

# **Autoreferat**

Dr Renata Szymańska

**Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki**

**Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej**

**Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie**

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

1. Imię i nazwisko: **RENATA SZYMAŃSKA**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**VI 2005** – magister biologii, Wydział Biologiczno-Geograficzny Uniwersytetu Pedagogicznego im. KEN w Krakowie; specjalność: biologia z chemią.

**IX 2008** – magister ochrony środowiska; Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

**IV 2011** – doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Udział chloroplastowych lipidów prenylowych w odpowiedzi roślin na stres”*. Promotor: Prof. dr hab. Jerzy Kruk.

Praca została wyróżniona przez Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ oraz nagrodzona Nagrodą im. W. Drabikowskiego za najlepszą pracę doktorską z biochemii przyznawaną przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne (2012).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

**Od 01.10-2013** – asystent, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie

**01.01.2012 – 30.09.2013** – adiunkt, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

**01.07.2011 – 30.11.2011** – adiunkt, Laboratorium im. Maxa Plancka, Małopolskie Centrum Biotechnologii w Krakowie

**01.07.2009 – 30.06.2011** – samodzielny biolog, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

**01.10.2006 – 08.04.2011** – studia doktoranckie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

4. Wskazanie 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

**„Funkcja chloroplastowych lipidów prenylowych w odpowiedzi *Arabidopsis thaliana* na stres abiotyczny”**

- b) Wykaz prac (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

*Kopie prac zostały zebrane w Załączniku 6. Wkład poszczególnych osób oraz mój udział w wykonaniu poszczególnych prac został szczegółowo opisany w oświadczeniach współautorów (Załącznik nr 7).*

\*autor korespondencyjny pracy

**Publikacja 1.** Szymańska R, Nowicka B, Kruk J\* (2014) Hydroxy-plastochromanol and plastoquinone-C as singlet oxygen products during photooxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 37: 1464-1473.

**IF 2014 – 6,96 Pkt MNiSW – 45**

**Wkład habilitantki:** hodowla roślin (WT, *vte1*, *vte2*, *vte4 Arabidopsis*), analiza HPLC prenylolipidów poddanych aklimatyzacji w WT oraz mutantach tokochromanoli (Rys. 3), optymalizacja metody detekcji produktów utleniania prenylolipidów (Rys. 3, 4); analiza HPLC lipidów prenylowych poddanych działaniu stresu świetlnego w WT oraz mutantach tokochromanoli (Rys. 4); analiza HPLC lipidów prenylowych w liściach infiltrowanych ciężką wodą (Rys. 5, 6) w WT oraz mutantach tokochromanoli *vte1-vte4*; analiza i interpretacja wyników przedstawionych na rysunkach 3, 4, 5, 6; sporządzenie rysunków 2, 3, 4, 5, 6, 11; przygotowanie tekstu manuskryptu dotyczącego w/w eksperymentów; odpowiedź na część uwag recenzentów.

**Publikacja 2.** Dłużewska J, Zieliński K, Nowicka B, Szymańska R, Kruk J\* (2015) New prenyllipid metabolites identified in *Arabidopsis* during photo-oxidative stress. *Plant, Cell and Environment* 38: 2698-2706.

**IF 2014 – 6,96 Pkt MNiSW – 45**

**Wkład habilitantki:** opracowanie i optymalizacja metody detekcji produktów utleniania prenylolipidów metodą HPLC; pomiar produktów utleniania prenylolipidów (Rys. 5, 6, 7); opracowanie i optymalizacja metody pomiaru ekspresji genów biosyntezy tokochromanoli *vte1-vte5* techniką qRT-PCR; przygotowanie rysunków 1, 5, 8; pomiar fluorescencji chlorofilu; analiza danych; przygotowanie części tekstu dyskusji.

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

**Publikacja 3. Szymańska R\***, Nowicka B, Gabruk M, Glińska S, Michlewska S, Dłużewska J, Sawicka A, Kruk J, Laitinen R. 2015. Physiological and antioxidant responses of two accessions of *Arabidopsis thaliana* in different light and temperature conditions. *Physiologia Plantarum* 154: 194-209.

**IF 2014 – 3,138 Pkt MNiSW – 35**

**Wkład habilitantki:** pomysł i opracowanie koncepcji pracy; zaplanowanie badań; pozyskanie finansowania (grant *Iuventus Plus*); czynny nadzór nad eksperymentami; pomiar prenololipidów metodą HPLC; pomiar stanu redoks puli plastochinonu; opracowanie wyników, przygotowanie tekstu manuskryptu, opracowanie tabel 1 i 2 oraz rysunków 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9; analiza statystyczna danych przedstawionych na w/w wykresach; autor korespondencyjny pracy.

**Publikacja 4.** Gabruk M, Habina I, Dłużewska J, Kruk J, **Szymańska R\*** (2016) Natural variation in tocochromanols content in *Arabidopsis thaliana* accessions - the effect of temperature and light intensity. *Physiologia Plantarum* 157: 147-160.

**IF 2014 – 3,138 Pkt MNiSW – 35**

**Wkład habilitantki:** pomysł i opracowanie koncepcji pracy; zaplanowanie badań; pozyskanie finansowania (grant *Iuventus Plus*); czynny nadzór nad eksperymentami; przygotowanie próbek i pomiar prenololipidów metodą HPLC; opracowanie wyników, przygotowanie tekstu manuskryptu, opracowanie tabel 1, 2 oraz S1, a także rysunków 2, 3, 4, 5, 6, 7, S1-S4; autor korespondencyjny pracy.

**Publikacja 5. Szymańska R\***, Kołodziej K, Ślesak I, Zimak-Piekarczyk P, Orzechowska A, Gabruk M, Żądło A, Habina I, Burda K, Kruk J (2016) Titanium dioxide nanoparticles (100-1000 mg/L) can affect vitamin E response in *Arabidopsis thaliana*; *Environmental Pollution* 213: 957-965.

**IF 2014 – 4,143 Pkt MNiSW – 40**

**Wkład habilitantki:** pomysł i opracowanie koncepcji pracy; zaplanowanie badań; pozyskanie finansowania (grant Dziekański); czynny nadzór nad eksperymentami; opracowanie

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

wyników, przygotowanie tekstu manuskryptu, opracowanie tabeli 1 oraz rysunków 1, 2, 3, 4, 5B; analiza statystyczna danych przedstawionych na w/w wykresach; autor korespondencyjny pracy.

### **Prace koncepcyjno-przeglądowe:**

**Publikacja 6.** Kruk J\*, Szymańska R, Nowicka B, Dłużewska J (2016) Function of isoprenoid quinones and chromanols during oxidative stress in plants. *New Biotechnology* 33: 636-643.

**IF – 2,898 Pkt MNiSW – 30**

**Wkład habilitantki:** przegląd i zbiór najnowszej literatury dotyczącej prezentowanego tematu; przygotowanie rozdziału manuskryptu dotyczącego funkcji tokoferoli i tokoferylochinonów w przekazywaniu sygnału oraz funkcji antyoksydacyjnych chinonów izoprenoidowych; opracowanie rysunków; przygotowanie części odpowiedzi na uwagi recenzentów.

**Publikacja 7.** Szymańska R\*, Gabruk M, Kruk J (2015) Ekotypy *Arabidopsis thaliana* – nowe narzędzie w badaniach biochemicznych i filogenetycznych. *Postępy Biochemii* 61(1): 102-113.

**IF 2014 – 0 Pkt MNiSW – 5**

**Wkład habilitantki:** pomysł i opracowanie koncepcji pracy; pozyskanie finansowania (grant *Iuventus Plus*); przygotowanie tekstu manuskryptu dotyczącego wykorzystania ekotypów w badaniach biochemicznych; przygotowanie rysunków; autor korespondencyjny pracy.

**Łączny IF publikacji (podany zgodnie z rokiem opublikowania) wchodzących w skład osiągnięcia wynosi 28,616, a suma punktów MNiSW – 270.**

### Wstęp

Stres abiotyczny powodowany takimi czynnikami jak wysokie natężenie światła, wysoka lub niska temperatura, susza czy metale ciężkie, ma ogromny wpływ na rozwój roślin, a w konsekwencji na uzyskiwane z nich plony. Rośliny jako organizmy niezdolne do aktywnego ruchu, w naturalnym środowisku są wystawione na działanie szeregu różnych stresów abiotycznych często oddziałujących synergistycznie lub jeden po drugim. Pod wpływem warunków stresowych w komórkach wzrasta poziom reaktywnych form tlenu (RFT) (Szymańska i Strzałka 2010). Ich nadmiar powoduje, że obecne w komórkach mechanizmy obronne nie są w stanie obniżyć ich zawartości do nieszkodliwego poziomu. Dochodzi wtedy do stanu określanego mianem stresu oksydacyjnego. Działanie RFT jako cząsteczek aktywnych chemicznie prowadzi do utleniania lipidów, białek czy kwasów nukleinowych, zaburzenia równowagi komórkowej, a w końcowym etapie nawet do śmierci komórki. W komórce roślinnej głównym miejscem wytwarzania RFT są chloroplasty. W ich obrębie głównymi źródłami RFT są fotosystem I (PSI) oraz fotosystem II (PSII) (Szymanska i Strzałka 2010).

W celu obrony przed niekorzystnym wpływem warunków stresowych rośliny wykształciły szereg mechanizmów obejmujących wiele poziomów organizacyjnych (m. in. zmiana położenia liści, ruchy chloroplastów). Roślinne antyutleniacze, czyli związki które usuwają RFT, dzielimy na dwie grupy: enzymatyczne i nieenzymatyczne. Do tej ostatniej grupy należą lipidy prenylowe, które stanowią jedne z najważniejszych chloroplastowych antyutleniaczy. Do lipidów prenylowych należą terpeny, chinony prenylowe i sterole. Związki te pełnią kluczową rolę w metabolizmie komórki (np. chinony prenylowe są transporterami elektronów i protonów w mitochondriach czy chloroplastach). Wspólną cechą strukturalną tych związków jest obecność jednostek izoprenoidowych. Związkami o charakterze antyutleniającym z grupy chloroplastowych lipidów prenylowych są tokochromanole oraz plastochinol (PQH<sub>2</sub>-9) i jego pochodne. Tokochromanole to grupa rozpuszczalnych w tłuszczach związków o charakterze amfipatycznym. Zbudowane są z polarnego pierścienia chromanolowego oraz hydrofobowego, izoprenoidowego łańcucha bocznego. Do grupy tej należą tokoferole (z nasyconym łańcuchem bocznym), tokotrienole (z nienasyconym łańcuchem bocznym) oraz plastochromanol-8 (PC-8) i jego pochodne. W zależności od liczby i pozycji grup metylowych w pierścieniu, wyróżniamy cztery homologi tokochromanoli:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ . Plastochromanol-8 to pochodna  $\gamma$ -tokotrienolu z dłuższym łańcuchem izoprenoidowym

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

(8 jednostek). Wszystkie tokochromanole są wydajnymi antyutleniaczami, a dla ludzi i zwierząt są niezbędnymi składnikami pożywienia, określanymi jako witamina E (Szymańska i Kruk 2007).

Właściwości antyoksydacyjne ma także zredukowana forma plastochinonu (PQ). Wykazano, że PQH<sub>2</sub>-9 skutecznie wygasza tlen singletowy (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) oraz pełni rolę ochronną w stosunku do PSII w warunkach stresu świetlnego (Nowicka i in. 2009). Badania przeprowadzone przeze mnie w ramach pracy doktorskiej pokazały, że PQH<sub>2</sub>-9 jest głównym chinonem prenylowym syntetyzowanym w odpowiedzi na stres świetlny u *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) (Szymańska i Kruk 2010).

Obecnie w wielu laboratoriach na świecie prowadzone są badania nad prenylolipidami, które obejmują między innymi:

- a) charakterystykę poszczególnych etapów biosyntezy tokochromanoli i wyjaśnienie mechanizmów regulacji tego procesu w warunkach stresu biotycznego, abiotycznego oraz w trakcie rozwoju i starzenia się rośliny;
- b) poznanie mechanizmu działania antyoksydacyjnego lipidów prenylowych w układach *in vitro* i *in vivo*, w tym wyjaśnienie funkcji mniej rozpowszechnionych tokochromanoli (np.  $\gamma$ -,  $\delta$ - tokoferolu czy PC-8);
- c) poznanie funkcji nie-antyoksydacyjnych tokochromanoli (m.in. udziału w transporcie cukrów czy regulacji ekspresji genów);
- d) wyjaśnienie funkcji tokochromanoli w szlakach transdukcji sygnału w komórce (m.in. szlaków zależnych od fitohormonów).

**Moje główne zainteresowania badawcze** dotyczą funkcji oraz regulacji biosyntezy lipidów prenylowych, ze szczególnym uwzględnieniem tokochromanoli, w czasie stresu abiotycznego (generowanego zmianami natężenia światła, temperatury oraz toksycznością metali w tym nanocząstek). W nurt ten wpisują się także badania eko-biochemiczne nad naturalną zmiennością ekotypów *Arabidopsis*. Tego typu analiza pozwala odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób lokalne adaptacje środowiskowe oraz różnice genetyczne pomiędzy ekotypami wpływają na metabolizm lipidów prenylowych. Pomimo, że udział chloroplastowych lipidów prenylowych w odpowiedzi roślin na stres jest badany od wielu lat, dokładny mechanizm tego procesu oraz jego regulacja nadal są słabo poznane. W dalszym ciągu niewyjaśniona pozostaje kwestia funkcji poszczególnych tokochromanoli w odpowiedzi na różne czynniki stresowe, a także regulacja ich syntezy w tych warunkach. Kolejną

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

niepoznaną kwestią jest dokładny mechanizm utleniania tych związków przez RFT w warunkach *in vivo* oraz funkcje powstających produktów utleniania. W opublikowanych dotychczas prac wynika, że w zależności od działania danego stresora istnieją preferencje działania chloroplastowych lipidów prenylowych (np. w czasie stresu suszy aktywnością dominuje  $\gamma$ -tokoferol, a czasie stresu świetlnego –  $\alpha$ -tokoferol i plastochinol) (Szymańska i Kruk 2008; Szymańska i Kruk 2010). Co więcej okazuje się, że ich zawartość jest regulowana na poziomie genetycznym. Osobnym zagadnieniem jest także taksonomiczna dystrybucja oraz funkcja mniej znanych lipidów prenylowych syntetyzowanych w chloroplastach, np. PC-8. Aktualny stan wiedzy na temat tego związku został przez nas przedstawiony w pracy przeglądowej opublikowanej w *Phytochemistry* (Kruk i in. 2014). Zagadnienia dotyczące nowych prenylolipidów będą przeze mnie kontynuowane w ramach przyznanego grantu SONATA 10 „Nowe lipidy prenylowe – występowanie, biosynteza i funkcje biologiczne” (NCN).

Wykaz prac cytowanych w powyższym tekście:

- 1) **Szymańska R**, Kruk J (2007) Występowanie oraz funkcja tokochromanoli u roślin, zwierząt i u człowieka. *Postępy Biochemii* 53(2), 174-182.
- 2) **Szymańska R**, Kruk J (2008) Gamma-tocopherol dominates in young leaves of runner bean (*Phaseolus coccineus*) under a variety of growing conditions. The possible functions of  $\gamma$ -tocopherol. *Phytochemistry* 69(11), 2142-2148.
- 3) Nowicka B, **Szymańska R**, Kruk J (2009) Chinony prenylowe - występowanie i funkcja. *Postępy Biochemii* 55(3), 307-315.
- 4) **Szymańska R**, Kruk J (2010) Plastochinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to high-light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastochromanol by tocopherol cyclase. *Plant and Cell Physiology* 51(4), 537-545.
- 5) **Szymańska R**, Strzałka Kazimierz (2010) Reaktywne formy tlenu w roślinach: powstawanie, dezaktywacja i rola w przekazywaniu sygnału. *Postępy Biochemii* 56(2), 182-201.
- 6) Kruk J, **Szymańska R**, Cela J, Munne-Bosch S (2014) Plastochromanol-8: Fifty years of research. *Phytochemistry* 108: 9-16.

### Cel badań

Tematyka prac, które uwzględniłam do oceny wpisuje się w zakres badań prowadzonych też w innych laboratoriach, przy czym stanowi ich uzupełnienie i rozszerzenie. Głównym celem tych pracy było poznanie mechanizmu działania antyoksydacyjnego chloroplastowych lipidów prenylowych w warunkach stresu oksydacyjnego generowanego czynnikami abiotycznymi (światło, temperatura, nanocząstki) oraz w czasie aklimatyzacji do tych warunków. Poprzez realizację tych prac chciałam wyjaśnić, jaki udział mają poszczególne lipidy w reakcji na te warunki. Odpowiedź lipidów prenylowych zależy od



## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

natężenia oraz czasu trwania czynnika stresowego. W trakcie aklimatyzacji obserwujemy akumulację tych związków, natomiast w czasie krótkotrwałego, silnego stresu dochodzi do znacznego spadku ich zawartości. W związku z tą obserwacją naszym celem było wyjaśnienie, jakie produkty powstają w warunkach stresu oksydacyjnego. Dodatkowo naszym celem była analiza ekspresji genów biosyntezy tokochromanoli, zarówno w trakcie aklimatyzacji jak i stresu. Uzupełnieniem tych badań jest analiza profilu lipidów prenylowych oraz ekspresji genów ich biosyntezy w ekotypach *Arabidopsis thaliana*, (ang. *accessions*) które stanowią warianty tego samego gatunku rozpowszechnione na całym świecie. Celem tych badań była analiza naturalnej zmienności ekotypów w odpowiedzi prenylolipidów na aklimatyzację do zwiększonego natężenia światła oraz obniżonej temperatury.

### Opis uzyskanych wyników

Pierwszym etapem prac w realizacji w/w celów była analiza zawartości lipidów prenylowych w dzikim typie (WT) oraz mutantach biosyntezy tokochromanoli (*vte1-vte4*) *Arabidopsis*. Prowadzone eksperymenty miały na celu wykazanie wpływu na te związki warunków świetlnych w dwóch wariantach: i) w czasie aklimatyzacji do wysokiego natężenia światła; ii) w czasie stresu świetlnego, czyli krótkotrwałego działania silnego światła. W trakcie badań wykazaliśmy, że w czasie stresu świetlnego w chloroplastach powstają produkty utlenienia lipidów prenylowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Plant, Cell and Environment* (**Publikacja 1**). Praca ta była częściowo kontynuacją badań prowadzonych przeze mnie w czasie doktoratu, a których wyniki znalazły się w publikacji *Plant, Cell and Physiology* oraz *Acta Biochemica Polonica*. W trakcie obecnych badań wykazałam, że aklimatyzacja do wysokiego natężenia światła (2000  $\mu\text{mol}$  fotonów/ $\text{m}^2/\text{s}$ ) prowadzi do akumulacji chloroplastowych prenylolipidów we wszystkich analizowanych liniach. Największy przyrost obserwowałam dla  $\alpha$ - tokoferolu oraz PQH<sub>2</sub>-9. Wzrastał także poziom PC-8 i PC-OH. W przeciwieństwie do aklimatyzacji, poziom lipidów prenylowych u roślin poddanych działaniu stresu świetlnego (2000  $\mu\text{mol}$  fotonów/ $\text{m}^2/\text{s}$  przez 1 i 2 h) malał. W tym przypadku, najbardziej znaczący spadek dotyczył tych samych związków ( $\alpha$ -tokoferol, PQH<sub>2</sub>-9), dla których obserwowano akumulację w trakcie aklimatyzacji. Uzyskane wyniki były zgodne z moim pierwotnym założeniem, że w czasie aklimatyzacji do warunków stresowych roślina stopniowo zwiększa syntezę antyutleniaczy co przejawia się wzrostem ich zawartości, natomiast w czasie silnego stresu, zużycie dostępnych lipidów prenylowych przewyższa szybkość ich biosyntezy (spadek zawartości). W czasie stresu świetlnego, w

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

chloroplastach dochodzi do stresu oksydacyjnego, podczas którego RFT utleniają lipidy prenylowe. W związku z tym kolejnym etapem prac była identyfikacja powstałych *in vivo* produktów utleniania. Z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz detekcji fluorescencyjnej w ekstraktach z liści WT wykryliśmy  $\alpha$ -TQ, PQ-C oraz PC-OH. Identyfikację PQ-C przeprowadziliśmy z wykorzystaniem kolumny z odwróconą fazą oraz redukującej post-kolumny. Przeprowadzone wcześniej badania *in vitro* wykazały, że w reakcji utlenienia lipidów prenylowych przez  $^1\text{O}_2$  powstaje szereg produktów. W eksperymentach *in vivo* potwierdziliśmy obecność  $\alpha$ -TQ, PQ-C, PC-OH. Dowodem na obecność w tkankach roślin był również wzrost ich poziomu w liściach infiltrowanych ciężką wodą (w ciężkiej wodzie czas życia  $^1\text{O}_2$  jest wydłużony). W infiltrowanych liściach poddanych działaniu stresu świetlnego, największe zmiany dotyczyły PQ-C – jego poziom znacząco wzrastał, zarówno w WT jak i mutantach *vte Arabidopsis*. Dodatkowo, wzrost ten był skorelowany ze spadkiem zawartości PQH<sub>2</sub>-9. W tych samych warunkach, spadek poziomu PC-8 nie był związany ze wzrostem PC-OH. Jego zawartość natomiast wzrastała wraz z wiekiem roślin aklimatyzowanych do silnego, słabego a także bardzo słabego światła. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że PC-OH tworzy się w warunkach długotrwałej, mniej intensywnej produkcji  $^1\text{O}_2$ , natomiast PQ-C w czasie silnego, krótkotrwałego stresu, gdzie wytwarzanie  $^1\text{O}_2$  jest większe. Te różnice związane są z rozmieszczeniem macierzystych związków (PQ-9 i PC-8) – w tylakoidach poziom PQ-9 w obu formach utlenionej i zredukowanej, był aż 4-krotnie wyższy niż PC-8. Analiza zawartości PC-OH w mutantach *vte2* i *vte4* oraz PQ-C w *vte1*, *vte2*, *vte4* nie wykazała różnic pomiędzy tymi liniami a WT co wskazuje, że produkcja  $^1\text{O}_2$  w tych warunkach jest we wszystkich liniach na podobnym poziomie. Te wyniki świadczą także o kompensacyjnym działaniu antyutleniającym PQH<sub>2</sub>-9 w przypadku braku tokoferoli w warunkach stresu świetlnego u *Arabidopsis*.

Kontynuacją wyżej opisanych wyników była publikacja, która także ukazała się w *Plant, Cell and Environment* (**Publikacja 2**). Z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz detekcji fluorescencyjnej zidentyfikowaliśmy w liściach WT i *vte1* oprócz opisanych wyżej inne, dotychczas nieopisane u *Arabidopsis* produkty utlenienia prenylolipidów: zredukowaną formę PQ-C oraz PQ-B czyli ester kwasów tłuszczowych oraz PQ-C. Detekcja obu form PQ-C (utlenionej i zredukowanej) oraz PQ-B opierała się na wykorzystaniu kolumny z odwróconą fazą i redukcji chinonów na post-kolumnie platynowej z wykorzystaniem układu solwentów (metanol w przypadku PQ-C oraz metanol/izopropanol w przypadku PQ-B). Punktem wyjścia do tych analiz były wyniki uzyskane w poprzedniej

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

pracy (**Publikacja 1**), gdzie wykazaliśmy że PQ-C powstaje jako produkt utleniania PQ-9, ale poziom tego związku nie wzrastał pod wpływem silnego światła. Dodatkowo, poziom PQ-C nie równoważył obserwowanego spadku zawartości PQ-9. Dlatego postawiona przez nas hipoteza zakładała występowanie zredukowanej formy PQ-C. Wyniki analiz chromatograficznych wykazały obecność tej formy już w liściach roślin kontrolnych hodowanych w słabym świetle. Pod wpływem silnego światła, poziom PQH<sub>2</sub>-C stopniowo zwiększał się, a nawet przekraczał zawartość PQ-9. Wyniki te potwierdziły, że w czasie stresu świetlnego PQ-C akumuluje się głównie w formie zredukowanej. Dodatkowe badania, z wykorzystaniem mutantów *vte1 Arabidopsis* wykazały, że obie formy PQ-C gromadzą się pod wpływem silnego światła, natomiast w obecności D<sub>2</sub>O poziom PQH<sub>2</sub>-C znacząco nie zmieniał się. Analiza zawartości lipidów prenylowych we frakcjach chloroplastów wykazała, że PQ-9 jest zlokalizowany głównie w błonach tylakoidowych i w plastoglobulach, natomiast czas życia <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w D<sub>2</sub>O jest przedłużony w fazie wodnej chloroplastów. Co ciekawe, w czasie relaksacji zawartość zredukowanej formy PQ-C spadała tylko u WT *Arabidopsis*, natomiast efekt ten nie występował u mutantu *vte1*.

W toku dalszych eksperymentów, wykazaliśmy obecność w chloroplastach PQ-B – estru kwasów tłuszczowych PQ-C. Forma ta była już opisywana w literaturze, ale po raz pierwszy zidentyfikowana u *Arabidopsis*. U WT *Arabidopsis* poziom PQ-B stopniowo wzrastał pod wpływem silnego światła, natomiast u mutantu *vte1* początkowo obserwowaliśmy spadek jego zawartości, a następnie wzrost. Oprócz wymienionych produktów utleniania PQ (PQ-C, PQH<sub>2</sub>-C oraz PQ-B) w chloroplastach WT *Arabidopsis* wykazaliśmy obecność PC-OH, którego poziom podnosił się pod wpływem światła. Kilka lat wcześniej w naszym laboratorium w ramach pracy doktorskiej pani Jolanta Gruszka przeprowadziła eksperymenty *in vitro*, w których dowiodła, że pod wpływem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> powstaje całe spektrum produktów utlenienia prenylolipidów, w tym PQ-C, PQH<sub>2</sub>-C, PQ-B, PQ(OH)<sub>3</sub>-9, PC-OH, PC(OH)<sub>3</sub>, chinon PC-8 (Gruszka i in. *Free Rad Biol Med.* 45: 920-928, 2008). O ile obecność niektórych z tych związków udało się potwierdzić *in vivo*, to pozostałe nie zostały wykryte. Wyniki uzyskane w obu omówionych wyżej pracach stały się podstawą artykułu przeglądowego dotyczącego funkcji chinonów izoprenoidowych w czasie stresu oksydacyjnego u roślin, opublikowanego w *New Biotechnology* (**Publikacja 6**).

Z wykorzystaniem opracowanej przeze mnie metody oznaczania ekspresji genów biosyntezy tokochromanoli (*vte1-vte5*) w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) wykazaliśmy, że zarówno pod wpływem silnego światła jak i aklimatyzacji dochodzi do specyficznego

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

wzrostu poziomu ekspresji genu *vte2*, kodującego fitylotransferazę homogentyzynianową. Reakcja katalizowana przez ten enzym odgrywa kluczową rolę w regulacji biosyntezy chloroplastowych prenylolipidów. Wysoki poziom ekspresji genu *vte2* występował także u mutantu *vte1*, co świadczy, że gen *vte1* nie wpływa na ekspresję *vte2*. Dodatkowo, w liściach infiltrowanych D<sub>2</sub>O ekspresja *vte2* była podwyższona. Uzyskane wyniki sugerują, że wzrost ekspresji genu *vte2* jest związany z działaniem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w warunkach wysokiego natężenia światła.

Kontynuacją, a zarazem uzupełnieniem wyżej opisanych prac są badania dotyczące zagadnienia aklimatyzacji do warunków stresowych u *Arabidopsis*. Doświadczenia te prowadziłam z wykorzystaniem ekotypów *Arabidopsis* i były one realizowane w ramach kierowanego przeze mnie projektu *Iuventus Plus* MNiSW (IP2011 055271). Wyniki tych badań zostały opublikowane w dwóch artykułach w *Physiologia Plantarum* (**Publikacja 3** i **Publikacja 4**). Wymiernym efektem tych prac jest także praca przeglądowa dotycząca ekotypów i możliwości ich wykorzystania w badaniach nad naturalną zmiennością, którą opublikowałam w *Postęпах Biochemii* (**Publikacja 7**). Praca ta stanowi pierwszą i jedyną pozycję omawiającą te zagadnienia w języku polskim.

Rośliny, jako organizmy pozbawione możliwości aktywnego poruszania się muszą być wyposażane w mechanizmy warunkujące ich prawidłowy rozwój w warunkach zmieniającego się środowiska, głównie światła i temperatury. Pod wpływem lokalnych warunków klimatycznych wykształcają specyficzne mechanizmy chroniące przed warunkami stresowymi. Doskonałym narzędziem do studiowania tego typu zależności są ekotypy, które stanowią różne warianty tego samego gatunku, ale wykazujące naturalną zmienność w odpowiedzi roślin na stres. Ich wykorzystanie umożliwiło mi nie tylko zbadanie funkcji chloroplastowych lipidów prenylowych w czasie aklimatyzacji do warunków świetlno-temperaturowych, ale także analizę naturalnej zmienności tych związków w obrębie analizowanych ekotypów.

W początkowym etapie prac (**Publikacja 3**) skupiłam się na analizie różnic w odpowiedzi fizjologicznej i antyoksydacyjnej pomiędzy dwoma ekotypami *Arabidopsis* aklimatyzowanymi do czterech różnych warunków świetlno-temperaturowych (I wariant hodowlany – 16°C i niskie natężenie światła; II wariant – 16°C i wysokie natężenie światła; III wariant – 23°C i niskie natężenie światła oraz IV wariant – 23°C i wysokie natężenie światła). Do badań wybrałam ekotypy: Shahdara (Sha) i Lovvik-5 (Lov-5), pochodzące ze

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

skrajnych warunków środowiskowych (różna roczna suma opadów, średnia roczna temperatura, nasłonecznienie, wysokość n.p.m, itd.), wykazujące inne strategie życiowe oraz różniące się odpornością na stres. Lov-5 pochodzi z północnej Szwecji, natomiast Sha z gór Pamir w Tadżykistanie (3500 m n.p.m.). Bazując na wymienionych różnicach postanowiliśmy sprawdzić jaka będzie odpowiedź tych roślin poddanych aklimatyzacji do różnych warunków temperaturowo-światlnych. Analiza lipidów prenylowych wykazała większą ich zawartość w wysokogórskim ekotypie, z wyjątkiem warunków 16°C/HL. Ponadto oba ekotypy miały wyższą zawartość prenylolipidów w temperaturze 23°C niż w 16°C. Co ciekawe, nie obserwowałam różnic pomiędzy zawartością antyoksydantów w zależności od zastosowanego natężenia światła. To oznacza, że w badanym przypadku synteza lipidów prenylowych jest uzależniona od temperatury wzrostu, a nie od warunków świetlnych. Podobnie, jak w opisanych wcześniej wynikach prac, we wszystkich zastosowanych warunkach największy przyrost zawartości wykazywał  $\alpha$ -tokoferol oraz PQH<sub>2</sub>-9. Górski ekotyp Sha miał wyższy poziom PC i PC-OH niż Lov-5. Analiza qRT-PCR poziomu ekspresji genów (*vte1-vte5*) u obu ekotypów wykazała, że aklimatyzacja do zastosowanych warunków powoduje wyraźny wzrost poziomu ekspresji dwóch genów – *vte3* (kodujący metylotransferazę metylofitylobenzchinolu) oraz *vte5* (kodujący kinazę fitolu). To oznacza, że w zastosowanych warunkach oba te geny specyficznie regulują syntezę prenylolipidów. Poziom ekspresji wszystkich genów był wyższy u ekotypu Sha. Uzupełnieniem badań dotyczących odpowiedzi antyoksydacyjnej, była analiza porównawcza, która obejmowała szeroki poziom organizacyjny roślin (badania fenotypowe, fizjologiczne przez analiza ultrastruktury chloroplastów). W każdym przypadku obserwowaliśmy znaczne różnice pomiędzy ekotypami. Uzyskane w trakcie tych analiz wyniki pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków: 1) znacznie niższa zawartość chlorofilu u Sha może stanowić adaptację do warunków wysokogórskich; 2) rośliny rosnące w niższej temperaturze wykazują bardziej wydajne niefotochemiczne wygaszanie fluorescencji (NPQ); 3) wyższa temperatura wzrostu powoduje zaburzenia struktury miękiszu oraz ultrastruktury chloroplastów; 4) pod wpływem wysokiego natężenia światła pula PQ-9 jest utrzymywana w stanie utlenionym, co może być jednym z mechanizmów adaptacyjnych zapobiegających fotoinhibicji.

Kontynuacją opisanych powyżej wyników jest praca opublikowana w *Physiologia Plantarum* (**Publikacja 4**). W tym przypadku analizę rozszerzyłam na 25 ekotypów *Arabidopsis* pochodzących z różnych warunków klimatycznych. Ekotypy te, tak samo jak



## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

poprzednio, były aklimatyzowane do czterech różnych warunków świetlno-temperaturowych (opisanych wyżej). Po 5 tygodniach wykonaliśmy analizę zawartości prenylolipidów oraz poziomu ekspresji genów ich biosyntezy (*vte1-vte5*), a interpretację wyników rozszerzyliśmy o dane klimatyczne dla miejsc pochodzenia ekotypów. W analizowanych roślinach obserwowaliśmy znaczne różnice w poziomie i składzie tokochochromanoli, lecz najwyższe i najniższe wartości dotyczyły tych ekotypów, dla których średnia roczna temperatura nie przekracza 7°C. Dla roślin hodowanych w 23°C stosunek PC-OH/PC był zdecydowanie niższy niż w 16°C, co wskazuje że niższa temperatura promuje tworzenie PC-OH. Taka zależność nie była obserwowana w stosunku do warunków świetlnych. W obniżonej temperaturze obserwowaliśmy także wyższy poziom PQH<sub>2</sub>-9. Co więcej w 16°C wyraźnie wzrósł poziom ekspresji genów *vte1* i *vte4*. W celu sprawdzenia czy pomiędzy zawartością prenylolipidów, poziomem ekspresji genów ich biosyntezy a warunkami wzrostu ekotypów istnieją korelacje, przeprowadziliśmy statystyczną analizę składowych głównych PCA – (ang. *principal component analysis*). Analiza PCA wykazała, że poziom lipidów prenylowych jest uzależniony od temperatury wzrostu roślin a nie warunków świetlnych. Największy wpływ w uzyskany rozkład miał poziom ekspresji genów *vte1*, *vte4*, *vte5* oraz zawartość  $\alpha$ -tokoferolu. Na podstawie uzyskanych wyników oraz danych klimatycznych dokonaliśmy także analizy skupień. Uzyskane dendrogramy pokazały, że ekotypy pochodzące z terenów o podobnej średniej rocznej temperaturze (wyższej niż 10°C i niższej niż 5°C) mają zbliżoną zawartość tokochochromanoli. Takiej korelacji nie obserwowaliśmy biorąc pod uwagę region, z którego dany ekotyp pochodzi. Wyniki obu prac (**Publikacja 3 i Publikacja 4**) były prezentowane na Sympozjum Fotosyntetycznym na Krecie (2015) oraz na Zjeździe Biochemicznym w Warszawie (2014).

Kontynuacją zagadnienia dotyczącego aklimatyzacji i związanych z tym mechanizmów antyoksydacyjnych są wyniki badań opublikowane w *Environmental Pollution* (**Publikacja 5**). Stres abiotyczny może być wywołany nie tylko zmianami natężenia światła czy temperatury, ale także zanieczyszczeniami środowiska, w tym obecnymi w coraz większym stopniu nanocząstkami. Do doświadczeń wybraliśmy nanocząstki tlenku tytanu (IV) (nano-TiO<sub>2</sub>) ze względu na: 1) szerokie wykorzystanie w różnych sektorach gospodarki, a co za tym idzie znaczne rozpowszechnienie w środowisku; 2) nietypowe, w porównaniu do większych cząstek, cechy; 3) wykazywanie efektu fotokatalitycznego pod wpływem oświetlania oraz związane z tym generowanie RFT. Naszym celem było sprawdzenie jaki jest funkcja chloroplastowych lipidów prenylowych u roślin hodowanych w obecności nano-TiO<sub>2</sub>

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

oraz poddanych działaniu stresu świetlnego. Jest to pierwsza praca pokazująca wpływ nanocząstek na metabolizm tokochromanoli i plastochinonu oraz uzupełniona o kompleksową analizę biochemiczno-molekularną. Nasiona *Arabidopsis* były inkubowane przez 48 h w zawieszynie wzrastających stężeń nano-TiO<sub>2</sub> (100 – 1000 µg/ml) i hodowane w ziemi przez 4 tygodnie. Analiza masowa potwierdziła obecność tytanu w liściach roślin. Z przeprowadzonych badań wynika, że tylko wyższe stężenia nano-TiO<sub>2</sub> powodują stres oksydacyjny (obserwowany jako peroksydacja lipidów), co za tym idzie objawy toksyczności i wzrost poziomu antyutleniaczy. Pod wpływem niższych stężeń nano-TiO<sub>2</sub>, zawartość tokochromanoli spadała, a podwyższony ich poziom występował przy 1000 µg/ml nano-TiO<sub>2</sub>. Natomiast w liściach roślin poddanych równocześnie działaniu nanocząstek oraz stresowi świetlnemu (2500 µmoli fotonów/m<sup>2</sup>/s) poziom tokochromanoli wzrastał wraz ze wzrostem stężenia nano-TiO<sub>2</sub>, co oznacza że w czasie synergistycznego działania silnego światła i nanocząstek efekt toksyczny potęguje się. Rezultat ten jest dodatkowo potęgowany przez infiltrację liści D<sub>2</sub>O, co świadczy o wysokiej aktywności <sup>1</sup>O<sub>2</sub> w tych warunkach. Kompleksowa analiza wpływu nano-TiO<sub>2</sub> na wzrost i rozwój *Arabidopsis* pozwoliła na wysnucie następujących wniosków: 1) obserwowany spadek świeżej i suchej biomasy roślin w roślinach traktowanych nano-TiO<sub>2</sub> może mieć związek z zaburzeniem transportu mikroelementów; 2) pod wpływem nanocząstek chlorofil ulega degradacji; 3) równoczesne działanie nanocząstek i silnego światła prowadzi do spadku aktywności katalazy i wzrostu aktywności SOD, co może świadczyć powstawaniu anionorodnika ponadtlenkowego w fazie wodnej chloroplastów; 4) przy małych stężeniach nano-TiO<sub>2</sub>, dochodzi do obniżenia ekspresji genów *vte1-vte5*, a przy wysokich do jej wzrostu, co koreluje z zawartością tokochromanoli; 5) pod wpływem nano-TiO<sub>2</sub> poziom PQH<sub>2</sub>-9 spada co sugeruje, że w tych warunkach występuje on głównie w formie utlenionej; 6) największy wzrost poziomu ekspresji dotyczy genu *vte5*, co ściśle koreluje ze spadkiem stężenia chlorofilu (kinaza fitolu kodowana przez gen *vte5* fosforyluje fitol uwolniony w czasie degradacji chlorofilu, który jest wykorzystywany jako substrat w syntezie tokochromanoli); 7) duże stężenia nano-TiO<sub>2</sub> powodują peroksydację lipidów, czym można wytłumaczyć wzrost poziomu lipofilnych tokochromanoli w tych warunkach.

### **Najważniejsze wnioski:**

W przedstawionych powyżej pracach opisałam funkcje chloroplastowych lipidów prenylowych ze szczególnym uwzględnieniem tokochromanoli i plastochinolu w czasie

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

stresu oksydacyjnego generowanego czynnikami abiotycznymi, tj. natężenie światła, zmiany temperatury oraz obecność nanocząstek (wpływ tych czynników był testowany pojedynczo lub w kombinacjach). Wszystkie badania były prowadzone na modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana* i uwzględniały nie tylko, wykorzystywany standardowo w laboratoriach na świecie ekotyp *Columbia*, ale także inne ekotypy pochodzące z różnych miejsc w Euroazji. Zamierzeniem przeprowadzonych doświadczeń było wykazanie różnic w metabolizmie omawianych związków w czasie stresu oraz aklimatyzacji. Do najważniejszych wniosków można zaliczyć wykazanie, że:

- w czasie aklimatyzacji do wysokiego natężenia światła dochodzi do akumulacji tokochromanoli i plastochinolu;
- pod wpływem stresu czyli krótkotrwałego działania niekorzystnego czynnika, chloroplastowe lipidy prenylowe są konsumowane, w związku z czym ich poziom maleje;
- w czasie stresu fotooksydacyjnego powstają produkty utlenienia prenylolipidów; pod wpływem  $^1\text{O}_2$  plastochromanol-8 utlenia się do hydroksy-plastochromanolu, natomiast plastochinon-9 do plastochinonu-C; w chloroplastach tworzy się także plastochinon-B, będący estrem kwasów tłuszczowych oraz plastochinonu-C;
- w warunkach stresu świetlnego plastochinon-C występuje głównie w formie zredukowanej, zarówno w dzikim typie jak i w pozbawionym tokoferoli mutancie *vte*;
- $^1\text{O}_2$  tworzący się w czasie stresu świetlnego specyficznie podnosi ekspresję genu *vte2* kodującego fitylotransferazę homogentyzynianową;
- w czasie aklimatyzacji, poziom chloroplastowych lipidów prenylowych zależy od warunków świetlno-temperaturowych;
- zawartość lipidów prenylowych jest ściśle uzależniona od miejsca pochodzenia danego ekotypu i jest efektem przystosowań do lokalnych warunków klimatycznych;
- aklimatyzacja ekotypów do wysokiego natężenia światła oraz obniżonej temperatury powoduje aktywację genów *vte3* oraz *vte5*, w przeciwieństwie do warunków stresowych, w których większe znaczenie ma aktywacja *vte2*;



## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

- w czasie aklimatyzacji zawartość lipidów prenylowych oraz poziom ekspresji genów zmienia się w zależności od zastosowanych warunków hodowli, przy czym większy udział ma temperatura niż warunki świetlne;
- u roślin aklimatyzowanych do niższej temperatury wzrasta poziom hydroksyplastochromanolu, co wskazuje na większą produkcję  $^1O_2$  w tych warunkach;
- pod wpływem nanocząstek metali, poziom prenylolipidów zmienia się, ale zakres tych zmian jest zależny od zastosowanego stężenia – objawy stresu oksydacyjnego dotyczą tylko wysokich stężeń (1000  $\mu\text{g/ml}$ );
- synergistyczne działanie nanocząstek oraz wysokiego natężenia światła powoduje znaczny wzrost poziomu lipidów prenylowych, co świadczy występowaniu stresu oksydacyjnego w tych warunkach;
- przy dużych stężeniach nanocząstek wzrasta poziom ekspresji genu *vte5*, co ma związek z obserwowaną degradacją chlorofilu w tych warunkach; gen *vte5* koduje kinazę fitolu, która wykorzystuje fitol pochodzący z rozkładu chlorofilu do syntezy tokochromanoli.

Bazując na uzyskanych wynikach można powiedzieć, że w zależności od działającego czynnika stresowego, jego natężenia oraz czasu trwania zachowanie lipidów prenylowych jest inne. W czasie krótkotrwałego działania warunków stresowych tokochromanole i plastochinol są zużywane, czego skutkiem jest powstawanie produktów ich utlenienia. Związki te mogą być traktowane zatem jako markery stresu oksydacyjnego. Z kolei w czasie aklimatyzacji wzmożona ich synteza skutkuje akumulacją tych antyutleniaczy. Regulacja biosyntezy tych związków ma miejsce na wielu etapach i jest także zależna od zastosowanych warunków hodowlanych. Oznacza to, że odpowiedź chloroplastowych lipidów prenylowych jest specyficzna dla danego czynnika stresowego i powinna być rozpatrywana odmiennie. Dodatkowym czynnikiem, który ma kluczowe znaczenie w odpowiedzi antyoksydacyjnej jest także pochodzenie gatunków i związane z tym lokalne adaptacje do warunków klimatycznych.

### **Kierunki kontynuacji badań**

Omówione badania stanowią część prowadzonych przeze mnie prac dotyczących metabolizmu chloroplastowych lipidów prenylowych. Główny ich nurt dotyczy funkcji lipidów prenylowych w czasie stresu abiotycznego. Uzupełnieniem a zarazem kontynuacją

badania jest identyfikacja i analiza nowych lipidów prenylowych w ramach przyznanego w edycji X grantu NCN Sonata pt. „*Nowe lipidy prenylowe – występowanie, biosynteza i funkcje biologiczne*”, którego jestem kierownikiem. Dodatkowo, moje prace skupiają się wokół biosyntezy tokochromanoli ze szczególnym uwzględnieniem kluczowych dla niej enzymów – VTE1 (cyklazy tokoferolu) oraz VTE5 (kinazy fitolu). Zagadnienia te uwzględniają badania nad specyficznością substratową tych enzymów *in vitro* oraz *in vivo*. W przypadku VTE5, główny nacisk położony jest na poznanie mechanizmu alternatywnego szlaku biosyntezy tokochromanoli zależnego od katabolizmu chlorofilu. Równoległe z tymi pracami będę prowadziła badania nad enzymem o aktywności oksydazowej, który utlenia tokoferole i którego aktywność udało mi się wykazać jeszcze w czasie prac nad doktoratem. Kolejnym etapem prac będzie próba oczyszczania tego enzymu i jego charakterystyka.

### **Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)**

Oprócz publikacji wymienionych i omówionych powyżej, w skład mojego dorobku naukowego wchodzi jeszcze 15 prac oryginalnych, 3 prace przeglądowe w języku angielskim, 7 prac przeglądowych w języku polskim, 2 doniesienia w materiałach pokonferencyjnych i 6 rozdziałów w książkach. Obecnie jestem kierownikiem grantu Sonata 10 (NCN) oraz wykonawcą grantu OPUS 10 (NCN). W poprzednich latach byłam kierownikiem grantu *Iuventus Plus* (Nr IP2011 055271; 2012-2014), głównym wykonawcą w grantzie NCN OPUS (Nr 2011/01/B/NZ1/00079; 2012–2015; kierownik Prof. dr hab. Jerzy Kruk) oraz wykonawcą w dwóch innych grantach: NCN Harmonia (Nr 2011/01/M/NZ1/01170; 2012–2015; kierownik Prof. dr hab. Kazimierz Strzałka) oraz projekt KBN (Nr N302 04932; 2007 – 2010; kierownik Prof. dr hab. Jerzy Kruk).

Moje zainteresowania badawcze od początku dotyczyły zagadnień związanych z tokochromanolami (witaminą E) oraz innymi chloroplastowymi lipidami prenylowymi. Badania te stanowiły jeden z głównych nurtów badań w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, w którym wykonywałam pracę magisterską, a później doktorską.

W trakcie badań w ramach pracy doktorskiej, która dotyczyła biosyntezy tokochromanoli w czasie stresu świetlnego, udało mi się wykazać, że PC-8 dzieli ten sam szlak biosyntezy co tokoferole i jest syntetyzowany przez cyklazę tokoferolu (VTE1). Dodatkowo, po raz pierwszy wykazałam obecność w liściach roślin hydroksylowej pochodnej plastochochanolu (PC-OH). W toku badań pokazałam również, że w etiolowanych liściach fasoli dominuje  $\gamma$ -tokoferol, a nie jak normalnie  $\alpha$ -tokoferol, oraz że ma on znaczenie w

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

ochronie przed suszą. Co więcej, w etiolowanej fasoli wykazałam obecność oksydazy tokoferolu i przeprowadziłam badania nad specyficznością tego enzymu. Część eksperymentów do pracy doktorskiej wykonywałam w trakcie kilkumiesięcznych staży naukowych na Uniwersytecie Christian Albrecht w Kiel w Niemczech, w ramach współpracy prof. Jerzego Kruka z dr Jonem Folkiem i prof. Karin Krupinska z tamtejszego uniwersytetu. Wyniki prac, o których traktuje moja praca doktorska, zostały opublikowane w *Plant and Cell Physiology* (2010), *Acta Biochemica Polonica* (2010), *Acta Physiologicae Plantarum* (2013) oraz w *Phytochemistry* (2008).

Po obronie pracy doktorskiej w centrum moich zainteresowań nadal pozostaje tematyka chloroplastowych lipidów prenylowych, stresu abiotycznego i oksydacyjnego. Oprócz centralnego nurtu badań, który stanowi przedmiot osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny, prowadzone przeze mnie badania przyczyniły się m.in. do:

- a) rozszerzenia wiedzy dotyczącej taksonomicznej dystrybucji tokoferoli, plastochromanolu-8 i hydroksy-plastochromanolu (rośliny wyższe, glony, mszaki) (prace w *Plant Physiology and Biochemistry* (2007), *Acta Biochimica Polonica* (2008), *Acta Biologica Cracoviensia* (2009), *Journal of Chilean Chemical Society* (2011))
- b) opracowania metod analizy produktów utleniania tokoferoli (*Journal of Plant Physiology* (2008)).
- c) identyfikacji nowych tokochromanoli – tokomonoenoli (*Journal of Plant Physiology* (2011)).
- d) oznaczania stanu redoks puli plastochinonu i funkcji lipidów prenylowych w czasie stresu oksydacyjnego generowanego przez  $^1\text{O}_2$  (*BBA-Bioenergetics* (2012), *Plant, Cell and Environment* (2014)).

Prace wymienione powyżej oraz te uwzględnione w osiągnięciu naukowym były/są finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, KBN oraz NCN. Ponadto prace związane z ekotypami są wynikiem odbytego przeze mnie stażu w Laboratorium Maxa Plancka, które funkcjonowało przy Małopolskim Centrum Biotechnologii. Prace te były efektem współpracy z dr Roosą Laitinen z *Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology* w Golm (Niemcy), która kierowała Laboratorium. Ponadto, większość z opublikowanych prac powstała we współpracy z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi, wśród których znajdują się:

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

- a) Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki (dr Sława Glińska)
- b) Zakład Biofizyki, WBBiB UJ (dr Andrzej Żądło)
- c) Laboratorium Środowiskowe AGH (mgr Wiesław Knap)
- d) Instytut Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk (dr hab. Ireneusz Ślesak)
- e) Palacky University, Olomouc, Czechy (prof. Pavel Pospisil)
- f) Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm/Poczdham, Niemcy (dr Roosa Laitinen)
- g) Christian Albrecht University, Kiel (Niemcy) (prof. Karin Krupinska, dr Jon Folk)
- h) Barcelona University (prof. Sergi Munne-Bosch, dr Jana Cela)

### Podsumowanie

Mój dorobek naukowy obejmuje

- **21** prac doświadczalnych z listy JCR – **łączny IF = 65,932** (zgodnie z rokiem opublikowania); **h index – 8, cytowań 150** (bez autocytowań) – dane z 27.07.2016

- **2** doniesienia w materiałach pokonferencyjnych

- **6** rozdziałów w książkach

- **4** prace przeglądowe w języku angielskim

- **8** prac przeglądowych w języku polskim.

Ponadto wygłosiłam 2 wykłady na zaproszenie w innych ośrodkach naukowych (Instytut Biochemii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; Instytut Molekularnej Fizjologii Roślin im. Maxa Plancka w Golm); 2 wykłady na seminarium Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH oraz dwa wykłady na konferencjach tematycznych (Zjazd Biochemiczny w Krakowie i Szkoła Zimowa Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Zakopanem). Wyniki moich prac zostały zaprezentowane w formie 22 posterów na konferencjach międzynarodowych oraz krajowych, w tym w 16 brałam udział jako osoba prezentująca. W czasie mojej pracy byłam promotorem 5 prac magisterskich, 1 pracy licencjackiej i 3 prac inżynierskich. Byłam także opiekunką 3 stażystów (kierunek *Biologia* i *Ochrona Środowiska*). Dodatkowo, byłam recenzentem kilkunastu prac magisterskich i inżynierskich. Jestem członkiem 4 towarzystw naukowych

## Załącznik 3A – Autoreferat Renata Szymańska

---

(Międzynarodowe Towarzystwo Fotosyntetyczne, Polskie Towarzystwo Botaniczne, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika).

KRAKÓW, 01.08.2016

Renata Szymańska