

Załącznik nr 2

## **AUTOREFERAT**

dr Mirosław Kwaśniewski

Katedra Genetyki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Śląski w Katowicach  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

Katowice, 2016

**1. Imię i nazwisko:** Mirosław Kwaśniewski

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

**2004:** **Doktor nauk biologicznych**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Identyfikacja genów ulegających zróżnicowanej ekspresji u mutantów bezwłośnikowych *Hordeum vulgare* L.”; promotor: prof. dr hab. Iwona Szarejko;

**2000:** **Magister biologii**, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach. Tytuł pracy magisterskiej "Analiza genetyczna protoonkogenu RET w zespole mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej typu 2B i w sporadycznym raku rdzeniastym tarczycy"; promotor: prof. dr hab. Barbara Jarzab (praca magisterska wykonana w Zakładzie Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział Gliwice).

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

**2008 – obecnie** **Adiunkt**, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski w Katowicach

**2006 – 2008** **Staż podoktorski**, Max-Planck Research Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Germany, grupa prof. Bernda Mueller-Roebera

**2005 – 2006** **Adiunkt**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Śląski w Katowicach

**2000 – 2005** **Asystent**, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Śląski w Katowicach

**1999 – 2000** **Pracownik inżynieryjno-techniczny**, Katedra Genetyki, 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 o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.)**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

*Molekularne analizy procesów rozwoju i funkcji włósników*

**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: 25.04.2016 (Liczba cytowań bez autocytowań).

- 1. Kwasniewski M., Janiak A., Mueller-Roeber B. and Szarejko I. 2010. Global analysis of the root hair morphogenesis transcriptome reveals new candidate genes involved in root hair formation in barley. *Journal of Plant Physiology*, 167: 1076-83.**

**IF<sub>2010</sub> 2,677; MNiSW 32 pkt; Cyt.: WoS 16 (12)**

*Mój udział procentowy szacuję na 80%. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, przygotowaniu materiału roślinnego do analiz, wykonaniu większości analiz molekularnych związanych z globalnym profilowaniem transkryptomu i qRT-PCR, opracowaniu wyników analiz mikromacierzowych i qRT-PCR oraz przygotowaniu manuskryptu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach, jestem przy tym autorem korespondencyjnym publikacji.*

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

**IF<sub>2013</sub> 2,770; MNiSW 35 pkt; Cyt.: WoS 16 (15)**

*Mój udział procentowy szacuję na 70%. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu większości analiz molekularnych związanych z analizą ekspresji genów dla peroksydaz metodą qRT-PCR, analizą aktywności peroksydaz in vitro, identyfikacją reaktywnych form tlenu w korzeniach roślin in vivo, analizami bioinformatycznymi promotorów badanych genów, zaplanowaniu doświadczeń analiz ekspresji genów in situ, opracowaniu otrzymanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach, jestem przy tym autorem korespondencyjnym publikacji.*

- 3. Kwasniewski M., Daszkowska-Golec A., Janiak A., Chwiałkowska K., Nowakowska U., Sablok G., Szarejko I. 2016. Transcriptome analysis reveals the role of the root hairs as environmental sensors to maintain plant functions under water deficiency conditions. *Journal of Experimental Botany*, 67: 1079–1094.**

**IF<sub>5-letni</sub> 6,312; MNiSW 45 pkt; Cyt.: WoS 1 (1)**

*Mój udział procentowy szacuję na 65%. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu większości analiz molekularnych dotyczących analiz transkryptomu badanych roślin, opracowaniu uzyskanych wyników analiz mikromacierzowych, przeprowadzeniu kompleksowych analiz bioinformatycznych oraz przygotowaniu manuskryptu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach, jestem przy tym autorem korespondencyjnym publikacji.*

4. **Kwasniewski M., Nowakowska U., Szumera J., Chwialkowska K., Szarejko I. 2013.** iRootHair: a comprehensive root hair genomics database. **Plant Physiology**, 161: 28-35.

**IF<sub>2013</sub> 7,394; MNiSW 45 pkt; Cyt.: WoS 13 (12)**

*Mój udział procentowy szacuję na 70%. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji i stworzeniu struktury bazy iRootHair, zaplanowaniu zakresu i układu treści portalu iRootHair, wyszukiwaniu i opracowaniu treści literaturowych, korespondencji z autorami publikacji dotyczących genomiki włośników w celu pozyskania niepublikowanych danych i rycin, przeprowadzeniu analiz z wykorzystaniem stworzonej bazy danych oraz przygotowaniu manuskryptu i ostatecznej redakcji manuskryptu po recenzjach, jestem przy tym autorem korespondencyjnym publikacji.*

**Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego = 19,153**

**Łączna liczba punktów MNiSW = 157**

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

Epiderma korzenia większości gatunków roślin charakteryzuje się występowaniem specyficznych komórek o wierzchołkowym typie wzrostu zwanych włośnikami. Duża liczba włośników, ich charakterystyczne ułożenie, często prostopadłe względem podłużnej osi korzenia, oraz względnie duża powierzchnia własna, powodują, że włośniki są ważnym elementem strukturalnym i funkcjonalnym rośliny. Począwszy od pierwszych etapów rozwoju rośliny, włośniki oddziałując z kompleksem glebowym wspomagają kiełkowanie i zakotwiczenie rośliny w podłożu (Ryan i wsp., 2001). Powszechnie przyjmuje się także, że kluczową funkcją włośników jest zwiększenie funkcjonalnej powierzchni chłonnej korzenia dla pobierania wody i soli mineralnych (Long 1996). Włośniki są wyrostkami peryklinalnych ścian zróżnicowanych komórek epidermy zwanych trichoblastami. Odrębną grupę komórek epidermy korzenia stanowią niezdolne do wytwarzania włośników atrichoblasty. Atrichoblasty są często dłuższe od

trichoblastów, charakteryzują się większym stopniem wakuolizacji, mniejszą gęstością cytoplazmy i dłuższym cyklem komórkowym (Marzec i wsp., 2013).

Fakt, iż funkcjonalne komórki włosnikowe nie są niezbędne do przeżycia rośliny sprawia, że w badaniach genetycznych dotyczących procesów różnicowania i wzrostu włosników możliwe jest wykorzystywanie mutantów o zmienionej morfologii strefy chłonnej. Pierwszych informacji dotyczących genetycznych i fizjologicznych podstaw rozwoju włosników dostarczyły prace prowadzone na mutantach *Arabidopsis thaliana* (przegląd w: Schiefelbein, 2000; Ryan i wsp., 2001). W roku 2000, kiedy rozpoczynałem pracę naukową jako doktorant w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, znanych było około 20 genów kontrolujących proces formowania, rozwoju i wzrostu włosników roślin dwuliściennych, przy czym tylko 5 z nich scharakteryzowanych było na poziomie molekularnym. Już wtedy wiadomo było jednak, że morfogeneza włosników jest procesem złożonym i wieloetapowym, obejmującym (i) różnicowanie trichoblastów, (ii) inicjację rozwoju włosników, (iii) przejście do wzrostu wierzchołkowego oraz (iv), wzrost wierzchołkowy. Prawidłowy przebieg każdego z wymienionych etapów wymaga skoordynowanego udziału wielu genów i czynników hormonalnych, co biorąc pod uwagę ówczesny stan wiedzy na temat molekularnych podstaw różnicowania i wzrostu włosników, jednoznacznie wskazywało na potrzebę kontynuacji badań w celu pełniejszego zrozumienia procesów prowadzących do powstania funkcjonalnych włosników.

W związku z poznaniem pełnej sekwencji genomu *Arabidopsis* w roku 2000 (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) oraz z udostępnieniem dużej kolekcji mutantów insercyjnych T-DNA *Arabidopsis* (opis kolekcji w pracy Alonso et al., 2003), początek XXI wieku przyniósł przełom w badaniach nad identyfikacją molekularnych podstaw rozwoju i funkcjonowania włosników. Przeważająca większość pojawiających się prac podejmujących ten temat dotyczyła jednak głównie modelowej rośliny dwuliściennej *Arabidopsis thaliana*. W porównaniu z roślinami dwuliściennymi, procesy morfogenezy włosników roślin jednoliściennych – w tym ważnych roślin uprawnych – poznane były w znacznie mniejszym stopniu. Podstawowym powodem takiego stanu rzeczy był brak porównywalnych kolekcji mutantów T-DNA.

W Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego od wielu lat prowadzone są badania wykorzystujące mutagenезę jako źródło zmienności genetycznej roślin jednoliściennych.

W toku prowadzonych prac badawczych wyodrębniono unikalną kolekcję mutantów jęczmienia o zmienionej morfologii strefy chłonnej korzenia (Szarejko i wsp., 2005; Chmielewska i wsp., 2014). Wykorzystując ten materiał, w roku 2000, w ramach studiów doktoranckich w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, rozpocząłem badania pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Szarejko zmierzające do identyfikacji genów zaangażowanych w procesy różnicowania i rozwoju komórek włóśnikowych jęczmienia. Wyniki przeprowadzonych badań, realizowanych częściowo w ramach grantu promotorskiego KBN, opublikowano w czasopiśmie *Plant Physiology* (Kwasniewski i Szarejko, 2006), a publikacja ta w roku 2007 została wyróżniona Nagrodą Kapituły Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin jako najlepsza publikacja oryginalna dotycząca biologii roślin opracowana w polskim laboratorium w latach 2005-2006. Oryginalne wyniki przeprowadzonych analiz mają swoje odzwierciedlenie w dużej liczbie cytowań wspomnianej publikacji (61 cytowań wg WoS, 83 cytowania wg Google Scholar Citations).

Niewątpliwie sukces przeprowadzonych badań zależał od przyjętej strategii związanej ze sposobem identyfikacji genów, których ekspresja różni transkryptomy mutantu i odmiany wyjściowej. Zastosowana w badaniach do pracy doktorskiej metoda różnicowania transkryptomów cDNA Representational Difference Analysis (cDNA-RDA) została zaadoptowana przeze mnie z prac badawczych związanych z genomiką człowieka i umożliwiła skuteczne różnicowanie transkryptomu gatunku słabo scharakteryzowanego pod względem sekwencji genomu i transkryptomu. Niemniej jednak metoda cDNA-RDA, zgodnie ze swoimi założeniami, umożliwiała głównie identyfikację różnic jakościowych porównywanych transkryptomów, natomiast geny, które ulegają ekspresji w obu porównywanych transkryptomach, nawet jeżeli ich ekspresja jest znacząco różna, nie były identyfikowane. W związku z tym, kolejnym etapem badań nad identyfikacją genów zaangażowanych w proces rozwoju włóśników u jęczmienia, były moje prace realizowane już po zakończeniu doktoratu, opisane poniżej jako główne osiągnięcie naukowe. Stanowią one kontynuację i istotne rozszerzenie zakresu podjętej wcześniej tematyki.

## **Identyfikacja genów uczestniczących w inicjacji rozwoju włóśników jęczmienia poprzez globalne profilowanie transkryptomu korzenia**

W związku z wprowadzeniem w lipcu roku 2003 do komercyjnego obrotu mikromacierzy DNA w formacie Affymetrix, zawierającej sondy oligonukleotydowe dla ok. 16 000 genów *H. vulgare*, stało się możliwym globalne profilowanie ekspresji genów tego gatunku i identyfikacja genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pomiędzy porównywanymi transkryptomami (GeneChip Barley Genome Array). Dostępność technologii mikromacierzy ekspresyjnych dla jęczmienia oraz dotychczasowe doświadczenia w pracach nad różnicowaniem transkryptomu mutantu bezwłóśnikowego i jego odmiany wyjściowej, stała się dla mnie podstawą do wystąpienia do KBN z wnioskiem o finansowanie projektu mającego na celu analizę transkryptomu korzenia jęczmienia w aspekcie genomiki funkcjonalnej procesu morfogenezy włóśników. W roku 2006 projekt 'Analiza transkryptomu korzenia *Hordeum vulgare* L. w aspekcie genomiki funkcjonalnej procesu morfogenezy włóśników' uzyskał dofinansowanie i dzięki współpracy z grupą dr Vladimira Benesa z Genomics Core Facility w EMBL w Haidelbergu podjąłem prace związane z globalnym profilowaniem transkryptomu mutantów włóśnikowych oraz ich odmian wyjściowych. Analizom porównawczym poddano transkryptomy jednocentymetrowych, wierzchołkowych fragmentów korzenia bezwłóśnikowego mutantu *rhl1.a* i jego odmiany wyjściowej 'Karat' oraz mutantu *rhp1.b*, wytwarzającego jedynie primordia włóśników i jego odmiany wyjściowej 'Dema'. Wyniki uzyskane po skanowaniu mikromacierzy poddano analizom bioinformatycznym i statystycznym, mającym na celu identyfikację genów ulegających zróżnicowanej ekspresji w układzie mutant/odmiana wyjściowa a następnie uzyskane wyniki weryfikowano z wykorzystaniem metody qRT-PCR. Wszystkie startery do analiz qRT-PCR zaprojektowano z wykorzystaniem narzędzia internetowego QuantPrime, w którego opracowaniu brałem udział podczas stażu podoktorskiego w Max-Planck Research Institute of Molecular Plant Physiology w Niemczech, oferującego zautomatyzowaną selekcję starterów do qRT-PCR dla ponad 100 gatunków organizmów (**Arvidsson i wsp., BMC Bioinformatics, 2008**). Analizy transkryptomu korzenia mutantu *rhp1.b* i odmiany 'Dema' wykazały brak istotnych różnic w ekspresji genów pomiędzy porównywanymi genotypami. Przeprowadzone analizy umożliwiły jednak identyfikację 10 genów, których ekspresja istotnie różni transkryptom korzenia mutantu bezwłóśnikowego *rhl1.a* i odmiany 'Karat' (FC>3; p<0.05, FDR 5%), przy czym wszystkie zidentyfikowane geny

ulegały znacznie niższej ekspresji w korzeniu mutantu bezwłośnikowego niż w korzeniu odmiany wyjściowej. Analizy sekwencji zidentyfikowanych genów umożliwiły określenie ich prawdopodobnej funkcji. Wykazano, że zidentyfikowane geny kodują białka należące do rodzin: peroksydaz, endotransglikozylaz ksyloglukanu, proteoglikanów bogatych w arabinogalaktany, ekstensyn i białek bogatych w powtórzenia leucynowe. Dodatkowo stwierdzono, że dwa spośród 10 genów ulegających obniżonej ekspresji w korzeniach bezwłośnikowego mutantu *rhl1.a* w stosunku do odmiany 'Karat', to ortologi genów *SCN1* (*SUPERCENTIPEDE 1*) i *COW1* (*CAN OF WORMS 1*) biorących udział w morfogenezie włośników u *A. thaliana* (odpowiednio Carol i wsp., 2005 oraz Böhme i wsp., 2004).

Wykorzystanie technologii mikomacierzy ekspresyjnych w systemie Afymetrix umożliwiło więc identyfikację nowych genów, których ekspresja jest znacznie obniżona w korzeniach mutantu bezwłośnikowego w stosunku do odmiany 'Karat', wykształcającej normalne włośniki, jednak ich ekspresja nie różni się istotnie pomiędzy mutantem charakteryzującym się zatrzymaniem rozwoju włośników w stadium inicjalnym (*rhp1.b*) a jego odmianą wyjściową 'Dema' (Kwaśniewski i wsp., **Journal of Plant Physiology**, 2010). Wyniki te wskazywały na udział zidentyfikowanych genów specyficznie w inicjacji rozwoju włośników jęczmienia a zarazem dostarczyły nowych, cennych informacji na temat procesów, które wydają się kluczowe dla początkowych etapów rozwoju włośników roślin jednoliściennych. Prawdopodobny udział białek z rodziny endotransglikozylaz ksyloglukanu w powstawaniu włośników opisywany był już wcześniej przez Vissenberga i współpracowników w badaniach nad morfogenezą włośników u *A. thaliana* (2001). We wspomnianej pracy nie zidentyfikowano jednak konkretnych genów dla endotransglikozylaz ksyloglukanu, obserwowano jedynie pośrednio dużą akumulację białek należących do tej rodziny w miejscach inicjacji rozwoju włośników oraz w częściach szczytowych rosnących włośników. Podobną kolokalizację stwierdzono również podczas badania obecności epitopów proteoglikanów bogatych w arabinogalaktany w inicjujących i rosnących włośnikach kukurydzy (Samaj i wsp., 1999). Podobnie jednak jak w przypadku endotransglikozylaz ksyloglukanu, nie były znane konkretne geny kodujące białka bogate w arabinogalaktany, które brałyby udział w powstawaniu włośników roślin jedno- czy dwuliściennych. W związku z tym nasza praca dostarczyła całkowicie nowych informacji na temat specyficznych genów zaangażowanych w proces inicjacji rozwoju włośników, a jednocześnie wspierała wcześniejsze doniesienia i obserwacje bazujące na analizach proteomu włośników.



## Udział zależnych od peroksydaz reaktywnych form tlenu w inicjacji rozwoju włośników

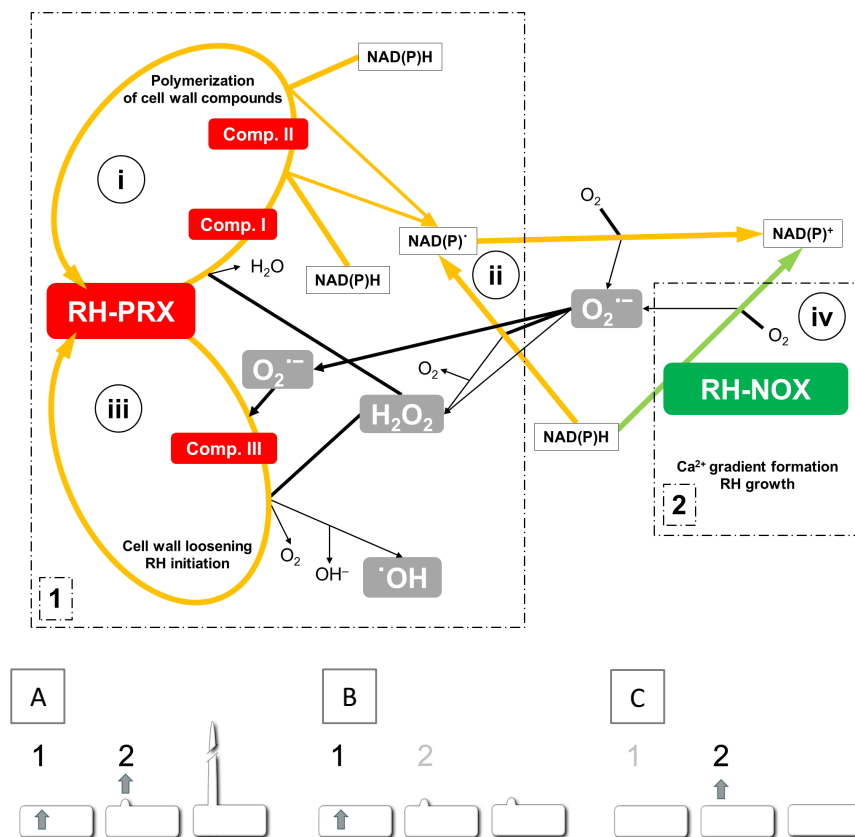
Szczególnie interesującą grupę genów wytypowanych w analizach mikromacierzowych stanowiły geny kodujące peroksydazy. Udział procesów oksydacyjno-redukcyjnych oraz reaktywnych form tlenu (ROS) w różnicowaniu i wzroście komórek korzenia opisywany był kilkakrotnie, jednak dotyczył wyłącznie roli oksydazy NADPH w tych procesach (Foreman i wsp., 2003, Dunand i wsp., 2007, Takeda i wsp., 2008). Mimo to, brak było jednak jakichkolwiek dowodów na udział białek z rodziny peroksydaz w procesie morfogenezy włośników. Fakt ogromnie obniżonej ekspresji genów dla peroksydaz obserwowanej w korzeniach bezwłośnikowego mutantu *rhl1.a* w odniesieniu do mutantu *rhp1.b* i roślin o fenotypie dzikim (różnica w ekspresji pomiędzy mutantem bezwłośnikowym a odmianą 'Karat' ponad 100 000 razy), skłonił mnie do podjęcia badań mających na celu zbadanie roli peroksydaz w procesie inicjacji rozwoju włośników jęczmienia.

Celem pierwszego etapu badań było sprawdzenie, czy strefa zróżnicowanych komórek korzenia bezwłośnikowego mutantu *rhl1.a*, u którego odnotowano ogromną redukcję ekspresji genów dla peroksydaz, różni od strefy włośnikowej odmiany 'Karat' i mutantu *rhp1.b* w poziomie wytwarzania reaktywnych form tlenu. W badaniach *in vivo* z wykorzystaniem fluorescencyjnego indykatora obecności wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego ( $\cdot\text{OH}$ ) wykazano, że poziom produkcji  $\cdot\text{OH}$  w korzeniu bezwłośnikowego mutantu jest minimalny i jest kilkakrotnie niższy niż w korzeniu mutantu *rhp1.b* i odmiany wyjściowej 'Karat'. Co istotne, traktowanie korzeni mutantu *rhp1.b* i odmiany wyjściowej 'Karat' inhibitorem peroksydaz powodowało efekt identyczny jak w przypadku fenotypu bezwłośnikowego: produkcja  $\cdot\text{OH}$  ulegała zahamowaniu (Kwaśniewski i wsp., *Journal of Plant Physiology*, 2013). W związku z tym uzyskane wyniki wskazywały na udział peroksydaz w produkcji reaktywnych form tlenu, głównie reaktywnego rodnika hydroksylowego, w inicjacji rozwoju włośników u jęczmienia.

Na podstawie uzyskanych wyników oraz kluczowych prac opisujących metabolizm reaktywnych form tlenu w komórkach roślinnych (Liszkay i wsp., 2004; Passardi i wsp., 2004), wysunąłem hipotezę, która zakładała zależną od peroksydaz produkcję rodnika hydroksylowego, z wykorzystaniem jako związku pośredniego anionorodnika ponadtlenkowego ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Rola anionorodnika ponadtlenkowego w

rozwoju włosników była opisywana wcześniej u *Arabidopsis*, gdzie wykazano, że zlokalizowana ekspresja włosnikowo-specyficznej oksydazy NADPH kodowanej przez gen *Rhd2* prowadzi do produkcji  $O_2^{\bullet-}$  w komórkach włosnikowych i jest wymagana do prawidłowego wzrostu włosników (Foreman et al., 2003, Jones et al., 2007). Aby stwierdzić, czy brak wytwarzania rodnika hydroksylowego w korzeniu bezwłosnikowego mutantu *rhl1.a* nie wynika z zaburzeń w produkcji  $O_2^{\bullet-}$ , przeprowadzono analizy *in vivo* z wykorzystaniem indykatora obecności anionorodnika ponadtlenkowego. Badania wykazały, że  $O_2^{\bullet-}$  produkowany jest na jednakowym poziomie w komórkach włosnikowych odmiany wyjściowej 'Karat', mutantu *rhp1.b* ale również w wybranych komórkach epidermy mutantu bezwłosnikowego. W związku z tym uzyskane wyniki potwierdzały prawdopodobną rolę peroksydaz w produkcji reaktywnych form tlenu niezbędnych do zainicjowania rozwoju włosników u jęczmienia. Co istotne, dodatkowe analizy wpływu inhibitora peroksydaz na wzrost włosników wykazały, że traktowanie korzenia odmiany 'Karat' inhibitorem peroksydaz powoduje powstanie fenotypu bezwłosnikowego, podobnego jak w przypadku mutantu *rhl1.a*.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz na podstawie danych literaturowych opisujących funkcję oksydazy NADPH w rozwoju włosników, zaproponowałem oryginalny schemat ilustrujący rolę reaktywnych form tlenu w inicjacji i rozwoju włosników (Ryc. 1; **Kwaśniewski i wsp., Journal of Plant Physiology, 2013**). Wydaje się uzasadnione stwierdzenie, że w pierwszym etapie inicjacji rozwoju włosników kluczową rolę odgrywają zależne od peroksydaz reaktywne formy tlenu, głównie wysoce reaktywny rodnik hydroksylowy, który może uczestniczyć we wstępnym rozluźnianiu ściany komórkowej trichoblastu w miejscu powstawania przyszłego primordium włosnika (Ryc. 1.1). Zaburzenie funkcjonowania peroksydaz (u mutantu bezwłosnikowego *rhl1.a* poprzez bardzo obniżoną ekspresję genów dla peroksydaz) prowadzi do braku produkcji rodnika hydroksylowego, uniemożliwiając zainicjowanie rozwoju włosników. W drugim etapie rozwoju włosników, już po zainicjowaniu primordium, kluczową rolę odgrywa produkowany przez oksydazę NADPH/*Rhd2* anionorodnik ponadtlenkowy, który uczestniczy w ustalaniu gradientu  $Ca^{2+}$  niezbędnego do prawidłowego wzrostu szczytowego włosnika (Ryc. 1.2).



Ryc. 1. Schemat ilustrujący skoordynowaną produkcję reaktywnych form tlenu (Reactive Oxygen Species, ROS) podczas rozwoju włośnika. (i-iii) odpowiednio peroksydacyjny, oksydacyjny i hydroksylacyjny cykl włośnikowo-specyficznej peroksydazy (RH-PRX), (iv) oksydacyjny cykl włośnikowo-specyficznej oksydazy NADPH (RH-NOX). (1) Pierwszy etap inicjacji rozwoju włośników wymaga produkcji zależnych od peroksydazy rodników hydroksylogowych (•OH) zaangażowanych w rozluźnianie ściany komórkowej i inicjację rozwoju primordium włośnika; (2) drugi etap rozwoju włośników wymaga zależnej od RH-NOX produkcji anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) koniecznego do wzrostu wierzchołkowego włośnika. A – prawidłowa, skoordynowana produkcja ROS w 1 i 2 etapie rozwoju włośnika umożliwia jego prawidłowy wzrost; B – zaburzenie produkcji O<sub>2</sub><sup>•-</sup> na skutek mutacji RH-NOX powoduje zatrzymanie rozwoju włośnika na etapie primordium (jak u mutantu *rhd2 A. thaliana*); C – brak produkcji •OH na skutek drastycznego obniżenia ekspresji RH-PRX uniemożliwia inicjację rozwoju włośnika (jak u mutantu *rhl1.a* jęczmienia). Schemat opracowano na podstawie Liszkay i wsp. (2004) oraz Passardi i wsp. (2004).

Przeprowadzone badania dostarczyły więc zupełnie nowych informacji na temat pierwszych etapów rozwoju włośników, i dowiodły roli peroksydaz w tym procesie. Zidentyfikowane geny dla peroksydaz, oznaczone jako *HvPRX2* i *HvPRX45* sklonowano a ich sekwencje nukleotydowe i kodowane sekwencje białkowe zdeponowano w bazie danych GenBank. Ponadto, przeprowadzono szczegółową analizę ekspresji zidentyfikowanych genów we fragmentach korzenia obejmujących oddzielnie część merystematyczną korzenia, strefę elongacyjną, strefę różnicowania komórek oraz strefę

ze zróżnicowanymi komórkami włóśnikowymi. Wykazano, że ekspresja zidentyfikowanych genów koreluje z rozwojem włóśników – ekspresja genów *HvPRX2* i *HvPRX45* jest minimalna w strefie merystematycznej i elongacyjnej, natomiast wzrasta drastycznie w strefie różnicowania komórek i w strefie włóśnikowej. Ponadto dla genu *HvPRX45* przeprowadzono analizy *in situ* RNA hybrydyzacji i wykazano, że ekspresja tego genu ograniczona jest wyłącznie do komórek włóśnikowych w korzeniu jęczmienia. Przeprowadzone dodatkowo analizy promotorów genów *HvPRX2* i *HvPRX45* wykazały istnienie konserwowanych ewolucyjnie elementów *cis*-regulatorowych, opisanych jako elementy decydujące o włóśnikowo-specyficznej ekspresji genów (RHE; **Kwasniewski i wsp., Journal of Plant Physiology, 2013**).

### **Rola włóśników w adaptacji roślin do stresu niedoboru wody**

Omawiane dotychczas prace dotyczyły identyfikacji nowych genów i charakterystyki procesów związanych z różnicowaniem i rozwojem włóśników. W pracach tych kluczową rolę odgrywały analizy porównawcze transkryptomów mutantów włóśnikowych i ich odmian wyjściowych, w szczególności analizy prowadzone w układzie bezwłóśnikowego mutantu *rhl1.a* i odmiany wyjściowej 'Karat'. Wykorzystując zdobyte doświadczenia związane z globalnym profilowaniem transkryptomu roślin, postanowiliśmy przeprowadzić kompleksowe badania dotyczące funkcji włóśników korzeniowych. W badaniach realizowanych w ramach projektu 7 Programu Ramowego UE „*EURoot - Enhancing resource Uptake from Roots under stress in cereal crops*”, kierowanego w Katedrze Genetyki UŚ przez prof. dr hab. Iwonę Szarejko, postanowiliśmy sprawdzić, jak stres niedoboru wody wpływa na kondycję roślin i zmiany w transkryptomie korzenia i liścia bezwłóśnikowego mutantu *rhl1.a* i odmiany 'Karat' wykształcającej prawidłowe włóśniki. W związku z tym, podstawowym celem badań była identyfikacja mechanizmów, które opisywałyby rolę włóśników podczas stresu suszy, a tym samym określenie czy i jak obecność włóśników wpływa na adaptację do stresu niedoboru wody u roślin.

Rośliny bezwłóśnikowego mutantu *rhl1.a* i odmiany 'Karat' poddawano stresowi suszy w stadium kilkunastodniowej siewki. W eksperymencie wyróżniono dwa etapy stresu niedoboru wody: stres wczesny, łagodny, trwający 4 dni od momentu zaprzestania podlewania roślin do osiągnięcia 3% objętościowej wilgotności gleby, oraz stres późny,

intensywny, trwający 10 dni od momentu osiągnięcia 3% wilgotności gleby, prowadzony w warunkach 1,5% objętościowej wilgotności gleby. Podczas obu etapów eksperymentu rośliny poddawano analizom fizjologicznym, obejmującym określenie wydajności procesu fotosyntezy i względnej zawartości wody, oraz analizom molekularnym, obejmującym globalne profilowanie transkryptomu korzenia i liścia z wykorzystaniem macierzy ekspresyjnych w systemie Agilent (Barley Agilent Array; **Kwasniewski i wsp., Journal of Experimental Botany, 2016**).

Przeprowadzone analizy wykazały, że podczas wczesnego etapu traktowania stresem suszy więcej genów wykazywało zróżnicowaną ekspresję w korzeniach odmiany wyjściowej 'Karat' niż u mutantu bezwłośnikowego *rhl1.a*. Wśród nich, 106 genów ulegało podwyższonej ekspresji tylko u odmiany 'Karat' ( $P \leq 0.05$ ; FDR 5%;  $FC \geq 3$ ). Analiza ontologii tej grupy genów wykazała, że geny te biorą udział w sześciu istotnie nadreprezentowanych procesach biologicznych, w tym w procesie biosyntezy kwasu abscysynowego (ABA), biosyntezy celulozy, syntezy pierwotnej i wtórnej ściany komórkowej, procesach pogrubiania ścian komórkowych oraz odpowiedzi na bodźce świetlne. Istotne podwyższenie ekspresji dwóch genów kodujących kluczowe enzymy na ścieżce biosyntezy ABA we wczesnych etapach stresu suszy wyłącznie w korzeniach odmiany 'Karat' wskazuje, że rośliny wykształcające normalne włosniki odpowiadają na niedobór wody wcześniej niż rośliny mutantu bezwłośnikowego poprzez szybszą lub silniejszą aktywację szlaków biosyntezy ABA. W konsekwencji można przyjąć, że rośliny o prawidłowo wykształconych, funkcjonalnych włosnikach sprawniej uruchamiają procesy adaptacji do warunków stresu niedoboru wody we wczesnych etapach stresu na drodze zależnej od kwasu abscysynowego. Procesy biologiczne, związane z syntezą celulozy oraz komponentów ściany komórkowej były reprezentowane przez siedem genów, które ulegały podwyższonej ekspresji w pierwszym etapie stresu suszy wyłącznie u odmiany 'Karat'. Geny te były ortologami genów *Arabidopsis thaliana*, należących do jednej ścieżki regulatorowej (Taylor-Teeples i inni, 2015). Ich zorganizowana aktywacja we wczesnym etapie suszy może wpływać na lepszą adaptację do stresu suszy u roślin o normalnych włosnikach w porównaniu do mutantu bezwłośnikowego, u którego nie obserwuje się podwyższenia ekspresji tych genów w korzeniach. Ponadto, we wczesnym etapie stresu suszy, wyłącznie w korzeniach odmiany 'Karat', zaobserwowano podwyższoną ekspresję ortologa genu *FLOWERING LOCUS T (FT)*, odpowiedzialnego m.in. za kontrolę ruchów aparatów szparkowych w odpowiedzi na fotoperiod (Ando i inni,

2013). Badania ostatnich lat sugerują, że istnieje związek między ścieżkami odpowiedzi na suszę a odpowiedzią na fotoperiod, dlatego też ekspresja genu ortologicznego do locus *FT* u odmiany 'Karat' może być jednym z elementów odpowiedzi na stres, poprzez aktywację ścieżki ucieczki przed suszą. Brak aktywacji takiej ścieżki u mutanta bezwłośnikowego może świadczyć o tym, że brak włóśników uniemożliwia właściwą detekcję stresu suszy lub też odpowiedź na ten stres u mutantu jest znacznie mniej wydajna.

Przedstawione wyniki sugerują, że u mutantu bezwłośnikowego mechanizmy chroniące przed stresem suszy są aktywowane w mniejszym stopniu niż u odmiany wyjściowej wykształcającej funkcjonalne włóśniki. Taka hipoteza jest dodatkowo poparta danymi o zróżnicowanej ekspresji genów, które podczas wczesnej suszy ulegały podwyższonej ekspresji wyłącznie w liściach bezwłośnikowego mutantu. Analiza ontologii tych genów wykazała, że istotnemu podwyższeniu ekspresji ulegają geny kodujące czynniki odpowiedzi na bodźce abiotyczne, w tym nadtlenek wodoru, ciepło i intensywne światło, jak również geny zaangażowane w regulację ekspresji, obróbkę rRNA, biogenezę rybosomów czy stabilizację białek. Geny należące do wspomnianych kategorii reprezentują czynniki związane z odpowiedzią na długotrwały stres suszy, zatem wydaje się że rośliny bezwłośnikowego mutantu doświadczają większego stresu niż rośliny odmiany 'Karat' wykształcającej prawidłowe włóśniki.

Intensywna, 10-dniowa susza spowodowała znacznie więcej zmian w transkryptomach korzeni i liści mutantu bezwłośnikowego niż u odmiany wyjściowej 'Karat'. Stwierdzono, że w korzeniach mutantu największą grupą genów ulegającą podwyższonej ekspresji na skutek stresu stanowią geny odpowiedzi na bodźce abiotyczne i związane z regulacją procesu transkrypcji w odpowiedzi na te bodźce. Z kolei obniżonej ekspresji w korzeniach mutantu ulegały geny zaangażowane z procesy biosyntezy różnorodnych makromolekuł. W przypadku liści bezwłośnikowego mutantu, długotrwała susza doprowadziła do specyficznego obniżenia ekspresji ponad 1500 genów odpowiadających za procesy cytokinezy, transportu komórkowego związanego z mikrotubulami, odpowiedzi na stres czy regulacje epigenetyczne. Wśród genów, które ulegały podwyższonej ekspresji wyłącznie u mutantu bezwłośnikowego znalazły się z kolei czynniki zaangażowane w komórkowe procesy kataboliczne, regulację translacji, kontrolę stabilności białek, transport cytoplazmatyczny, odpowiedź na związki

nieorganiczne oraz organizację mitochondriów. Podwyższona ekspresja tych genów może wiązać się z wyższym poziomem uszkodzeń komórkowych w liściach mutanta bezwłośnikowego niż u jego formy wyjściowej. Taki wniosek koreluje z obserwacjami funkcjonowania fotosystemu II u mutantu i odmiany 'Karat' na skutek długotrwałego niedoboru wody. Stwierdzono mianowicie, że silna i długotrwała susza prowadzi u mutantu do znacznie większego uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego niż ma to miejsce u odmiany 'Karat'.

W toku przeprowadzonych badań stwierdzono więc, że w trakcie pierwszych dni stresu, gdy następuje stopniowy spadek wilgotności gleby, w korzeniach odmiany wykształcającej normalne włosniki dochodzi do specyficznej aktywacji genów związanych z sygnalizacją stresu suszy oraz genów aktywujących mechanizmy obrony przed tym stresem, podczas gdy u mutantu bezwłośnikowego mechanizmy te nie są włączane. Biorąc pod uwagę, że u mutantu bezwłośnikowego nie dochodzi do ekspresji szeregu genów koniecznych do wykształcenia włosników, a dane literaturowe sugerują, że część z nich może być jednocześnie wykorzystywana jako czynniki przekazujące sygnał o występowaniu niedoboru wody, można postawić hipotezę, że włosniki mogą pełnić rolę swoistych sensorów stanu środowiska, a w związku z tym mogą wpływać na adaptację do zmiennych i niekorzystnych warunków środowiska (**Kwasniewski i wsp., Journal of Experimental Botany, 2016**).

### **Baza danych dotycząca genomiki włosników – iRootHair**

W trakcie realizacji opisanych powyżej prac, w których prowadzono globalne analizy transkryptomu w celu identyfikacji nowych genów związanych z różnicowaniem i rozwojem włosników jęczmienia, oraz charakteryzowano zależne od włosników mechanizmy adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych, każdorazowo przeszukiwano dostępne dane literaturowe i sekwencyjne, czy zidentyfikowane geny były dotychczas opisywane jako pełniące rolę w powstawaniu i funkcji włosników. Podobne analizy prowadzone są przez większość grup badawczych zajmujących się badaniem molekularnych podstaw różnicowania i rozwoju włosników i za każdym razem wymagają skrupulatnego sprawdzenia istniejącej literatury i przeszukania baz sekwencyjnych. W związku z tym, w celu usprawnienia tego typu badań opracowałem pierwszą, szczegółową bazę danych dotyczącą genomiki włosników – iRootHair

(Kwaśniewski i wsp., *Plant Physiology*, 2013; [www.iroothair.org](http://www.iroothair.org)). Aktualnie baza iRootHair zawiera informacje o 166 genach uczestniczących w procesach różnicowania komórek włosnikowych i regulujących wzrost włosników. Informacje dotyczące genów w bazie iRootHair zawierają dane o nazwie genu, identyfikatorach, funkcji kodowanego białka, roli genu w różnicowaniu i rozwoju komórek włosnikowych, fenotypie mutantów z bezpośrednim odnośnikiem do bazy The Arabidopsis Information Resource (TAIR), poprzez którą można zamówić nasiona mutantów Arabidopsis, oraz o profilu ekspresji genu. Ponadto, każda karta genu zawiera odnośnik do sekwencji genomowej genu, sekwencji mRNA/cDNA, sekwencji białkowej, sekwencji promotorowej na odcinku 1000 pb powyżej miejsca startu transkrypcji oraz do kart genów ortologicznych zidentyfikowanych u innych gatunków roślin. Dodatkowo, karta genu zawiera odnośniki do bazy eFP Browser oraz Root Hair Expression Database, umożliwiającej analizę profilu ekspresji genu przeprowadzaną na podstawie metaanaliz danych pochodzących z mikromacierzy ekspresyjnych Affymetrix. W końcowej części karty genu zawarto referencje literaturowe publikacji opisujących funkcje genu z odnośnikami do artykułów w bazie NCBI. W celu usprawnienia korzystania z bazy iRootHair i wyszukiwania informacji o genach i ich funkcjach, wszystkie geny przyporządkowano do regulowanych przez nie 3 podstawowych procesów rozwojowych oraz do 6 kategorii fenotypowych mutantów włosnikowych. Takie przyporządkowanie znacznie ułatwia analizę genów charakterystycznych dla poszczególnych etapów rozwoju włosników w badaniach *reverse genetics* a także pozwala zawęzić grupę genów w zależności od obserwowanego fenotypu w analizach mutantów metodami *forward genetics*. Co więcej, w celu usprawnienia przeszukiwania sekwencji genów włosnikowych, ich promotorów oraz kodowanych przez nie białek, baza iRootHair została wyposażona w narzędzie BLAST do wyszukiwania sekwencji podobnych do sekwencji użytkownika. Ponadto, wykorzystanie programu BLAST oraz zgromadzonych sekwencji genów ortologicznych do genów opisanych jako biorących udział w różnicowaniu i rozwoju włosników umożliwia przeprowadzanie wstępnych analiz konserwacji ewolucyjnej białek i/lub promotorów genów w układach ortologicznych. W sytuacji kiedy jednak użytkownik preferuje przeprowadzanie takich analiz z wykorzystaniem zewnętrznych narzędzi, iRootHair oferuje funkcję eksportu wszystkich zawartych w bazie sekwencji z podziałem na sekwencje genomowe genów, mRNA/cDNA, sekwencje białkowe i promotorowe genów włosnikowych i ich ortologów. Na koniec należy wspomnieć również o tekstowym



narzędziu przeszukiwania bazy iRootHair oraz o panelu formularza, poprzez który możliwe jest dodawanie lub weryfikacja informacji o genach włóśnikowych przez zweryfikowanych użytkowników. Przydatność bazy iRootHair oraz skuteczność zastosowanych rozwiązań została potwierdzona w analizach przeprowadzonych na danych uzyskanych we wspomnianych analizach transkryptomu wykorzystujących platformę mikromacierzową Affymetrix oraz we wszystkich późniejszych pracach realizowanych w naszej grupie. Publikacja opisująca bazę iRootHair została opublikowana w czasopiśmie *Plant Physiology* w dziale Breakthrough Technologies (**Kwaśniewski i wsp., Plant Physiology, 2013**). O popularności bazy iRootHair, poza wskaźnikami cytowań świadczy również ilość odwiedzin serwisu – od czasu udostępnienia odnotowano ponad 11450 wejść na adres bazy iRootHair.

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

1. Analizy różnicowe transkryptomów mutantów włóśnikowych jęczmienia i ich odmian wyjściowych umożliwiły identyfikację 8 nowych genów uczestniczących w inicjacji rozwoju włóśników jęczmienia. Zidentyfikowane geny kodują białka należące do peroksydaz, endotransglikozylaz ksyloglukanu, proteoglikanów bogatych w arabinogalaktany, ekstensyn i białek bogatych w powtórzenia leucynowe. Rola tych genów w rozwoju włóśników nie była wcześniej opisywana u żadnego gatunku.
2. Spośród zidentyfikowanych genów sklonowano i szczegółowo scharakteryzowano dwa włóśnikowo-specyficzne geny kodujące białka należące do peroksydaz i opisano ich rolę w inicjacji rozwoju włóśników jęczmienia.
3. Wykazano rolę zależnych od włóśnikowo-specyficznych peroksydaz reaktywnych form tlenu w inicjacji rozwoju włóśników jęczmienia. Zaproponowano przy tym schemat dwuetapowego udziału zależnych od włóśnikowo-specyficznych peroksydaz i zależnych od włóśnikowo-specyficznej oksydazy NADPH reaktywnych form tlenu w inicjacji i wzroście wierzchołkowym włóśników u roślin.
4. Wykazano rolę włóśników w adaptacji jęczmienia do stresu niedoboru wody poprzez wcześniejszą i/lub skuteczniejszą aktywację mechanizmów odpowiedzi

na stres suszy. Opisano potencjalną rolę włóśników jako sensorów stanu środowiska, zaangażowanych bezpośrednio w mechanizmy percepcji i przekazywania sygnału o stanie środowiska.

5. Stworzono pierwszą, szczegółową bazę danych dotyczącą genomiki włóśników, iRootHair, która dzięki zaimplementowanym narzędziom ułatwia prowadzenie badań dotyczących charakterystyki mechanizmów różnicowania, wzrostu i funkcji włóśników.

### Cytowana literatura

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H et al. 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Ando E, Ohnishi M, Wang Y, Matsushita T, Watanabe A, Hayashi Y, Fujii M, Ma JF, Inoue S, Kinoshita T. 2013. *TWIN SISTER OF FT*, *GIGANTEA*, and *CONSTANS* have a positive but indirect effect on blue light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162, 1529-1538.
- Arvidsson S, Kwasniewski M, Riano-Pachon D. M. and Mueller-Roeber B. 2008. QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 9: 465.
- Böhme K, Li Y, Charlot F, Grierson C, Marrocco K, Okada K, et al. 2004. The *Arabidopsis* COW1 gene encodes a phosphatidylinositol transfer protein essential for root hair tip growth. *Plant J* 40: 686-98.
- Carol RJ, Takeda S, Linstead P, Durrant MC, Kakesova H, Derbyshire P, et al. 2005. A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* 438: 1013-6.
- Chmielewska B, Janiak A, Karcz J, Guzy-Wrobelska J, Forster BP, Nawrot M, Rusek A, Smyda P, Kedziorowski P, Maluszynski M, Szarejko I. 2014. Morphological, genetic and molecular characteristics of barley root hair mutants. *J Appl Genet* 55: 433-47.
- Clowes FAL. 2000. Pattern in root meristem development in angiosperms. *New Phytol* 146: 83-94.
- Dunand C, Crvecoeur M and Penel C. 2007. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol* 174: 332-41.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-6.
- Jones MA, Raymond MJ, Yang Z, Smirnov N. 2007. NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *J Exp Bot* 58: 1261-70.
- Kwasniewski M and Szarejko I. 2006. Molecular cloning and characterization of beta-expansin gene related to root hair formation in barley. *Plant Physiol* 141: 1149-58.
- Liszkay A, van der Zalm E, Schopfer P. 2004. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , and  $\cdot OH$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 136: 1-10.
- Long SR. 1996. Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* 8(10): 1885-98.
- Marzec M, Melzer M, Szarejko I. 2013. Asymmetric growth of root epidermal cells is related to the differentiation of root hair cells in *Hordeum vulgare* (L.). *J Exp Bot* 64: 5145-55.
- Passardi F, Penel C, Dunand C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9: 534-40.
- Ridge RW. 1995. Recent developments in the cell and molecular biology of root hairs. *J Plant Res* 108: 399-405.
- Ryan E, Steer M, and Dolan L. 2001. Cell biology and genetics of root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 215: 140-149.
- Samaj F, Braun M, Baluka F, Ensikat H-J, Tsumuraya Y and Volkmann D. 1999. Specific Localization of Arabinogalactan-Protein Epitopes at the Surface of Maize Root Hairs. *Plant and Cell Physiology* 40: 874-883.
- Schiefelbein JW. 2000. Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiology* 124: 1525-1531.

- Singh P, Kaloudas D, Raines CA. 2008. Expression analysis of the Arabidopsis CP12 gene family suggests novel roles for these proteins in roots and floral tissues. *Journal of Experimental Botany* 59: 3975-3985.
- Szarejko I, Janiak A, Chmielewska B, Nawrot M. 2005. Genetic analysis of several root hair mutants of barley. *Barley Gen Newslett* 35: 36-8.
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L. 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319: 1241-4.
- Taylor-Teeples M, Lin L, de Lucas M, Turco G, Toal TW, Gaudinier A, Young NF, Trabucco GM, Veling MT, Lamothe R, et al. 2015. An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* 517: 571-5.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Vissenberg K, Fry SC, Verbelen J-P. 2001. Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 127: 1125-35.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo badawczych

Początek mojej pracy naukowej związany był z realizacją badań do pracy magisterskiej "Analiza genetyczna protoonkogenu RET w zespole mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej typu 2B i w sporadycznym raku rdzeniastym tarczycy", którą wykonywałem w latach 1997-2000 w Zakładzie Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Jarząb. Wyniki uzyskane podczas realizacji mojej pracy magisterskiej zostały opublikowane w postaci dwóch artykułów (**Wiench i wsp., Endokrynologia Polska, 2010; Wiench i wsp., Wiadomości Lekarskie, 2011**), w których omówiono skuteczność opartych o sekwencjonowanie fragmentów sekwencji genomowej protoonkogenu RET testów diagnostycznych, umożliwiających diagnozowanie dziedzicznych i somatycznych przypadków raka rdzeniastego tarczycy. Wyniki przeprowadzonych badań były istotne ze względu na złe rokowania osób ze sporadyczną postacią raka rdzeniastego tarczycy i z zespołem mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej typu 2B, w którym rak rdzeniasty tarczycy jest jednym z symptomów. Zastosowane metody zostały wdrożone w Zakładzie Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej jako rutynowe testy genetyczne raka rdzeniastego tarczycy. W roku 1999, jeszcze jako student 4. roku studiów magisterskich miałem możliwość wygłoszenia referatu z wyników pracy magisterskiej podczas XXXV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Olsztynie.

### **Wykorzystanie technik biologii molekularnej w genomice roślin**

Będąc na 5. roku studiów podjąłem pracę w wymiarze ½ etatu w charakterze pracownika inżynierjno-technicznego w Katedrze Genetyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Szarejko, gdzie byłem zaangażowany w prace nad wykorzystaniem markerów SSR do analizy częstotliwości rekombinacji w męskiej i żeńskiej gametogenezie wykorzystując podwojone haploidy pszenicy, uzyskane na drodze krzyżowania oddalonego z kukurydzą i poprzez kultury pylnikowe (**Guzy-Wrobelska i wsp., Euphytica, 2007**). Przeprowadzone badania dostarczyły interesujących wniosków na temat częstotliwości rekombinacji zachodzących podczas tworzenia gamet. Wykazano istotnie wyższą częstotliwość rekombinacji w mejozie gamet męskich niż żeńskich, co może mieć istotne znaczenie w doborze metodyki otrzymywania podwojonych haploidów w hodowli roślin. Jednocześnie, wykorzystując doświadczenia zdobyte podczas realizacji pracy magisterskiej w Instytucie Onkologii w Gliwicach, wraz ze współpracownikami z Katedry Genetyki UŚ rozpocząłem wdrażanie do badań Katedry Genetyki nowych metod biologii molekularnej a także brałem aktywny udział w pracach inwestycyjnych związanych z tworzeniem i modernizacją laboratoriów biologii molekularnej WBiOŚ, realizowanych w ramach grantu inwestycyjnego KBN na rozbudowę i modernizację laboratoriów WBiOŚ UŚ.

W roku 2000, po uzyskaniu tytułu magistra biologii, rozpocząłem studia doktoranckie na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Równocześnie zostałem zatrudniony w Katedrze Genetyki w wymiarze ½ etatu asystenta. W trakcie studiów doktoranckich prowadziłem badania pod opieką prof. dr hab. Iwony Szarejko związane z identyfikacją genów zaangażowanych w proces inicjacji rozwoju włósników jęczmienia. Realizacja badań związanych z pracą doktorską wymagała ode mnie opanowania wielu zaawansowanych technik biologii molekularnej, obejmujących metody globalnego różnicowania transkryptomów takie jak cDNA Representational Difference Analysis i Differential Display, techniki klonowania genów takie jak Genome Walking czy RACE, metody analizy promotorów, obejmujące izolację białek jądrowych i Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA), przygotowywanie konstruktów genowych czy wreszcie opanowania i wdrożenia metod bioinformatycznych i statystycznych. Niewątpliwie czas studiów doktoranckich, związany z realizacją badań

do pracy doktorskiej, oraz wdrażanie do badań Katedry Genetyki UŚ zaawansowanych technik biologii molekularnej wpłynął na dalsze etapy mojej kariery naukowej. Ponadto, postęp w dziedzinie genomiki, jaki miał miejsce w tamtym okresie, ukształtował moje zainteresowania naukowe a zdobyta wiedza i doświadczenie otworzyły pole do współpracy naukowej w wielu dziedzinach.

W związku z szerokimi zainteresowaniami naukowymi i dużym doświadczeniem dotyczącym metod biologii molekularnej i analizy danych, od początku pracy w Katedrze Genetyki UŚ współpracuję z innymi pracownikami i doktorantami Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska oraz z absolwentami Wydziału. Ta aktywność przekłada się na realizację wspólnych projektów naukowych, w których wykorzystując swoje doświadczenie pełnię często rolę konsultanta merytorycznego i wykonawcy, głównie w zakresie technik biologii molekularnej i genomiki oraz bioinformatyki i statystyki. Efektem takich prac jest szereg publikacji dotyczących genomiki roślin oraz genomiki mikroorganizmów.

Współpraca naukowa z dr Damianem Gruszką, którego byłem bezpośrednim opiekunem naukowym podczas jego badań dotyczących pracy magisterskiej, przyczyniła się do scharakteryzowania jęczmiennego genu *HvBRI*, homologa genu *Arabidopsis thaliana BR-insensitive1*, kodującego receptor brasinosteroidowy. W pracy tej wykazano, że półkarłowy fenotyp mutantu 093AR, otrzymanego na drodze mutagenyzy chemicznej w Katedrze Genetyki UŚ, wynika z mutacji genu *HvBRI*. Moja rola w prowadzonych badaniach dotyczyła pomocy w klonowaniu i sekwencjonowaniu genu *HvBRI* oraz w przeprowadzonych następnie analizach bioinformatycznych sekwencji genu i białka (**Gruszka i wsp., Barley Genetics Newsletter, 2004**).

Podobny zakres współpracy dotyczył mojego udziału w badaniach nad izolacją, charakterystyką i lokalizacją w genomie *Chenopodium quinoa* sekwencji powtarzalnych, wyizolowanych z genomu z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego *Taq I* (**Kolano i wsp., Journal of Applied Genetics, 2008**). Przeprowadzone badania wykazały, że mimo iż zidentyfikowana sekwencja występuje w genomie *Chenopodium quinoa* w wielu kopiach i jest rozproszona w obrębie chromosomów, nie jest homologiczna do znanych ruchomych sekwencji genomowych, co wskazuje na identyfikację nowej sekwencji powtarzalnej niewiadomego pochodzenia.

Współpraca naukowa w zakresie genomiki roślin, w której moja rola podobnie jak w opisaney powyżej pracy dotyczyła głównie pomocy w analizie sekwencji genów i białek, związana była również z badaniami komplementarnymi do badań, które stanowią treść mojego podstawowego osiągnięcia naukowego. W pracy Janiak i współpracowników (2012), realizowanej w ramach grantu MNiSW COST „Genomika funkcjonalna i proteomika korzeni *Hordeum vulgare* – poszukiwanie genów i białek związanych z różnicowaniem i wzrostem komórek włosnikowych”, przeprowadzono analizy porównawcze proteomu korzenia mutantów włosnikowych jęczmienia *rhl1.a* i *rhp1.b* i ich odmian wyjściowych. Przeprowadzone badania umożliwiły identyfikację 13 białek różniących proteom korzenia mutantów włosnikowych i roślin wykształcających prawidłowe włosniki, przy czym wykazano brak jednoznacznej korelacji pomiędzy poziomem ekspresji zidentyfikowanych białek a poziomem ekspresji kodujących je genów (Janiak i wsp., **Journal of Applied Genetics**, 2012).

Moja współpraca w dziedzinie genomiki roślin obejmowała również przeprowadzenie analiz statystycznych w badaniach wrażliwości genomu roślin na działanie czynników mutagennych. W pracy Kwasniewskiej i współpracowników (2012) dowiedziono, że obszary rDNA *Crepis capillaris* podlegają silnej fragmentacji w wyniku działania hydrazydu kwasu maleinowego (MH), przy czym szczegółowe analizy wykazały zróżnicowaną wrażliwość sekwencji rDNA w odpowiedzi na traktowanie tym mutagenem. Stwierdzono wyższą wrażliwość 5S rDNA niż 25S rDNA, przy czym różnice we wrażliwości tych sekwencji na działanie mutagenu mogą wynikać z ich lokalizacji w obrębie regionów chromatyny o różnej strukturze, tj. regionów hetero- i euchromatynowych (Kwasniewska i wsp., **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 2012). Uzyskane wyniki skłoniły do podjęcia dodatkowych badań, których celem było sprawdzenie, czy wyższa wrażliwość genów 5S rRNA w porównaniu do genów 25S rRNA wykazana u *C. capillaris* jest gatunkowo specyficzna, czy raczej wynika z liczby loci tych genów u tego gatunku. Ponadto sprawdzano, czy obserwowany wcześniej efekt jest podobny w przypadku różnych mutagenów: hydrazydu kwasu maleinowego (MH), nitrozo-metylomocznika (MNU) oraz promieniowania gamma. Analizy przeprowadzone u jęczmienia wykazały, że wyższa wrażliwość sekwencji 5S rDNA niż 25S rDNA na działanie mutagenów nie jest gatunkowo specyficzna ani nie zależy od rodzaju mutagenu. Wykazano jednak różnice we wrażliwości 25S rDNA na rodzaj zastosowanego mutagenu - 25S rDNA było bardziej wrażliwe na działanie mutagenów chemicznych, niż

promieniowania gamma (**Kwasniewska i Kwasniewski, Journal of Applied Genetics, 2013**).

### **Wykorzystanie technik biologii molekularnej w genomice mikroorganizmów**

Moja pomoc w zakresie metodyki badań i zaangażowanie w projekty z zakresu genomiki organizmów nie ograniczała się jedynie do genomiki roślin. Od wielu lat prowadzę współpracę z grupą badawczą z Katedry i Zakładu Ogólnej Biologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. W badaniach Małeckiej-Mikosz i współpracowników (2004) prowadziłem analizy bioinformatyczne i opracowałem metodykę analiz laboratoryjnych dotyczących identyfikacji i analizy polimorfizmu genu metycylinooporności (*mecA*) bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (gronkowiec). Przeprowadzone analizy wykazały silną konserwację genu *mecA* i brak zmienności w obrębie sekwencji genu amplifikowanego z analizowanych szczepów, a także potwierdziły skuteczność diagnostyki metycylinoopornych gronkowców koagulazoujemnych poprzez szybką amplifikację fragmentu genu *mecA* (**Małecka-Mikosz i wsp., Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, 2004**).

Podobny zakres mojej współpracy z grupą badawczą z Katedry i Zakładu Ogólnej Biologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego dotyczył badań Strzelczyk i współpracowników (2006), na potrzeby których opracowałem metodykę analiz związanych z oceną częstotliwości występowania i analizą genogatunków wywołujących boreliozę bakterii *Borrelia burgdorferi* w organizmach kleszczy występujących na terenach rekreacyjnych w obrębie województwa śląskiego. Badania wykazały, że aż 16,5% kleszczy było zainfekowanych bakteriami *B. burgdorferi sensu lato*. Co istotne, badania potwierdziły skuteczność szybkiej i niedrożej metody amplifikacji fragmentu genu *fla*, w identyfikacji zakażeń kleszczy bakteriami *B. burgdorferi*, co może być przydatne w diagnostyce potencjalnej boreliozy u człowieka (**Strzelczyk i wsp., Advances in Clinical and Experimental Medicine, 2006**).

### **Badania z zakresu biologii systemowej organizmów modelowych**

W roku 2006 wyjechałem na dwuletni staż podoktorski do Max-Planck Research Institute of Molecular Plant Physiology w Potsdam-Golm w Niemczech, gdzie pracowałem

pod kierownictwem prof. Bernda Mueller-Roebera. Wyjazd do dużego, wiodącego instytutu badawczego umożliwił mi zapoznanie się z najnowocześniejszymi technikami stosowanymi w genomice roślin, w szczególności metodami biologii systemowej stosowanymi w genomice roślin modelowych oraz dał możliwość pracy w dużej, międzynarodowej grupie badawczej. Podczas stażu byłem bezpośrednim opiekunem naukowym 2 doktorantów, współpracowałem również ściśle z innymi pracownikami grupy.

W pracy Flavii Vischi Winck, wykorzystując moje doświadczenie w izolacji białek jądrowych z liści i korzeni jęczmienia, opracowaliśmy nowy, wydajny protokół izolacji jąder komórkowych i białek jądrowych modelowego glonu *Chlamydomonas reinhardtii*. Globalne analizy proteomiczne, przeprowadzone w celu weryfikacji opracowanego protokołu na wyizolowanych z jąder ekstraktach białkowych, przeprowadzone metodami matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) oraz nano-LC/MS/MS wykazały skuteczność opracowanej metody. Dodatkowe badania z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających specyficznie białka chloroplastowe, mitochondrialne i jądrowe potwierdziły skuteczność separacji frakcji białek jądrowych od innych kompartmentów komórkowych (**Winck i wsp., Journal of Phycology, 2011**).

Badania związane z proteomiką jąder komórkowych roślin, w szczególności czynników transkrypcyjnych, kontynuowałem we współpracy z dr Aleksandrą Skiryecz w kompleksowych badaniach dotyczących opisu roli czynnika transkrypcyjnego OBP1 w regulacji cyklu komórkowego u *Arabidopsis thaliana*. W badaniach tych opracowałem protokół analiz powinowactwa oczyszczonych białek czynnika transkrypcyjnego do fragmentów promotorów genów, których ekspresja jest regulowana przez ten czynnik transkrypcyjny. Protokół analiz metodą electrophoretic mobility shift assay (EMSA), opracowany w oparciu o czuły czytnik barwników podczerwieni Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) został wykorzystany w omawianej pracy do analiz przyłączania czynnika transkrypcyjnego OBP1 do promotora genu *AtDOF2;3* (**Skiryecz i wsp., The Plant Journal, 2008**) i jest wykorzystywany ciągle w kolejnych pracach grupy badawczej prof. Bernda Mueller-Roebera, dotyczących analiz funkcjonalnych czynników transkrypcyjnych i promotorów genów.



Podobne zagadnienia dotyczące biologii systemowej roślin, w tym charakterystyki czynników transkrypcyjnych i promotorów genów poruszyliśmy w pracy Balazadeh i współpracowników (2011), w której wykazaliśmy udział należącego do rodziny NAC czynnika transkrypcyjnego ORS1 w regulacji procesu starzenia u *Arabidopsis thaliana*. Kompleksowe badania, obejmujące identyfikację elementów regulomu zależnego od ekspresji czynnika ORS1 oraz miejsc *cis*-regulatorowych rozpoznawanych przez ORS1 zostały wsparte przeprowadzonymi przeze mnie analizami, prowadzącymi do identyfikacji konserwowanych ewolucyjnie miejsc regulatorowych promotora genu *ORS1*, niezbędnych do kontroli ekspresji genu podczas starzenia u *Arabidopsis* (**Balazadeh i wsp., Molecular Plant, 2011**)

### **Badania wykorzystujące analizy wielkoskalowe i techniki bioinformatyczne**

Niewątpliwie badania z zakresu biologii systemowej, jakie prowadziłem podczas stażu podoktorskiego wpłynęły na rozwój moich zainteresowań związanych z zastosowaniem analiz wielkoskalowych w genomice oraz umożliwiły zdobycie większego doświadczenia z zakresu bioinformatyki. Swoje doświadczenie wykorzystałem w opisanych wcześniej pracach, w których wykorzystano technologie globalnego profilowania ekspresji genów z użyciem mikromacierzy ekspresyjnych w systemie Affymetrix (**Kwasniewski i wsp., Journal of Plant Physiology, 2010**) oraz w systemie Agilent (**Kwasniewski i wsp., Journal of Experimental Botany, 2016**), w stworzeniu bazy danych dotyczącej genomiki włóśników iRootHair (**Kwasniewski i wsp., Plant Physiology, 2013**) lecz także w pracy, której wynikiem było stworzenie zautomatyzowanego narzędzia do projektowania starterów do ilościowych analiz ekspresji genów prowadzonych metodą qRT-PCR – QuantPrime (**Arvidsson i wsp., BMC Bioinformatics, 2008**; [www.quantprime.de](http://www.quantprime.de)). Ze względu na dowiedzioną skuteczność, wygodę użytkowania oraz uniwersalność (umożliwia projektowanie starterów na ponad 100 gatunków organizmów) stworzone narzędzie zyskało dużą popularność i jest szeroko wykorzystywane w genomice wielu organizmów.

Zdobyte doświadczenie z zakresu bioinformatyki i analiz wielkoskalowych, znacznie ułatwiło mi opanowanie stworzonych w ostatnich latach technologii sekwencjonowania DNA następnej generacji (Next Generation Sequencing, NGS) – technologii, które stały się moim podstawowym narzędziem badawczym w

realizowanych obecnie projektach. W ramach projektu konsorcyjnego '*ZiZOZap - Zintegrowany system wspomagający zarządzaniem i ochroną zbiornika zaporowego*', finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, koordynowałem zadanie badawcze dotyczące analiz bioróżnorodności mikrobiologicznej wód zbiornika zaporowego w Goczałkowicach. W projekcie tym, jako jedni z pierwszych w Polsce zastosowaliśmy technologię NGS w systemie 454/Roche do przeprowadzenia analiz metagenomicznych opartych o sekwencje 16S rRNA, wykorzystane do genotypowania mikroorganizmów zbiornika oraz określenia sezonowej, oraz zależnej od chwilowych czynników zewnętrznych, dynamiki zmian populacji mikroorganizmów. Poza publikacją przeglądową dotyczącą zastosowania biotestów i biomarkerów molekularnych w ocenie stanu wód (**Woznica i wsp., 2011**), publikacja opisująca wyniki kompleksowych, kilkuletnich analiz mikrobiologicznych i fizyko-chemicznych stanu zbiornika goczałkowickiego jest obecnie w recenzji (Stanimirova-Daszykowska i wsp.).

Opanowanie metod analiz metagenomowych opartych o technologie NGS umożliwiło również przeprowadzenie badań dotyczących stabilności składu rodzajowego mikroorganizmów wykorzystanych jako element biodetektora toksyczności wód (**Woznica i wsp., PLoS ONE, 2013**). Wyniki analiz metagenomicznych mikroorganizmów wykorzystanych w biodetektorze wykazały, że pomimo heterogeniczności wykorzystanych konsorcjów bakteryjnych, zapewniony pozostaje stały poziom bakterii nitryfikacyjnych koniecznych do prawidłowego działania biodetektora. Tym samym przeprowadzone badania przyczyniły się do wykazania jego użyteczności jako długoterminowego bioindykatora toksyczności wód. Biodetektor został zakwalifikowany do finału konkursu "Polski Wynalazek 2014", a także zdobył wyróżnienie w konkursie "Polski Produkt Przyszłości".

Analizy NGS w systemie 454/Roche wykorzystaliśmy również do opracowania nowej, szybkiej metody identyfikacji markerów mikrosatelitarnych (SSR) wykorzystywanych w genomice roślin. W cyklu prac dotyczących mszaków z rodzaju *Orthotrichum* oraz roślin wyższych *Galium trifidum*, *Pulsatilla patens* (odpowiednio **Sawicki i wsp., 2012**; **Szczecińska i wsp., 2012** oraz **Szczecińska i wsp. 2013**) przeprowadziliśmy sekwencjonowanie prób genomowego DNA z niewielkim pokryciem, które okazało się jednak wystarczające aby wśród otrzymanych setek tysięcy sekwencji o długości ok 400 pz zidentyfikować sekwencje mikrosatelitarne. Przeprowadzone

następnie analizy laboratoryjne umożliwiły wykazanie polimorficznego charakteru zidentyfikowanych sekwencji i na tej podstawie stworzono panele markerów SSR do badań zmienności w obrębie analizowanych gatunków. Zaproponowana strategia wykorzystująca technologie NGS była nowatorską, szybką metodą umożliwiającą identyfikację polimorficznych markerów SSR u mało znanych gatunków – dotychczasowe metody identyfikacji markerów SSR często wymagały żmudnych, nawet kilkuletnich analiz. Obecnie prowadzę podobne prace dotyczące identyfikacji markerów mikrosatelitarnych dla gatunków roślin inwazyjnych we współpracy z Katedrą Botaniki i Ochrony Przyrody WBiOŚ UŚ.

### **Bieżące badania i dalsze plany naukowe**

Technologie NGS umożliwiające wielkoskalowe sekwencjonowanie DNA, opracowane i wdrożone do badań w ostatnich zaledwie 4-5 latach otwały zupełnie nowe możliwości analiz genomu, transkryptomu, epigenomu i w związku z tym spowodowały rewolucję w naukach biologicznych. Duże doświadczenie jakie zdobyłem dzięki podjętym wcześniej badaniom wykorzystującym system NGS 454/Roche oraz doświadczenie w zakresie analiz bioinformatycznych danych uzyskiwanych w technologiach NGS, wsparte stażami i współpracą naukową z najlepszymi ośrodkami bioinformatycznymi w Europie (VIB/Ghent University, Bioinformatics & Systems Biology group, Ghent, Belgia; Genomics Core Facility, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Niemcy; Bioinformatics & Scientific Computing Core Facility, BioComp, Vienna Biocenter, Wiedeń, Austria) spowodowało, że mogłem w ostatnim czasie podjąć dotychczas niedostępne tematy badawcze.

Badania, które prowadzę obecnie, są rozwinięciem dotychczasowych zainteresowań związanych z biologią systemową i analizami wielkoskalowymi i dotyczą głównie zagadnień związanych z epigenetyką i transkryptomiką roślin. W roku 2014, w ramach pięcioletniego grantu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi *'Analiza zmienności epigenetycznej indukowanej stresem suszy oraz ocena jej stabilności transgeneracyjnej w aspekcie tolerancji jęczmienia na stres niedoboru wody'*, którego jestem kierownikiem, rozpocząłem prace mające na celu charakterystykę metylomu jęczmienia oraz określenie charakteru zmian wywoływanych w metylomie i transkryptomie przez stres niedoboru wody. Równocześnie, w ramach grantu NCN MAESTRO *'Struktura, dynamika i ewolucja*

*roślinnego genomu jądrowego z perspektywy badań cytomolekularnych*, prowadzę komplementarne badania metylomu i transkryptomu blisko spokrewnionego z jęczmieniem gatunku *Brachypodium distachyon*. Długofalowym celem badań prowadzonych na obu gatunkach jest określenie wpływu zmian w metylomie na zmiany w transkrypcji i mikrotranskrypcji roślin oraz analiza odziedziczalności wyindukowanych zmian w metylomie i ich potencjalny wpływ na kondycję roślin kolejnego pokolenia. W związku z tym najbliższe lata mojej pracy naukowej niewątpliwie koncentrować się będą na analizie stabilności transgeneracyjnej wyindukowanych nowych epialleli oraz możliwości wykorzystania wyindukowanych, dziedziczonych zmian w metylomie w hodowli roślin. Pierwsze wyniki badań, opisujących różnice w odpowiedzi metylomu liścia i korzenia jęczmienia na stres niedoboru wody opublikowano (**Chwiałkowska i wsp., Journal of Experimental Botany, 2016**), natomiast kolejne, kompleksowe publikacje są obecnie przygotowywane. Ponadto, rozpocząłem badania związane z badaniem mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie i dziedziczenie wyindukowanych zmian w metylomie, m.in. poprzez badanie dynamiki zmian w metylomie jęczmienia wywołanych stresem niedoboru wody w ramach grantu NCN PRELUDIUM mgr Karoliny Chwiałkowskiej, której jestem promotorem pomocniczym a jednocześnie opiekunem naukowym w grancie.

Ponadto, jestem zaangażowany w realizację międzynarodowych projektów finansowanych ze środków UE w ramach programów ERA-NET i ERA-CAPS, w których jestem odpowiedzialny za prowadzone na dużą skalę badania zmienności genetycznej w obrębie egzomu mutantów jęczmienia oraz za badania związane z profilowaniem transkryptomu jęczmienia poddawanego stresowi wpływu glinu. Jestem również odpowiedzialny za koordynację zadania badawczego i przeprowadzenie analiz metagenomowych w grancie NCN *'Odpowiedź rośliny i endofitycznych zespołów bakterii na inokulację gleby metaloopornymi endofitami o zdolnościach promowania wzrostu roślin'*.

Co istotne, prowadzę równoległe komplementarne prace związane z rozwojem technik bioinformatycznych wykorzystywanych w analizie danych pochodzących z eksperymentów NGS. W ramach zakończonego w roku 2015 projektu infrastrukturalnego *'Platforma Analiz i Archiwizacji Danych (PAAD)'*, finansowanego ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, brałem udział w opracowaniu i stworzeniu

systemu informatycznego High Performance Computing na potrzeby wielkoskalowych analiz bioinformatycznych prowadzonych w naszej grupie, stworzyłem przy tym pracownię bioinformatyczną działającą na WBiOŚ. Ponadto, opracowaliśmy nowe, automatyczne narzędzie do analiz danych NGS uzyskiwanych w stworzonej przez nas nowej metodzie analizy metylomu roślin o dużych genomach MSAP-Seq (**Chwialkowska i wsp., Journal of Experimental Botany, 2016** oraz Nowakowska i wsp., w recenzji). Obecnie prowadzimy również prace nad udostępnieniem do badań prowadzonych na WBiOŚ platformy bioinformatycznej Galaxy oraz prace nad opracowaniem zautomatyzowanego narzędzia do metaanaliz łączonych danych metylacyjnych i transkryptomicznych. Współpracuję również z podmiotami prywatnymi (OpenExome s.c.) i innymi jednostkami naukowymi (m.in. Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku) jako konsultant w zakresie analiz danych uzyskiwanych w technologiach NGS.

#### **Wykaz niewchodzących w skład osiągnięcia opublikowanych prac naukowych**

1. Chwialkowska K., Nowakowska U., Mroziewicz A., Szarejko I. and **Kwasniewski M.** 2016. Water-deficiency conditions differently modulate the methylome of roots and leaves in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Experimental Botany**, 67: 1109-21.
2. Janiak A., **Kwasniewski M.** and Szarejko I. 2016. Gene expression regulation in roots under drought. **Journal of Experimental Botany**, 67: 1003-14.
3. Kwasniewska J. and **Kwasniewski M.** 2013. Comet-FISH for the evaluation of plant DNA damage after mutagenic treatments. **Journal of Applied Genetics**, 54: 407-15.
4. Koprowski R., Wrobel Z., Korzyńska A., Chwialkowska K. and **Kwasniewski M.** 2013. Automatic analysis of 2D polyacrylamide gels in the diagnosis of DNA polymorphisms. **BioMedical Engineering OnLine**, 12: 68.
5. Woznica A., Nowak A., Ziemiński P., **Kwasniewski M.** and Bernas T. 2013. Stimulatory effect of xenobiotics on oxidative electron transport of chemolithotrophic nitrifying bacteria used as biosensing element. **PLoS ONE**, 8: e53484.
6. Szczecińska M., **Kwaśniewski M.**, Chwialkowska K. and Sawicki J. 2013. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pulsatilla patens* (L.) Mill. (Ranunculaceae) a rare and endangered plant species in Europe. **Conservation Genetics Resources**, 5: 421-23.
7. Szczecińska M., **Kwasniewski M.**, Sawicki J., Chwialkowska K., Szandar K. and Pisarek W. 2012. Development of microsatellite markers using pyrosequencing in *Galium trifidum* (Rubiaceae), a rare species in Central Europe. **International Journal of Molecular Sciences**, 13: 9893-99.
8. Sawicki J., **Kwasniewski M.**, Szczecińska M., Chwialkowska K., Milewicz M. and Plášek V. 2012. Isolation and Characterization of Simple Sequence Repeats (SSR) Markers from the

- Moss genus *Orthotrichum* using a small throughput pyrosequencing machine. **International Journal of Molecular Sciences**, 13: 7586-93.
9. Kwasniewska J., Grabowska M., **Kwasniewski M.** and Kolano B. 2012. Comet-FISH with rDNA probes for the analysis of mutagen-induced DNA damage in plant cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 53: 369-75.
  10. Janiak A., Piórko S., Matros A., Mock H-P., **Kwasniewski M.**, Chwialkowska K., Chmielewska B. and Szarejko I. 2012. A comparative analysis of proteins that accumulate during the initial stage of root hair development in barley root hair mutants and their parent varieties. **Journal of Applied Genetics**, 53: 363-76.
  11. Balazadeh S., **Kwasniewski M.**, Caldana C., Mehrnia M., Zanon M-I, Xue G-P, and Mueller-Roeber B. 2011. ORS1, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive NAC transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, 4: 346-60.
  12. Winck F., **Kwasniewski M.**, Wienkoop S. and Mueller-Roeber B. 2011. An optimized method for the isolation of nuclei from *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, 47: 333-40.
  13. Woźnica A., Łaszczycza P., **Kwaśniewski M.**, Augustyniak M., Migula P., Siudy A. and Szlęk Z. 2011. Zastosowanie biotestów i biomarkerów molekularnych w ocenie stanu zbiornika zaporowego i przewidywaniu skutków dla jakości wody. W: Aktualne zagadnienia w uzdatnianiu i dystrybucji wody; Rozdział I: Środowiskowe uwarunkowania ochrony ujęć wody. Zimoch I., Sawiniak W., Pieczykolan B. & Barbusiński K. (Eds.). Gliwice, pp. 57-67. ISBN978-83-925064-8-5.
  14. Arvidsson S., **Kwasniewski M.**, Riano-Pachon D.M. and Mueller-Roeber B. 2008. QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. **BMC Bioinformatics**, 9: 465; doi:10.1186/1471-2105-9-465.
  15. Skirycz A., Radziejwoski A., Busch W., Hannah M.A., Czeszejko J., **Kwasniewski M.**, Zanon M.I., Lohmann J.U., De Veylder L., Witt I. and Mueller-Roeber B. 2008. The DOF transcription factor OBP1 is involved in cell cycle regulation in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, 56: 779-92.
  16. Kolano B., Płócienniczak A., **Kwasniewski M.** and Maluszynska J. 2008. Chromosomal localization of a novel repetitive sequence in the *Chenopodium quinoa* genome. **Journal of Applied Genetics**, 49: 313-20.
  17. Guzy-Wrobelska J., Labocha-Pawlowska A., **Kwasniewski M.** and Szarejko I. 2007. Different recombination frequencies in wheat doubled haploid populations obtained through maize pollination and anther culture. **Euphytica**, 156:173-83.
  18. **Kwasniewski M.** and Szarejko I. 2006. Molecular cloning and characterization of beta-expansin gene related to root hair formation in barley. **Plant Physiology**, 141: 1149-58.
  19. Strzelczyk J.K., Wiczowski A., **Kwasniewski M.**, Zalewska-Ziob M., Strzelczyk J., Gawron K., Adamek B. and Spausta G. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from recreational areas of Silesia. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, 15: 1003-08.
  20. Gruszka D., Zbieszczek J., **Kwasniewski M.**, Szarejko I. and Maluszynski M. 2006. A new allele in a uzu gene encoding brassinosteroid receptor. **Barley Genetics Newsletter**, 35: 1-2.
  21. Malecka-Mikosz O., Wiczowski A., Strzelczyk J., Zalewska-Ziob M., Dyla L. and **Kwasniewski M.** 2004. Molekularna analiza metycylinoopornych gronkowców izolowanych od chorych hospitalizowanych i ambulatoryjnych. **Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia**, 56: 1-9.
  22. Furmanek M. and **Kwaśniewski M.** Neolityzacja i początki gospodarki rolniczo-hodowlanej w świetle badań archeogenetycznych. Zarys problematyki badawczej. 2004. W: Zmiany

- Środowiska Geograficznego w Dobie Gospodarki Rolno-Hodowlanej. Studia z Obszaru Polski. Red. Abłamowicz, D., Śnieszko, D. Muzeum Śląskie w Katowicach. Str.119-131.
23. Wiench M., **Kwasniewski M.**, Gubala E., Wygoda Z., Pawlaczek A., Oczko M. and Jarzab B. 2001. Mutacje somatyczne protoonkogenu RET w raku rdzeniastym tarczycy. **Wiadomości Lekarskie**, 54: 415-21.
24. Wiench M., Wloch J., Wygoda Z., Gubala E., Kula D., **Kwasniewski M.**, Przybylik-Mazurek E., Ratajczak R., Działkowiak K., Kukulska A., Roskosz J., Szybinski Z. and Jarzab B. 2000. Genetic diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2B. **Endokrynologia Polska**, 51: 67-76.

## Podsumowanie dorobku naukowego

Tab. 1. Liczba publikacji naukowych, ich wskaźniki Impact Factor (IF) oraz punkty MNiSW (podano wartości dla czasopism z roku wydania publikacji), liczba cytowań i liczba cytowań bez autocytowań (na podstawie bazy Web of Science z kwietnia 2016 r.).

Opublikowane prace							
Okres	Język	Rodzaj publikacji	Liczba	Wskaźniki IF	Punkty MNiSW	Liczba cytowań	Liczba cytowań bez autocytowań
Przed doktoratem	Polski	Spoza listy JCR	2	0	10	1	1
		Monografie	1	0	0	0	0
	Angielski	Z listy JCR	1	6,125	24	65	61
		Spoza listy JCR	1	0	2	0	0
Po uzyskaniu stopnia doktora	Polski	Monografie	1	0	0	0	0
	Angielski	<b>Główne osiągnięcie naukowe (JCR)</b>	4	<b>19,153</b>	<b>157</b>	<b>46</b>	<b>40</b>
		Pozostałe z listy JCR	16	51,717	453	348	338
		Spoza listy JCR	2	0	5	0	0
<b>Suma</b>			<b>28</b>	<b>76,995</b>	<b>651</b>	<b>460</b>	<b>440</b>

Indeks Hirscha = 8

*Udowolnienie, 06.05.2016*