunem studenta odbywającego w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin praktyki zawodowe. Opracowane metody badań zostały wykorzystane w pracy dydaktycznej w trakcie prowadzenia zajęć ze studentami z przedmiotów: cytogenetyka roślin (kierunek biotechnologia), cytogenetyka molekularna (kierunek biotechnologia), biologia komórki (kierunek biotechnologia), mutageneza roślin uprawnych (kierunek biotechnologia), pracownice licencjackie, specjalistyczne i magisterskie. W 2011 roku byłam członkiem Komitetu Naukowego I Ogólnopolskiego Zjazdu Młodych Biotechnologów organizowanego w ramach realizacji projektu „Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia – ATRINBIOTECH” na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Zdobyte doświadczenie

pozwoili pełnić rolę wykładowcy w czasie międzynarodowego kursu „Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health” zorganizowanego w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin w ramach 5 Ramowego Programu „Confirming the International Role of Community Research”.

Byłam recenzentem kilku prac naukowych w takich czasopismach jak: Journal of Applied Genetic, Plant Biosystems, Chemosphere, Acta Biologica Cracoviensia series Botanica, Environmental and Experimental Botany.

### Reasumując na cały dorobek naukowy składa się:

• 21 prac o łącznym IF= 28,291 i 423 pkt MNiSW

- prace stanowiące osiągnięcie naukowe – 6 (rozdział 1.3.B)

- pozostałe prace – 15

1. Maluszynska J, **Juchimiuk J**, Wolny E. 2003. Chromosomal aberrations in *Crepis capillaris* cells detected by FISH. Folia Histochemica et Cytobiologica Vol. 41, No. 2, pp. 101-104.

**IF – 0,902, Pkt MNiSW – 13, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 10**

2. **Juchimiuk J**, Maluszynska J. 2003a. Sister chromatid exchanges test (SCE). In: “Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health” ed. Maluszynska J., Plewa M. Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego. pp. 115-122.

**IF – nie dotyczy, Pkt MNiSW – 7**

3. **Juchimiuk J**, Maluszynska J. 2003b. Detection of DNA fragmentation caused by chemical mutagens in TUNEL test. In: “Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health” ed. Maluszynska J., Plewa M. Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego. pp. 133-138.

**IF – nie dotyczy, Pkt MNiSW – 7**

4. Maluszynska J, **Juchimiuk J**. 2004. Obraz genomu roślin zwierciadłem stanu naszego środowiska. In: Problemy ochrony środowiska i jego ochrony. Eds. Nakonieczny M., Migula P. 12 pp 67-82.

**IF – nie dotyczy, Pkt MNiSW – 1**

5. **Juchimiuk J**, Maluszynska J. 2005. Transformed roots *Crepis capillaris* - a sensitive system for the evaluation of abiotic factors. Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 565: 129-138.

**IF – 2,188, Pkt MNiSW – 32, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 12**

6. Maluszynska J. and **Juchimiuk J**. 2005. Plant genotoxicity. Molecular cytogenetic approach in plant bioassays. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 56: 177-184.

**IF – nie dotyczy, Pkt MNiSW – 2, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 12**

7. **Juchimiuk J**, Gnys A, Maluszynska J. 2006. DNA damage induced by mutagens in plant and human cells nuclei by acellular comet assay. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44(1): 127-131.

**IF – 0,897, Pkt MNiSW – 13, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 5**

8. Augustyniak M, **Juchimiuk J**, Przybyłowicz WJ, Mesjasz-Przybyłowicz J, Babczyńska A, Migula P. 2006. Zinc-induced DNA damage and the distribution of metals in the brain of grasshoppers by the Comet Assay and Micro-PIXE. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 144: 242-251.

**IF – 1,991, Pkt MNiSW – 32, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 25**

9. Fras A, **Juchimiuk J**, Siwinska D, Maluszynska J. 2007. Cytological events in explants of *Arabidopsis thaliana* during early callogenesis. *Plant Cell Reports* 26(11): 1933-1939.

**IF – 1,974, Pkt MNiSW – 32, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 7**

10. **Juchimiuk-Kwasniewska J**, Kolano B, Hasterok R, Hosiawa M, Maluszynska J. 2011. Mutagenesis and physical mapping of genes in crops with small chromosomes. In: Lokko Y. (ed) *Physical mapping technologies for the identification and characterization of mutated genes to crop quality*. IAEA-TECDOC-1664. ISSN 1011-4289 Vienna, Austria, pp. 39-51.

**IF – brak, Pkt MNiSW – 7**

11. **Kwasniewska J**, Nawrocki W, Siwinska D, Maluszynska J. 2012. DNA damage in *Crepis capillaris* cells in response to *in vitro* conditions. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 54/2:1-8

**IF – 0,565, Pkt MNiSW – 20, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 0**

12. **Kwasniewska J**, Nałęcz-Jawecki G, Skrzypczak A, Płaza GA, Matejczyk M. 2012. Assessment of genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75:55-62

**IF – 2,34, Pkt MNiSW – 30, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 3**

13. Kwasniewski M, Chwiałkowska K, **Kwasniewska J**, Kusak J, Szarejko I. 2013. Accumulation of peroxidase-related reactive oxygen species in trichoblast correlates with root hair initiation in barley. *Journal of Plant Physiology*, 170:185-95.

**IF – 2,791, Pkt MNiSW – 35, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 1**

14. **Kwasniewska J**, Jaskola R, Maluszynska J. 2013. Cytogenetic tests in the assessment of the genotoxicity of river water. *International Journal of Environmental Research* 7(4):869-876

**IF – 1,818, Pkt MNiSW – 25, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 0**

15. Scaldaferrero MA, Prina AR, Moscone EA, **Kwasniewska J**. 2013. Effects of ionizing radiation on *Capsicum baccatum* var. pendulum (Solanaceae). *Applied Radiation and Isotopes*, 79:103-108.

**IF – 1,248, Pkt MNiSW – 25, cyt. na podstawie bazy Web of Knowledge- 1.**

*Wszystkie cytowania powyżej podano bez uwzględnienia samocytowań.*

- 31 doniesień zjazdowych prezentowanych w formie komunikatów na 15 krajowych i 16 międzynarodowych konferencjach. 10 doniesień zjazdowych prezentowanych było przeze mnie w formie prezentacji ustnych.

Suma cytowań na podstawie Web of Knowledge - 76, bez uwzględnienia samocytowań

Całkowita suma cytowań na podstawie Web of Knowledge - 93, z uwzględnieniem samocytowań

h-index (Indeks Hirscha`a): Scopus - 6, ISI Web of Knowledge - 6

#### **Na okres przed doktoratem złożyło się:**

- 4 doniesienia zjazdowe prezentowane w formie komunikatów na 3 krajowych i 1 międzynarodowej konferencji.

#### **Na okres po doktoracie złożyło się:**

- 21 prac o łącznym IF= 28,291 i 423 pkt MNiSW, oraz
- 27 doniesień zjazdowych prezentowanych w formie komunikatów na 12 krajowych i 15 międzynarodowych konferencjach. 9 doniesień zjazdowych prezentowanych było przez mnie w formie prezentacji ustnych.

Suma cytowań na podstawie Web of Knowledge - 76, bez uwzględnienia samocytowań

Całkowita suma cytowań na podstawie Web of Knowledge - 93

h-index (Indeks Hirscha`a): Scopus - 6, ISI Web of Knowledge - 6

#### **Na dorobek przed doktoratem składają się:**

- **Doniesienia zjazdowe - 4**

Prezentowane w formie komunikatów na 3 krajowych konferencjach w formie plakatów i 1 międzynarodowej konferencji (prezentacja ustna).

#### **Na dorobek po doktoracie składają się:**

- **Prace eksperymentalne - 18**

- prace stanowiące osiągnięcie naukowe - 5

- pozostałe prace - 10

- rozdziały w książce - 3

- **Prace przeglądowe - 3**

- praca w czasopiśmie naukowym - 2

- rozdział w książce - 1 (wchodzi w skład osiągnięcia naukowego)



### Uzyskane punkty za publikacje:

- IF - 28,291
- pkt. MNiSW - 423
- suma cytowań na podstawie Web of Knowledge (bez samocytowań) - 76
- całkowita suma cytowań na podstawie Web of Knowledge - 93
- **h-index** (Indeks Hirscha`a): Scopus - 6, ISI Web of Knowledge – 6

### Na cały dorobek składają się:

#### • Prace eksperymentalne - 18

- prace stanowiące osiągnięcie naukowe - 5
- pozostałe prace - 10
- rozdziały w książce - 3

#### • Prace przeglądowe – 3

- praca w czasopiśmie naukowym - 2
- rozdział w książce - 1 (wchodzi w skład osiągnięcia naukowego)

### Uzyskane punkty za publikacje:

- IF- 28, 291
- pkt. MNiSW - 423
- suma cytowań na podstawie Web of Knowledge (bez samocytowań) – 76
- całkowita suma cytowań na podstawie Web of Knowledge – 93
- **h-index** (Indeks Hirscha`a): Scopus - 6, ISI Web of Knowledge – 6

#### • Doniesienia zjazdowe – 31

### ZESTAWIENIE SUMARYCZNE DOROBKU NAUKOWEGO

Artykuły opublikowane	Punktacja	
	<i>impact factor</i>	pkt. MNiSW
przed doktoratem - 0	0	0
po doktoracie - 21	28,291	423
- w tym wchodzące w skład osiągnięcia naukowego - 6	11,576	142
<b>Sumaryczny <i>impact factor</i> i pkt. MNiSW</b>	<b>28,291</b>	<b>423</b>

Katowice, dnia 24 kwietnia 2014 roku

podpis..... 