

dr Mariola Dietrich
Zakład Biologii Gamet i Zarodka
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk
ul. Tuwima 10
10-748 Olsztyn

ZAŁĄCZNIK II

Autoreferat

Identyfikacja, charakterystyka i rola głównych białek plazmy nasienia karpia oraz ich związek z białkami osocza krwi

Olsztyn 2015

1. Dane personalne

Imię i nazwisko	Mariola Dietrich
Miejsce pracy	Zakład Biologii Gamet i Zarodka Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk ul. Tuwima 10 10-748 Olsztyn

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2006 doktor nauk rolniczych w zakresie zootechniki, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Izolacja i charakterystyka alfa1-inhibitry proteinaz z plazmy nasienia karpia (*Cyprinus carpio* L)”,

promotor: prof. dr hab. A. Ciereszko, *praca doktorska wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie*

2001 magister inżynier biotechnologii: Wydział Biologii, kierunek biotechnologia, specjalność - biotechnologia, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

Tytuł pracy magisterskiej: „Transdukcja sygnału prolaktynowego w komórkach wczesnolutealnych jajnika świni”,

promotor: prof. dr hab. R.E. Ciereszko, *dyplom ukończenia studiów z wyróżnieniem*

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

01.03.2006 - obecnie **Adiunkt**, Zakład Biologii Gamet i Zarodka (ZBGZ),
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

01.09.2001 – 28.02.2006 **Asystent**, Zakład Biologii Nasienia, Instytut
Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

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/artystycznego

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą złożonego wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego jest cykl publikacji przedstawionych pod wspólnym tytułem:

„IDENTYFIKACJA, CHARAKTERYSTYKA I ROLA GŁÓWNYCH BIAŁEK PLAZMY NASIENIA KARPIA ORAZ ICH ZWIĄZEK Z BIAŁKAMI OSOCZA KRWI”.

B) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

(7 oryginalnych prac eksperymentalnych)

1. **Wojtczak M*.,** Dietrich G.J., Irnazarow I., Jurecka P., Słowińska M., Ciereszko A. 2007. Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 148: 426-431 (IF=1,65, MNiSW₂₀₀₇ 27, liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS)=20).
2. **Dietrich M.A*.,** Żmijewski D., Karol H., Hejmej A., Bilińska B., Jurecka P., Irnazarow I., Słowińska M., Hliwa P., Ciereszko A. 2010. Isolation and characterization of transferrin from common carp (*Cyprinus carpio* L) seminal plasma. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 66-74 (IF=3,044; MNiSW₂₀₁₀ 32, liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS)=12).
3. **Dietrich M.A*.,** Dietrich G.J. Hliwa P., Ciereszko A. 2011. Carp transferrin can protect spermatozoa against toxic effects of cadmium ions. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 422-429 (IF=2,616, MNiSW₂₀₁₁ 30, liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS)=11).
4. **Dietrich M.A*.,** Nynca J., Bilińska B., Kuba J., Kotula-Balak M., Karol H., Ciereszko A. 2010. Identification of parvalbumin-like protein as a major protein of common carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa which appears during final stage of spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 157: 224-231 (IF=1,989, MNiSW₂₀₁₀ 27, liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS)=5).
5. **Dietrich M*.,** Westfalewicz B., Jurecka P., Irnazarow I., Ciereszko A. 2014. Isolation, characterization and cDNA sequencing of new form of parvalbumin from carp semen. *Reproduction Fertility and Development* 26,: 1117-1128 (IF=2.577, MNiSW₂₀₁₄ 25, liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS)=1)

6. **Dietrich M.A***, Adamek M., Bilińska B., Hejmej A., Steinhagen D., Ciereszko A. 2014. Characterization, expression and antibacterial properties of apolipoproteins A from carp (*Cyprinus carpio* L.) seminal plasma. *Fish & Shellfish Immunology* 41: 389-401 (IF=3,034, MNiSW₂₀₁₄ 40, liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS)=1).
7. **Dietrich M.A***, Arnold G.J., Nynca J., Fröhlich T., Otte K., Ciereszko A. 2014. Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma. *Journal of Proteomics* 98; 218-232. (IF = 3,929, MNiSW₂₀₁₄ 35, liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS)=5).

IF podano zgodnie z rokiem opublikowania, punkty MNiSW podano zgodnie z listą, która obowiązywała w czasie opublikowania czasopisma. Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład zamieszczono w Zał. 5.

Łącznie dla w/w cyklu publikacji:

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF -*Impact factor*) = **18,839**

Liczba cytowań = **55**

Sumaryczna ilość punktów MNiSW = **216**

Sumaryczna ilość punktów MNiSW według obecnie obowiązującej listy z roku 2014 = **230**

Prace finansowane były w ramach następujących projektów przyznanych przez MNiSW, w których dr Mariola Dietrich była kierownikiem:

- (1) Identyfikacja i charakterystyka specyficznych białek plazmy nasienia karpia (*Cyprinus carpio*) – zastosowanie metod klasycznych i proteomicznych 2011/01/D/NZ9/00628; 2011-2016 (projekt oceniony został w konkursie Sonata na pierwszym miejscu w rankingu wśród projektów zaakceptowanych do finansowania),
- (2) Identyfikacja i charakterystyka apolipoprotein A plazmy nasienia karpia i pstrąga tęczowego IP2011 009971; 2012-2014 (Projekt Iuventus Plus),
- (3) Charakterystyka i rola transferyny w układzie rozrodczym karpia (*Cyprinus carpio*), N N311098934, 2008-2011.

* autor korespondencyjny

C) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Przedstawiane osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl publikacji poświęconych identyfikacji, charakterystyce i roli białek plazmy nasienia karpia (*Cyprinus carpio* L) oraz określeniu ich związku z białkami krwi. Główną funkcją plazmy nasienia ryb jest zapewnienie optymalnego środowiska dla przechowywania plemników, często przez dłuższy okres czasu. W tym okresie muszą być chronione wszelkie kluczowe fizjologiczne właściwości plemników: zdolność zapładniająca, zdolność do ruchu, przeżywalność (metabolizm i integralność błon komórkowych) oraz zachowanie materiału genetycznego (Ciereszko, 2008). Bardzo ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu plamy nasienia ryb pełnią białka, dlatego też poznanie składu białkowego plazmy nasienia karpia, który jest jednym z ważniejszych gatunków w polskiej i światowej akwakulturze oraz uważany jest za gatunek modelowy w badaniach naukowych, jest istotne w celu poznania biochemicznych i fizjologicznych podstaw funkcjonowania nasienia tego gatunku.

Plazma nasienia ryb, w przeciwieństwie do ssaków, charakteryzuje się niskim stężeniem białka. Zawiera głównie składniki mineralne (sód, potas, wapń, magnez) oraz niskie stężenia składników organicznych, takich jak hormony i feromony, cholesterol, witaminy, wolne aminokwasy, cukry czy lipidy (Ciereszko, 2008). Niewiele jest danych dotyczących charakterystyki białek nasienia karpia. Nasze wcześniejsze badania z użyciem elektroforezy jednokierunkowej (1-DE) oraz barwienia na aktywność antytrypsynową doprowadziły do wykrycia w plazmie nasienia karpia systemu inhibitorów proteinaz serynowych; jeden ze składowych tego systemu został zidentyfikowany jako $\alpha 1$ -antyproteinaza należąca do rodziny serpin (Wojtczak i in., 2007). W plazmie nasienia karpia wykazano także obecność proteinaz, w tym metaloproteinaz i proteinaz serynowych (Wojtczak i in., 2003, Kowalski i in., 2003), białek wiążących wapń (Wojtczak i in., 2010) oraz esteraz (karboksylesterazy; Wojtczak i Ciereszko, 2005). Warto dodać, iż detekcja w/w białek przeprowadzona była przy użyciu barwienia, które nie pozwala jednak na ich specyficzną identyfikację. Ponadto zidentyfikowano transferynę (Tf) jako jedno z dominujących białek plazmy nasienia karpia (Wojtczak i in., 2005). Inhibitory proteinaz serynowych są prawdopodobnie zaangażowane w regulację spermatogenezy oraz ochronę plemników i tkanek układu rozrodczego przed niekontrolowaną proteolizą (Wojtczak i in., 2007); esterazy, których funkcja związana jest z detoksykacją ksenobiotyków mogą chronić plemniki przed szkodliwym działaniem związków toksycznych; białka wiążące wapń mogą uczestniczyć w mechanizmie aktywacji ruchu plemników karpia. Transferyna zaś jest białkiem wielofunkcyjnym, które oprócz transportu jonów żelaza posiada właściwości antyoksydacyjne i antybakteryjne. Pogłębiona analiza struktury, właściwości oraz funkcji pojedynczych białek plazmy nasienia karpia jest istotna w celu określenia ich specyficznej roli w układzie rozrodczym samców ryb.

W przeciwieństwie do plazmy nasienia ssaków, której składniki białkowe pochodzą głównie z najądrzy i dodatkowych gruczołów płciowych, źródłem składników plazmy nasienia ryb są krew oraz komórki wydzielnicze jądra i nasieniowodu, u ryb brak jest dodatkowych gruczołów płciowych i najądrzy (Loir i in., 1990, Lahnsteiner i in., 1993). Ponadto, składniki białkowe plazmy nasienia mogą pochodzić z uszkodzonych plemników oraz innych komórek somatycznych, jak leukocyty (Ciereszko i in., 2004). Określenie związku pomiędzy osoczem krwi i plazmą nasienia jest istotnym zagadnieniem dotyczącym fizjologii układu rozrodczego samców ryb, ponieważ pozwala na zrozumienie pochodzenia białek obecnych w plazmie nasienia. Zastosowanie elektroforezy 1D oraz barwienia na aktywność antytrypsynową oraz

proteolityczną, wykazało obecność czterech proteinaz oraz dwóch wysokocząsteczkowych inhibitorów proteinaz serynowych wspólnych dla plazmy nasienia i osocza krwi karpia (Wojtczak i in., 2003, Kowalski i in., 2003). Ponadto zidentyfikowano niskocząsteczkowy inhibitor oraz dwie metaloproteinazy jako białka specyficzne dla nasienia oraz proteinazę serynową (21 kDa) i metaloproteinazę (113 kDa) charakterystyczną dla krwi, co wskazuje na selektywność barier krew-jądro oraz specyfikę układu rozrodczego. Wykazanie ekspresji oraz immunolokalizacja głównych białek plazmy nasienia karpia pozwoli na określenie pochodzenia białek obecnych w plazmie nasienia. Ponadto kompleksowe porównanie proteomu plazmy nasienia i osocza krwi przy użyciu metod proteomicznych (2D-DIGE) jest ważne dla wyselekcjonowania białek specyficznych dla nasienia, pełniących istotną rolę w układzie rozrodczym karpia.

Proteom plazmy nasienia i plemników jest poznany głównie u ssaków. W przypadku ryb głównym ograniczeniem zastosowania metod proteomicznych jest brak w pełni zsekwencjonowanych genomów gatunków ryb co limituje identyfikację białek. Do tej pory, metody proteomiczne zostały wykorzystane głównie w badaniach z wykorzystaniem gatunków modelowych przede wszystkim danio pręgowanego. Nieliczne prace z wykorzystaniem technik proteomicznych dotyczą poznania wpływu kriokonserwacji na profil białkowy plemników karpia (Li i in., 2010a) oraz basa morskiego (Zili i in., 2005), jak również porównania proteomu nasienia ryb jesiutowatych (Li i in., 2010b). Jednakże prace te skutkowały identyfikacją tylko pojedynczych białek i nie dają kompleksowej wiedzy na temat składu białkowego nasienia ryb. Wprowadzenie metod proteomicznych do badań nasienia karpia pozwoli na kompleksową analizę kompletnego zestawu białek (proteomu) nasienia i krwi tego gatunku ryb.

Celem ogólnym prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego prezentowanego we wniosku jest

- Poznanie składu białkowego plazmy nasienia karpia oraz ich związku z profilem białkowym krwi.
- Zrozumienie roli białek plazmy nasienia karpia w męskim układzie rozrodczym ryb.

Cele szczegółowe obejmowały:

- Izolację, identyfikację i charakterystykę właściwości fizykochemicznych oraz funkcji głównych białek plazmy nasienia karpia: **transferyny**, **parwalbumin** oraz **apolipoprotein A**;
- Porównanie transferyny, apolipoprotein i parwalbumin plazmy nasienia i osocza krwi oraz porównanie proteomu obu płynów ustrojowych przy użyciu 1DE oraz 2DE;
- Identyfikację proteomu plazmy nasienia i osocza krwi karpia.

Osiągnięcie naukowe prezentowane we wniosku do postępowania habilitacyjnego przedstawione zostało w następujących podrozdziałach:

- i) Izolacja, identyfikacja i charakterystyka właściwości fizykochemicznych transferyny plazmy nasienia karpia oraz jej rola w ochronie plemników przed toksycznym działaniem jonów kadmu
- ii) Izolacja, identyfikacja i charakterystyka właściwości fizykochemicznych parwalbumin (PV-I oraz PV-II) nasienia karpia
- iii) Izolacja, charakterystyka, ekspresja oraz właściwości antybakteryjne apolipoprotein A plazmy nasienia karpia

- iv) Charakterystyka proteomu plazmy nasienia i osocza krwi karpia
- v) Porównawcze badania proteomu plazmy nasienia i osocza krwi w celu oszacowania pochodzenia białek nasienia oraz funkcjonowania bariery krew-jądro

i) Izolacja, identyfikacja i charakterystyka właściwości fizykochemicznych transferyny plazmy nasienia karpia oraz jej rola w ochronie plemników przed toksycznym działaniem jonów kadmu

Badania przeprowadzone na rybach dotyczą głównie Tf obecnej w krwi ryb (DeSmet i in., 2001). Moje wcześniejsze badania wykazały po raz pierwszy obecność dużych ilości Tf w plazmie nasienia ryb, gdzie stanowi ona jedno z głównych białek (Wojtczak i in., 2005). Jej obecność w nasieniu karpia jest intrygująca z powodu wielofunkcyjności omawianego białka. Na podstawie danych dla ssaków, oraz Tf krwi ryb, przypuszczalną funkcją Tf w nasieniu karpia może być ochrona plemników przed drobnoustrojami poprzez wiązanie jonów żelazowych niezbędnych do życia bakterii (Stafford i in., 2001, Stafford i Belosevic, 2003). Ponadto, Tf może chronić plemniki przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu (funkcja antyoksydacyjna; Saleh i Agarwal, 2002) oraz metali ciężkich (De Smet i in., 2001). Stwierdzono także udział Tf w procesie steroidogenezy oraz w regulacji spermatogenezy poprzez uczestnictwo w transporcie Fe^{2+} do rozwijających się komórek rozrodczych (Sylvester i Griswold, 1994). Brak informacji na temat Tf nasienia ryb, skłonił mnie do przeprowadzenia badań nad pogłębioną charakterystyką Tf, które przyczyniają się do lepszego zrozumienia jej funkcji w męskim układzie rozrodczym karpia, szczególnie w mechanizmach ochrony plemników przed toksycznym działaniem metali ciężkich oraz zdolności wiązania jonów żelaza.

Celem badań było 1) Porównanie polimorfizmu Tf w plazmie nasienia i osoczu krwi karpia oraz określenie jego związku z jakością nasienia, **2)** Izolacja i oczyszczanie Tf z plazmy nasienia karpia, **3)** Określenie właściwości fizykochemicznych i biochemicznych Tf, **4)** Otrzymanie poliklonalnych przeciwciał anti-Tf plazmy nasienia karpia, **5)** Immunolokalizacja Tf w jądrze i wątrobie karpia oraz plazmie nasienia różnych gatunków ryb, **6)** Sprawdzenie czy Tf plazmy nasienia karpia posiada zdolność wiązania jonów kadmu oraz neutralizacji jego toksycznego działania na ruchliwość plemników karpia (**publikacje nr 1, 2, 3**).

Porównanie polimorfizmu Tf w plazmie nasienia i osoczu krwi karpia oraz określenie jego związku z jakością nasienia

Dane literaturowe wskazują, że Tf krwi karpia charakteryzuje się wysokim stopniem polimorfizmu; stwierdzono obecność ponad 20 genotypów Tf, reprezentowanych przez siedem alleli (Csizmadia i in., 1995, Valenta i in., 1976). W pierwszym etapie badań postanowiono sprawdzić, czy Tf obecna w nasieniu również charakteryzuje się polimorfizmem oraz czy polimorfizm Tf jest podobny do obserwowanego we krwi. Wyniki badań potwierdziły obecność licznych form Tf w plazmie nasienia karpia, z których dominującym był fenotyp DG i DD oraz wykazały podobieństwo polimorfizmu Tf w plazmie nasienia i krwi. W kolejnym etapie określono związek polimorfizmu Tf z jakością nasienia. Z danych literaturowych dotyczących nasienia ssaków wiadomo, że poziom Tf w plazmie nasienia uważany jest za główny marker spermatogenezy (Barthelemy i in., 1988, Zalata i in., 1999). Wykazano również pozytywną korelację między ilością Tf plazmy nasienia a koncentracją i parametrami ruchu plemników (niska zawartość Tf w plazmie nasienia skorelowana była z występowaniem azoospermii oraz oligozoospermii (Griswold, 1995). Te przesłanki skłoniły mnie do przeprowadzenia eksperymentu w celu sprawdzenia czy ilość oraz polimorfizm Tf (DD, DG) plazmy nasienia

karpia koreluje z parametrami metabolizmu żelaza oraz z parametrami jakości nasienia. Wykazano, różnice pomiędzy fenotypem Tf DD oraz DG plazmy nasienia w % nasycenia Tf oraz stwierdzono istotne różnice w metabolizmie żelaza pomiędzy krwią a plazmą nasienia, co wskazuje na odmienny mechanizm regulacji Tf w wątrobie i jądrze. Ponadto wykazano, że polimorfizm Tf związany jest z parametrami ruchu plemników. Plemniki samców o genotypie Tf DD charakteryzowały się wyższą prędkością całkowitą (VCL), oraz amplitudą bocznych wychyleń główki (ALH,) zaś niższymi parametrami kierunkowości (STR) i liniowości (LIN) w porównaniu do DG. Rezultaty tych badań wyraźnie wskazują, że Tf w plazmie nasienia karpia może uczestniczyć w utrzymaniu plemników w zdolności do ruchu oraz uczestniczyć w mechanizmach regulacji ruchliwości plemników.

Wyniki te zostały opublikowane w oryginalnej publikacji eksperymentalnej nr 1.

Wojtczak M., Dietrich G.J., Irnazarow I., Jurecka P., Słowińska M., Ciereszko A. 2007. Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 148: 426-431.

Izolacja i charakterystyka właściwości fizykochemicznych Tf oraz lokalizacja Tf w jądrze karpia

W celu przeprowadzenia szczegółowej charakterystyki Tf plazmy nasienia konieczne było opracowanie wydajnej metodyki izolacji. Jak wykazałam we wcześniejszych badaniach (Wojtczak i in., 2007) Tf plazmy nasienia karpia charakteryzuje się wysokim stopniem polimorfizmu, dlatego w pracach izolacyjnych zastosowałam preselekcję fenotypów homozygotycznych transferyny DD (pojedyncze pasmo na żelu). Opracowałam wydajną trzy-etapową procedurę oczyszczania Tf składającą się z chromatografii powinowactwa, oddziaływań hydrofobowych oraz filtracji żelowej. Uzyskanie dużych ilości oczyszczonego preparatu Tf było niezbędne do przeprowadzenia doświadczeń nad określeniem właściwości fizykochemicznych Tf oraz uzyskania przeciwciał poliklonalnych anti-Tf. Masa cząsteczkowa Tf wyznaczona przy użyciu spektrometrii mas MALDI-TOF wynosiła 73,6 kDa, zaś punkt izoelektryczny 5,1.

Jedną z cech wyróżniających Tf jest ich przynależność do glikoprotein, dlatego też jako pierwszy etap izolacji zastosowano chromatografię powinowactwa z wykorzystaniem konkanawaliny A, która selektywnie wiąże glikoproteiny. Okazało się jednak, że wbrew oczekiwaniom Tf plazmy nasienia karpia nie ma zdolności łączenia się z wymienionym ligandem. Dalsze badania wykazały, że w przeciwieństwie do ludzkiej Tf, Tf plazmy nasienia karpia nie wybarwiała się przy użyciu Pro-Q Emerald 300, który specyficznie wybarwia glikoproteiny. Wyniki te potwierdziły, że Tf plazmy nasienia karpia nie jest glikoproteiną. Analiza sekwencji aminokwasowej Tf (wariant A, AF457152) z krwi karpia także potwierdziła tą sugestię, ponieważ nie wykryto żadnych potencjalnych miejsc N- ani O-glikozylacji. Być może brak glikozylacji jest cechą charakterystyczną transferyn ryb karpiowatych. Sprawdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań.

Drugą unikalną cechą transferyny karpia było wiązanie tylko jednego atomu żelaza przez cząsteczkę Tf. Transferyny posiadają dwa miejsca wiążące żelazo, każdy łańcuch: N oraz C jest w stanie przyłączyć jeden jon żelazowy. Z moich badań wynika, że w przeciwieństwie do transfery ludzkiej, Tf plazmy nasienia karpia ma zdolność wiązania tylko jednego atomu żelaza, co sugeruje obecność w cząsteczce Tf tylko jednego aktywnego miejsca wiążącego żelazo. Uzyskane wyniki potwierdziła analiza sekwencji aminokwasowej Tf krwi karpia, z której

wynika iż tylko łańcuch N posiada cztery konserwatywne aminokwasy odpowiedzialne za wiązanie żelaza.

Przy wykorzystaniu oczyszczonego preparatu Tf przeprowadziłam immunizację królików co pozwoliło na uzyskanie przeciwciał poliklonalnych anty-Tf z plazmy nasienia karpia. W badaniach western blot, z wykorzystaniem otrzymanych przeciwciał anty-Tf wykazałam wysokie podobieństwo immunologiczne Tf plazmy nasienia karpia do Tf krwi, co potwierdza podobieństwo lub identyczność Tf obecnej w plazmie nasienia i osoczu krwi. Ponadto, wykazałam wysokie podobieństwo immunologiczne Tf do plazmy nasienia ryb karpiowatych, zaś niskie do Tf plazmy nasienia pstrąga tęczowego oraz okonia. Słaba reakcja immunologiczna wynika najprawdopodobniej z różnic filogenetycznych w strukturze pierwszorzędowej Tf oraz różnic w kompozycji węglowodanowej, której jak wynika z moich badań, pozbawiona jest Tf plazmy nasienia karpia. Rezultaty tych badań wskazują na uniwersalność występowania Tf w plazmie nasienia ryb i ich zróżnicowanie uwarunkowane gatunkowo.

Kolejnym etapem badań było określenie lokalizacji Tf za pomocą metody immunohistochemicznej w tkance jądrowej. Silny sygnał Tf zlokalizowano głównie w śródbłonku naczyń krwionośnych. Uzyskane wyniki sugerują, że Tf obecna w plazmie nasienia karpia najprawdopodobniej syntetyzowana jest w wątrobie i transportowana do jądra. Za tym faktem przemawiają podobne właściwości fizykochemiczne Tf obecnej w plazmie nasienia i osoczu krwi karpia oraz immunologiczne podobieństwo obu białek.

Wyniki te zostały opublikowane w oryginalnej publikacji eksperymentalnej **nr 2**

Dietrich M.A., Żmijewski D., Karol H., Hejmej A., Bilińska B., Jurecka P., Irnazarow I., Słowińska M., Hliwa P., Ciereszko A. 2010. Isolation and characterization of transferrin from common carp (*Cyprinus carpio* L) seminal plasma. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 66-74.

Sprawdzenie czy Tf plazmy nasienia karpia posiada zdolność wiązania jonów kadmu oraz neutralizacji jego toksycznego działania na ruchliwość plemników karpia

Dane literaturowe wskazują, że Tf krwi karpia posiada zdolność wiązania jonów kadmu, pierwiastka szczególnie toksycznego dla męskiego układu rozrodczego. Kadm narusza wiele mechanizmów związanych z rozrodem ryb. Powoduje zaburzenia w syntezie androgenów, a także może powodować nekrozę jąder (degradacja, Migliarini i in., 2005, Sangaland i O'Halloran, 1973). Celem badań było sprawdzenie czy Tf plazmy nasienia karpia posiada zdolność wiązania jonów kadmu oraz w konsekwencji neutralizacji toksycznego działania kadmu na ruchliwość plemników karpia. W celu uzyskania dużych ilości oczyszczonej Tf z plazmy nasienia karpia, niezbędnej do przeprowadzenia doświadczeń, opracowałam alternatywę jednoetapową procedurę oczyszczania tego białka z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa na złożu z immobilizowanymi monospecyficznymi przeciwciałami anty-Tf. Poprzez miareczkowanie apoTf jonami kadmu wykazałam, że jedna cząsteczka Tf plazmy nasienia karpia posiada zdolność wiązania jednego atomu kadmu. Wyniki te są zgodne z moimi wcześniejszymi wynikami wykazującymi, że Tf karpia posiada jedno aktywne miejsce wiążące jony metali. Na podstawie doświadczeń wstępnych do doświadczenia właściwego wybrano dawkę 50 ppm kadmu oraz 24 i 48 godz czas inkubacji. Mlecz karpia rozcieńczono 50-krotnie buforem immobilizującym, buforem zawierającym 50 ppm kadmu, oraz buforem immobilizującym zawierającym oczyszczoną Tf i 50 ppm kadmu.

Ilość transferyny została dobrana tak, aby zachowany był stosunek molowy 1:1 kadmu do Tf. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że nasienie karpia z dodatkiem egzogennej Tf, poddane 48 godz ekspozycji na 50 ppm kadmu charakteryzowało się około 4-krotnie wyższym odsetkiem ruchliwych plemników w porównaniu do nasienia inkubowanego z 50 ppm kadmu. Podobnie, w próbach inkubowanych z kadmem z dodatkiem Tf przez 48 godz obserwowano wyższe wartości innych parametrów ruchu plemników (VCL, VSL, ALH). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że rola transferyny obecnej w plazmie nasienia może być związana z ochroną plemników przed toksycznym działaniem jonów kadmu. Wyniki te zostały opublikowane w oryginalnej publikacji eksperymentalnej **nr 3**.

Dietrich M.A., Dietrich G.J. Hliwa P., Ciereszko A. 2011. Carp transferrin can protect spermatozoa against toxic effects of cadmium ions. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 422-429.

Podsumowując, Tf karpia charakteryzuje się unikalną strukturą, tj nie jest glikoproteiną oraz posiada tylko jedno miejsce wiążące żelazo. Transferyna obecna w plazmie nasienia karpia najprawdopodobniej pochodzi z krwi, co potwierdza lokalizacja w naczyniach krwionośnych jądra, podobieństwo właściwości fizykochemicznych i determinant antygenowych Tf krwi i plazmy nasienia. Transferyna może przeciwdziałać toksycznemu działaniu kadmu, co sugeruje jej udział w ochronie plemników i tkanek układu rozrodczego przed toksycznym działaniem metali ciężkich. Transferyna może mieć związek z mechanizmem ruchliwości plemników.

ii) Izolacja, identyfikacja i charakterystyka właściwości fizykochemicznych parwalbumin (PV-I oraz PV-II) plazmy nasienia karpia

Parwalbumina (PV) należy do grupy białek wiążących wapń, u ryb jest znana jako główny alergen występujący w mięśniach (Swoboda i in., 2002). Parwalbumina, jako bufor jonów wapniowych, pełni istotną rolę w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych i układu nerwowego; w literaturze brak było danych dotyczących roli Pv w układzie rozrodczym ryb. **Celem badań było: 1)** Izolacja i charakterystyka właściwości fizykochemicznych form parwalbumin (PV-I oraz PV-II) plazmy nasienia karpia, **2)** Uzyskanie poliklonalnych przeciwciał skierowanych wobec PV plazmy nasienia karpia, **3)** Określenie lokalizacji PV w męskim układzie rozrodczym karpia, **4)** Analiza porównawcza PV nasienia oraz krwi oraz międzygatunkowa analiza PV nasienia ryb karpiowatych, **5)** Uzyskanie pełnej sekwencji cDNA parwalbuminy z jąder karpia (**publikacje nr 4 i 5**).

Wyniki badań własnych wykazały po raz pierwszy obecność PV w nasieniu karpia. Obecność PV w nasieniu, przy jednoczesnym braku PV we krwi, sugeruje, że PV jest specyficzna dla męskiego układu rozrodczego karpia. Ponadto, zgodnie z naszą wiedzą jest to pierwsze doniesienie na temat obecności PV w płynie ustrojowym; do tej pory PV była charakteryzowana jako białko wewnątrzkomórkowe, występujące głównie w mięśniach ryb (Bugajska-Schretter i in., 1998, 2000) Opracowano szybkie i efektywne metodyki izolacji obydwu form parwalbuminy (PV-I i PV-II), które obejmowały chromatografię jonowymienną, filtrację żelową oraz elektroforezę preparatywną. Opracowane po raz pierwszy dla ryb metodyki oczyszczania doprowadziły do uzyskania homogennych preparatów obu form PV (PV-I oraz PV-II). W porównaniu do wcześniej opisanych metod (Bugajska-Schretter i in., 2000, Liu i in, 2010) charakteryzują się one niższą pracochłonnością.

Identyfikacja wyizolowanych białek poprzez wyznaczenie sekwencji N-końcowej była niemożliwa z powodu blokady N-końca. Dlatego podjęto próbę uzyskania sekwencji

wewnętrznej po cięciu bromocyjanem. Zidentyfikowano 28 reszt aminokwasowych dla PV-I oraz 24 reszty aminokwasowe dla PV-II, co pozwoliło na zidentyfikowanie wyizolowanych białek jako parwalbumin. Uzyskane sekwencje PV-I oraz PV-II różniły się trzema aminokwasami. Masę cząsteczkową wyznaczono na $12099,48 \pm 1,73$ Da dla PV-I oraz $12196,13 \pm 0,68$ dla PV-II. Punkt izoelektryczny wyznaczono na 4,06-4,09 dla PV-I oraz 4,8-4,9 dla PV-II. Uzyskane wyniki wskazują, że obydwie izoformy parwalbuminy nasienia karpia różnią się od siebie zarówno sekwencją aminokwasową, masą cząsteczkową oraz pI. Wyższe wartości masy cząsteczkowej oraz pI parwalbumin nasienia karpia w porównaniu do wartości ustalonych dla PV mięśni ryb oraz inna sekwencja aminokwasowa wyraźnie odzwierciedla specyfikę właściwości oraz odrębność PV nasienia karpia.

Wykazałam także, że obydwie formy PV w warunkach krótkookresowego przechowywania tworzyły dimery i trimery a mechanizm oligomeryzacji oparty jest na tworzeniu mostków disiarczkowych pomiędzy Cys₆₇ monomerów PV. Wykazano także, że plazma nasienia karpia może przeciwdziałać tworzeniu oligomerów. Efekt ten jest przypuszczalnie wynikiem działania antyoksydantów obecnych w plazmie nasienia (Lahnsteiner i in., 2010), które mogą chronić PV obecne w plazmie nasienia przed oligomeryzacją i/lub agregacją z innymi białkami.

Ponieważ uzyskana wewnętrzna sekwencja aminokwasowa PV nasienia karpia była odmienna od istniejących w bazie danych 8 sekwencji PV mięśni karpia oraz 12 sekwencji *Danio rerio* (Friedberg i in., 2005, Brownridge i in., 2009) uzyskano pełną sekwencję cDNA parwalbuminy, którą zdeponowano w EMBL Nucleotide Sequence database, GenBank accession no KC879154. Otrzymana sekwencja była odmienna od istniejących 8 sekwencji PV mięśni karpia, co potwierdziło specyfikę PV jądrowej. Analiza otrzymanej sekwencji cDNA oraz wyniki eksperymentalne wskazują na dwie modyfikacje potranslacyjne w cząsteczce PV: N-acetylacja alaniny oraz S-cysteinyłacja cysteiny w pozycji 67. Zgodnie z naszą wiedzą, omawiane modyfikacje zostały opisane po raz pierwszy dla parwalbumin.

Wykorzystując uzyskane przeciwciała anti-PV wykazałam obecność PV w spermatydach i plemnikach, jednocześnie nie wykazano reakcji w spermatogoniach, spermatocytach ani w innych typach komórek jądra karpia. Uzyskane wyniki wykazały po raz pierwszy obecność białka podobnego do parwalbuminy w jądrze ryb, do tej pory informacje na ten temat uzyskano dla ssaków, gdzie w przeciwieństwie do karpia nie stwierdzono obecności PV w plemnikach, zaś wykryto ją w komórkach Leydiga (Berchtold i in., 1984). Uzyskane przez nas wyniki wyraźnie wskazują na znaczące różnice w jądrowej lokalizacji PV pomiędzy niższymi a wyższymi kręgowcami. Obecność PV w plemnikach karpia koreluje z kluczową rolą jonów wapniowych w regulacji ruchliwości plemników u tego gatunku.

Podsumowując, istotnym odkryciem jest wykazanie po raz pierwszy istnienia dużych ilości parwalbumin w nasieniu karpia, co sugeruje jej udział w mechanizmie aktywacji ruchu plemników, w których pośredniczą jony wapniowe oraz w ochronie plemników przed apoptozą. Nasienie karpia charakteryzuje się występowaniem dwóch unikalnych form parwalbumin (PV-I oraz PV-II) różniących się istotnie między sobą właściwościami fizykochemicznymi oraz sekwencją aminokwasową. W warunkach *in vitro* obydwie formy parwalbuminy wykazują tendencję do oligomeryzacji lub wiązania się do innych białek poprzez tworzenie mostków disiarczkowych. W warunkach *in vivo* parwalbuminy wydają się występować w formie monomerycznej, co może wynikać z ochronnego wpływu plazmy nasienia przed oligomeryzacją i/lub agregacją z innymi białkami. Obecność PV w ostatnich etapach spermatogenezy sugeruje jej istotny udział w formowaniu dojrzałych gamet męskich i koreluje z postulowaną rolą jonów wapniowych w aktywacji ruchu plemników karpia. Prezentowane wyniki zostały opublikowane w dwóch oryginalnych publikacjach eksperymentalnych **nr 4, 5**.

Dietrich M.A., Nynca J., Bilińska B., Kuba J., Kotula-Balak M., Karol H., Ciereszko A. 2010. Identification of parvalbumin-like protein as a major protein of common carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa which appears during final stage of spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 157: 224-231.

Dietrich M., Westfalewicz B., Jurecka P., Irnazarow I., Ciereszko A. 2014. Isolation, characterization and cDNA sequencing of new form of parvalbumin from carp semen. *Reproduction, Fertility and Development* 26: 1117-1128.

iii) Izolacja, charakterystyka, ekspresja oraz właściwości antybakteryjne apolipoprotein A plazmy nasienia karpia

Apolipoproteiny A są białkami wielofunkcyjnymi, które oprócz udziału w metabolizmie i transporcie lipidów, uczestniczą w odpowiedzi nieswoistej u ryb. Ponieważ w dostępnej literaturze brak było informacji na temat obecności oraz roli apolipoprotein A w układzie rozrodczym ryb, celem moich badań było uzyskanie nowych informacji na temat apolipoprotein A obecnych w plazmie nasienia karpia, w szczególności ich struktury, właściwości i funkcji oraz ekspresji i lokalizacji w układzie rozrodczym (**publikacja nr 6**). **Cele szczegółowe obejmowały:** **1)** Opracowanie skutecznej metody izolacji apolipoprotein (ApoA-I oraz Apo-14kDa) z plazmy nasienia karpia, **2)** Identyfikację i charakterystykę właściwości fizykochemicznych apolipoprotein plazmy nasienia karpia, **3)** Porównanie profili apolipoprotein plazmy nasienia i osocza krwi karpia, **4)** Uzyskanie przeciwciał anti-apoA-I oraz anti-Apo-14kDa, **5)** Uzyskanie pełnej sekwencji cDNA ApoA-I, **6)** Immunolokalizacja oraz ekspresja mRNA ApoA-I oraz Apo-14kDa w jądrze, nasieniowodzie i wątrobie karpia, **7)** Sprawdzenie właściwości antybakteryjnych i antywirusowych ApoA z plazmy nasienia karpia.

Opracowałam szybką i efektywną metodę izolacji obydwu apolipoprotein (ApoA-I oraz ApoA-14kDa) z plazmy nasienia karpia. Po elektroforezie SDS-PAGE obserwowałam obecność dwóch pasm białkowych Apo AI (ApoA-Ia oraz ApoA-Ib), co wskazywało na heterogenność izolowanego białka oraz jednego prążka Apo-14kDa. W celu identyfikacji wyizolowanych białek z plazmy nasienia karpia uzyskano 20 aminokwasową sekwencję dla ApoA-Ia z plazmy nasienia karpia wykazującą 80% podobieństwo do ApoA-I *Gobiocypris rarus* oraz taką samą 26 aminokwasową sekwencję dla ApoA-Ib. Forma ApoA-Ib o niższej masie cząsteczkowej (26 kDa) powstała najprawdopodobniej w wyniku odcięcia fragmentu C-końcowego ApoA-Ia (28 kDa), za czym przemawia identyczna sekwencja N-końcowa obydwu form apolipoprotein A-I plazmy nasienia karpia. Ponieważ Apo-14kDa wykazywała blokadę N-końca, białko poddano trawieniu trypsyną i analizie z użyciem spektrometrii mas. Analiza MALDI-TOF/TOF wykazała 51 % pokrycie z apolipoproteina o masie 14 kDa karpia. Masę cząsteczkową ApoA-I karpia składającej się z dwóch form wyznaczono przy użyciu metod proteomicznych na 23388 Da oraz 27878 Da zaś Apo-14kDa na 13622,8 Da.

W wyniku immunizacji królików oczyszczonymi preparatami ApoA-I i Apo-14kDa uzyskałam przeciwciała poliklonalne skierowane przeciw w/w białkom. Przeciwciała te oczyszczano z wykorzystaniem kolumn z immobilizowanymi ApoA-I lub Apo-14kDa, co pozwoliło na uzyskanie monospecyficznych przeciwciał, które wykorzystano do detekcji proteoform ApoA-I w plazmie nasienia i osoczu krwi oraz w badaniach immunohistochemicznych. Zastosowanie 2DE oraz western blot z wykorzystaniem uzyskanych przeciwciał anti-ApoA-I wykazało, że ApoA-I występuje w postaci licznych proteoform, z czego 6 było specyficznych dla plazmy nasienia, ponieważ nie występowały w krwi. Izoformy ApoA-I różniły się zarówno masą

cząsteczkową jak i pI (zakres pI 5,1- 6,2). Obecność proteoform ApoA-I plazmy nasienia karpia o niższej masie cząsteczkowej jest zgodne z opisaną podatnością na degradację w wyniku ograniczonej proteolizy od N- i C-końca białka (Concha i in., 2003). Przeciwciała anty-ApoA-14kDa wykazały obecność dwóch wspólnych form zarówno w plazmie nasienia i osoczu krwi (pI 5,6; 5,1). Obecność proteoform ApoA-I specyficznych dla nasienia może być związana ze specyficzną funkcją jaką pełnią w układzie rozrodczym karpia.

Uzyskane przeciwciała wykorzystano także do badań porównawczych z plazmami nasienia różnych gatunków ryb. Przeciwciała skierowane przeciwko ApoA-I oraz ApoA-14kDa reagowały z apolipoproteinami w plazmie nasienia ryb karpiowatych, co wskazuje na uniwersalność występowania apolipoprotein w plazmie nasienia tych gatunków ryb. Brak reakcji z plazmami nasienia ryb łososiowatych może wynikać z różnic filogenetycznych oraz niskiej homologii w strukturze pierwszorzędowej apolipoprotein ryb.

Ponieważ uzyskana N-końcowa sekwencja aminokwasowa ApoA-I z plazmy nasienia karpia nie wykazywała podobieństwa do istniejącej w bazie danych sekwencji ApoA-I z wątroby karpia (AJ308993.1) uzyskano pełną sekwencję cDNA ApoA-I z jąder karpia, co po raz pierwszy pozwoliło na kompleksową analizę struktury II i III rzędowej. W strukturze wykazano obecność pro- i prepeptydu, kilku powtarzających się domen konserwatywnych dla ApoA, miejsc wiążących lipidy oraz wysoką zawartość alfa heliks. Uzyskaną sekwencję zdeponowano w Banku Genów KF268349, pokrywała się ona w 100% z istniejącą sekwencją ApoA-I karpia od 67 do 138 aa. Nasze wyniki pozwoliły na uzupełnienie istniejącej w bazie danych BLAST sekwencji o 66 aa fragment N-końcowy, który zawiera peptyd sygnałowy, propeptyd i N-końcową sekwencję dojrzałego białka oraz o 18 aa fragment C-końcowy, który odgrywa istotną rolę w antybakteryjnych właściwościach tego białka.

Kontynuując badania, po raz pierwszy wykazałam ekspresję apolipoprotein w układzie rozrodczym ryb. W jądrze i nasieniowodzie karpia ekspresja ApoA-I była wyższa w porównaniu do Apo-14kDa. Ponadto analizy immunohistochemiczne wykazały obecność ApoA-I oraz ApoA-14kDa w spermatogoniach, spermatocytach, spermatydach oraz w komórkach Leydiga. W nasieniowodzie obserwowano silny sygnał dla ApoA-I w nabłonku wielorzędkowym walcowatym oraz w komórkach podstawnych. Wykazanie ekspresji apolipoprotein w jądrze i nasieniowodzie oraz ich lokalizacja w komórkach rozrodczych sugeruje ich rolę w rozwoju i wzroście gonad poprzez transport lipidów do rozwijających się komórek rozrodczych, w utrzymaniu integralności błon komórkowych plemników przechowywanych w nasieniowodzie oraz mogą dostarczać energii niezbędnej w ich prawidłowym metabolizmie. Ponadto wykazanie ekspresji apolipoprotein w jądrze, nasieniowodzie a także w wątrobie oraz podobieństwo sekwencji i właściwości fizykochemicznych Apo z plazmy nasienia i krwi wskazuje, że apolipoproteiny obecne w plazmie nasienia karpia mogą być syntetyzowane przez komórki układu rozrodczego lub/oraz transportowane z krwi poprzez barierę krew-jądro.

Na podstawie doniesień literaturowych wskazujących, że apolipoproteiny krwi karpia i pstrąga tęczowego wykazują właściwości antybakteryjne (Concha i in. 2004, Villarroel i in., 2007), postanowiłam zbadać czy apolipoproteiny obecne w plazmie nasienia karpia także charakteryzują się właściwościami antybakteryjnymi. Badania wykazały, po raz pierwszy dla nasienia ryb, że apolipoproteiny ApoA-I plazmy nasienia karpia skutecznie zabijały *E. coli* natomiast hamowały wzrost *A. hydrophila*. Uzyskane wyniki sugerują, że apolipoproteiny A plazmy nasienia karpia mogą odgrywać ważną rolę w odpowiedzi nieswoistej uczestniczącej w ochronie tkanek i plemników przed atakiem drobnoustrojów.

Podsumowując, apolipoproteiny A należą do głównych białek plazmy nasienia karpia, występują w postaci licznych proteoform. Plazma nasienia karpia charakteryzuje się obecnością charakterystycznych proteoform ApoA-I, które nie występują w osoczu krwi. Apolipoproteiny A ulegają ekspresji oraz syntezie w jądrze i nasieniowodzie karpia. Uzyskane wyniki są pierwszymi w odniesieniu do układu rozrodczego ryb. Otrzymane informacje na temat apolipoprotein są ważne dla zrozumienia ich roli w transporcie lipidów, stabilizacji błon plemników oraz w ochronie plemników czy tkanek układu rozrodczego ryb przed atakiem wirusowym lub bakterii.

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w oryginalnej publikacji eksperymentalnej nr 6:

Dietrich M.A., Adamek M., Bilińska B., Hejmej A., Steinhagen D., Ciereszko A. 2014. Characterization, expression and antibacterial properties of apolipoproteins A from carp (*Cyprinus carpio* L.) seminal plasma. *Fish & Shellfish Immunology* 41:389-401.

iv) Charakterystyka proteomu plazmy nasienia i osocza krwi karpia

Dotychczasowe podejście metodyczne w badaniach proteomu plazmy nasienia ryb koncentrowało się na izolacji i charakterystyce pojedynczych białek, co było czasochłonne, gdyż często pociągało za sobą konieczność opracowania wieloetapowej procedury oczyszczania, odmiennej dla każdego białka (rozdziały i, ii, iii). Ponadto wybór białek do badań był często przypadkowy. Wprowadzenie do analiz nowego podejścia metodycznego jakim jest proteomika pozwoliło na dokonanie przełomu w badaniach opartych na równoczesnej obserwacji złożonych mieszanin białek w sposób kompleksowy. W proteomice stosowane są dwie główne metody badawcze polegające na 1) rozdzieleniu białek na żelu (elektroforeza dwukierunkowa – 2DE), trawieniu i identyfikacji poszczególnych białek oraz 2) metodzie typu „shotgun” z trawieniem mieszaniny białek za pomocą enzymów proteolitycznych i rozdzieleniu mieszaniny uzyskanych peptydów za pomocą chromatografii cieczowej w połączeniu z identyfikacją białek za pomocą spektrometrii mas.

Brak informacji na temat proteomu plazmy nasienia karpia skłoniło mnie do zastosowanie metod proteomicznych typu „shotgun” do analizy składu białkowego plazmy nasienia karpia. To podejście daje możliwość jednoczesnej identyfikacji od kilkudziesięciu do kilkuset białek. Dane literaturowe wskazują, że do tej pory w nasieniu karpia zidentyfikowano tylko pojedyncze białka przy użyciu technik proteomicznych (Li i in., 2010a,b, Gazo i in., 2015).

Stosując elektroforezę jednokierunkową wraz z spektrometrią mas połączoną z chromatografią cieczową (LC-MS/MS) zidentyfikowałam 137 białek w plazmie nasienia oraz 88 białek w osoczu krwi karpia. Większość z nich opisano po raz pierwszy dla tego gatunku. Jest to jak dotychczas największy zbiór białek plazmy nasienia opisany dla karpia. Wyróżniono główne białka plazmy nasienia tj. transferynę, apolipoproteiny A, białka układu dopełniacza, inhibitory proteinaz serynowych, białka szoku cieplnego oraz białko aklimatyzacji do ciepłych temperatur. Klasyfikacja zidentyfikowanych białek pod względem kryterium „procesy biologiczne” wykazała ich udział w metabolizmie (51%), w odpowiedzi na stres (17%) oraz procesach immunologicznych (12%). Podział pod względem „funkcji molekularnych” wskazał, że 44% białek posiada aktywność katalityczną (wyróżniono ligazy, hydrolazy, oksydoreduktazy, transferazy, izomerazy) zaś 36% posiada funkcje wiążące (jony wapnia, DNA, tłuszcze).

Uzyskane informacje są kluczowe dla uzyskania znaczącego postępu na temat biochemicznego uwarunkowania funkcjonowania układu rozrodczego u ryb. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że funkcja białek plazmy nasienia karpia związana jest głównie z metabolizmem, transportem i ochroną plemników przed stresem oksydacyjnym i atakiem drobnoustrojów. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w oryginalnej publikacji eksperymentalnej **nr 7**:

Dietrich M.A., Arnold G.J., Nynca J., Fröhlich T., Otte K., Ciereszko A. 2014. Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma. *Journal of Proteomics* 98: 218-232.

v) Porównawcze badania proteomu plazmy nasienia i osocza krwi w celu oszacowania pochodzenia białek nasienia oraz funkcjonowania bariery krew-jądro

Określenie związku pomiędzy osoczem krwi i plazmą nasienia ryb jest istotnym zagadnieniem dotyczącym fizjologii męskiego układu rozrodczego, szczególnie w odniesieniu do pochodzenia białek plazmy nasienia. Związane z tym tematy obejmują: poznanie selektywności bariery krew-jądro, określenie związku pomiędzy układem rozrodczym i innymi tkankami oraz specyfiki układu rozrodczego. Pochodzenie białek obecnych w plazmie nasienia ryb nie zostało wyjaśnione. Można przypuszczać, że białka wspólne dla plazmy nasienia i osocza krwi mogą być syntetyzowane na obszarze układu rozrodczego bądź transportowane z krwi poprzez barierę krew-jądro. Możliwe jest także, że białka obecne w plazmie nasienia mogą być częściowo transportowane z krwi oraz częściowo syntetyzowane w układzie rozrodczym podobnie jak transferyna ssaków (Skinner i Griswold, 1980). Występowanie białek specyficznych dla plazmy nasienia może wskazywać na ich syntezę na obszarze układu rozrodczego oraz wskazywać ich istotną rolę w układzie rozrodczym, zaś występowanie białek charakterystycznych dla krwi może wskazywać na selektywność bariery krew-jądro. Biorąc pod uwagę wyniki własnych analiz (Wojtczak i Ciereszko, 2005, Wojtczak i in., 2003, Wojtczak i in., 2007) wskazujących, że większość białek plazmy nasienia wykazuje podobieństwo do krwi oraz badań dotyczących PV i ApoA (Dietrich i in., 2010, 2014a, 2014b, rozdziały iii, iv), które wskazują na obecność białek lub form białek specyficznych dla nasienia, postanowiłam kompleksowo porównać proteom plazmy nasienia i osocza krwi przy użyciu fluorescencyjnej dwukierunkowej elektroforezy różnicowej (2D-DIGE), w celu oszacowania pochodzenia białek nasienia karpia oraz funkcjonowania bariery krew-jądro (**publikacja nr 7**).

Ilościowa porównawcza analiza osocza krwi i plazmy nasienia karpia przeprowadzona przy użyciu 2D-DIGE wykazała, że większość białek plazmy nasienia wykazuje podobieństwo do krwi. Spośród 1240 spotów białkowych, 1014 spotów było wspólnych dla plazmy nasienia i osocza krwi, 99 spotów białkowych specyficznych dla plazmy nasienia i 127 specyficznych dla osocza krwi. Spośród 99 spotów białkowych charakterystycznych dla plazmy nasienia zidentyfikowano 63 spoty jako parwalbuminę, ApoA-I, ApoE, NKEF, kofilinę, białka szoku termicznego HSP90, białka antyoksydacyjne, katępsynę oraz białka strukturalne plemnika. Większość z tych białek występowała w postaci licznych proteoform. Jak wspomniano powyżej (rozdział iii), ApoA-I została sklasyfikowana na podstawie 1DE jako białko wspólne dla obu płynów ustrojowych. Dopiero, zastosowanie 2D-DIGE oraz 2DE wykazało, że istnieją zarówno proteoformy ApoA-I wspólne dla nasienia i krwi oraz proteoformy specyficzne tylko dla nasienia.

Podsumowując, po raz pierwszy przeprowadzono kompleksową analizę porównawczą proteomu plazmy nasienia i osocza krwi karpia przy użyciu metod proteomicznych. Uzyskane wyniki są kluczowe dla zrozumienia funkcjonowania układu rozrodczego u ryb. Rezultaty tych badań wyraźnie wskazują, że w przeciwieństwie do ssaków, większość białek plazmy nasienia wykazuje podobieństwo do składu białkowego osocza krwi. Występowanie białek specyficznych dla nasienia związane jest przypuszczalnie z ich funkcją jaką pełnią w układzie rozrodczym ryb tj. w regulacji spermatogenezy i ruchliwości plemników, utrzymaniu integralności błon plemników czy ochronie antyoksydacyjnej plemników. Uzyskane wyniki wskazują, że białka wspólne dla krwi i plazmy nasienia mogą pochodzić z krwi, zaś białka specyficzne dla nasienia najprawdopodobniej ulegają ekspresji na obszarze układu rozrodczego. Ponadto obecność białek specyficznych dla krwi, które nie występują w plazmie nasienia wskazuje na selektywność bariery krew-jądro. Wyróżnione białka specyficzne dla plazmy nasienia powinny być w przyszłości przedmiotem dalszych szczegółowych analiz.

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w oryginalnej publikacji eksperymentalnej **nr 7**:

Dietrich M.A., Arnold G.J., Nynca J., Fröhlich T., Otte K., Ciereszko A. 2014. Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma. *Journal of Proteomics* 98: 218-232.

Wyniki prezentowanych badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znacząco wzbogacają wiedzę dotyczącą składu białkowego plazmy nasienia karpia i mogą być kluczowe dla zrozumienia funkcjonowania plazmy nasienia ryb. Jest to dotychczas największy zbiór opisanych białek dla nasienia tego gatunku. Uzyskane wyniki mają charakter pionierski, większość zidentyfikowanych białek jest opisanych po raz pierwszy dla nasienia ryb. Wprowadzenie proteomiki do badań rozrodu karpia pozwala na poznanie fizjologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za funkcjonowanie układu rozrodczego, w tym mechanizmów aktywacji ruchliwości plemników oraz zdolności zapładniającej. Ponadto, zastosowanie metod proteomicznych daje podstawę do dalszych badań aplikacyjnych, ukierunkowanych na poszukiwanie potencjalnych markerów jakości gamet, co może przyczynić się do optymalizacji metod kontrolowanego rozrodu w warunkach wylęgarnianych, w szczególności zwiększenia wydajności zapłodnienia oraz krótko- i długookresowego przechowywania nasienia. Białka będące potencjalnymi wyznacznikami jakości nasienia mogą zostać wyizolowane, oczyszczone i dogłębnie scharakteryzowane przy wykorzystaniu tradycyjnych metod w celu poznania ich specyficznych funkcji.

Otrzymane wyniki badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego prezentowałam także na licznych konferencjach krajowych i zagranicznych (wykaz w Załączniku IV, pkt III.B.8,9,10,19,14,25,26,28,32).

Podsumowanie i wnioski

- Zidentyfikowano po raz pierwszy i scharakteryzowano szczegółowo główne białka plazmy nasienia karpia tj. transferynę, parwalbuminy i apolipoproteiny A (ApoA-I i Apo-14kDa). Ich funkcje związane są z mechanizmem ruchu plemników oraz ochroną plemników i tkanek układu rozrodczego przed toksycznym działaniem jonów kadmu oraz przed atakiem drobnoustrojów. Uzyskana wiedza może się przyczynić do

lepszego zrozumienia mechanizmów determinujących jakość nasienia ryb, a następnie wykorzystania tych informacji do poprawy metod kontroli rozrodu ryb.

- Uzyskano katalog białek plazmy nasienia karpia oraz przeprowadzono kompleksową analizę porównawczą plazmy nasienia i osocza krwi, która wskazuje na selektywność bariery krew-jądro. W przeciwieństwie do ssaków, skład białkowy plazmy nasienia karpia wykazuje wysokie podobieństwo do składu białkowego osocza krwi.
- Plazma nasienia karpia charakteryzuje się obecnością charakterystycznych białek w tym parwalbuminy oraz proteoform ApoA-I. Obecność tych białek może być związana ze specyficzną funkcją jaką mogą pełnić w układzie rozrodczym karpia tj. w regulacji spermatogenezy i ruchliwości plemników, utrzymaniu integralności błon plemników oraz ochronie antyoksydacyjnej plemników.
- Wyniki prac proteomicznych pozwoliły na wyselekcjonowanie białek ważnych dla funkcji nasienia ryb do przyszłych badań oraz dają podstawę do dalszych badań aplikacyjnych, polegających na poszukiwaniu markerów jakości nasienia.

Piśmiennictwo

- Barthelemy C, Khalfoun B, Guillaumin JM, Lecomte P, Bardos P. Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. *J Reprod Fertil.* 1988 82:113-8.
- Berchtold, M.W., Celio, M.R., Heizmann, C.W., 1984. Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. Quantitation and immunohistochemical localization. *J. Biol. Chem.* 259, 5189-5196.
- Brownridge, P., de Mello, L.V., Peters, M., McLean, L., Claydon, A., Cossins, A. R., Whitfield, P.D., Young, I.S., 2009. Regional variation in parvalbumin isoform expression correlates with muscle performance in common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Exp. Biol.* 212, 184-193.
- Bugajska-Schretter, A., Elfman, L., Fuchs, T., Kapiotis, S., Rumpold, H., Valenta, R., Spitzauer, S., 1998. Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101, 67-74.
- Bugajska-Schretter, A., Groteb, M., Vangelistac, L., Valentd, P., Sperdd, W.R., Rumpolda, H., Pastoree, A., Reicheltb, R., Valentaf, R., Spitzauera, S., 2000. Purification, biochemical, and immunological characterisation of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound forms of carp parvalbumin. *Gut* 46, 661-669.
- Ciereszko A., Własow T., Dobosz S., Goryczko K., Glogowski J. 2004. Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period. *Theriogenology* 62, 1353-1364.
- Ciereszko, A., 2008. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity, and cryopreservation success in fish, in: Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.), *Fish Spermatology*. Alpha Science International Ltd. Oxford, U.K., pp. 215-240.
- Concha M., Smith V., Castro K., Bastias A., Romero A., Amthauer R. 2004. Apolipoproteins A-I and A-II are potentially important effectors of innate immunity in the teleost fish *Cyprinus carpio*. *Eur. J. Biochem.* 271; 2984-2990.
- Concha M.I., Molina S., Oyarzún C., Villanueva J., Amthauer R. 2003. Local expression of apolipoprotein A-I gene and a possible role for HDL in primary defence in the carp skin. *Fish Shellfish Immunol.* 14; 259-273.
- Csizmadia C, Jeney Z, Szerencsés I, Gorda S. Transferrin polymorphism of some races in a live gene bank of common carp. *Aquaculture.* 1995 129:193-8.
- De Smet, H., Blust, R., Moens, L., 2001. Cadmium-binding to transferrin in the plasma of the common carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Phys. C* 128, 45-53.
- Dietrich M., Westfalewicz B., Jurecka P., Irnazarow I., Ciereszko A. 2014a. Isolation, characterization and cDNA sequencing of new form of parvalbumin from carp semen. *Reproduction Fertility and Development* 26;: 1117-1128.
- Dietrich M.A., Nynca J., Westfalewicz B., Karol H., Ciereszko A. 2011. Identification of calcium-binding proteins in fish seminal plasma. *Fish Physiol. Biochem.* 37,447-452.

- Dietrich, M.A., Adamek, M., Bilińska, B., Hejmej, A., Steinhagen, D., Ciereszko, A., 2014b. Characterization, expression and antibacterial properties of apolipoproteins A from carp (*Cyprinus carpio* L.) seminal plasma. *Fish Shellfish Immunol.* 341, 389-401.
- Dietrich, M.A., Nynca, J., Bilinska, B., Kuba, J., Kotula-Balak, M., Karol, H., Ciereszko, A., 2010. Identification of parvalbumin-like protein as a major protein of common carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa which appears during final stage of spermatogenesis. *Comp Biochem Phys B157*, 220-227.
- Friedberg, F., 2005. Parvalbumin isoforms in zebrafish. *Mol. Biol. Rep.* 32, 167–175.
- Gazo, I., Shaliutina-Kolešová, A., Dietrich, M.A., Linhartová, P., Shaliutina, O., Cosson, J., 2015. The effect of reactive oxygen species on motility parameters, DNA integrity, tyrosine phosphorylation and phosphatase activity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 48-57.
- Kowalski, R., Wojtczak, M., Glogowski, J., Ciereszko, A., 2003. Gelatinolytic and anti-trypsin activities in seminal plasma of common carp: relationship to blood, skin mucus and spermatozoa. *Aquat. Living Resour.* 16, 438-444.
- Lahnsteiner F, Patzner RA, Weismann T. 1993. The spermatic duct of salmonid fishes (*Salmonidae*, Teleostei). Morphology, histochemistry and composition of the secretion. *J Fish Biol.* 42,79-93.
- Li, P., Hulak, M., Koubek, P., Sulc, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M., Gela, D., Manaskova-Postlerova, P., Peknicova, J., Linhart, O., 2010a. Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Theriogenology* 74, 413-423.
- Li P; Hulak M; Rodina M; Sulc M; Li ZH; Linhart O. 2010b. Comparative protein profiles: Potential molecular markers from spermatozoa of Acipenseriformes (Chondrostei, Pisces). *Comp Biochem Phys D* 5,302-307.
- Liu, G-M., Wang, N., Cai, Q-F., Li, T., Sun, L-Ch., Su, W.-J., Cao, M-J., 2010. Purification and characterization of parvalbumins from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 90, 1034 – 1040.
- Loir M, Labbe C, Maisse G, Pinson A, Boulard G, Mourot B, Chambeyron F. 1990. Proteins of seminal fluid and spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Partial characterization and variations. *Fish Physiol Biochem* 8,485-495.
- Migliarini, B., Campisi, A.M., Maradonna, F., Truzzi, C., Annibaldi, A., Scarponi, G., Carnevali, O., 2005. Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Fobius niger*. *Gen Comp Endocrinol.* 142, 241-247.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 23, 737-752.
- Sangalang, G.B., O'Halloran, M.J., 1973. Adverse effects of cadmium on brook trout testis and on in vitro testicular androgen synthesis. *Biol. Reprod.* 9, 394-403.
- Skinner MK, Griswold MD. 1980. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *J Biol Chem.* 255:9523-5.
- Stafford JL, Belosevic M. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Dev Comp Immunol.* 2003 27:539-54.
- Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Dev Comp Immunol.* 2001 25:101-15.
- Swoboda, I., Bugajska-Schretter, A., Verdino, P., Keller, W., Sperr, W.R., Valent, P., Valenta, R., Spitzauer, S., 2002. Recombinant carp parvalbumin, the major cross-reactive fish allergen: a tool for diagnosis and therapy of fish allergy. *J. Immunol.* 168, 4576-84.
- Sylvester SR, Griswold MD. The testicular iron shuttle: a "nurse" function of the Sertoli cells. *J Androl.* 1994 15:381-5.
- Valenta M, Stratil A, Slechtova V, Kalal L, Slechta V. Polymorphism of transferrin in carp (*Cyprinus carpio* L.): genetic determination, isolation, and partial characterization. *Biochem Genet.* 1976 14:27-45.
- Villarroel F., Bastías A., Casado A., Amthauer R., Concha M.I. 2007. Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish. *Fish Shellfish Immunol.* 23; 197–209.
- Wojtczak, M., A. Ciereszko. 2005. Improvement of electrophoretic detection of antitrypsin activity in fish blood and seminal plasma. *Electrophoresis* 26,514-516.
- Wojtczak, M., Całka, J., Glogowski, J., Ciereszko, A., 2007b. Isolation and characterization of α 1-proteinase inhibitor from common carp (*Cyprinus carpio*) seminal plasma. *Comp. Biochem. Physiol. B* 148, 264-276.
- Wojtczak, M., Dietrich, G.J., Ciereszko, A., 2005. Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 387-391.

- Wojtczak, M., Glogowski, J., Kołdras, M., Kucharczyk, D., Ciereszko, A., 2003. Characterization of proteinase inhibitors of seminal plasma of cyprinids. *Aquat Living Resour.* 16, 461-465.
- Zalata, A., Hafez, T., Schoonjans, F., Comhaire, F., 1996. The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Hum. Reprod.* 11, 761-764.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonn, V., Rossano, R., Storelli, C., Vilella, S. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biol. Reprod.* 2005, 72, 1262-1267.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO BADAWCZEJ

Przed uzyskaniem stopnia doktora

Studia rozpoczęłam w 1997 r. na wydziale Biologii, kierunek Biotechnologia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W 1999 r. w ramach pracy magisterskiej rozpoczęłam badania dotyczące transdukcji sygnału prolaktynowego w komórkach wczesnolutealnych jajnika świni pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Ciereszko w Katedrze Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (UWM) w Olsztynie. Ukończyłam studia w grupie 10% najlepszych absolwentów UWM ze średnią 4,58. W czerwcu 2001 r. obroniłam pracę magisterską i uzyskałam tytuł magistra inżyniera biotechnologii. Wyniki pracy zostały opublikowane w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej *Reproductive Biology* (wskazana w punkcie II.A.47 Załącznika IV „Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”)

Od października 2001 r. zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Biologii Nasienia Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie gdzie rozpoczęłam szczegółowe badania dotyczące charakterystyki białek w plazmie nasienia karpia. Charakterystykę białek plazmy nasienia karpia rozpoczęłam od identyfikacji enzymów proteolitycznych i inhibitorów proteinaz serynowych. Zainteresowanie tymi białkami wynikało z braku informacji na temat ochrony plemników przed potencjalnym zagrożeniem ze strony enzymów proteolitycznych. Prowadzone prace doprowadziły w krótkim okresie do identyfikacji i wstępnej charakterystyki głównych białek plazmy nasienia karpia. Wykazałam, iż transferyna i inhibitory proteinaz serynowych są głównymi białkami omawianego płynu ustrojowego. Wyniki te opublikowałam w *Fish and Shellfish Immunology* (wskazana w pkt II.A.42, III.B.46 Załącznika IV). Jest to pierwsza praca na ten temat w odniesieniu do nasienia ryb i ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia roli białek plazmy nasienia u tej gromady zwierząt.

Pracę doktorską wykonywałam pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Ciereszko w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN. Badania te prowadziłam w ramach projektu promotorskiego finansowanego przez KBN pt: „Izolacja i charakterystyka α 1-antyproteinazy z plazmy nasienia karpia”. Zidentyfikowałam oraz scharakteryzowałam α 1-antyproteinazę, należącą do rodziny serpin. Dużym sukcesem okazało się określenie lokalizacji serpiny w układzie rozrodczym przy pomocy uzyskanych przeciwciał. Przeciwciała te rozpoznają nie tylko wolną serpinę, ale także jej kompleksy z enzymami proteolitycznymi. Uzyskane wyniki wskazują na obecność wymienionych kompleksów w plazmie nasienia. Odkrycie to jest dowodem na aktywną rolę serpiny w ochronie plemników przed atakiem proteolitycznym. Informacje te mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia roli fizjologicznej serpin w męskim układzie rozrodczym ryb.

Dnia 27 lutego 2006 r. odbyła się obrona mojej rozprawy doktorskiej pt: „Izolacja i charakterystyka $\alpha 1$ —antyproteinazy z plazmy nasienia karpia (*Cyprinus carpio* L)”. Uchwałą Rady Naukowej IRZiBŻ otrzymałam stopień doktora nauk zootechnicznych, a moja praca doktorska na wniosek w/w Rady Instytutu została nagrodzona Nagrodą Indywidualną III stopnia Dyrektora IRZiBŻ PAN w Olsztynie. Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w *Aquatic Living Resources* oraz *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* oraz licznych komunikatach prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych (Załącznik IV, pkt II.A.32, 45, 46, III.B.44, 54, 55, 56).

Uczestniczyłam w doświadczeniach nad wpływem UV na jakość nasienia pstrąga tęczowego. Badania te są istotne dla optymalizacji metod manipulacji genomowych u ryb, takich jak gynogeneza (uzyskanie potomstwa z materiału matczynego). Kluczowym elementem uzyskania potomstwa gynogenetycznego jest zastosowanie nasienia którego genom jest zinktywowany, najczęściej przy pomocy promieniowania UV. W pracy opublikowanej w *Theriogenology*, monografii i komunikatach na konferencję (prace wykazane w pkt II.A.41, II.D.14, III.B.53 Załącznik IV), której jestem współautorem wykazano m.in. przydatność analizy komet do oszacowania fragmentacji DNA plemników pstrąga tęczowego poddanych działaniu UV oraz związek pomiędzy uszkodzeniami DNA plemników a parametrami ruchu i wartością biologiczną.

Uczestniczyłam także w badaniach, których celem było określenie zmiany w parametrach ruchu plemników w zależności od sekwencyjnego pobierania mleczu, czasu anestezji tarlaków oraz czasu *post-mortem*. Wykazano, że nawet drobne odstępstwa od tzw. dobrych praktyk hodowlanych w zakresie pobierania nasienia mogą mieć wysoce negatywny wpływ na parametry ruchu plemników, a co za tym idzie potencjalnie niższą wartość biologiczną. Prace te mają istotne znaczenie dla doskonalenia metodyk krótko i długookresowego przechowywania nasienia ryb w zakresie oceny i selekcji materiału do konserwacji. Wyniki opublikowano w periodyku naukowym *Fish Physiology and Biochemistry* (pkt II.A.40 Załącznik IV).

Ważnym osiągnięciem było udoskonalenie powszechnie stosowanej metody elektroforetycznej detekcji inhibitorów enzymów proteolitycznych plazmy nasienia ryb. Elektroforegramy inhibitorów proteinaz serynowych przedstawione w opublikowanych pracach (Wojtczak i in. 2003; Kowalski i in. 2003) pokazują, że ich interpretacja może być utrudniona w wyniku maskowania przez niespecyficzne esterazy, widoczne w postaci ciemnych pasm na żelu, często w miejscu migracji inhibitorów. Dlatego też podjęłam próbę eliminacji wymienionych pasm poprzez hamowanie aktywności esteraz dodając do nanoszonych prób inhibitory esteraz, co doprowadziło do ujawnienia inhibitorów maskowanych przez esterazy. Wyniki tych badań opublikowano w prestiżowym czasopiśmie *Electrophoresis* (Załącznik IV, pkt II.A.43).

Od samego początku pracy w Instytucie zaangażowana byłam także w badania o charakterze aplikacyjnym. Należy podkreślić, że większość wykonywanych badań jest możliwa dzięki dobrej współpracy ze środowiskiem hodowców ryb. Efektem tej współpracy było rozwiązanie problemu sygnalizowanego przez wielu hodowców pstrąga tęczowego, dotyczącego niskich efektów zapłodnienia spowodowanego złą jakością ikry. Wraz z zespołem opracowano prosty test szacowania obecności popękanej ikry (jakości ikry) pstrąga tęczowego na podstawie analizy zmętnienia wody (tzw. „próba kieliszkowa”). Próba ta jest pomocna do oceny odsetka popękanej ikry, gdyż w momencie kontaktu z wodą dochodzi do wytrącenia lipidów żółtka w postaci mlecznej zawiesiny, co z kolei prowadzi do utrudnienia ruchu plemników bądź ich aglutynacji oraz zablokowania mikropyle. Nasze prace wykazały także, że można zneutralizować niekorzystny wpływ zmętnienia poprzez użycie do

zapłodnienia roztworów soli zamiast wody, ponieważ zapobiega to wytrącaniu żółtka i powoduje przedłużenie żywotności plemników. Opracowana metoda oceny jakości ikry została już wdrożona w czterech gospodarstwach rybackich (Dąbie, Mylof, Łopuszna, Zawoja). Wyniki opublikowano w pracy eksperymentalnej w *Aquaculture* oraz w dwóch monografiach (Załącznik IV, pkt II.A.44, II.D.19, 17).

W latach 2001-2006 byłem członkiem zespołu prowadzącego Bank Nasienia ważnych gospodarczo oraz zagrożonych gatunków ryb przy IRZiBŻ PAN w Olsztynie dotacja z Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Prace te mają duże znaczenie dla ochrony bioróżnorodności populacji ryb. Uczestniczyłam aktywnie w pracach nad optymalizacją metod kriokonserwacji licznych gatunków ryb w tym ryb jesiotrowatych. Wyniki prowadzonych badań prezentowano w dwóch monografiach (Załącznik IV, pkt II.D.15,18, III.B.51).

Po uzyskaniu stopnia doktora

Z dniem 1 lipca 2006, awansowałam na stanowisko adiunkta w Zakładzie Biologii Gamet i Zarodka kontynuując badania dotyczące charakterystyki białek plazmy nasienia i plemników ryb i ptaków oraz ogólnej charakterystyki parametrów jakościowych i ilościowych nasienia ryb, w tym ryb cennych gospodarczo oraz gatunków zagrożonych (sieja i sielawa). Ponadto uczestniczyłam w badaniach nad oceną jakości oraz analizą biochemiczną płynu jajnikowego ryb. Moje zainteresowania głównie koncentrują się na izolacji i dogłębnej charakterystyce właściwości fizykochemicznych oraz funkcji białek plazmy nasienia karpia i pstrąga tęczowego oraz wprowadzeniu metod proteomicznych do analiz nasienia ryb.

Charakterystyka białek plazmy nasienia pstrąga tęczowego, halibuta oraz okonia

Uczestniczyłam w badaniach, które doprowadziły do identyfikacji i określenia właściwości biochemicznych i kinetycznych głównych białek nasienia pstrąga, tj lipokaliny (LTP), systemu trzech apolipoprotein C-I (ApoC-I), fetuiny oraz transferyny. Identyfikacja inhibitora I z plazmy nasienia pstrąga jako fetuiny, rodziny związanej z inhibitorami proteinaz cysteinowych znacząco przewartościowuje dotychczasowe poglądy na temat inhibitorów proteinaz serynowych plazmy nasienia ryb. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że fetyna z plazmy nasienia pstrąga hamuje aktywność proteinaz serynowych oraz wykazuje zdolność hamowania proteinazy cysteinowej – papainy. Fetyna obecna w plazmie nasienia pstrąga prawdopodobnie pełni rolę ochronną w odniesieniu do komórek i białek układu rozrodczego przed nadmierną aktywnością enzymów proteolitycznych. Przeprowadzone badania wykazały, że białko LTP wydaje się być specyficzne tylko dla plazmy nasienia ryb łososiokształtnych, gdyż nie występuje w krwi. Przeprowadzona analiza immunohistochemiczna LTP w układzie rozrodczym pstrąga tęczowego przy wykorzystaniu uzyskanych przeciwciał sugeruje jego rolę w transporcie androgenów, jak również w ruchliwości plemników. Uzyskane wyniki opublikowano w 3 artykułach w *Reproduction Fertility and Development*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* oraz licznych referatach na konferencje krajowe i zagraniczne (wykazane w Załączniku IV pkt II.A.13, 14, 17, III.B.34). Są to pierwsze doniesienia dotyczące obecności fetuiny, apolipoprotein C-I oraz białka należącego do lipokalin w nasieniu ryb.

Współpracując z Department of Fisheries and Natural Sciences, Bodø w Norwegii oraz Szent Istvan University, Department of Aquaculture, Gödöllő, Węgry uczestniczyłam w pionierskich badaniach nad analizą parametrów biochemicznych oraz systemu antyproteolitycznego plazmy nasienia halibuta atlantyckiego (*Hippoglossus hippoglossus*) oraz okonia (*Perca fluviatilis*). Owocem współpracy są dwie publikacje w których jestem

współautorem, opublikowane odpowiednio w *Fish Physiology and Biochemistry* oraz *Journal of Applied Ichthyology*, wyniki także były prezentowane na konferencjach (Załącznik IV, pkt II.A.15, 23; III.B.30, 35).

Jako główny wykonawca w projekcie MNiSzW Nr N N311 512739 „Charakterystyka i rola białek wiążących wapń nasienia ryb” odpowiedzialna byłam m. in. za wykonanie zadania badawczego nr 5. Opracowano metodę detekcji białek wiążących wapń w plazmie nasienia różnych gatunków ryb z użyciem Quin2. Zidentyfikowano specyficzne gatunkowo profile elektroforetyczne białek wiążących wapń w plazmach nasienia ryb. Uzyskane wyniki przyczyniły się do pogłębienia wiedzy w zakresie badań białek nasienia ryb i otwierają nowe obszary badawcze w zakresie poznania mechanizmów działania jonów wapniowych w męskim układzie rozrodczym ryb. Wyniki opublikowałam w *Fish Physiol. Biochem.* (Załącznik IV, pkt II.A.2). Ponadto uczestniczyłam w badaniach nad identyfikacją białek niskocząsteczkowych nasienia karpia, wyniki zostały opublikowane w *J. Applied. Ichthyol.* (Załącznik IV, pkt II.A.2).

Charakterystyka biochemiczna nasienia siei, stynki oraz sielawy

Przedmiotem moich zainteresowań była również problematyka rozrodu siei. Sieja uważana jest za gatunek szlachetny o dużym znaczeniu dla akwakultury, o wyjątkowych walorach smakowych, często utożsamiana z nieskażonym środowiskiem ze względu na wysokie wymagania tlenowe. Odpowiedzialna byłam za przeprowadzenie szerokich badań mających na celu fizjologiczną i biochemiczną charakterystykę mleczu siei w czasie sezonu rozrodczego oraz sprawdzenie skuteczności stymulacji hormonalnej w celu poprawy produkcji nasienia u tego gatunku. Uzyskane wyniki wykazały przydatność analogu GnRH azagly-nafarelin do stymulacji spermiacji. W tym okresie uczestniczyłam także w pracach dotyczących regulacji ruchliwości plemników siei. Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane w dwóch publikacjach eksperymentalnych *Archive fur Hydrobiologie*, monografii oraz licznych doniesieniach na konferencje (Załącznik IV, pkt. II.A.34,35, II.D.5, III.B.21,24,42,43). Kontynuując badania nad rozrodem siei uczestniczyłam w badaniach nad analizą nasienia unikalnej formy siei z jeziora Łebsko, tzw siei łebskiej. Sieja łebska jest anadromicznym gatunkiem wstępującym na tarło z wód słonych Morza Bałtyckiego do wód słodkich Jeziora Łebsko. Przyjmuje się, że populacja siei z Jeziora Łebsko jest jedną z dwóch autochtonicznych, naturalnie rozradzających się populacji tego gatunku w Polsce. W ostatnich latach liczebność siei łebskiej znacząco zmalała w wyniku m.in. narastającej eutrofizacji i zanieczyszczenia jezior oraz intensywnych odłowów rybackich. W ramach projektu „Ichtiologiczna bioróżnorodność jezior: wypracowanie modelu rozwiązywania problemów na przykładzie zasobów naturalnych autochtonicznej siei wędrownej w jeziorze Łebsko (siei łebskiej)” (Fish-WILL), mającym na celu odbudowę i zachowanie bioróżnorodności populacji siei łebskiej, uczestniczyłam w badaniach mających na celu kompleksową charakterystykę nasienia świeżego oraz kriokonserwowanego tego gatunku. W wyniku przeprowadzonych badań opracowano efektywną metodę kriokonserwacji nasienia siei, co zapewnia całoroczną dostępność nasienia oraz umożliwia utworzenie banku genów dla tego gatunku. Uzyskane wyniki dają możliwość optymalizacji metod sztucznego rozrodu siei z wykorzystaniem prób nasienia pochodzących od osobników charakteryzujących się najlepszymi parametrami jakościowymi nasienia. Prace te mają duże znaczenie dla ochrony bioróżnorodności rodzimych populacji ryb. Badania te miały na celu wypracowanie skutecznej metody kriokonserwacji lokalnej populacji siei, a w konsekwencji utrzymanie puli genetycznej tego gatunku. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w *Fundamental and Applied Limnology*, *Journal of Applied Ichthyology* oraz rozdziałach w monografiach (Załącznik IV, pkt II. A.9,18,20, II.D.1,2,6,8) .

Współuczestniczyłam także w pionierskich badaniach dotyczących kompleksowej analizy plemników stynki (*Osmerus eperlanus*), gatunku niezwykle istotnego z punktu widzenia ekologicznego, w wielu krajach zagrożonego wyginięciem. Na podstawie wyników zidentyfikowano szereg parametrów biochemicznych nasienia wyróżniających stynkę na tle innych gatunków ryb, w tym małe rozmiary plemników czy różnice w trajektorii ruchu plemników pomiędzy nasieniem gonadalnym a ejakulowanym. Uzyskane wyniki opublikowano w *Aquaculture* oraz monografii (Załącznik IV, pkt II.A38, II.D.9).

Byłam także członkiem zespołu zajmującego się badaniem rozrodu sielawy (*Coregonus albula* L.), ryby cennej gospodarczo. Kiedyś bardzo rozpowszechniona, staje się ostatnimi laty coraz rzadszą zdobyczą rybaków. Dzieje się tak m.in. dlatego, że ryba ta jest wrażliwa na zanieczyszczenia powodujące przyspieszoną eutrofizację. W wielu przypadkach doszło także do nadmiernej eksploatacji rybackiej sielawy. Ta niekorzystna sytuacja zainspirowała nasze prace nad zrozumieniem biologii rozrodu, które są niezbędne dla ulepszenia metod sztucznego tarła, np. wyboru optymalnych warunków aktywacji ruchu plemników oraz kriokonserwacji nasienia. Celem prowadzonych badań była kompleksowa analiza nasienia sielawy w tym ruchliwości i parametrów morfometrycznych plemników. Uzyskane wyniki, po raz pierwszy opisują ruchliwość i morfometrię plemników sielawy. Parametry opisujące prędkość i trajektorię ruchu plemników sielawy były zbliżone do siebie, jednakże plemniki sielawy były bardziej wrażliwe na niskie pH. Zwiększona wrażliwość plemników sielawy na jony wapnia i sodu oraz charakterystyczny ruch kołowy plemników wydaje się wyróżniać siejowate na tle innych łososiokształtnych. Uzyskane wyniki opublikowano w pracy eksperymentalnej w *Fish Physiology and Biochemistry* oraz w monografii (załącznik IV, pkt II.A.18, II.D.4).

Ocena jakości ikry pstrąga tęczowego oraz sandacza amerykańskiego

Ocena jakości ikry jest jednym z podstawowych problemów w hodowli ryb łososiowatych, gdyż niska jakość ikry skutkuje stratami produkcyjnymi w postaci zmniejszonej ilości uzyskanego narybku. Dlatego też kontynuowałam wraz z zespołem prace w zakresie poszukiwań prostych wskaźników jakości ikry takich jak np. opracowana przez nas w poprzednich badaniach próba zmętnieniowa zwana „kieliszkową”. Badania w których uczestniczyłam dotyczyły sprawdzenia związku pomiędzy stopniem rozproszenia kropli lipidowych oocytów a zapłodnialnością ikry. Badania miały na celu opracowanie prostego testu morfologicznego jakości oocytów, gdyż rozkład kropli może być związany ze starzeniem ikry. Wykazano, że jedynie ikra z tarła jesienno wykazuje zależność pomiędzy stopniem rozproszenia kropli lipidowych a wynikami zapłodnienia, ikra o równomiernym rozproszeniu kropli charakteryzowała się najwyższym odsetkiem wylęgu. Uzyskane wyniki opublikowano w *Aquaculture* oraz monografii (Załącznik IV, pkt II.A.21, II.D.3, III.B.33). Dalsze prace powinny przesądzić o możliwym praktycznym wykorzystaniu wymienionych charakterystyk do oceny jakości ikry.

Kontynuując badania nad charakterystyką płynu owaryjnego uczestniczyłam w badaniach dotyczących wpływu pH płynu jajnikowego na parametry ruchu plemników. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na kluczową rolę pH płynu jajnikowego w aktywacji ruchu plemników ryb, płyny owaryjne o niskim pH nie wykazywały zdolności do aktywacji ruchu, co wpływa negatywnie na zapłodnienie. W kolejnym doświadczeniu wykazaliśmy negatywne korelacje między zmętnieniem a pH płynu jajnikowego. Ponadto, dodanie zgniecionych ziaren ikry do płynu jajnikowego powodowało obniżenie pH i obniżenie zdolności płynu do aktywacji ruchliwości plemników. W ostatnich latach wykazaliśmy także wpływ pH płynu jajnikowego na ruchliwość plemników innych gatunków ryb łososiowatych. Otrzymane

wyniki dotyczące charakterystyki płynu owaryjnego opublikowano w czterech pracach eksperymentalnych oraz licznych doniesieniach na konferencję i monografiach (wykazane w Załączniku IV, pkt II.A.25,16,31,33, II.D.10, III.B.29,36).

Przebywając na stażu w School of Environment and Natural Resources, The Ohio State University w USA kontynuowałam prace nad określeniem parametrów jakościowych ikry sandacza amerykańskiego (*Sander vitreus*). Celem moich badań było określenie biochemicznych wskaźników zdolności zapładniającej oocytów oraz ich zmian w czasie przechowywania i dojrzewania oocytów. Uzyskane wyniki wskazują, że stężenie białka i zmętnienie płynu jajnikowego sandacza amerykańskiego mogą być stosowane jako wskaźnik do oceny jakości oocytów. Otrzymane wyniki opublikowałam, jako pierwszy autor w *Journal of Great Lakes Research* oraz konferencji naukowej (Załącznik IV, pkt II.A.11, III.B.40).

Wpływ metali ciężkich oraz surfaktantów na jakość plemników ryb

Inny kierunek badawczy w którym uczestniczyłam dotyczył wpływu subletalnych dawek metali ciężkich na parametry ruchu plemników ryb łososiowatych i jesiotrowatych. Jony metali ciężkich mogą kumulować się w tkankach ryb i osiągać stężenia nawet 20 tyś. razy większe niż w otaczającym środowisku wodnym. Co więcej, metale ciężkie mogą wpływać zarówno na ilość i wartość biologiczną gamet, jak również, oddziałując na układ endokrynnny, powodować zaburzenia w przebiegu gametogenezy. Zaburzenia te mogą także dotyczyć zmian w trajektorii ruchu plemników, integralności plazmolemy czy fragmentacji DNA plemników. Celem badań było określenie wpływu subletalnych stężeń jonów rtęci i kadmu na parametry ruchu (CASA) plemników pstrąga tęczowego i jesiotrów, integralność plazmolemy plemników oraz wartość biologiczną plemników. Wykazano, że jony kadmu i rtęci wpływały negatywnie na parametry ruchu plemników, integralność błon oraz zapłodnienie. Rezultaty badań przedstawiono w dwóch oryginalnych pracach w *Aquatic Toxicology* oraz *J. Appl. Ichthyol*, licznych rozdziałach w monografiach oraz w szeregu komunikatach na konferencjach krajowych i międzynarodowych (załącznik IV, pkt II.A.8,19, II.D.13,16; III.B.23,45,47,52). Jednym z owoców doświadczeń było stworzenie własnej, metody *in-vitro* symulacji przechowywania mleczu ryb z wykorzystaniem plazmy nasienia ryb jako płynu immobilizującego ruch plemników, co pozwoliło na stwierdzenie unikalnej, ochronnej roli plazmy nasienia w przeciwdziałaniu negatywnym efektom metali ciężkich.

Ponadto uczestniczyłam w badaniach nad wpływem surfaktantów tj. SDS, Triton, powszechnie stosowanych składników detergentów, na fragmentację DNA i ruchliwość plemników karpia i pstrąga tęczowego. W/w surfaktanty po wykorzystaniu trafiają do wód powierzchniowych, gdzie mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla organizmów wodnych. Uzyskane wyniki wykazały, że surfaktanty wpływają bardziej na ruchliwość plemników niż na fragmentację DNA, co może być główną przyczyną obniżenia ich zdolności zapładniającej. Z tego powodu surfaktanty mogą wywierać negatywny wpływ na proces reprodukcji ryb w warunkach hodowlanych jak i naturalnych. Uzyskane wyniki opublikowano w *Reproductive Biology* (Załącznik IV pkt II.A.36).

Charakterystyka białek oraz analiza biochemiczna nasienia indora

Indyki odgrywają ważną rolę w produkcji mięsa drobiowego w kraju. W hodowli średnich i ciężkich rodów indyków ze względu na dużą masę ciała i ukształtowanie piersi indorów konieczne jest stosowanie inseminacji. Jednak podczas przechowywania nasienia następuje szybkie obniżenie zdolności zapładniającej plemników, co zmniejsza skuteczność inseminacji. Celem badań w których uczestniczyłam była charakterystyka zmian aktywności amidazowej, fragmentacji DNA oraz ruchliwości plemników indora podczas 48 godz

przechowywania nasienia. Uzyskane wyniki wskazują, że obniżenie zdolności zapładniającej nasienia indora podczas jego krótkookresowego przechowywania może być wynikiem zburzenia szlaków proteolitycznych wewnątrz plemników, prawdopodobnie związanych z przedwczesną aktywacją akrosomalnych proteinaz serynowych. Powyższe wyniki opublikowano w *Theriogenology* oraz komunikatach (Załącznik IV, pkt II.A.37, III.B.27).

W ramach badań nad rozrodem ptaków uczestniczyłam w pracach nad charakterystyką inhibitorów proteinaz serynowych plazmy oraz akrosyny nasienia indora, które doprowadziły do identyfikacji i dogłębnej charakterystyki właściwości fizykochemicznych i kinetycznych inhibitora typu Kazal, określane u ssaków jako inhibitor akrosyny. Są to pierwsze informacje o obecności inhibitora typu Kazal w układzie rozrodczym ptaków dla którego otrzymano pełną sekwencję cDNA, która została umieszczona w nukleotydowej bazie danych EMBL pod numerem dostępu AJ 877013. Wyniki zostały opublikowane w *Comparative Biochemistry and Physiology* oraz komunikatach naukowych (Załącznik IV pkt II.A.27, III.B.31,49)

Charakterystyka proteomu plemników karpia

Struktura chromatyny w plemniku jest wysoce skondensowana i upakowana w nukleoprotaminowe chromosomy, w których nie zachodzi replikacja, ani transkrypcja. Ponieważ plemniki są nieaktywne transkrypcyjnie, proteomika jest niezwykle przydatna w poznaniu ich funkcji i charakterystyce białek, gdyż proteom plemników jest bardziej statyczny w porównaniu do dynamicznego proteomu komórek somatycznych. Przy użyciu metody shotgun zidentyfikowałam 348 białek plemników karpia. Na podstawie kryterium „procesy biologiczne” białka zostały zakwalifikowane jako uczestniczące w metabolizmie (62%), odpowiedzi na bodźce (11%), transporcie (11%), transdukcji sygnałów (7%), ruchliwości (2%) oraz spermatogenezie (1%). Wykazano, że większość białek posiada aktywność enzymatyczną (44%; hydrolazy, oksydoreduktazy, transferazy, izomerazy, ligazy, inhibitory proteinaz) oraz posiada funkcje wiążące (41%; w większości nukleotydy i jony metali). Uzyskane wyniki dopełniają wcześniejszą pracę nad składem białkowym plazmy nasienia karpia pozwalając na kompleksową analizę proteomu nasienia karpia (plazmy nasienia i plemników) identyfikując w sumie 534 białka. Jest to dotychczas największy zbiór opisanych białek dla nasienia tego gatunku. Uzyskane wyniki mają charakter pionierski, większość zidentyfikowanych białek jest opisanych po raz pierwszy dla nasienia ryb. Uzyskane wyniki opublikowano w *Comparative Biochemistry and Physiology Part D Genomics and Proteomics* oraz prezentowałam na konferencji międzynarodowej (Załącznik IV II.A.4, III.B.14).

Wprowadzenie do analiz nowego podejścia metodycznego jakim jest proteomika pozwoliło na dokonanie przełomu w badaniach, polegającego na równoczesnej obserwacji złożonych mieszanin białek w sposób kompleksowy. Potrzebę dokonania zmian metodycznych w badaniach rozrodu ryb przedstawiono na konferencji dotyczącej biologii gamet ryb (3rd International Workshop on the Biology of Fish Gametes a następnie opublikowano w pracy przeglądowej, w której jestem współautorem (Załącznik IV II.A.10, III.B.1,17, 22).

W ostatnim roku przy współpracy z Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, University of South Bohemia w Ceske Budejovice brałam udział w doświadczeniu nad wpływem reaktywnych form tlenu na jakość nasienia (parametry ruchu plemników, integralność DNA, aktywność fosfatazy kwaśnej oraz fosforylację reszt tyrozynowych białek plemników) karpia. Odpowiedzialna byłam za przeprowadzenie analiz proteomicznych, w tym identyfikacji białek ulegających fosforylacji w wyniku ekspozycji na

stres oksydacyjny. Uzyskane wyniki wykazują, że stres oksydacyjny powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu plemników karpia tj powoduje obniżenie odsetka ruchliwych plemników, ich prędkości oraz stabilności DNA oraz wpływa na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, poprzez zmiany w fosforylacji tyrozyny zidentyfikowanych białek oraz aktywność kwaśnej fosfatazy. Efektem współpracy jest praca eksperymentalna, w której jestem współautorem, opublikowana w *Molecular Reproduction and Development* (załącznik IV, pkt II.A.3). Ponadto zaangażowana byłam w badania zmian proteomu endometrium powstałych w wyniku implantacji zarodka świni, wyniki tych badań opublikowano w *J. Proteomics* (Załącznik IV, pkt II.A.1).

Współpraca krajowa:

- Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Instytut Zoologii, Zakład Endokrynologii pod kierunkiem prof. dr hab. Barbara Bilińska. Współpraca dotyczyła immunohistochemicznej lokalizacji parwalbuminy, apolipoproteiny oraz transferryny w układzie rozrodczym karpia. Efektem współpracy jest pięć oryginalnych publikacji eksperymentalnych oraz liczne komunikaty naukowe (I.B.2,4,6, II.A.13,14, III.B.3,4,9,25,28);
- Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołysz, Polska Akademia Nauk, dr Ilgiz Irnazarow oraz dr Patrycja Jurecka. Współpraca dotyczy badań nad identyfikacją głównych białek nasienia karpia. Efektem są cztery oryginalne publikacje eksperymentalne i liczne komunikaty naukowe (I.B.1,2,5, II.A.2, III.B.13,32).
- Instytut Rybactwa Śródlądowego Zakład Hodowli Ryb Łososiowatych w Rutkach, dr hab. Stefan Dobosz. Współpraca dotyczy badań nad charakterystyką białek nasienia pstrąga tęczowego oraz płynu owaryjnego na parametry ruchu plemników. Efektem tej współpracy są liczne publikacje eksperymentalne (II.A.16,19,21,22,25,30,31,33, 34,35,40,41,44), rozdziały w monografiach (II.D.3,6,7,8,10,12,13,14,17,19) oraz komunikaty naukowe (III.B.29,33,36,37,42,43,45).
- Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Wydział Nauk o Środowisku, Katedra Ichtiologii, dr hab. Piotr Hliwa. Współpraca dotyczy badań nad wpływem metali ciężkich na jakość nasienia karpia oraz analiz biochemicznych i histologicznych nasienia siei oraz stynki (I.B.2,3, II.A.18,20,22,38, II.D.4,5,6,9, III.B.26).
- Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Wydział Nauk Medycznych, Katedra Farmakologii i Toksykologii, dr hab. Całka. Współpraca dotyczy immunofluorescencyjnej lokalizacji – antyproteiny w jądrze karpia (II.A.32).

Współpraca z ośrodkami zagranicznymi:

- University of Veterinary Medicine in Hanover, Fish Disease Research Unit, Germany dr Mikołaj Adamek. Efektem współpracy jest jedna oryginalna praca eksperymentalna (I.B.6) oraz komunikaty naukowe (III.B.8,9,10,11)
- Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany. dr Georg J. Arnold, Thomas Fröhlich współpraca w badaniach nad analizami proteomicznymi nasienia karpia. Efektem

współpracy są dwie publikacje (I.B.7; II.A.4) oraz komunikaty naukowe (III.B.5,14,18, 19)

- School of Environment and Natural Resources, The Ohio State University, Columbus Ohio, USA. dr Konrad Dabrowski. Współpraca dotyczyła analiz jakościowych ikry sandacza amerykańskiego oraz wpływu doboru efektywnej diety dla suma afrykańskiego. Efektem współpracy są dwie oryginalne prace eksperymentalne (IIA7, IIA11) oraz komunikaty naukowe (III.B.39-41).
- Department of Fisheries and Natural Sciences, Bodø University College, Bodo, Norway dr Igor Babiak oraz dr Maren Mommens. Współpraca dotyczyła analiz nasienia halibuta. Efektem współpracy jest jedna praca eksperymentalna (II.A.23) oraz komunikat naukowy (III.B.35).
- Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Vodany, Czech Republic. Ievgeniia Gazo, dr Psenicka. Współpraca dotyczyła analiz proteomicznych nasienia karpia oraz wpływu kriokonserwacji na strukturę akrosomu plemników jesiotra. Efektem współpracy są dwie oryginalne prace eksperymentalne (II.A.3,26).
- Departamento de Biología Pesquera, Instituto Canario de Ciencias Marinas, Telde (Las Palmas) Canary Islands, Spain dr Victor Tuset , współpraca dotyczyła sprawdzenia korelacji morfologii plemników pstrąga tęczowego a ich zdolnością zapładniającą oraz analiz morfometrycznych plemników pstrąga tęczowego. Efektem współpracy są dwie prace eksperymentalne (II.A.24,28) oraz komunikat naukowy (III.B.38).
- Szent István University, Department of Aquaculture, Pater K. u. Gödöllo, Hungary dr Ácosh Horváth. Współpraca dotyczyła analiz inhibitorów proteinaz serynowych w plazmie nasienia ryb okoniowatych oraz analiza systemu antyoksydacyjnego w plazmie nasienia różnych gatunków ryb. Efektem współpracy są dwie prace eksperymentalne (II.A.6,15) oraz komunikat naukowy (III.B.30).

Pełna lista moich **osiągnięć dotyczący pracy badawczej, dydaktycznej i organizacyjnej** znajduje się w Załączniku IV pt: „Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”.

Podsumowując, brałam udział lub obecnie uczestniczę w realizacji 16 projektów badawczych, w tym pięciu projektów międzynarodowych. W czterech projektach byłam/jestem kierownikiem. Odbywałam staże w zagranicznych ośrodkach naukowych: w Department of Molecular Biology of Fertilization, Institute of Molecular Genetics, Praga, School of Environment and Natural Resources, The Ohio State University, Columbus Ohio, USA oraz w Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

Wyniki badań prezentowałam w formie referatów (9) oraz plakatów (13) na licznych

konferencjach międzynarodowych i krajowych. Z 56 komunikatów naukowych, w 20 jestem pierwszym autorem.

Współpracując z redakcjami czasopism o zasięgu międzynarodowym z bazy JCR, wykonałam recenzje oryginalnych publikacji eksperymentalnych dla czasopism *Asian Journal of Andrology* (1 recenzja); *Fish and Shellfish Immunology* (1 recenzja), *Process Biochemistry* (1 recenzja), *Acta Ichthyologica et Piscatoria* (1 recenzja), *Biology of Reproduction* (1 recenzja), *Proteomics* (1 recenzja).

Jestem laureatką licznych nagród i stypendiów naukowych, m.in. stypendium dla wybitnych młodych naukowców MNiSW, dwukrotne stypendium START Fundacji Nauki Polskiej oraz nagroda *Pro Scientia et Vita* Fundacji Członków PAN, dyplom Uznania Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych za cykl prac „Biochemiczne podstawy funkcjonowania męskiego układu rozrodczego ryb oraz możliwość ich praktycznego wykorzystania”.

Na Wydziale Biologii UWM w latach (2003-2005) współuczestniczyłam w prowadzeniu ćwiczeń ze studentami III i IV roku Biotechnologii. Byłam promotorem 1 pracy magisterskich oraz opiekunem naukowym trzech prac magisterskich oraz jednej pracy licencjackiej. Obecnie pełnię funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim Pana Błażeja Westfalewicza pt” Charakterystyka proteomu nasienia buhaja: uwarunkowania fizjologiczne oraz zmiany wynikające z technologii kriokonserwacji”.

Moja działalność popularnonaukowa obejmuje: przygotowanie i prowadzenie warsztatów "Ocena jakości nasienia ryb" (3 x 45 min) w ramach międzynarodowych warsztatów "Karp jako organizm modelowy do badań biologicznych: propagacja, hodowla i kontrola zdrowia" (maj 9-11 , Gołysz/Ustroń), współautorstwo monografii oraz zdeponowanie sekwencji pełnego cDNA ApoA oraz parvalbuminy w bazie danych GenBank.

Zestawienie danych dotyczących dorobku naukowego

Rodzaj opracowania	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
Rozdziały w monografiach	11	8	19
Oryginalne prace eksperymentalne: w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citations Reports (JCR)	8	46	54
Komunikaty naukowe	15	41	56
Ogółem	34	95	129

Dane bibliograficzne dla całego dorobku naukowego

Sumaryczny *impact factor* według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: **87,72**

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS): **501**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **13**

Łączna liczba punktów MNiSW = **1169**

Sumaryczna ilość punktów MNiSW zgodnie z aktualnie obowiązującą listą czasopism punktowanych (2014r) **1395**

Dariusz Honek