Załącznik 3

AUTOREFERAT

SPIS TREŚCI

1. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego
2. Prezentacja osiągnięć, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
   - 2.1. Wprowadzenie
   - 2.2. Wykaz publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
   - 2.3. Najważniejsze osiągnięcia naukowe wynikające z cyklu publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
   - 2.4. Zwięzła prezentacja wyników, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
     - 2.4.1. Wprowadzenie
     - 2.4.2. Charakterystyka procesów biosyntezy tiaminy i TDP w kiełkujących nasionach i siewkach roślin
     - 2.4.3. Izolacja i charakterystyka enzymów roślinnych biorących udział w biosyntezie tiaminy
     - 2.4.4. Udział procesów biosyntezy tiaminy oraz działanie enzymów zależnych od TDP w reakcji roślin na stres abiotyczny
     - 2.4.5. Regulacja procesów biosyntezy i czynnego wykorzystania TDP w roślinach w warunkach stresu solnego i osmotycznego
3. Osiągnięcia naukowe niezwiązane z tematyką badań, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego
   - 3.1. Molekularna natura białek wiążących tiaminę w nasionach roślin
   - 3.2. Nowe funkcje fizjologiczne zależne od genów biosyntezy tiaminy
   - 3.3. Analiza procesów oksydacyjnych w stanach zapalnych
   - 3.4. Ogólna charakterystyka funkcjonowania układu kontaktu w stanie zapalnym
   - 3.5. Organizacja układu kontaktu na powierzchni komórek gospodarza oraz na powierzchni bakteryjnych i drożdżowych patogenów
   - 3.6. Udział głównych czynników wirulencji grzybów z wybranych gatunków rodzaju *Candida* w propagacji stanu zapalnego
4. Inne realizowane aktualnie zadania badawcze

4.1. Charakterystyka oddziaływań międzycząsteczkowych z zastosowaniem pomiarów rezonansu plazmonów powierzchniowych (system BIACORE 3000)
4.2. Charakterystyka spektralna i analiza możliwości biologicznych zastosowań różnego typu interkalatorów DNA
5. Dalsze perspektywy badawcze
6. Współpraca naukowa
7. Udział w projektach badawczych
7.1. Projekty własne z funkcją kierownika projektu
7.2. Projekty własne z funkcją głównego wykonawcy projektu
7.3. Projekty współfinansowane przez Unię Europejską
8. Udział w konferencjach naukowych
8.1. Konferencje krajowe
8.2. Konferencje zagraniczne
9. Przygotowane recenzje prac naukowych
9.1. Recenzje publikacji naukowych na zaproszenie redakcji czasopism zagranicznych
9.2. Recenzje grantów dla National Science Fundation (USA)
9.3. Recenzja książki
10. Staże i szkolenia zagraniczne
11. Nagrody
12. Podziękowania

1. Ogólna charakterystyka dorobku naukowego

Po ukończeniu studiów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w 1985 roku i rocznej praktyce zawodowej, podjęłam w roku 1986 pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Biochemii Zwierząt Instytutu Biologii Molekularnej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w zespole kierowanym przez Prof. dr hab. Zdzisława Żaka, od lat prowadzącym badania nad biochemią witamin grupy B i wywodzących się z nich koenzymów. Celem mojej pierwszej pracy naukowej stała się izolacja i fizykochemiczna charakterystyka białek odpowiedzialnych za magazynowanie i/lub transport witamin B_1 i B_{12}. Znaczące wzbogacenie mojego warsztatu metodycznego w tej dziedzinie nastąpiło wskutek uzyskania w roku 1988 stypendium DAAD (Niemcy) i rocznego stażu naukowego na Wydziale Biologii Uniwersytetu w Konstancji (Niemcy), w zespole Prof. Sandro Ghishli, gdzie zajmowałam się oddziaływaniami pochodnych witaminy B_2 z wybranymi flawoproteinami. Kontynuację tych badań od 1989 roku stanowiły prace eksperymentalne związane z moją rozprawą doktorską pt. „Chemiczna charakterystyka oddziaływania tiaminy ze swoistym białkiem wiążącym izolowanym z nasion gryki" (promotor: Prof. dr hab. Zdzisław Żak), którą obroniłam w 1994 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, uzyskując stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii. Na tym etapie mojego rozwoju naukowego mój łączny dorobek naukowy obejmował współautorstwo czterech prac eksperymentalnych o sumarycznym współczynniku „impact factor" (IF) równym 5,618. Badania chemicznego mechanizmu oddziaływania tiaminy z białkami magazynującymi tę witaminę w nasionach roślin kontynuowane były przez nasz zespół jeszcze przez kilka lat, czego owocem było moje współautorstwo w kolejnych sześciu publikacji eksperymentalnych (łączny IF 8,343; ostatnia praca z tej serii: J. Plant Physiol. 2000).

W latach 1997-1998 odbyłam półtoraroczny zagraniczny staż podoktorski w USA, w Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Stanowego Georgii w Athens, GA, w zespole Prof. Jamesa Travisa, gdzie brałam udział w badaniach dotyczących roli enzymów proteolitycznych oraz procesów oksydacyjnych w stanach zapalnych, a ich wymiernym efektem były trzy publikacje o łącznym IF wynoszącym 11,68 i fascynacja zagadnieniem molekularnych mechanizmów oddziaływań patogenów z organizmem gospodarza.

Od 1999 roku, pracując na stanowisku starszego asystenta a od 2004 roku adiunkta w obecnym Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie kontynuuję moje prace eksperymentalne w dwóch głównych, niezależnych nurtach badawczych.

Pierwszy z nich nadal mieści się w zakresie biochemii i fizjologii roślin i dotyczy biosyntezy witaminy B_1 (tiaminy) i jej wykorzystania przez rośliny w procesach adaptacji do wzrostu w warunkach stresu abiotycznego. Jego realizacja miała swoje podstawy merytoryczne oraz finansowe w trzech samodzielnie kierowanych przeze mnie projektach badawczych własnych, przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (lata 2000-2003, 2004-2007 i 2009-2011), których finał stanowi jednotematyczny cykl publikacji, opatrzony tytułem „Biosynteza witaminy B_1 (tiaminy) w roślinach i jej udział w odpowiedzi na stres abiotyczny", będący podstawą postępowania habilitacyjnego. Zakończenie tych projektów zaowocowało siedmioma pracami eksperymentalnymi (J. Prot. Chem. 2003, Plant Cell 2010 i 5 publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego) oraz rozdziałem w książce „Plant vitamin biosynthesis" z renomowanej serii wydawniczej Advances in Botanical Research. Łączny IF dla wszystkich uzyskanych w tym nurcie badawczym publikacji wynosi 28,552. Badania te zostały także dostrzeżone przez specjalistów w zakresie biochemii tiaminy i biochemii stresu roślinnego, czego rezultatem było nawiązanie przeze mnie współprac naukowych z ośrodkami zagranicznymi (m.in. z Zakładem Biologii Roślin, Cornell University, Ithaca, NY, USA), udział w zespołach oceniających zagraniczne projekty badawcze (National Science Foundation, USA) oraz rola recenzenta artykułów w szeregu czasopism zagranicznych.

Drugi realizowany przeze mnie kierunek badawczy stanowi kontynuację moich zainteresowań zapoczątkowanych stażem w zespole Prof. J. Travisa w USA i dotyczy biochemii stanu zapalnego wywoływanego w organizmie ludzkim przez infekcje bakteryjne i grzybicze, a w szczególności zaangażowania w tych procesach układu generacji bioaktywnych peptydów – kinin, uniwersalnych mediatorów stanu zapalnego. W pracach tych szczególnie interesuje mnie rola czynników wirulencji drożdży z rodzaju *Candida*, głównych grzybiczych patogenów dla człowieka, które stanowią coraz częstszą przyczynę szeregu powikłań pooperacyjnych i zakażeń szpitalnych. Prowadząc badania w tej tematyce byłam głównym wykonawcą czterech projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (lub wcześniej KBN) i brałam udział w przygotowaniu kolejnych dziewięciu prac doświadczalnych i jednego artykułu przeglądowego (sumaryczny IF 29,117).

Ujmując sumarycznie, mój dorobek naukowy obejmuje 32 publikacje naukowe w czasopismach lub wydawnictwach ciągłych, znajdujących się na tzw. Liście Filadelfijskiej, w

tym 30 prac eksperymentalnych, 1 artykuł przeglądowy i 1 rozdział w książce naukowej (wydawnictwie ciągłym). Ich sumaryczny IF wynosi 86,321. Opublikowane prace były cytowane 276 razy, a odpowiadający im indeks Hirscha wynosi 10. W moim dorobku naukowym znajdują się ponadto 43 komunikaty (1 wykład wygłoszony na zaproszenie organizatorów, 1 referat własny, 5 referatów wygłoszonych przez współautorów i 36 posterów) na 14 zagranicznych i 14 krajowych zjazdach i konferencjach naukowych. Jestem ponadto współautorką 1 podręcznika i 3 rozdziałów w skryptach akademickich. Kierowałam trzema projektami badawczymi finansowanymi przez MNiSzW a ponadto byłam/jestem głównym wykonawcą 6 takich projektów oraz jednym z realizatorów 2 grantów strukturalnych współfinansowanych przez Unię Europejską. Za działalność naukową otrzymałam 3-krotnie Nagrody Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego (w latach 1993, 2009 i 2011) oraz Stypendium Naukowe z Rektorskiego Funduszu Stypendialnego Uniwersytetu Jagiellońskiego (w 2004 roku).

W kolejnych częściach autoreferatu omówione zostaną najpierw publikacje, będące podstawą postępowania habilitacyjnego a następnie prace powstałe w wyniku prowadzenia przeze mnie badań w odrębnych kierunkach badawczych.

2. Prezentacja osiągnięć, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

2.1. Wprowadzenie

Jednotematyczny cykl publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, opatrzony tytułem:

„Biosynteza witaminy B_1 (tiaminy) w roślinach
i jej udział w odpowiedzi na stres abiotyczny”

powstał w wyniku realizacji kierowanych przeze mnie projektów badawczych finansowanych przez MNiI/MNiSzW (p. 7.1). W pracach tych jestem pierwszym autorem lub/i autorem korespondencyjnym, a moi współpracownicy (często byli to pracujący pod moją opieką studenci) sprecyzowali swój względny udział w tych badaniach w załączonych deklaracjach.

Otrzymane przeze mnie wyniki badań eksperymentalnych zostały podsumowane i naświetlone w szerokim aspekcie w artykule przeglądowym (rozdziale w książce), prezentującym aktualny stan wiedzy na temat procesów biosyntezy, transportu i magazynowania witaminy B_1 w roślinach, jak również najnowsze poszukiwania dotyczące jej roli w reakcjach roślin na stres biotyczny i abiotyczny. Cykl publikacji, stanowiących

podstawę postępowania habilitacyjnego, obejmuje ponadto pięć prac eksperymentalnych, przedstawiających: (1) aktywację biosyntezy tiaminy w kiełkujących nasionach i kiełkach roślin; (2) izolację oraz molekularną i enzymatyczną charakterystykę głównych enzymów biorących udział w biosyntezie tiaminy i difosforanu tiaminy (TDP) w roślinach; (3) rolę procesów biosyntezy i metabolicznego wykorzystania tiaminy w warunkach stresu abiotycznego, analizowaną na poziomie ekspresji genów oraz aktywności kodowanych białek, oraz (4) możliwe mechanizmy regulacyjne zaangażowane w aktywację produkcji tiaminy w stresie abiotycznym. Wymienione prace zostały opublikowane w czasopismach zachodnich o sumarycznym IF wynoszącym 18,313.

2.2. Wykaz publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

1. Gołda A., Szyniarowski P., Ostrowska K., Kozik A., Rapała-Kozik M.(2004) Thiamine binding and metabolism in germinating seeds of selected cereals and legumes. Plant Physiol. Biochem. 42, 187-95; **IF = 1.414**
2. Rapala-Kozik M., Olczak M., Ostrowska K., Starosta A., Kozik A.(2007) Molecular characterization of the *thi3* gene involved in thiamine biosynthesis in *Zea mays*: cDNA sequence and enzymatic and structural properties of the recombinant bifunctional protein with 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (phosphate) kinase and thiamine monophosphate synthase activities. Biochem. J. 408, 149-159; **IF = 4.009**
3. Rapala-Kozik M., Kowalska E., Ostrowska K. (2008) Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. J. Exp. Bot. 59, 4133-4143; **IF = 4.001**
4. Rapala-Kozik M., Gołda A., Kujda M.(2009) Enzymes that control the thiamine diphosphate pool in plant tissues. Properties of thiamine pyrophosphokinase and thiamine-(di)phosphate phosphatase purified from *Zea mays* seedlings. Plant Physiol. Biochem. 47, 237-242; **IF = 2.485**
5. Rapala-Kozik M., Wolak N., Kujda M., Banas A. K. (2012) The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. BMC Plant Biology 12:2; **IF= 4.085**

6. Rapala-Kozik M. (2011) Vitamin B_1 (Thiamine): A Cofactor for Enzymes Involved in the Main Metabolic Pathways and an Environmental Stress Protectant. Rozdział w książce pt. „Biosynthesis of vitamins in plants. Part A: Vitamins A, B1, B2, B3, B5", pod redakcją F. Rebeille i R. Douce (redaktorzy serii: J.C. Kader i M. Delseny) wydanej przez Elsevier w ramach cyklu wydawniczego: Advances in Botanical Research, Tom 58, str. 37-91; **IF = 2.319**

2.3. Najważniejsze osiągnięcia naukowe, wynikające z cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

- charakterystyka uruchamiania rezerw tiaminy i inicjacji własnej biosyntezy tiaminy/TDP w kiełkujących nasionach i siewkach wybranych gatunków zbóż i roślin strączkowych;
- oczyszczenie i szczegółowa charakterystyka pod względem właściwości molekularnych, kinetycznych i regulacyjnych enzymów zaangażowanych w procesy biosyntezy i bioaktywacji tiaminy w roślinach;
- określenie udziału tiaminy w procesach rozpoznawania, przeciwdziałania i adaptacji roślin do wzrostu w warunkach stresu abiotycznego;
- wykazanie roli kwasu abscysynowego (ABA) jako regulatora odpowiedzi roślin na stres solny i osmotyczny, z udziałem procesów angażujących działanie tiaminy i TDP;
- zaproponowanie roli tiaminy w reakcji komórki roślinnej na stres.

2.4. Zwięzła prezentacja wyników, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

2.4.1. Wprowadzenie

Witamina B_1(tiamina) jest niezbędna w funkcjonowaniu wszystkich organizmów z uwagi na udział jej difosforanowej pochodnej (TDP) jako koenzymu w procesach enzymatycznych katalizowanych przez szereg enzymów zaangażowanych w główne procesy metaboliczne, do których należą m.in. synteza acetylo-CoA, cykl kwasów trikarboksylowych, fermentacja alkoholowa, szlak pentozofosforanowy, cykl Calvina-Bensona czy szlak syntezy aminokwasów z rozgałęzionym łańcuchem bocznym. Organizmy zwierzęce zachowały w swym metabolizmie jedynie etap difosforylacji pobieranej z pokarmem tiaminy, natomiast

bakterie, drożdże i rośliny mogą prowadzić pełny proces biosyntezy tej witaminy z prostych prekursorów (Rapala-Kozik, 2011, str. 45-55). O ile biosynteza tiaminy przez mikroorganizmy była intensywnie rozpoznawana od wielu lat, o tyle analogiczne badania w odniesieniu do roślin są znacznie mniej zaawansowane. Stąd zrodził się pomysł na uzupełnienie tej luki.

2.4.2. Charakterystyka procesów biosyntezy tiaminy i TDP w kiełkujących nasionach i siewkach roślin

W pierwszej z cyklu publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego (Golda i wsp., 2004) starano się zidentyfikować stadium rozwoju roślin, na którym siewki uruchamiają własne procesy biosyntezy tiaminy. Rozpoznanie to było konieczne z uwagi na obecność w nasionach roślin nago- i okrytozalążkowych białek specyficznie wiążących i magazynujących tę witaminę, będących jej źródłem dla kiełków we wczesnych fazach wzrostu. Jednocześnie aktywacja i poziom biosyntezy tiaminy *de novo* podlega precyzyjnemu mechanizmowi regulacyjnemu, bazującemu na swoistych sensorach wewnątrzkomórkowego stężenia TDP (a zatem, pośrednio, obecności tiaminy w środowisku zewnętrznym), jakimi są ryboprzełączniki, których struktura i wynikająca z niej regulacja, zależy od możliwości wiązania dostępnego TDP (Rapala-Kozik, 2011, str. 55-58).

Ustalono, że w pierwszej fazie kiełkowania, trwającej w zależności od gatunku 1-2 doby, kiełki bazują przede wszystkim na zgromadzonym w nasionach zapasie tiaminy, uwalnianym do otoczenia w wyniku stopniowej hydrolizy magazynujących tiaminę białek. W kolejnej fazie (4-6 dób), gdy zapasy ulegną ostatecznemu wyczerpaniu, rozwijająca się roślina uruchamia własne procesy biosyntezy tiaminy i przez kilka kolejnych dni hodowli jej ilośćutrzymuje się na mniej więcej stałym poziomie. Spośród analizowanych modeli roślinnych (zbóż i roślin strączkowych) najlepiej prezentującymi te zależności okazały się siewki *Zea mays* i ten model był wykorzystywany w dalszych badaniach.

Aktywację procesów biosyntezy tiaminy identyfikowano poprzez pomiary aktywności trzech kluczowych enzymów: (1) syntazy monofosforanu tiaminy (syntazy TMP), która bierze udział w łączeniu powstających na niezależnych drogach dwóch komponent cząsteczki tiaminy: pirymidynowej (difosforan 4-amino-5-hydroksymetylo-2-metylopirymidyny, HMP-PP) oraz tiazolowej (fosforan 4-metylo-5-(2-hydroksyetylo)-tiazolu, HET-P) z utworzeniem monofosforanu tiaminy (TMP); (2) fosfatazy, która defosforyluje TMP prowadząc do powstania wolnej tiaminy; (3) pirofosfokinazy tiaminy (TPK), katalizującej proces

pirofosforylacji tiaminy, prowadzący do utworzenia aktywnej biologicznie formy tiaminy – TDP.

2.4.3. Izolacja i charakterystyka enzymów roślinnych biorących udział w biosyntezie tiaminy

Ponieważ żaden ze wspomnianych wyżej enzymów nie został wcześniej wyizolowany z materiału roślinnego i scharakteryzowany, w dalszych badaniach (dwie następne publikacje) starano się uzupełnić te informacje.

Najważniejszym obiektem tych badań była syntaza TMP, kodowana w *Zea mays* przez gen *THI3* (Rapala-Kozik i wsp., 2007). Porównanie sekwencji kodowanego białka z enzymem bakteryjnym wykazało 39 % identyczności a sekwencja ta zlokalizowana była we fragmencie C-końcowym białka THI3. Na podstawie porównań sekwencyjnych z bakteryjną kinazą HMP (THID), zaproponowano obecność drugiej aktywności enzymatycznej w tym białku, którą po raz pierwszy potwierdzono także eksperymentalnie. Wykazano, że enzym ten może katalizować reakcję dwóch kroków fosforylacji HMP. Pierwszy z nich może stanowić naturalny proces odzyskiwania produktu rozkładu tiaminy, ograniczający konieczność ponownej biosyntezy; drugi jest etapem niezbędnym w wytwarzaniu naturalnego półproduktu dla kolejnego etapu - biosyntezy TMP. W obu krokach katalitycznych biorą udział jony magnezu i ATP.

W wyniku kolejnej aktywności katalitycznej białka THI3, tj. syntazy TMP, dochodzi do połączenia wytworzonego HMP-PP i ufosforylowanej komponenty tiazolowej (HET-P) w ostateczną cząsteczkę TMP. Ten etap także zachodzi w obecności jonów magnezu. Najciekawsze okazało się odkrycie, że powstawanie końcowego produktu, tj. TMP, jest bardzo precyzyjnie regulowane, na zasadzie hamowania akompetycyjnego poziomem dostępności substratu (HMP-PP), który jednocześnie jest produktem aktywności kinazowej białka THI3. Również ATP (substrat reakcji fosforylacji HMP-P) okazał się inhibitorem akompetycyjnym reakcji syntezy TMP. Wyraźne wyodrębnienie w sekwencji THI3 N-końcowej domeny kinazowej i C-końcowej domeny syntazowej nie jest zapewne przypadkowe i wskazuje na stworzenie mechanizmu regulacji aktywności tego enzymu w zależności od aktualnych potrzeb metabolicznych rośliny. Obserwacja tak specyficznego połączenia w jednym białku obu aktywności, katalizujących dwie ostatnie reakcje biosyntezy tiaminy w roślinach, skłoniła nas do przygotowania modelu struktury obu domen, opartego na homologii do monofunkcyjnych białek bakteryjnych (kinazy HMP-P i syntazy TMP) o znanej

strukturze krystalograficznej (Rapala-Kozik i wsp., 2007). Modele te wskazały na duże podobieństwa centrów aktywnych w odniesieniu do reszt aminokwasowych biorących udział w oddziaływaniu z substratami, w porównaniu z białkami bakteryjnym. W celu weryfikacji tych modeli przygotowano zestaw mutein z podstawionymi postulowanymi resztami centrów aktywnych. Szczegółowe badania kinetyczne tych mutein pozwoliły potwierdzić prawidłowość tych modeli oraz oddziaływania z cząsteczkami substratów, warunkujące przebieg procesu katalizy enzymatycznej.

TMP, powstały w wyniku działania THI3 ulega w roślinach procesowi defosforylacji przy udziale kwaśnej fosfatazy o szerokiej specyficzności substratowej (Rapala-Kozik i wsp., 2009). Enzym ten został przez nas wyizolowany z liści siewek *Zea mays* i scharakteryzowany pod względem podstawowych właściwości molekularnych i kinetycznych. Enzym ten bierze także udział w defosforylacji TDP i może być istotny zarówno w procesach regulacji dostępności TDP, jak również może decydować o możliwości przemieszczania się cząsteczki tiaminy między chloroplastem, gdzie biegnie biosynteza do etapu TMP, a cytozolem, gdzie zachodzi bioaktywacja zsyntetyzowanej puli, przez utworzenie TDP z wolnej tiaminy przy udziale pirofosfokinazy tiaminy. Enzym odpowiedzialny za ten ostatni proces (TPK) został również przez nas oczyszczony i scharakteryzowany pod względem molekularnym i kinetycznym. A pomiar jego aktywności w różnych warunkach hodowli wykazał, że tylko nieznacznie zależy ona od dostępności tiaminy w środowisku, natomiast ulega istotnym zmianom w zależności od dostępu światła w trakcie hodowli, co wskazuje na kolejny poziom regulacji biosyntezy witaminy B_1 w roślinach.

2.4.4. Udział procesów biosyntezy tiaminy oraz działanie enzymów zależnych od TDP w reakcji roślin na stres abiotyczny

Na podstawie pojawiających się w literaturze sugestii o niekofaktorowej roli tiaminy jako cząsteczki sygnałowej lub bezpośrednio działającego antyoksydanta w komórkach nerwowych i bakteryjnych (Rapala-Kozik, 2011, str. 40-45), przeprowadzono badania zmierzające do określenia wpływu warunków stresu abiotycznego (oksydacyjnego, solnego, osmotycznego) na przebieg biosyntezy i bioaktywacji tiaminy oraz procesów, zachodzących z udziałem enzymów, wykorzystujących TDP jako koenzym (Rapala-Kozik i wsp., 2008; 2012).

Wykazano 2-3-krotny wzrost zawartości tiaminy i/lub jej estrów fosforanowych w stresowanych roślinach, zwłaszcza w warunkach stresu oksydacyjnego, który jest udziałem roślin poddawanych długotrwałemu działaniu stresów także innego typu (solny, osmotyczny).

Zmiany te skorelowane zostały ze wzrostem ekspresji genów (*THIC*, *THI1*, *TH1* lub *THI3*, *TPK*) oraz odpowiadających im aktywności katalitycznych kluczowych enzymów biosyntezy i bioaktywacji tiaminy. Rosnące zapotrzebowanie rośliny na tiaminę zostało również potwierdzone wzrostem poziomu ekspresji genów kodujących najważniejsze enzymy, zależne od kofaktorowej współpracy z TDP (dehydrogenazę α-ketoglutaranową - KGDH, dehydrogenazę pirogronianową - PDH, transketolazę – TK i syntazę 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforanową - DXPS) i dodatkowo potwierdzone na poziomie aktywności enzymatycznej w stresowanych siewkach (TK).

Na podstawie poczynionych obserwacji zaproponowany został model udziału procesów produkcji tiaminy w roślinach, zarówno na etapie wczesnego wykrywania czynników stresowych w otoczeniu roślin jak i rozwijania procesów adaptacyjnych przystosowujących metabolizm roślin do wzrostu w niekorzystnych warunkach środowiska.

We wczesnej fazie rozpoznania stresu biosynteza TDP zmierza raczej do regeneracji uszkodzonych systemów enzymatycznych, warunkujących prawidłowy rozwój rośliny tj. cyklu Calvina-Bensona, szlaku pentozo-fosforanowego, cyklu kwasów trikarboksylowych czy szlaku niezależnej od kwasu mewalonowego biosyntezy izoprenoidów. Natomiast długotrwałe działanie stresorów, generujące w rezultacie stres oksydacyjny w roślinach, wymusza uaktywnienie szeregu mechanizmów obronnych a co zatem idzie mechanizmów adaptacyjnych. W ten szereg wpisuje się także akumulacja tiaminy, która wykorzystywana jest w rozwijaniu strategii adaptacyjnych takich jak aktywacja zależnych od NADPH systemów antyoksydacyjnych czy synteza karotenoidów, jak również pośredni jej udział w procesach akumulacji cukrów, pełniących w warunkach stresu szczególnie istotne funkcje regulatorowe, czy syntezy szeregu zależnych od stresu białek czy osmoprotektantów. Natomiast przypuszczalne, bezpośrednie własności antyoksydacyjne tiaminy wciąż pozostają niepotwierdzone.

2.4.5. Regulacja procesów biosyntezy i czynnego wykorzystania TDP w roślinach w warunkach stresu solnego i osmotycznego

Procesy biosyntezy tiaminy podlegają w roślinach regulacji na różnych poziomach. Do tej pory potwierdzono ją na poziome genetycznym z udziałem ryboprzełączników oraz na poziomie białkowym w odniesieniu do syntazy TMP (THI3), której aktywność hamowana jest nadmiarem substratu. Natomiast szereg odpowiedzi generowanych stresem abiotycznym regulowanych jest globalnie, za pośrednictwem hormonów, do których należy kwas

abscysynowy (ABA). Jego udział w regulacji zarówno biosyntezy jak i bioaktywacji tiaminy został po raz pierwszy jednoznacznie wykazany na przykładzie siewek *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego oraz mutantów z zablokowaną syntezą ABA (Rapala-Kozik i wsp., 2012). Przedstawiono także wpływ tego hormonu na wzrost ekspresji genów kodujących KGDH i TK, ale nie PDH i DXPS. Zaangażowanie ABA w regulację procesów funkcjonujących z udziałem tiaminy potwierdzono w sposób jednoznaczny w stresie solnym natomiast stres osmotyczny wywołany obecnością sorbitolu w pożywce wydaje się być procesem poddawanym kontroli z udziałem różnych czynników, do których można zaliczyć także ABA, ale nie pełni on w tym procesie roli decydującej.

Badania mechanizmów adaptacji roślin do wzrostu w warunkach stresu abiotycznego stanowią istotny problem w rozwoju odpowiednich strategii ich hodowli, gdzie możliwość wykorzystania naturalnych procesów zachodzących w tych warunkach wydaje się postępowaniem optymalnym. Z tego punktu widzenia pozycja witaminy B_1 jako naturalnego czynnika pełniącego rolę antystresora jest szczególnie atrakcyjna.

3. Osiągnięcia naukowe, niezwiązane z tematyką badań, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

3.1. Molekularna natura białek wiążących tiaminę w nasionach roślin

Białka wiążące tiaminę, występujące w obfitych ilościach w nasionach roślin nagozalążkowych i okrytozalążkowych i najprawdopodobniej pełniące funkcję magazynowania tej witaminy, były przedmiotem mojego zainteresowania naukowego od wczesnych prac na potrzeby doktoratu. Najważniejszym sumarycznym osiągnięciem tego nurtu badawczego było oszacowanie cząstkowych udziałów fragmentów cząsteczki tiaminy w jej oddziaływaniach z tymi białkami. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano całą gamę analogów chemicznych cząsteczki tiamin, których znaczna część została specjalnie zsyntetyzowana na potrzeby tych prac. Seria prac na ten temat, których jestem współautorką, liczy 8 pozycji i kończy się publikacją (Rapala-Kozik i wsp., J. Prot. Chem. 2003), w której wykazano, że te białka wiążące tiaminę są szczególnymi wariantami głównych białek zapasowych nasion, np. w nasionach gryki należą one do głównych legumin. Scharakteryzowano szczegółowo ich budowę podjednostkową a także wskazano w cząsteczce tego białka centrum wiązania tiaminy, wykorzystując metodę „fotoznakowania powinowactwa" (ang. photoafffinity labeling). Doświadczenia chemiczne, zdobyte w trakcie

badań nad białkami magazynującymi tiaminę, w istotny sposób ukształtowały mojej dalsze podejście badawcze w stosunku do struktury i funkcjonowania enzymów biosyntezy tiaminy.

3.2. Nowe funkcje fizjologiczne zależne od genów syntezy tiaminy

W luźnym związku z tematyką publikacji, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, były moje badania we współpracy ze światowymi liderami w dziedzinie biosyntezy tiaminy, Profesorami M. J. Scanlonem i T. P. Begleyem z Cornell University (NY, USA) nad zaangażowaniem genu syntezy tiazolu, *THI4*, w funkcjonowaniu merystemu wierzchołkowego w *Zea mays*. Wyniki tych prac zostały opublikowane w 2010 r. w bardzo prestiżowym czasopiśmie, Plant Cell (IF = 9,396).

3.3. Analiza procesów oksydacyjnych w stanach zapalnych

Odbyty w latach 1997-1998 staż naukowy w laboratorium Prof. Jamesa Travisa (USA) zapoczątkował moje zainteresowania: (1) procesami oksydacyjnymi, towarzyszącymi stanom zapalnym, jakie mogą się pojawiać w organizmie w wyniku infekcji, (2) funkcjonowaniem w tych warunkach enzymów proteolitycznych, należących zarówno do organizmu gospodarza jak i atakującego go patogenu, oraz (3) produkcją mediatorów stanu zapalnego, uczestniczących w dalszej jego propagacji, a w szczególności bioaktywnych peptydów spokrewnionych z bradykininą - kinin.

Procesy oksydacyjne, zachodzące w stanach zapalnych prowadzą często do zmian właściwości utlenianych białek, co może w szczególnych przypadkach działać na niekorzyść organizmu lub stanowić sposób jego obrony przed dalszym rozszerzaniem się stanu zapalnego. Problem ten był przeze mnie analizowany na przykładzie kilku układów białkowych, ze szczególnym uwzględnieniem roli tej oksydacji w infekcjach bakteryjnych. Uzyskane wyniki streścić można w następujących punktach:

- dla białka amyloidowego, które podlega oksydacyjnej modyfikacji w trakcie choroby Alzheimera, wykazano w badaniach modelowych wyhamowanie procesów degradacji utlenionego białka: prekursora amyloidu, z udziałem enzymów: chymazy z komórek tucznych, katepsyn G i D, metaloproteinazy 3 macierzy zewnątrzkomórkowej oraz elastazy neutrofilowej, zdolnych do degradacji tego białka charakterystycznej dla β-sekretaz (Rapala-Kozik i wsp., J. Pept. Res. 1998);
- przedstawiono dowody, że procesy oksydacyjne zachodzące w ogniskach zapalnych a generowane przez reaktywne formy tlenu uwalniane przez fagocyty, prowadzą do

częściowej dysfunkcji tzw. układu kontaktu – zestawu osoczowych białek, odpowiedzialnego za produkcję uniwersalnych mediatorów stanu zapalnego, jakimi są kininy (Kozik i wsp., J. Biol. Chem. 1998; Kozik i wsp., Biol. Chem. 2011);

- określono sposób działania wybranych proteaz bakteryjnych w procesach inaktywacji białek istotnych dla funkcjonowania organizmu gospodarza, do których należy α_1-inhibitor proteinaz, oraz zanalizowano, jaki wpływ na przebieg tej degradacji ma oksydacja tego białka w wyniku działania wolnych rodników produkowanych przez układ obronny (Rapala-Kozik i wsp., Biol. Chem. 1999).

3.4. Ogólna charakterystyka funkcjonowania układu kontaktu w stanie zapalnym

Układ kontaktu, ulegający aktywacji na powierzchniach komórek organizmu ludzkiego, m.in. śródbłonka naczyń krwionośnych i płytek krwi, jest kompleksem trzech kooperujących ze sobą białek: czynnika XII, aktywującego prekalikreinę do kalikreiny, która z kolei generuje kininy z wysokocząsteczkowego kininogenu. Zaangażowanie kinin w procesy fizjologiczne, takie jak kontrola ciśnienia krwi, skurcz lub relaksacja mięśni gładkich czy nadwrażliwość na ból, skłaniają do rozważenia ich udziału w stanach zapalnych i określenia warunków sprzyjających ich produkcji. W realizacji tego zagadnienia mój udział dotyczył:

- opracowania metody HPLC analizy kinin,
- wstępnych badań, dążących do określenia postępu degradacji kininogenu przez elastazę (Duliński i wsp., Biol. Chem. 2003).

3.5. Organizacja układu kontaktu na powierzchni komórek gospodarza oraz na powierzchni bakteryjnych i drożdżowych patogenów

Układ kontaktu, generujący mediatory stanu zapalnego – kininy, aktywujące dalsze odpowiedzi prozapalne w komórkach, stał się w poniższych badaniach modelem szczególnie atrakcyjnym w aspekcie infekcji bakteryjnych a ponadto, co stanowi zasadnicze novum w tym zakresie badawczym, infekcji drożdżowych, zachodzących z udziałem gatunków *Candida albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis i C. glabrata*. Badania te wydają się być szczególnie istotne w kontekście szerzących się infekcji szpitalnych z udziałem *Candida* spp., szczególnie w odniesieniu do pacjentów z chorobami związanym z immunosupresją czy też pacjentów poddawanych zabiegom chirurgicznym z wprowadzaniem implantów. Rozpoznanie

mechanizmów wirulencji tych mikroorganizmów na przykładzie jednego z głównych układów homeostazy organizmu gospodarza - układu kontaktu, może dostarczyć cennych wskazówek dotyczących leczenia i zapobiegania tego typu infekcjom. Dlatego badania prowadzone w tym zakresie angażują mnie intensywnie, a dotychczas uzyskane wyniki streścić można następująco:

- opracowano metodę oznaczania tworzenia aktywnego układu kontaktu na powierzchni komórek mysich makrofagów (Barbasz i wsp., Int. Immunopharmacol. 2008);
- po raz pierwszy wykazano zdolność komórek *Candida* spp do wykorzystywania białek gospodarza (białek tworzących układ kontaktu) w propagacji stanu zapalnego za pośrednictwem dokującego do powierzchni komórek tych organizmów układu generacji kinin, potwierdzając jednocześnie produkcję tych mediatorów w zaproponowanym modelu. Wykazano także, że poziom tego wiązania i produkcji kinin zależy od gatunku grzyba oraz jego formy morfologicznej (Rapala-Kozik i wsp., Int. Immunopharmacol. 2008; Karkowska-Kuleta i wsp., Biol. Chem. 2010);
- za pomocą specyficznych przeciwciał oraz fragmentów peptydowych cząsteczki kininogenu, wskazano rejony tej cząsteczki pośredniczące w dokowaniu całego układu generacji kinin do komórek *C. albicans* a ponadto, za pomocą chromatografii powinowactwa na unieruchomionym na żelu agarozowym kininogenie, sprzężonej z analizą metodą spektrometrii mas, zidentyfikowano główne białka powierzchni drożdży, zaangażowane w wiązanie kininogenu (Karkowska-Kuleta i wsp., Peptides 2011);
- udowodniono wiązanie białek układu kontaktu do powierzchni bakterii *Porphyromonas gingivalis*, głównego patogenu chorób przyzębia (parodontozy) oraz wykazano, że w oddziaływaniu tym bakterie te nie wykorzystują białek budujących fimbrie czy lipopolisacharydu, lecz własności adhezyjne gingipain – proteaz, stanowiących główny czynnik wirulencji tych bakterii, biorących także udział w niezależnej od adsorpcji na komórkach produkcji kinin, polegającej na ich proteolitycznym działaniu na kininogen lub zymogeny układu kontaktu. Względny udział tych dwóch mechanizmów produkcji kinin określono dla szczepów pochodzenia klinicznego, pozyskanych od pacjentów z różnym poziomem zaawansowania chorób przyzębia (Rapala-Kozik i wsp., Inf. Immun. 2011).

3.6. Udział głównych czynników wirulencji grzybów z wybranych gatunków rodzaju *Candida* w propagacji stanu zapalnego

Najnowsze badania wskazują, że zewnątrzkomórkowe proteinazy drożdży z rodzaju *Candida*, należące do głównych czynników wirulencji tych oportunistycznych patogenów mogą, wzorem wielu proteaz bakteryjnych, odpowiadać również za propagację stanu zapalnego. Stosując różne warunki hodowli dla wybranych gatunków *Candida* przeprowadzono analizę ich aktywności proteolitycznej w odniesieniu do białek układu kontaktu i wykazano, że:

- proteinazy wydzielane do otoczenia przez wybrane gatunki tych drożdży są zdolne do degradacji białek należących do układu kontaktu;
- potwierdzono udział wydzielniczych proteinaz aspartylowych (SAP) w tym procesie;
- po raz pierwszy wykazano, że SAP są zdolne do generacji kinin z kininogenu wielko- i niskocząsteczkowego;
- rodzaj produkowanej kininy zależy od pH działania proteinaz, skorelowanego z możliwymi warunkami w różnych niszach organizmu gospodarza, gdzie najczęściej dochodzi do infekcji;
- potwierdzono zróżnicowaną aktywację receptorów kinin (typu B1 i B2) występujących na powierzchni komórek gospodarza, przy udziale kinin produkowanych przez SAP, w zależności od warunków a co zatem idzie od formy morfologicznej grzyba i poziomu powodowanej przez niego infekcji (Rapala-Kozik i wsp., Biol. Chem. 2010).

4. Inne realizowane aktualnie zadania badawcze

Przedstawione poniżej badania wynikają z podjętej przeze mnie współpracy międzyzakładowej w obrębie Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii w ramach projektu strukturalnego z Unii Europejskiej Nr POIG.02.01.00-12-064/08 „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” oraz współpracy międzywydziałowej z Wydziałem Chemii UJ w identyfikacji związków organicznych o potencjalnych zastosowaniach biologicznych jako interkalatory. Poniżej przedstawiam krótki opis uzyskanych wyników.

4.1. Charakterystyka oddziaływań międzycząsteczkowych z zastosowaniem pomiarów rezonansu plazmonów powierzchniowych (system BIACORE 3000)

W ramach realizacji projektu strukturalnego „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia", współpracuję z pracownikami Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii w zakresie charakterystyki oddziaływań międzycząsteczkowych, w których wykorzystywane jest urządzenie typu BIACORE 3000, umożliwiające pomiary parametrów wiązania biocząsteczek w czasie rzeczywistym. W ramach tej współpracy brałam udział w rozwiązaniu następujących problemów badawczych (publikacje w przygotowaniu):

- określenie oddziaływania białka AtPCNA (*Arabidopsis thaliana* Proliferating Cell Nuclear Antygen) oraz jego mutanta z fragmentem At-SCE (SUMO conjugating enzyme) warunkującego funkcjonalność procesów sumoilacji białka (współpraca Zakładem Biotechnologii Roślin, Dr Wojciech Strzałka);
- charakterystyka wiązania peptydów centrum wiążącego białka p53 i jego analogów z białkiem MDM oraz jego muteinami (współpraca z Zakładem Mikrobiologii, Dr Grzegorz Dubin);
- wyznaczenie stałych szybkości reakcji tworzenia kompleksów przez białka układu generacji kinin (Zakład Biochemii Analitycznej);
- badania wpływu aktywatorowych, represorowych i inicjatorowych sekwencji DNA na zmiany strukturalne w wybranych domenach czynnika transkrypcyjnego Yin Yang 1 (współpraca z Zakładem Biochemii Fizycznej, Dr Andrzej Górecki, Mgr Filip Gołębiowski).

4.2. Charakterystyka spektralna i analiza możliwości biologicznych zastosowań różnego typu interkalatorów DNA

Przy współpracy z Dr Katarzyną Ostrowską z Wydziału Chemii UJ wykonałam charakterystykę własności spektralnych pochodnych pirazyny (Ostrowska i wsp., Tetrahedron 2011), mogących znaleźć w przyszłości zastosowania jako czułe sensory jonów metali ciężkich (praca w przygotowaniu) lub interkalatory w detekcji DNA.

5. Dalsze perspektywy badawcze

W planowanych przeze mnie dalszych badaniach zamierzam wykorzystać zdobyte doświadczenia do realizacji następujących zagadnień:

- określenie możliwości udziału tiaminy w ochronie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *C. albicans* w warunkach stresu oksydacyjnego, z uwzględnieniem funkcjonowania mechanizmów biosyntezy i transportu tiaminy w mutantach *S. cerevisiae* z defektem odporności na stres;
- analiza roli tiaminy i jej S-acylowych pochodnych (np. benfotiaminy) w komórkach układu odpornościowego poddanych działaniu czynników pozapalnych;
- badanie zmian w procesach biosyntezy, transportu i wykorzystania TDP w układach mikoryzowych;
- oszacowanie udziału głównych czynników wirulencji *C. albicans* w aktywacji komórek układu obronnego.

6. Współpraca naukowa

Poniżej przedstawiam listę ośrodków naukowych w kraju i zagranicą oraz kierowników zespołów badawczych, z którymi współpracowałam w trakcie swojej działalności naukowej. Podaję także krótką informację o zakresie prowadzonych badań.

- 1988-1989; University of Konstanz, Department of Biological Science, Konstancja, Niemcy; Prof. S. Ghishla; staż przeddoktorski w zakresie zastosowań najnowszych metod oczyszczania białek oraz syntezy analogów witaminy B_2, niezbędnych w analizie centrów aktywnych enzymów, wykorzystujących FAD jako koenzym.
- 1997-1998; University of Georgia, Department of Biochemistry, Athens, Georgia, USA; Prof. J. Travis; staż podoktorski w zakresie roli enzymów proteolitycznych w infekcjach i stanach zapalnych.
- 2009-2010; Cornell University, Ithaca, Nowy Jork, USA; Dr. M. J. Scanlon; współpraca dotycząca analizy funkcjonowania mutantów roślinnych upośledzonych pod względem syntezy tiaminy.
- 2010-2011; Department of Clinical Sciences, Division of Infection Medicine, Biomedical Center, Lund, Szwecja; Dr. H. Herwald; analiza oddziaływań białek układu kontaktu z powierzchnią bakterii *Porphyromonas gingivalis*.
- Od 2008; Division of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Monachium, Niemcy; Dr A. Faussner; współpraca dotycząca roli receptorów kinin w infekcjach drożdżowych.

- Od 2011; Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japonia; Prof. M. Ueda; analiza wirulencji drożdży *Candida* z udziałem proteinaz drożdżowych, ekspresjonowanych w *Pichia pastoris*.
- Od 1997; Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński; Prof. dr hab. J. Potempa; badania w zakresie biochemicznych mechanizmów oddziaływań patogen-gospodarz.
- Od 2005; Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski; Prof. dr hab. M. Olczak; współpraca w badaniach nad muteinami białka THI3;
- Od 2002; Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński; Dr K. Ostrowska; synteza analogów tiaminy, niezbędnych w badaniach nad biosyntezą i metabolizmem tiaminy.
- Od 2010; Instytut Nauk o Środowisku, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński; Prof. dr hab. K. Turnau; badania dotyczące roli tiaminy w zjawisku mikoryzy.

7. Udział w projektach badawczych

7.1. Projekty własne z funkcją kierownika projektu

1. Projekt badawczy własny **KBN Nr 6 P04C 039 19**, „Metabolizm tiaminy (witaminy B1) oraz białek wiążących tiaminę w procesach rozwoju i kiełkowania nasion", 2000 – 2003;
2. Projekt badawczy własny **MNiI, Nr 2 P04C 017 27**, „Enzymy odpowiedzialne za syntezę i aktywację witaminy B1 w organizmach roślinnych", 2004 – 2007;
3. Projekt habilitacyjny **MNiSW Nr NN303 320937,** „Charakterystyka enzymów biorących udział w procesach biosyntezy i aktywacji tiaminy oraz ich rola w stresie abiotycznym w roślinach", 2009–2011.

7.2. Projekty własne z funkcją głównego wykonawcy projektu

1. Projekt badawczy własny **KBN Nr 6 P203 019 04**, „Fizykochemiczna charakterystyka oddziaływania witaminy B1 (tiaminy) ze swoistymi białkami z nasion" (kierownik: dr Andrzej Kozik), 1993–1995;
2. Projekt badawczy własny **KBN Nr 6 P04C 088 12**, „Strukturalno-chemiczne cechy mikrootoczenia tiaminy (witaminy B1) w kompleksach z rozpuszczalnymi białkami wiążącymi (transportującymi lub enzymatycznymi) z bakterii, roślin nasiennych i kręgowców" (kierownik: Dr hab. Andrzej Kozik), 1997 – 1999;

3. Projekt badawczy własny **KBN Nr 6 P04A 023 19**, „Wpływ czynników uwalnianych przez granulocyty obojętnochłonne (aktywnych form tlenu oraz elastazy) na potencjał wytwarzania kinin przez układ kininogen-kalikreina", (kierownik: Dr hab. Andrzej Kozik), 2000 – 2003;
4. Projekt badawczy własny **MNIiI Nr 2P04C 035 29**, „Wiązanie i aktywacja układów produkcji kinin na powierzchniach komórek", (kierownik: Prof. dr hab. Andrzej Kozik), 2005 – 2008
5. Projekt badawczy własny **MNiSW Nr N N303 572538**, „Charakterystyka oddziaływania białek osoczowego układu generacji kinin (układu kontaktu) z komórkami drożdży *Candida albicans*", 2010-2013 (kierownik: Prof. dr hab. Andrzej Kozik);
6. Projekt badawczy **NCN Nr 2011/01/B/Nz6/00277,** „Rola peptydaz aspartylowych Candida spp. w generowaniu hemocydyn," 2011-2013 (kierownik: dr hab. P. Mak).

7.3. Projekty współfinansowane przez Unię Europejską

1. Brałam udział w pracach nad przygotowaniem a obecnie realizacją jednego z zadań badawczych projektu strukturalnego **Nr. POIG.02.01.00-12-064/08 „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia"** – „Stworzenie kompleksowego systemu analizy genów na poziomie transkryptomu i proteomu". Projekt ten realizowany jest w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, współfinansowanego przez Unię Europejską (2008-2012).
2. Jestem zaangażowana w część prac badawczych wykonywanych w obrębie projektu strukturalnego **Nr POIG.01.01.02-00-109/09 "Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie"** (Zadanie nr 3 - Poszukiwanie nowych markerów mysich, szczurzych oraz ludzkich komórek VSELs w celu optymalizacji ich pozyskiwania dla celów badawczych oraz klinicznych; Zadanie nr 5 - badanie roli genów antyoksydacyjnych dla zwiększenia potencjału regeneracyjnego VSELs) współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (2007-2013).

8. Udział w konferencjach naukowych

8.1. Konferencje krajowe

1. XXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok 1987, poster*
2. XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk 1990, poster*
3. XXX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Szczecin 1994, 2 postery*
4. XXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Warszawa 1995, 2 postery*
5. XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń 2001, 2 postery*
6. XXXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk 2003, 2 postery*
7. 29 Kongres Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), Warszawa 2004, poster
8. 14 Kongres Federacji Europejskich Towarzystw Biologii Roślin (FESPB), Kraków 2004, poster
9. 40 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin 2005, poster
10. XXXIV Szkoła Zimowa Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakopane 7-11 marca 2007, referat
11. XXXV Szkoła Zimowa Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakopane 23-27 lutego 2008, 2 referaty*
12. XXXVI Szkoła Zimowa Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakopane 21-26 lutego 2009, referat
13. XLV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Wisła 2010, referat + poster
14. 2 Polski Kongres Biochemii i Biologii Komórki, Kraków 2011, **wykład na zaproszenie organizatorów*** + 5 posterów

---

(* - czynny udział w zjeździe – jeden z komunikatów prezentowany osobiście)

8.2. Konferencje zagraniczne

1. 14th International Congress of Biochemistry, Praga 1988, poster
2. Konferencja nt. “Vitamins and the health of the population of Belarus and neighboring regions”, Grodno, Białoruś, 1995, poster
3. Experimental Biology 99’ Meeting, Washington DC, April 17-21, 1999, poster
4. 13th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology (FESPP), Hersonissos, Heraklion, Kreta, Grecja, 2-6 września 2002, poster*
5. 30th FEBS Congress – 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary, 2 –7 July 2005, 2

postery*

6. XV FESPB Congress (Federation of European Societies of Plant Biology), Lyon (France) 17-21 July 2006, 2 postery*
7. XIII Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Davos (Switzerland) August 15-19, 2006, poster
8. KININ 2007: 2nd International Conference on "Exploring the Future of Vascular and Inflammatory Mediators", Berlin (Germany) May 30 – June 2, 2007, 2 postery
9. 32nd FEBS Congress, Vienna (Austria) 7-12 July 2007, 2 postery*
10. 33rd FEBS Congress – 11th IUBMB Conference, Athens, Greece, June 28 – July 3, 2008, poster
11. The 14th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (14th SFFRI), Beijing, China, October 18-22, 2008, 2 postery*
12. 34th FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 4-9 July 2009, poster
13. MC9 The biology of fungi. Edinburgh, UK, 1-6 August 2010, poster
14. 36th FEBS Congress, Torino, Italy, 25-30 June 2011, poster*

(* - czynny udział w zjeździe – jeden z komunikatów prezentowany osobiście)

9. Recenzje prac naukowych

9.1. Recenzje publikacji naukowych na zaproszenie redakcji czasopism zagranicznych

- **Journal of Plant Interaction** – styczeń 2009, "Changes in soluble carbohydrates, soluble amino-N, soluble proteins and free amino acids in leaves and roots of salt-stressed maize genotypes".
- **Environmental and Experimental Botany** – listopad 2009, "Growth of axile and lateral roots of maize: Response to desiccation stress induced by polyethylene glycol 8000".
- **Microbial Pathogenesis** – listopad 2009, "The Role of Diclofenac in the dimorphic transition in *Candida albicans*".
- **Acta Biochimica et Biophysica Sinica** – marzec 2010, "Abscisic acid activates a Ca^{2+}/calmodulin stimulated protein kinase involved in antioxidant defense in maize leaves".

- **Plant Physiology and Biochemistry** - kwiecień 2010, “Partial purification and characterization of acid phosphatase from seedlings of Mucuna pruriens (L) DC. var. utilis”.
- **Environmental and Experimental Botany** – kwiecień 2010, “Seedling root growth of tropical maize lines at various abiotic stresses”.
- **Plant and Cell Physiology** – kwiecień 2010, grudzień 2010, luty 2011, “Tomato LeTHIC is a Fe-required HMP-P synthase involved in thiamine synthesis and regulated by multiple factors”.
- **Plant and Cell Physiology** – maj 2010, “Tomato thiamineless(tl) mutant is caused by the transcriptional inactivation of LeThiC, which encodes a Fe-dependent HMP synthase involved in thiamine synthesis”.
- **Acta Physiologiae Plantarum** – czerwiec 2010, “Changes of glutathione reductase activity and isoform profile induced by abiotic stresses in rice are associated with hydrogen peroxide”.

9.2. Recenzje grantów dla National Science Fundation (USA)

Na prośbę NSF przygotowałam recenzję następujących projektów badawczych:

- “Deducing the biochemical mechanism of thiamin induced stress tolerance in plants”- kwiecień 2009;
- “Thiamine diphosphate and its pyrimidine precursors in plants: hydrolysis, regulation, and engineering”- październik 2009.

9.3 Recenzja książki

Dla czasopisma Elsevier, przygotowałam w maju 2005 roku recenzję książki profesoraWernera Müller-Esterla pt. “Biochemie. Eine Einfürung für Mediziner und Naturwissenschaftler”. Recenzja ta przygotowana została w nawiązaniu do zapotrzebowania na książki biochemiczne na polskim rynku wydawniczym.

10. Staże i szkolenia zagraniczne

- staż naukowy (DAAD) w Instytucie Biologii Uniwersytetu w Konstancji, Niemcy (1988-1989);
- staż naukowy podoktorski w Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Stanowego Georgii, Athens, Georgia, USA (1997-1998);

- szkolenie z zakresu wykorzystania nowoczesnych technik w badaniach oddziaływań międzycząsteczkowych na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu w Lublanie, Słowenia (listopad 2009);
- szkolenie w zakresie przeprowadzania i interpretacji badań kinetycznych z wykorzystaniem techniki rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR) - GE Healthcare, Monachium, Niemcy (czerwiec, 2010).

11. Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za cykl opublikowanych artykułów naukowych oraz prac doświadczalnych, 1993;
- Nagroda im. Antoniego Dmochowskiego przyznana przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne za pracę na rzecz rozwoju dydaktyki biochemii (dla współautorów podręcznika „Analiza instrumentalna w biochemii"), 2002;
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za osiągnięcia dydaktyczne (dla zespołu współautorów podręcznika „Wprowadzenie do chemii białek"), 2003;
- Stypendium naukowe z Rektorskiego Funduszu Stypendialnego Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2004;
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za osiągnięcia naukowe, 2009;
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za osiągnięcia naukowe, 2011.

12. Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować –

- *prof. dr hab. Andrzejowi Kozikowi - nieocenionemu mentorowi i zawsze pierwszemu recenzentowi moich prac, którego cenne uwagi, wskazówki a czasem i krytyka umożliwiły mi realizację i zakończenie wielu projektów;*
- *prof. dr hab. Zdzisławowi Żakowi – za nieustanny uśmiech i wiarę we mnie;*
- *Koleżankom i Kolegom z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, za ich pomoc i życzliwość w codziennej pracy;*
- *wszystkim moim Magistrantom, których zapał i optymizm pomagał przezwyciężać każde trudności;*
- *i moim Najbliższym, za ich ciepło, zrozumienie i troskę...*

Lucia Rybka-Kozik