

Magdalena Płotka

Dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych

Dyscyplina: Nauki biologiczne

**Analiza molekularna bakteriofagowych i bakteryjnych enzymów
litycznych wykazujących podobieństwo do eukariotycznych białek
rozpoznających peptydoglikan**

OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Pracownia Biologii Ekstremofili, Katedra Mikrobiologii
Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

Gdańsk 2020

1. **Imię i nazwisko:** Magdalena Płotka
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

2007	doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii; Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; rozprawa doktorska pt. „Białkowe składniki mitochondrialnego nukleoidu drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ”; promotor: Prof. dr hab. Jarosław Marszałek
1999	mgr biotechnologii; Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; praca magisterska pt. „Brak związku pomiędzy polimorfizmem A1/A2 genu GPIIIa a występowaniem zawału serca w populacji Polski Północnej”; promotor: Prof. dr hab. Janusz Limon, Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

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

od 2012	Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański; stanowiska: 2012-2014 starszy specjalista, od 2014 - obecnie adiunkt
2010 – 2011	Diagnostyczne Laboratoria Medyczne Invicta, Gdański Park Naukowo – Technologiczny im. Hilarego Koprowskiego, Gdańsk; stanowisko: asystent w Laboratorium Biologii Molekularnej i Cytogenetyki
2007-2010	Katedra Położnictwa i Ginekologii, Szpital John Radcliffe, Uniwersytet w Oxfordzie, Oxford, Wielka Brytania; stanowisko: postdoctoral research assistant
2003-2007	Studium Doktoranckie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (MWB UG-GUM); doktorantka
1999-2003	Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny; stanowisko: asystent

4. **Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy:**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 5 powiązanych tematycznie publikacji, dotyczących charakterystyki molekularnej enzymów litycznych pochodzących z bakteriofagów termofilnych bakterii z rodzaju *Thermus* oraz białka LysC z *Clostridium intestinale* URNW. Enzymy te wykazują podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasowej do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan (PGRPs). Cykl zawiera 5 prac

oryginalnych. Prace te zostały opublikowane w latach 2014-2020. Dotyczą one zarówno badań funkcjonalnych, jak i powiązania pomiędzy strukturą, a funkcją lityczną wyżej wymienionych białek. Publikacje te są rezultatem interdyscyplinarnej współpracy z ośrodkami naukowymi oraz firmami biotechnologicznymi w Polsce i za granicą.

Łączna wartość wskaźnika cytowań IF dla prac składających się na osiągnięcie wynosi **19,095**. Łączna liczba punktów MNiSW dla prac składających się na osiągnięcie wynosi **580** pkt. (zgodnie z załącznikiem do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 18 grudnia 2019 r.).

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Analiza molekularna bakteriofagowych i bakteryjnych enzymów litycznych wykazujących podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan.

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

4.1 Plotka M., Kaczorowska A.K., Stefanska A., Morzywołek A., Fridjonsson O.F., Dunin-Horkawicz S., Kozłowski L., Hreggvidsson G.O., Kristjansson J.K., Dabrowski S., Bujnicki J.M., Kaczorowski T.: Novel highly thermostable endolysin from *Thermus scotoductus* MAT2119 bacteriophage Ph2119 with amino acid sequence similarity to eukaryotic peptidoglycan recognition proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 80(3), 2014, p. 886-895. (IF₂₀₁₄ **4,251**; MNiSW₂₀₁₄ = **40**).

4.2 Plotka M., Kaczorowska A.K., Morzywołek A., Makowska J., Kozłowski L.P., Thorisdottir A., Skirnisdottir S., Hjorleifsdottir S., Fridjonsson O.H., Hreggvidsson G.O., Kristjansson J.K., Dabrowski S., Bujnicki J.M., Kaczorowski T.: Biochemical characterization and validation of a catalytic site of a highly thermostable Ts2631 endolysin from the *Thermus scotoductus* phage vB_Tsc2631. *PLoS One* 10:e0137374, 2015. (IF₂₀₁₅ **3,057**; MNiSW₂₀₁₅ = **40**).

4.3 Plotka M.*, Sancho-Vaello E., Dorawa S., Kaczorowska, A.K., Kozłowski L.P., Kaczorowski T.*, Zeth K.: Structure and function of the Ts2631 endolysin of *Thermus scotoductus* phage vB_Tsc2631 with unique N-terminal extension used for peptidoglycan binding. *Scientific Reports* 9:1261; 2019; <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37417-6> 1. (IF₂₀₁₉ **4,120**; MNiSW₂₀₁₉ = **40**).

* - autor korespondencyjny

4.4 Plotka M.*, Kapusta M., Dorawa S., Kaczorowska A.K., Kaczorowski T.*: Ts2631 endolysin from the extremophilic *Thermus scotoductus* bacteriophage vB_Tsc2631 as an antimicrobial agent against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *Viruses* 11(7), 657; 2019; <https://doi.org/10.3390/v11070657>. (IF₂₀₁₉ **3,816**; MNiSW₂₀₁₉ = **30**; według nowej punktacji **100**). * - autor korespondencyjny

4.5 Plotka M.*, Szadkowska M., Håkansson M., Kovačič R., Al-Karadaghi S., Walse B., Werbowy O., Kaczorowska A.K. and Kaczorowski T.*: Molecular characterization of a novel lytic enzyme LysC from *Clostridium intestinale* URNW and its antibacterial activity mediated by positively charged N-terminal extension. *Int. J. Mol. Sci.* 2020,

21(14), 4894; <https://doi.org/10.3390/ijms21144894>. (IF₂₀₂₀ 4,556; MNiSW₂₀₂₀ = 140).
* - autor korespondencyjny

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego autora w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w **załączniku nr 5**. Oświadczenia habilitantki dotyczące wkładu w powstanie wykonanych prac znajdują się w **załączniku nr 4, punkt I.2**.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Światowa Organizacja Zdrowia WHO (World Health Organization) ostrzega, że do roku 2050 bakterie odporne na antybiotyki mogą być przyczyną śmierci ponad 10 mln osób, a liczba ta, jeśli nie zostaną podjęte żadne środki zaradcze w postaci rozwoju alternatywnych terapii, będzie większa niż liczba ofiar chorób nowotworowych (O' Neill, 2016). Po raz pierwszy terminu antybiotyk użył mikrobiolog Selman Waksman w 1942 roku podczas prac nad charakterystyką substancji organicznej, wytwarzanej przez drobnoustroje i mającej zdolność zabijania lub hamowania wzrostu innych mikroorganizmów. Strategia działania zespołu badawczego Waksmana pozwoliła na odkrycie szeregu naturalnych antybiotyków pochodzących z bakterii glebowych *Actinomycetes* (promieniowce). Niestety, okazało się, że naturalne źródło nowych grup antybiotyków zostało szybko wyczerpane, a w lecznictwie nowe ich odmiany ukazują się niezmiernie rzadko (Lewis, 2012).

Obecnie, jesteśmy świadkami intensywnych poszukiwań alternatywnych dla antybiotyków źródeł substancji o działaniu przeciwbakteryjnym. Oprócz, przeżywającej swój renesans terapii bakteriofagowej, enzymy rozkładające peptydoglikan ściany komórkowej mikroorganizmów wydają się być obiecującymi w zwalczaniu infekcji bakteryjnych. Peptydoglikan występuje zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych (Vollmer i in., 2008a). U tych ostatnich osłonięty jest błoną zewnętrzną, która stanowi efektywną barierę dla wielu makrocząsteczek. Polimer ten zbudowany jest z części cukrowej: N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym oraz przyłączonego do kwasu N-acetylmuraminowego krótkiego łańcucha peptydowego. Najczęściej jest on utworzony z pięciu reszt aminokwasowych: L-Ala- γ -D-Glu-kwas mezo-2,6-diaminopimelinowy, DAP (lub L-Lys)-D-Ala-D-Ala. Tzw. typ DAP peptydoglikanu występuje u większości bakterii Gram-ujemnych oraz u prątków i bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Clostridium*, typ Lys u większości bakterii Gram-dodatnich. U bakterii z grupy *Thermus* występuje natomiast typ A3 β peptydoglikanu charakteryzujący się występowaniem L-ornityny (L-Orn) w pozycji trzeciej łańcucha peptydowego. W procesie dojrzewania odcinana jest końcowa reszta D-Ala przez D,D-karbosypeptydazę alaninową. Poszczególne łańcuchy cukrowe peptydoglikanu są sieciowane w jedną trwałą strukturę dzięki tworzeniu się wiązań chemicznych pomiędzy grupą karboksylową D-Ala w pozycji czwartej, a grupą aminową kwasu diaminowego w pozycji 3 dwóch sąsiednich terapeptydów. Może być to wiązanie bezpośrednie bądź odbywać się poprzez krótkie mostki peptydowe (np. u *Staphylococcus aureus* jest to mostek pentaglicynowy) (Vollmer i in., 2008a). Hydrolazy peptydoglikanu to enzymy które ze względu na specyficzność substratową dzielimy na: N-acetylmuramidazy (lizozymy) oraz endo- β -N-acetyloglukozaminidazy katalizujące hydrolizę wiązań glikozydowych, endopeptydazy tnące wiązania peptydowe pomiędzy resztami

aminokwasowymi oraz amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowe tnące wiązania amidowe pomiędzy częścią cukrową, a tetrapeptydami (Borysowski i in., 2006). Osobną grupę stanowią lityczne transglikozylazy (np. produkt genu R faga λ) przeprowadzające reakcję rozszczepienia łańcucha glikanowego bez udziału wody. Ze względu na rolę oraz pochodzenie (np. bakteriofagowe lub bakteryjne) wszystkie te enzymy dzielimy na: endolizyny, egzolizyny oraz autolizyny (Schmelcher i in., 2012).

Endolizyny to enzymy produkowane przez bakteriofagi (często w skrócie nazywane fagami) w końcowej fazie cyklu litycznego degradujące strukturę peptydoglikanu co w rezultacie prowadzi do lizy komórki bakteryjnej i uwolnienia fagów potomnych do środowiska (Young, 2014). Jednym z klasycznych układów u bakteriofagów z genomem o strukturze dwuniciowego DNA jest tzw. system holina-endolizyna, gdzie małe hydrofobowe białka o nazwie holiny tworzą w błonie wewnętrznej mikropory przez które przedostają się aktywne endolizyny otrzymując dostęp do peptydoglikanu. Nazwa endolizyny pochodzi od połączenia przedrostka „endo”, czyli wewnątrz ze słowem „lysis” co po połączeniu oznacza lizę bakterii od wewnątrz. W 2001 roku w laboratorium Prof. Vincenta Fischetti po raz pierwszy użyto oczyszczonej endolizyny faga C₁ do zwalczania infekcji bakteryjnej myszy zakażonych *Streptococcus pyogenes* aplikując ją od zewnątrz (Nelson i in., 2001). Doświadczenia te zapoczątkowały szereg badań obejmujących terapeutyczne zastosowania tych enzymów, w których ewaluacji poddano m.in. endolizyny CF-301, SAL200, P128 i Staphefekt™ w zwalczaniu zakażeń *Staphylococcus aureus*, a prace te są na etapie badań klinicznych (Gerstmans i in., 2020). Co ważne, ponieważ celem działania endolizyn są wiązania chemiczne peptydoglikanu, a nie metabolicznie aktywne komórki, występowanie bakterii opornych na ich działanie jest niezwykle rzadkie (Love i in., 2018).

Problem jednak stanowią bakterie Gram-ujemne, gdyż w ich przypadku błona zewnętrzna jest nieprzepuszczalną barierą uniemożliwiającą endolizynom dotarcie do warstwy peptydoglikanu, a tylko niewielkie cząsteczki (<600 Da) przechodzą przez umiejscowione w błonie zewnętrznej poryny (Gutierrez i Briers, 2021). Ponieważ, cztery z grupy tzw. wielolekoopornych patogenów alarmowych ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter spp.*) to bakterie Gram-ujemne, naukowcy postanowili rozwiązać problem nieprzepuszczalności błony zewnętrznej stosując dwa podejścia: (i) metodami inżynierii genetycznej tworzono fuzję endolizyn z peptydami mającymi zdolność penetracji błony zewnętrznej, (ii) wraz z endolizynami stosowano środki chemiczne lub fizyczne osłabiające błonę zewnętrzną. Nieoczekiwanie, niektóre endolizyny posiadają naturalną zdolność przemieszczania się przez błonę zewnętrzną. To rzadkie zjawisko związane jest najczęściej z występowaniem amfipatycznej α -helisy w C-terminalnej części białka (Thandar i in., 2016; Peng i in., 2017). Przykład stanowi lizozym bakteriofaga T4 (Gutierrez i Briers, 2021).

Kolejną grupą substancji antybakteryjnych są egzolizyny (bakteriocyny). Enzymy te wytwarzane są przez bakterie w celu eliminacji zagrażających im pokrewnych gatunków. Jedną z najlepiej poznanych egzolizyn jest lizostafyna wydzielana przez *Staphylococcus simulans* biovar *staphyloliticus*. Enzym ten jest endopeptydazą tnącą peptydoglikan wielu gatunków bakterii z rodzaju *Staphylococcus* ze szczególnym uwzględnieniem *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA, ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Bastos i in., 2010).

Ostatnią grupą omawianych enzymów są autolizyny. Hydrolizują one i modyfikują peptydoglikan bakterii, które je produkują, biorąc udział w takich procesach jak wzrost i podziały komórkowe oraz dojrzewanie peptydoglikanu. Aktywność tych enzymów musi być ściśle regulowana, aby nie spowodować śmierci (lizy) komórek gospodarza (Vollmer i in., 2008b).

Zarówno endolizyny, egzolizyny, jak i autolizyny mogą wykazywać tę samą specyficzność względem substratu (tj. peptydoglikanu). Mogą mieć również podobną strukturę przestrzenną (Vermassen i in., 2019).

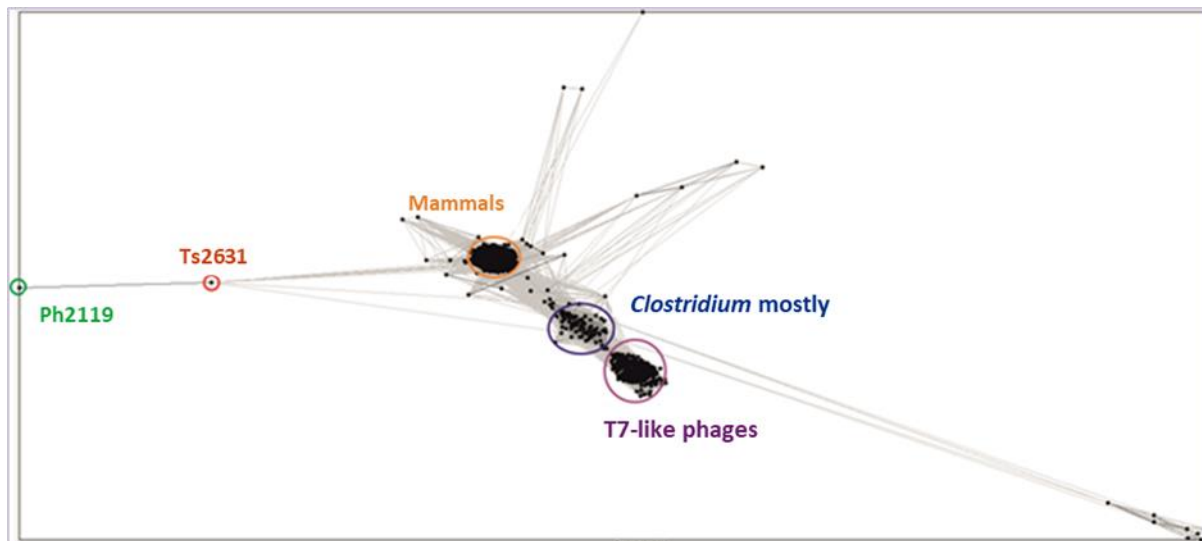
Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań nad enzymami litycznymi wpisują się w ogólnoświatowe wysiłki mające na celu znalezienie alternatywnych terapii w stosunku do infekcji wywoływanych przez groźne patogeny z grupy bakterii Gram-ujemnych.

A. Novel highly thermostable endolysin from *Thermus scotoductus* MAT2119 bacteriophage Ph2119 with amino acid sequence similarity to eukaryotic peptidoglycan recognition proteins. Applied and Environmental Microbiology 80(3), 2014, p. 886-895.

W ramach projektu “Exgenome molecular enzymes” (7 Program Ramowy Unii Europejskiej) rozpoczętego w 2012 roku, a w którym moja macierzysta jednostka brała udział, poddano analizie bioinformatycznej genomu bakteriofagów termofilnych wyizolowanych z gorących źródeł Islandii (współpraca z Instytutem Matis, Reykjavik, Islandia oraz laboratorium prof. Janusza Bujnickiego, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie). Moją uwagę zwrócił enzym lityczny o roboczej nazwie lizozym Ph2119. Wstępna analiza sekwencji aminokwasowej tego białka zbudowanego ze 155 reszt aminokwasowych sugerowała podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan. Byłam odpowiedzialna za opracowanie technologii nadprodukcji tego białka oraz jego charakterystykę biochemiczną (**publikacja 4.1**). Zaplanowałam wszystkie praktyczne eksperymenty zawarte w pracy. Syntetyczny gen *ph2119* klonowałam do wektora pET15b, a następnie **zaproponowałam strategię i przeprowadziłam optymalizację nadprodukcji i oczyszczania rekombinowanego białka oraz charakterystykę enzymu pod względem biochemicznym**. Mimo że endolizyny są potencjalnie toksyczne dla produkujących je komórek, Ph2119 jest pierwszą endolizyną bakteriofaga *Thermus* oczyszczoną w ilościach miligramowych (wydajność oczyszczania wynosiła ok. 24 mg/litr hodowli bakteryjnej). Przykładowo, jedyny ówczesnie częściowo scharakteryzowany lizozym faga ϕ IN93 *Thermus aquaticus* TZ2 oczyszczono w ilości 0.0072 mg wychodząc z 600 ml lizatu bakteryjnego (Matsushita i Yanase, 2008).

Analiza podobieństwa enzymu Ph2119 do innych tego typu białek znajdujących się w bazach danych wskazała na 22% identyczność sekwencji aminokwasowej białka z sekwencją lizozymu bakteriofaga T7 oraz 23% identyczność z lizozymem T3. Enzym wykazywał również podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan (PGRPs), biorących udział we wrodzonej odporności immunologicznej, a odkrytych zarówno u insektów, jak i u ssaków. **Co ciekawe, na poziomie sekwencji aminokwasowej, enzym ten nie był podobny**

do żadnego znanego dotychczas enzymu litycznego pochodzącego z mikroorganizmu termofilnego (Ryc. 1).



Ryc. 1. Podobieństwo sekwencji pierwszorzędowej endolizyny Ph2119 (zaznaczonej kolorem zielonym) do dostępnych sekwencji białek ssaków, bakterii i wirusów. Analizę wykonano przy użyciu aplikacji CLuster ANalysis of Sequences (CLANS) (Frickey i Lupas 2004), zmodyfikowano za Prof. Kornelius Zeth. Endolizyna Ph2119 wykazuje 74% identyczności sekwencji z (opisaną w publikacji 4.2) endolizyną Ts2631 (kolor czerwony) oraz podobieństwo do ssaczych białek rozpoznających peptydoglikan (PGRPs). Co ciekawe, endolizyna wykazuje podobieństwo do lizozymu bakteriofaga T7 *E. coli*, ale nie jest podobna do żadnych potencjalnych białek litycznych z bakteriofagów termofilnych.

Po analizie dostępnej literatury (Schmelcher i in., 2012) oraz sekwencji aminokwasowej enzymu stwierdziłam jednak błędne przypisanie białku określenia lizozym. Lizozym (inaczej N-acetylmuramidaza lub muramidaza) hydrolizuje wiązanie 1,4- β -glikozydowe części cukrowej peptydoglikanu. Natomiast analiza BLASTP sekwencji Ph2119 wskazała, że jest to amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa typu 2 (co sugeruje chociażby obecność charakterystycznego dla amidaz centrum aktywnego koordynującego jon cynku, a składającego się z dwóch histydyn i cysteiny). Dlatego też, pomimo wstępnego, błędnego przypisania białku funkcji lizozymu, podobnie jak błędne jest nazewnictwo lizozymu T7, będącego również amidazą N-acetylmuramylo-L-alaninową, a nazywanego lizozymem jedynie ze względów historycznych, w dalszej części pracy używałam poprawnego nazewnictwa określając Ph2119 jako endolizynę (ze względu na pochodzenie bakteriofagowe) lub jako amidazę N-acetylmuramylo-L-alaninową. **Jest to pierwsza amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa typu 2 wyizolowana z faga termofilnego.** W dalszej kolejności zoptymalizowałam metody badania jego aktywności i wprowadziłam do użycia odpowiednie protokoły metodologiczne. **Nowością pracy jest eksperymentalne potwierdzenie aktywności litycznej potencjalnej endolizyny Ph2119.** Określiłam optymalne warunki aktywności enzymu, w tym pH, stężenie NaCl, czy optymalną temperaturę działania. Na przykładzie endolizyny Ph2119, **po raz pierwszy udało się wykazać działanie lityczne enzymu pochodzącego z organizmu termofilnego wobec peptydoglikanu mezofilnych bakterii Gram-ujemnych.** W przypadku endolizyny Ph2119 były to bakterie takie jak: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens* oraz *Salmonella enterica* serovar Panama. Bakterie te przygotowywano poprzez permeabilizację chloroformem co umożliwiło endolizynie dotarcie z zewnątrz do warstwy peptydoglikanu (publikacja 4.1). **Udowodniłam również unikatową**

termostabilność badanego enzymu. Wyniki opisane w pracy stanowią istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat funkcji dotychczas mało znanych termostabilnych enzymów litycznych. Pomimo znacznych wysiłków w badaniach nad enzymami z fagów mezofilnych, jedynymi dotąd scharakteryzowanymi termofilnymi endolizynami były: lizozym faga ϕ IN93 *Thermus aquaticus* TZ2 (Matsushita i Yanase, 2008) oraz enzym lityczny GVE2 z termofilnego bakteriofaga *Geobacillus sp.* (Ye i Zhang, 2008). Enzymy te nie wykazują podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej do endolizyny Ph2119.

B. Biochemical characterization and validation of a catalytic site of a highly thermostable Ts2631 endolysin from the *Thermus scotoductus* phage vB_Tsc2631. PLoS One 10:e0137374, 2015.

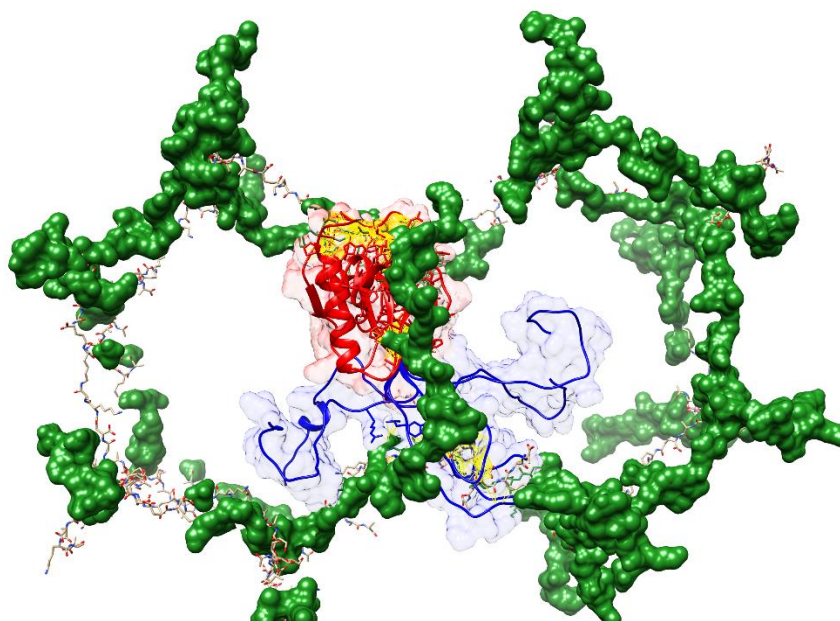
Kolejnym białkiem budzącym moje zainteresowanie była endolizyna Ts2631 pochodząca z bakteriofaga vB_Tsc2631 infekującego komórki *Thermus scotoductus* MAT2631. Enzym ten na poziomie sekwencji aminokwasowej wykazuje 74% identyczności z endolizyną Ph2119 bakteriofaga MAT2119 również infekującego *Thermus scotoductus*. W wyniku współpracy z Instytutem Matis z Islandii w ramach projektu Exgenomes otrzymaliśmy konstrukt plazmidowy pJOE3075 zawierający gen *ts2631* kodujący endolizynę pod kontrolą promotora ϕ 10 faga T7, jednakże próby nadprodukcji białka zakończyły się niepowodzeniem. W kolejnym kroku wykonałam klonowanie genu *ts2631* do wektora pET15b, optymalizację nadprodukcji i oczyszczania białka. Następnie, stworzyłam koncepcję pracy i zaplanowałam wszystkie eksperymenty przedstawione w prezentowanej publikacji. Wykorzystując modelowy substrat, permeabilizowane chloroformem komórki *Thermus thermophilus* HB8 i testy redukcji zmętnienia zawiesiny bakterii (ang. turbidity reduction assays) określiłam funkcję lityczną enzymu w zależności od wartości pH, stężenia NaCl, oraz temperatury. **Nowym elementem uzyskanym w tej pracy było eksperymentalne potwierdzenie wpływu jonów metali, w szczególności jonów Zn^{2+} na aktywność lityczną enzymu. Endolizyna Ts2631 wykazywała również wysoką aktywność po wielogodzinnej inkubacji w 95°C, co świadczy o unikatowej termostabilności tego białka.** Parametrem, który precyzyjnie opisuje stabilność termiczną białek jest temperatura topnienia T_m (ang. melting temperature), w której 50% białka znajduje się w postaci rozfałdowanej. Określenie T_m pozwala na odróżnienie rzeczywistej termostabilności badanego białka od stanu, gdy enzym ulega denaturacji w wysokiej temperaturze, a po obniżeniu temperatury następuje jego renaturacja i przywrócenie aktywności (Briers i in., 2007). Parametr ten pozwala na porównanie właściwości białek izolowanych z organizmów termostabilnych i mezofilnych (Kumar i in., 2000). **We współpracy z Dr hab. Joanną Makowską, prof. UG z Wydziału Chemii przy pomocy różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) określiłam temperaturę $T_m=99.82^\circ C$ endolizyny Ts2631. Wynik ten wyróżnia endolizynę Ts2631 jako najbardziej termostabilne białko spośród dotychczas tego typu poznanych.** Oryginalnym wkładem jakiej praca wnosi w badania nad endolizynami bakteriofagów jest również określenie funkcjonalności centrum katalitycznego enzymu. W tym celu w oparciu o analizę porównawczą (lizozym faga T7) oraz model molekularny enzymu wytypowałam pięć reszt aminokwasowych, których istotność analizowałam wykorzystując mutagenезę miejscowo-specyficzną genu *ts2631*. W jej wyniku uzyskałam pięć wariantów substytucyjnych endolizyny Ts2631 (H30N, Y58F, H131N, T137K, C139S), które następnie nadprodukowałam i oczyściłam. Wykazałam znacznie obniżoną aktywność lityczną badanych wariantów w porównaniu do natywnej formy białka (wyniki częściowo umieszczone w pracy

magisterskiej mgr Agnieszki Morzywołek wykonanej pod moim nadzorem). Badane warianty endolizyny Ts2631 wykazywały również obniżoną stabilność w wyższych temperaturach. **Endolizyna Ts2631 jest pierwszą endolizyną z termofilnego bakteriofaga, którego funkcjonalność centrum katalitycznego (reszty H30, Y58, H131 i C139) została eksperymentalnie potwierdzona.** Budowa tego centrum wykazuje podobieństwo nie tylko do centrum aktywnego lizozymu faga T7, ale także do centrum aktywnego eukariotycznych białek PGRPs posiadających aktywność katalityczną amidaz.

C. Structure and function of the Ts2631 endolysin of *Thermus scotoductus* phage vB_Tsc2631 with unique N-terminal extension used for peptidoglycan binding. Scientific Reports 9:1261; 2019.

Pod względem strukturalnym endolizyny bakteriofagowe cechuje obecność dwóch domen: katalitycznej - EAD (ang. enzymatically active domain) oraz domeny wiążącej ścianę komórkową bakterii - CBD (ang. cell wall-binding domain) (Schmelcher i in., 2012). Dotychczas scharakteryzowano 24 warianty domeny EAD oraz 13 wariantów domeny CBD opisując białka o różnej kombinacji obu domen (Oliveira i in., 2013). Najczęściej konformacja „modułowa” (EAD + CBD) dotyczy endolizyn pochodzących z bakteriofagów infekujących komórki bakterii Gram-dodatnich oraz mykobakterii. Endolizyny fagów bakterii Gram-ujemnych często nie posiadają domeny CBD (Oliveira i in., 2018), dlatego interesującym mnie zagadnieniem było, **jak termofilna endolizyna Ts2631 składająca się tylko z domeny katalitycznej EAD, przy braku domeny CBD wiąże peptydoglikan bakteryjny.** Byłam pomysłodawcą wszystkich doświadczeń opisanych w pracy. Wraz z Prof. Tadeuszem Kaczorowskim nawiązaliśmy współpracę z krystalografem Prof. Korneliusem Zeth (obecnie Roskilde University, Roskilde, Dania) w celu zbadania struktury krystalicznej endolizyny Ts2631. Przeprowadziłam niełatwą optymalizację oczyszczania białka uzyskując stężenie wynoszące ponad 10 mg/ml w buforze bez dodatkowych substancji stabilizujących takich jak glicerol, czy NaCl. **Badania zaowocowały otrzymaniem, charakterystyką i zdeponowaniem struktury krystalicznej endolizyny Ts2631 w bazie PDB (Protein Data Bank) pod numerem akcesyjnym 6FHG. Tym samym endolizyna Ts2631 jest pierwszą endolizyną faga termofilnego o poznanej strukturze przestrzennej.** Badania krystalograficzne określiły konformację endolizyny Ts2631 jako dimer. Wykonane przeze mnie sączenie molekularne SEC (ang. size exclusion chromatography) wykazały obecność w rozworze monomerycznej formy białka. Dodatkowe badania z użyciem analitycznego ultrawiórowania (dzięki nawiązanej przeze mnie współpracy z Dr Romanem Szczepanowskim, Pracownia aparaturowa, Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie), ostatecznie potwierdziły monomeryczną konformację enzymu w środowisku wodnym. Analizy bioinformatyczne pozwoliły mi na wytypowanie 19 reszt aminokwasowych, konserwowanych w sekwencji białka, a mających prawdopodobny wpływ na jego aktywność oraz specyficzność względem peptydoglikanu. Przeprowadziłam mutagenezę miejscowo-specyficzną genu *ts2631* uzyskując 19 pojedynczych wariantów substytucyjnych reszt aminokwasowych endolizyny Ts2631 (H31A, T32A, A33G, P54A, Y60A, R64A, D65A, R67A, Y69A, K70A, L72A, I79A, C80A, N85A, G95A, D96A, N133A, V135A, E138A). Po nadprodukcji i oczyszczeniu wymienionych wariantów oraz dodatkowych 5 wariantów substytucyjnych w centrum katalitycznym (**publikacja 4.2**) **dysponowałam 24 wariantami endolizyny Ts2631, które posłużyły do analizy specyficzności substratowej enzymu.** W

pierwszej kolejności sprawdziłam funkcjonalność badanych wariantów w porównaniu do enzymu typu dzikiego. **Oryginalnym wkładem pracy jest określenie aminokwasów kluczowych dla aktywności litycznej endolizyny Ts2631 jako przedstawiciela endolizyn bakteriofagów *Thermus*.** Niezbędne do zachowania aktywności litycznej białka Ts2631 oprócz aminokwasów wchodzących w skład centrum katalitycznego okazało się 6 reszt aminokwasowych: H31, T32, Y60, K70, C80 oraz N85. Zamiana tych aminokwasów na alaninę, nie powoduje zmian konformacyjnych enzymu co potwierdziłam przy pomocy techniki dichroizmu kołowego (CD, ang. circular dichroism). W kolejnym etapie badań zoptymalizowałam procedurę oczyszczania peptydoglikanu bakterii *Thermus thermophilus* HB8 (Desmarais i in., 2014) oraz testy wiązania peptydoglikanu wykorzystanych po raz pierwszy do badania specyficzności substratowej endolizyn, a zaadoptowanych na podstawie metodyki używanej do badań nad eukariotycznymi białkami PGRPs (Yoshida i in., 1996). Testy te przeprowadzone przeze mnie oraz pod moim kierunkiem przez magistranta Sebastiana Dorawę wykazały brak wiązania peptydoglikanu *Thermus* w przypadku dwóch wariantów substytucyjnych: Y60A oraz K70A. Warianty te wykazywały również obniżoną aktywność lityczną, natomiast mogły oddziaływać z częścią cukrową peptydoglikanu poprzez oddziaływania CH- π oraz wiązania wodorowe (publikacja 4.3). Co ciekawe, zarówno reszta Y60 jak K70, nie znajdowały się w rowku wiążącym peptydoglikan, a po przeciwnej stronie cząsteczki białka i są pierwszymi tego typu aminokwasami wytypowanymi w przypadku amidaz typu 2 do oddziaływania z peptydoglikanem. Regionem endolizyny Ts2631, który również zwrócił moją uwagę był dodatnio naładowany N-terminalny region białka (reszty aminokwasowe 1-20, w obrębie których znajduje się 6 arginin i 1 lizyna). **Wykazałam eksperymentalnie, że endolizyna Ts2631 ma unikatowe właściwości lityczne wobec bakterii *Thermus* (pomimo obecności błony zewnętrznej w strukturze ściany komórkowej), a w aktywności tej pośredniczy dodatnio naładowany N-terminalny fragment enzymu. Region ten odpowiedzialny jest również za oddziaływanie enzymu z peptydoglikanem.** Wizualizację tych oddziaływań uzyskałam w wyniku współpracy z Dr Łukaszem Kozłowskim (Wydział Matematyki, Informatyki i Mechaniki, Uniwersytet Warszawski) oraz otrzymując współrzędne struktury peptydoglikanu w wyniku nawiązanej współpracy z Prof. Shahriar Mobashery (University of Notre Dame, USA). Model oddziaływania endolizyny Ts2631 z peptydoglikanem pokazuje wiązanie rdzenia katalitycznego enzymu z polimerem, jak również możliwe położenia elastycznego N-terminalnego regionu białka, który pomaga w dokowaniu białka do peptydoglikanu (Ryc. 2).



Ryc. 2. Model endolizyny Ts2631 wiążącej peptydoglikan. Przedstawiono globularny rdzeń katalityczny enzymu (kolor czerwony) oraz elastyczny N-terminalny region (kolor niebieski), który może przyjmować szereg konformacji. Obie części białka są niezbędne do wiązania peptydoglikanu (możliwe oddziaływania oznaczono kolorem żółtym) (publikacja 4.3).

Przedstawione w pracy powiązanie badań strukturalnych endolizyny Ts2631 z danymi eksperymentalnymi wnoszą istotny wkład w zrozumienie zależności struktura-funkcja endolizyn bakteriofagów termofilnych.

D. Ts2631 endolysin from the extremophilic *Thermus scotoeductus* bacteriophage vB_Tsc2631 as an antimicrobial agent against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. Viruses 11(7), 657; 2019.

Odkrycie właściwości litycznych endolizyny Ts2631 wobec komórek *Thermus thermophilus* HB8 bez osłabionej/usuniętej błony zewnętrznej ściany komórkowej skłoniły mnie do kontynuowania tej ścieżki badań. Głównym pytaniem które sobie postawiłam było, czy możliwe jest wykorzystanie termostabilnej endolizyny Ts2631 jako czynnika o działaniu przeciwbakteryjnym?

W kolejnych eksperymentach wykazałam zwiększoną aktywność endolizyny Ts2631 wobec komórek bakterii z rodzaju *Thermus* w obecności EDTA oraz odwrotną zależność po dodaniu kwasu cytrynowego oraz kwasu maleinowego. EDTA oraz kwasy cytrynowy i maleinowy to naturalnie występujące związki powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, czy farmaceutycznym, a ich dodatek nie jest szkodliwy dla zdrowia człowieka (Oliveira i in., 2014). Osłabiają one natomiast błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych, ułatwiając dostęp do peptydoglikanu endolizynom bakteriofagowym.

W badaniach wykorzystałam dziewięć wielolekoopornych szczepów bakterii Gram-ujemnych. Testy antybakteryjne przeprowadzone w nieoptymalnej dla funkcjonalności endolizyny temperaturze 37°C wykazały jej aktywność bakteriobójczą wobec dwóch groźnych patogenów bakteryjnych *Acinetobacter baumannii* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. **W ten**

sposób wykazałam, że endolizyna Ts2631 jest pierwszą endolizyną z bakteriofaga termofilnego o potwierdzonej eksperymentalnie aktywności przeciwbakteryjnej w 37°C. Zarówno *Acinetobacter baumannii* jak i *Pseudomonas aeruginosa* należą do bakterii rzędu *Pseudomonadales*. Bakterie z rzędu *Enterobacteriales* takie jak *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Klebsiella pneumoniae*, czy *Enterobacter cloacae* nie były podatne na działanie endolizyny Ts2631. Dopiero dodatek EDTA uwrażliwił komórki tych bakterii na działanie endolizyny. **Wykazałam aktywność endolizyny Ts2631 wobec wszystkich badanych szczepów bakterii w obecności EDTA**, ze szczególnym podkreśleniem wrażliwości *C. braakii* (ponad 6 jednostek logarytmicznego spadku liczebności). Podobne doświadczenia w obecności kwasu maleinowego oraz cytrynowego wykonałam z pomocą magistranta Sebastiana Dorawy (praca magisterska wykonana pod moim kierunkiem). Podobnie jak w testach z wykorzystaniem substratu *Thermus*, tak w przypadku testów antybakteryjnych przeciwko mezofilnym bakteriom Gram-ujemnym dodatek obu kwasów tylko w niewielkim stopniu poprawił działanie endolizyny Ts2631. Największy logarytmiczny spadek liczby komórek zanotowano w przypadku bakterii *Acinetobacter baumannii* CRAB KPD 205 w obecności kwasu cytrynowego (**publikacja 4.4**). Dzięki nawiązaniu współpracy z Dr hab. Magdaleną Narajczyk, Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, zastosowałam transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) w celu zobrazowania działania antybakteryjnego endolizyny Ts2631. Stosując komórki *Thermus thermophilus* HB8 udało się uwidocznić degradację warstwy peptydoglikanu bakterii *Thermus*, a w przypadku bakterii *A. baumannii* wykonane zostały unikatowe w przypadku endolizyn zdjęcia wpływu zawartości cytoplazmy komórki poprzez punktowe uszkodzenia ściany komórkowej. Zaprojektowałam również eksperymenty z użyciem barwnika SynapoRed C2, specyficznego m. in. wobec błon bakteryjnych. Współpraca z Dr Małgorzatą Kapustą (Katedra Cytologii i Embriologii Roślin, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego) **zaowocowała wykonaniem zdjęć z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej obrazujących podwójną funkcję endolizyny Ts2631 biorącej udział zarówno w destabilizacji błony zewnętrznej jak i w degradacji peptydoglikanu**. Zdjęcia preparatów wykonanych po dodaniu endolizyny Ts2631 do zawiesiny bakterii zobrazowały lizę większości komórek. Interesujące było to, że pomimo lizy zachowany został prawidłowy kształt wielu komórek przy obserwacji preparatów w świetle widzialnym, czy po barwieniu komórek barwnikiem DAPI specyficznym dla DNA. Komórki te nie barwiły się SynapoRed C2 co pozwoliło na ustalenie sekwencji zdarzeń prowadzących do lizy bakterii, czyli początkowe uszkodzenie błon komórkowych, a dopiero w drugiej kolejności degradacja peptydoglikanu i liza komórki. Wykorzystanie zaprojektowanego przeze mnie, nadprodukowanego i oczyszczonego wariantu delecyjnego endolizyny Ts2631 (Δ 2-22) pozwoliło również na zaobserwowanie braku lizy bakterii, w przypadku braku regionu N-terminalnego enzymu. Wynik ten pozwolił na sformułowanie wniosku, że N-terminalny region białka odpowiada za destabilizację bakteryjnych błon komórkowych. **Prowadzone badania są niezmiernie istotne z punktu widzenia zrozumienia funkcji endolizyn bakteriofagowych i ich potencjału aplikacyjnego. Ponieważ endolizyna Ts2631 jest pierwszą ekstremofilną endolizyną o potwierdzonym szerokim potencjale antybakteryjnym, badania te pozwolą na skierowanie uwagi na praktyczne zastosowanie dotychczas niedocenionych endolizyn izolowanych ze środowisk ekstremalnych, takich jak gorące źródła.**

E. Molecular characterization of a novel lytic enzyme LysC from *Clostridium intestinale* URNW and its antibacterial activity mediated by positively charged N-terminal extension. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(14), 4894.

Obie badane termofilne endolizyny Ph2119 oraz Ts2631 wykazują podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasowych do szeregu potencjalnych enzymów litycznych bakterii z rodzaju *Clostridium*. Po konsultacji z Dr n. med. Anną Kaczorowską do dalszych badań wybrałam prawdopodobny enzym lityczny LysC (172 aa) z Gram-dodatniej bakterii *Clostridium intestinale* URNW (nr akcesyjny ERK30183.1). Z użyciem metody zymogramu (zmieszanie bakterii z żelem rozdzielającym w elektroforezie poliakryloamidowej) potwierdziłam aktywność enzymu wobec komórek *C. intestinale* DSM 6191, jak również *C. sporogenes* DSM 767, *B. cereus* ATCC 13061, *M. luteus* ATCC 4698 oraz *S. aureus* ATCC 25923. Enzym nie był aktywny wobec bakterii *C. perfringens* Cp39 oraz *B. subtilis* 168 DSM 23778. Niestety jednak, popularne i łatwe w analizie testy TRA (ang. turbidity reduction assays), oceny spadku gęstości optycznej zawiesiny bakterii po dodaniu enzymu, nie przyniosły zadowalających rezultatów. Gęstość optyczna zawiesiny bakterii *C. intestinale* DSM 6191 nie spadała po dodaniu enzymu, niezależnie od zmiany buforu, pH, czy ilości NaCl w reakcji. Uniemożliwiało to zbadanie w prosty sposób zależności aktywności enzymu od zmian pH, stężenia NaCl, czy temperatury reakcji. Ponadto hodowla beztlenowej bakterii *C. intestinale* przysparzała dużych problemów technicznych i niemożliwe było przeprowadzenie standardowych testów antybakteryjnych, odróżnienie i policzenie pojedynczych kolonii uzyskanych na płytkach z podłożem do hodowli tych bakterii. Ponieważ enzym lityczny LysC był aktywny wobec komórek *S. aureus* ATCC 25923 w metodzie zymogramu, postanowiłam użyć tej bakterii jako substratu w testach antybakteryjnych. Otrzymanie pozytywnego wyniku (ponad 5 względnych jednostek logarytmicznego spadku ilości bakterii po dodaniu enzymu) pozwoliło na kontynuację badań. Byłam autorką koncepcji tych badań i zaplanowałam wszystkie doświadczenia praktyczne zawarte w pracy. **Eksperymentalna weryfikacja aktywności białek o przypisanej bioinformatycznie (*in silico*) aktywności litycznej uzyskana w tej pracy jest podstawą i punktem wyjścia w praktycznym zastosowaniu tych enzymów.** Dlatego też, po przeprowadzeniu analiz porównawczych (publikacja 4.5) postanowiłam przeprowadzić walidację struktury centrum katalitycznego enzymu, w którego skład (podobnie jak w przypadku termostabilnej endolizyny Ph2119, której struktura krystaliczna została określona w niniejszej pracy), wchodziły dwie reszty histydyny (H50 i H51), tyrozyna (Y76) oraz cysteina (C155). Do przeprowadzonej przeze mnie mutagenyzy miejscowo-specyficznej wybrałam jeszcze 3 konserwowane aminokwasy leżące w pobliżu centrum aktywnego: treoninę (T52), histydynę (H147) oraz treoninę (T153). Dużym zaskoczeniem była tylko w niewielkim stopniu obniżona aktywność wariantów białka z mutacjami centrum katalitycznego wobec *S. aureus* ATCC 25923. Dlatego też w dalszym etapie badań we współpracy z Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Wydziału Biologii UG wykonane zostały zdjęcia z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM do zobrazowania działania białka LysC. Zdjęcia te wykazały nieprawidłowe nagromadzenie i pofałdowanie błon komórkowych w komórkach *S. aureus* po traktowaniu bakterii enzymem LysC. Otrzymany wynik wskazywał na inny mechanizm działania białka LysC w porównaniu do wcześniej badanych endolizyn fagów *Thermus*. Postawiłam zatem pytanie, jaka cecha enzymu LysC odpowiada za jego aktywność przeciwbakteryjną? Moja uwaga skupiła się na dodatnio naładowanym N-terminalnym regionie białka. Analiza struktury krystalicznej białka

LysC wykonana w ramach niniejszej pracy wykazała, że region ten nie ma stabilnej struktury i należy do tak zwanych regionów wewnętrznie nieuporządkowanych IDR (z ang. intrinsically disordered regions). Analizy *in silico* z użyciem aplikacji internetowej AMPA do oceny potencjalnej obecności domen przeciwdrobnoustrojowych w białkach oraz kalkulatora peptydów antybakteryjnych APD3, wykazały, że region ten może wykazywać aktywność przeciwbakteryjną poprzez oddziaływanie z błonami bakteryjnymi. Na potwierdzenie stawianej hipotezy badawczej wykazałam, że białko LysC bez N-terminalnego regionu (wariant delecyjny pozbawiony reszt aminokwasowych 2-23) nie było aktywne wobec komórek *S. aureus*. Postanowiłam nawiązać współpracę z Dr hab. Elżbietą Jankowską, prof. UG (Katedra Chemii Biomedycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański), która zsyntetyzowała peptyd odpowiadający 30 pierwszym resztom aminokwasowym białka LysC. Peptyd ten okazał się być aktywnym czynnikiem antybakteryjnym wobec komórek *S. aureus* ATCC 25923 na poziomie odpowiadającym aktywności rekombinowanego enzymu. Ponadto doktorantka Monika Szadkowska w ramach pracy doktorskiej wykonała pod moim kierunkiem analizy strukturalne peptydu (nazwanego przeze mnie Intestinaliną od nazwy *C. intestinale*) ukazujące jego helikalną strukturę w obecności detergentów takich jak laurylosiarczan sodu (SDS), czy dodecylphosphocholine (DPC), strukturalnie „udających” błony bakteryjne. Badania te zostały sfinansowane w ramach przyznanego mi finansowania działania naukowego w projekcie MINIATURA3 Narodowego Centrum Nauki.

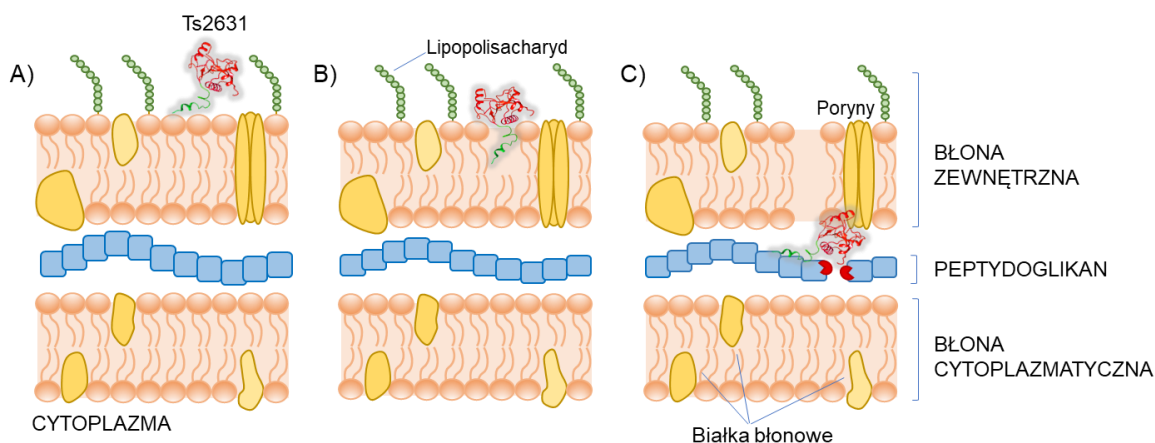
W pracy po raz pierwszy eksperymentalnie potwierdziłam działanie antybakteryjne enzymu litycznego LysC z bakterii *C. intestinale* URNW. Wykazałam również mechanizm bakteriobójczego działania białka, oraz szczególną rolę jego N-terminalnego regionu. Scharakteryzowałam bakteriobójcze działanie nowego syntetycznego peptydu Intestinaliny, stanowiącego 30 pierwszych aminokwasów N-terminalnego regionu enzymu LysC.

Za swoje najważniejsze osiągnięcia uważam:

- Wykazanie aktywności trzech wytypowanych po analizie bioinformatycznej enzymów litycznych, w tym dwóch endolizyn fagowych Ph2119 oraz Ts2631, a także enzymu litycznego LysC o pochodzeniu bakteryjnym
- Walidację centrum katalitycznego endolizyny Ts2631, pierwszej pochodzącej z bakteriofaga ekstremofilnego (vB-Tsc2631).
- Określenie stabilności termicznej endolizyn Ph2119 oraz Ts2631, w tym ustalenie wartości temperatury topnienia T_m (ang. melting temperature) endolizyny Ts2631, jako pierwszej endolizyny z termofilnego faga, której parametr ten został określony.
- Funkcjonalno/strukturalną charakterystykę endolizyny Ts2631, w tym odkrycie reszt aminokwasowych regionu białka odpowiedzialnego za wiązanie peptydoglikanu.
- Wykazanie po raz pierwszy działania bakteriobójczego endolizyny z faga termofilnego w stosunku do antybiotykoopornych, mezofilnych bakterii Gram-ujemnych
- Określenie funkcji wysoko dodatnio naładowanych N-terminalnych regionów białek litycznych (na podstawie endolizyny Ts2631 (Ryc. 3) oraz białka litycznego LysC), co może się przełożyć na zrozumienie funkcji podobnych regionów innych białek o aktywności przeciwbakteryjnej.
- Określenie aktywności bakteriobójczej syntetycznego peptydu antybakteryjnego, Intestinaliny.

W 2014 roku Prof. Rob Lavigne oraz Prof. Yves Briers wprowadzili pojęcie Artilysin® jako określenie rekombinowanych endolizyn fagowych posiadających zdolność penetracji błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych otrzymanych w wyniku fuzji enzymów litycznych z (najczęściej polikationowymi) peptydami antybakteryjnymi takimi jak PCNP (polycationic nonapeptide) (Briers i in., 2014). Ponadto, w 2020 r. została zaproponowana nowa metodologia (a VersaTile-driven platform) otrzymywania tysięcy wariantów rekombinowanych endolizyn o różnej budowie domenowej, a tym samym o różnej specyficzności substratowej, szybkości działania, czy stabilności (Gerstmans i in., 2020).

Prowadzone przeze mnie analizy doskonale wpisują się w nurt tych badań. Po pierwsze odkrycie i szczegółowa charakterystyka termostabilnych endolizyn o budowie globularnej może przyczynić się do wykorzystania ich w przyszłości jako części składowe (cegiełki) w procesie tworzenia nowych rekombinowanych endolizyn o unikalnych właściwościach (takich jak oporność na działanie wysokiej temperatury). Po drugie odkryłam istnienie naturalnych białek, których N-terminalne polikationowe regiony odpowiadają za destabilizację bakteryjnych błon komórkowych. Regiony te również mogą zostać wykorzystane w inżynierii genetycznej fuzyjnych białek litycznych o ulepszonych właściwościach przeciwbakteryjnych. Proponowany mechanizm działania takich białek litycznych przedstawiłam schematycznie na przykładzie aktywności endolizyny Ts2631 (Ryc. 3).



Ryc. 3. Schemat aktywności litycznej endolizyny Ts2631. Poprzez dodatnio naładowany N-terminalny region białko oddziałuje (A) i destabilizuje (B) bakteryjną błonę zewnętrzną, a następnie degraduje warstwę peptydoglikanu (C) w wyniku aktywności katalitycznej (białko posiada domenę amidazy N-acetylomuramyl-L-alaninowej).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

A. Praca naukowa

Studia rozpoczęłam w 1995 roku na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny). Już w trakcie drugiego roku studiów rozpoczęłam prace badawcze w zespole Prof. dr hab. Janusza Limona w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki ówczesnej Akademii Medycznej

w Gdańsku, które zaowocowały pierwszymi doniesieniami zjazdowymi (pod panińskim nazwiskiem Szczygiel):

- M. Perkowska, **M. Szczygiel**: Influence of sodium nitroprusside (NaNP) on sister chromatid exchange frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. Maj 1998, 6-th International Students' scientific Conference, Gdansk, Poland
- M. Perkowska, **M. Szczygiel**: Influence of diethylenetriamine (DETA) and sodium nitroprusside (NaNP) on sister chromatid exchange frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. 22-25 September 1998, 13th Symposium of Polish Society of Genetics, Warsaw, Poland
- **M. Szczygiel**, M. Gruchala, W. Dubaniewicz, K. Ochman, D. Ciecwierz, A. Rynkiewicz, J. Limon: The PLA1/PLA2 glycoprotein IIIa Polymorphism is not associated with increased risk for coronary artery disease and myocardial infraction in the population of the north region of Poland. 24-26 Maj 1999, 2nd Symposium of Polish Society of Human Genetics, Poznań, Poland

oraz w 2001 roku publikacją:

- M. Perkowska, **M. Szczygiel**, A. Wozniak, J. Limon: Influence of diethylenetriamine (DETA) and sodium nitroprusside (NaNP) on sister chromatid exchange frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. J. Appl. Genet. 42(1), 2001, p. 233-235

W lutym 1998 odbyłam również pierwszy dwutygodniowy staż naukowy w grupie Prof. dr hab. Jerzego Bala w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. Ponadto jako studentka czwartego roku Biotechnologii uczestniczyłam w organizacji międzynarodowego sympozjum: 7th Symposium of the European Society for the Study of Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Gdańsk, Polska, uczestnicząc w rejestracji uczestników i biorąc udział w organizacji wycieczek fakultatywnych.

Po ukończeniu studiów w 1999 r., w poszukiwaniu swojej drogi badawczej rozpoczęłam pracę w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Tam pod kierunkiem Dr hab. Władysława Werela prowadziłam badania nad regulacją procesu transkrypcji u bakterii zdobywając doświadczenie w pracy z DNA (klonowanie genów) oraz przy oczyszczaniu białek. Tam również po raz pierwszy jako nauczyciel akademicki prowadziłam ćwiczenia z mikrobiologii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego.

W 2002 r. wyjechałam na 15 miesięczny staż naukowy odbywany w zespole Prof. Lei Sistonen, Uniwersytet Åbo Akademi, Turku Centre for Biotechnology, Turku, Finlandia otrzymując stypendium CIMO (Centre for International Mobility) pod patronatem fińskiego Ministerstwa Edukacji i Kultury. W laboratorium Prof. Sistonen pracowałam głównie z komórkami eukariotycznymi zajmując się badaniami nad regulacją działania różnorodnych ssaczych czynników transkrypcyjnych HSF (ang. heat shock factors).

Po powrocie do kraju w 2003 r. zostałam słuchaczką Studium Doktoranckiego macierzystego Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W zespole Prof. dr hab. Jarosława Marszałka prowadziłam badania nad rolą mitochondrialnego białka opiekuńczego Hsp40 (Mdj1) oraz dwufunkcyjnego białka Ilv5 (główna rola w biosyntezie aminokwasów rozgałęzionych) w utrzymywaniu stabilności mitochondrialnego DNA drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Wyniki badań zostały opublikowane w postaci dwóch prac w wysoko punktowanym czasopiśmie *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (punkty MNiSW₂₀₂₀ = 140; **Załącznik nr 4, pkt. 4, pozycje 11 i 12**):

- M. Macierzanka*, **M. Plotka***, D. Pryputniewicz-Drobinska, A. Lewandowska, R. Lightowlers, J. Marszalek: Maintenance and stabilization of mtDNA can be facilitated by the DNA-binding activity of Ilv5p. *Biochim Biophys Acta.* 1783(1), 2008, p.107-117. * równy współudział; (IF₂₀₀₈ 4.893; MNiSW₂₀₁₅ = 40).
- G. L. Ciesielski*, **M. Plotka***, M. Manicki*, B. A. Schilke, R. Dutkiewicz, Ch. Sahi, J. Marszalek, E. A. Craig: Nucleoid localization of Hsp40 Mdj1 is important for its function in maintenance of mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1833(10), 2013, p. 2233-2243. * równy współudział; (IF₂₀₁₃ 5.297; MNiSW₂₀₁₅ = 40)

Obrona rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Białkowe składniki mitochondrialnego nukleoidu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” odbyła się w grudniu 2007 r. Recenzentami byli: Prof. dr hab. Michał Obuchowski z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed (Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) oraz Prof. dr hab. Hanna Kmita z Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Po złożeniu rozprawy doktorskiej, we wrześniu 2007 r. rozpoczęłam podoktorski staż naukowy w Katedrze Ginekologii i Położnictwa, Szpitala John Radcliffe Uniwersytetu w Oxfordzie, Wielka Brytania. W zespole Prof. Joanny Poulton badałam powiązania pomiędzy występowaniem wariantu mitochondrialnego DNA zwanego wariantem OriB lub wariantem 16184 (substytucja T→C), a ryzykiem występowania m. in. cukrzycy typu 2 u ludzi (publikacja **Załącznik nr 4, pkt. 4, pozycja 10**):

- Z. Ye, Ch. Gillson, M. Sims, K-T. Khaw, **M. Plotka**, J. Poulton, C. Langenberg, N. J. Wareham: The association of the mitochondrial DNA OriB variant (16184-16193 polycytosine tract) with type 2 diabetes in European populations. *Diabetologia* 56(9), 2013, p. 1907-1913. (IF₂₀₁₃ = 6.880; MNiSW₂₀₁₅ = 40)

Do Polski wróciłam z początkiem roku 2010 r., a następnie rozpoczęłam pracę jako asystent Laboratorium Biologii Molekularnej i Cytogenetyki w Diagnostycznych Laboratoriach Medycznych Invicta w Gdańskim Parku Naukowo – Technologicznym im. Hilarego Koprowskiego. W laboratorium we współpracy ze środowiskiem naukowym Uniwersytetu Gdańskiego wdrażałam m. in. diagnostykę molekularną wirusa HCV wywołującego zapalenie wątroby typu C, czy diagnostykę molekularną boreliozę wywoływaną przez bakterię *Borrelia burgdorferi*. W roku akademickim 2011/2012 prowadziłam również ćwiczenia z mikrobiologii ze studentami Wydziału Farmaceutycznego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W 2012 r. powróciłam na Uniwersytet Gdański, rozpoczynając pracę w Katedrze Mikrobiologii jako wykonawca projektu Exgenome Molecular Enzymes (EXGENOMES) przyznanego w ramach 7 programu ramowego Unii Europejskiej. Celem projektu była charakterystyka enzymów izolowanych z mikroorganizmów bytujących w gorących źródłach Islandii. Potencjalna termostabilność tych enzymów czyniła je cennymi odczynnikami do celów aplikacyjnych takich jak synteza DNA na dużą skalę. Technologie oparte na pracy z DNA są coraz częściej wykorzystywane w diagnostyce, przemyśle farmaceutycznym, czy pracy naukowej. Grupami enzymów wzbudzających największe zainteresowanie firm takich jak Prokazyne (Islandia), czy A&A Biotechnology (Polska) biorących udział w projekcie były polimerazy DNA i RNA, ligazy, nukleazy, odwrotne transkryptazy, kinazy polinukleotydowe, czy lizozymy. Moje zainteresowanie wzbudziła ostatnia grupa enzymów i w ramach projektu zajęłam się charakterystyką białek o potencjalnej aktywności lizozymowej.

Rozpoczynając projekt byłam już doświadczonym badaczem i posiadałam szeroki warsztat metodologiczny. **W Katedrze Mikrobiologii wdrożyłam więc i zoptymalizowałam szereg metod pozwalających na badanie aktywności litycznej białek.** W tamtym czasie jedynym

scharakteryzowanym białkiem litycznym wyizolowanym z bakteriofaga infekującego bakterie *Thermus aquaticus* TZ2 był enzym ϕ IN93 (Matsushita i Yanase 2008). Enzym ten oczyszczono jednak tylko w niewielkiej ilości (0.0072 mg/600 ml lizatu bakteryjnego) co utrudniało prowadzenie badań nad jego właściwościami. Ponadto enzym ϕ IN93 był specyficzny tylko w stosunku do bakterii z grupy *Thermus* (nie powodował lizy bakterii mezofilnych) co czyniło go mało atrakcyjnym pod względem aplikacyjnym (np. nie mógł być zastosowany do zwalczania infekcji bakteryjnych). Dlatego też **przeprowadzona** przeze mnie **charakterystyka dwóch termostabilnych enzymów litycznych (endolizyn) pochodzących z bakteriofagów infekujących komórki *Thermus* stanowi istotny wkład w poznanie i wykorzystanie funkcji enzymów izolowanych ze środowisk ekstremofilnych.** Oba badane przeze mnie enzymy wykazały szeroką specyficzność substratową zarówno wobec peptydoglikanu bakterii rodzaju *Thermus*, jak i mezofilnych bakterii tj. *Escherichia coli*, czy *Pseudomonas fluorescens*. Nie powodowały lizy bakterii Gram-dodatnich tj. *Lactococcus lactis*, czy *Staphylococcus aureus*. Firmy biotechnologiczne zaangażowane w projekt EXGENOMES, czy kolejny projekt unijny prowadzony w naszym laboratorium o nazwie Virus-X (Program Horyzont 2020) zainteresowane były szczególnie zastosowaniem lizozymów/enzymów litycznych przeznaczonych do lizy bakterii Gram-dodatnich, dlatego też zainteresowanie firm badanymi przeze mnie enzymami wyraźnie spadło. Ja jednak postanowiłam zastanowić się nad szeregiem szczegółowych zagadnień i kontynuować badania:

- **W jaki sposób badane enzymy wiążą warstwę peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii przy braku domeny CBD?**
- **Czy możliwe jest zastosowanie badanych enzymów do zwalczania infekcji bakteryjnych w temperaturze 37°C, czyli o co najmniej 23°C niższej od ich optymalnej temperatury działania?**
- **Jakie właściwości mają enzymy wywodzące się z mikroorganizmów mezofilnych, podobne pod względem sekwencji aminokwasowej, czy struktury przestrzennej w porównaniu do badanych przeze mnie enzymów termostabilnych?**

Wskazanie aminokwasów kluczowych dla wiązania peptydoglikanu przez termostabilną endolizynę Ts2631, wykazanie roli N-terminalnego regionu enzymu w wiązaniu peptydoglikanu (publikacja 4.3), czy potwierdzenie antybakteryjnej aktywności endolizyny Ts2631 w temp. 37°C w stosunku do takich bakterii jak *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* (publikacja 4.4) stanowiły odpowiedź na zadawane pytania. Ponadto, scharakteryzowałam aktywność białka litycznego LysC o pochodzeniu bakteryjnym wykazującym 34% identyczności sekwencji aminokwasowej z endolizyną Ph2119 oraz 33% z endolizyną Ts2631 (publikacja 4.5). Wśród białek wykazujących podobieństwo do termostabilnych endolizyn Ph2119 i Ts2631 znajduje się również potencjalna amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa, o nazwie LysB pochodząca z profaga *Clostridium botulinum*. Aktywność lityczna enzymu została eksperymentalnie potwierdzona w ramach badań prowadzonych wspólnie z doktorantką mgr Agnieszką Morzywołek. Wyniki prowadzonych eksperymentów wchodzi w skład manuskryptu: *Newly identified lytic enzyme from prophage of C. botulinum E3 strain Alaska E43, which shows activity against cells of Clostridium genus*, który jest na końcowym etapie przygotowania.

B. Współpraca

W ramach prowadzonych badań nawiązałam współpracę z:

- Dr Danutą Augustin-Nowacką (Sekcja Pomiarów Fizyko-Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański) – pomiary z użyciem dichroizmu kołowego (CD)

- Dr hab. Elżbietą Jankowską, prof. UG (Zespół Chemii Medycznej, Katedra Chemii Biomedycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański) – synteza peptydów o działaniu antybakteryjnym
- Dr Małgorzatą Kapustą (Katedra Cytologii i Embriologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański) – mikroskopia fluorescencyjna
- Dr hab. Joanną Makowską, prof. UG (Zespół Biologicznej Chemii Nieorganicznej, Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański) – analizy z użyciem skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC)
- prof. Shahriar Mobashery (University of Notre Dame, USA) - modelowanie peptydoglikanu
- Dr hab. Magdaleną Narajczyk, prof. UG (Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański) – transmisyjna mikroskopia elektronowa
- Dr Steven M. Swift (USDA ARS NEA BARC Animal Biosciences and Biotechnology Laboratory, Beltsville, USA) – analiza aktywności białek litycznych wobec komórek *Clostridium perfringens*
- Dr Romanem Szczepanowskim (Pracownia Aparaturowa, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie) – analityczne ultrawiwowanie

Ponadto w ramach dwóch projektów Unii Europejskiej nawiązałam współpracę z naukowcami z wielu ośrodków naukowych i firm biotechnologicznych. Ośrodki te wymienione są w Załączniku nr 4, pkt 14 (Wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny).

Jest dla mnie oczywiste, że moje badania nie byłyby możliwe bez stałego finansowania i znakomicie wyposażonego warsztatu pracy. Dlatego, chciałabym tu podkreślić bardzo istotną rolę Prof. dr hab. Tadeusza Kaczorowskiego w zdobyciu środków unijnych na badania w ramach dwóch projektów międzynarodowych: EXGENOMES oraz Virus-X (**Załącznik nr 4, pkt. 14**), nasze współdziałanie merytoryczne oraz zabezpieczenie organizacyjne mojej pracy w Katedrze Mikrobiologii. Praca w tych projektach pozwoliła mi na spotkanie i czerpanie wiedzy od światowej klasy ekspertów z dziedziny klonowania genów, oczyszczania i charakterystyki enzymów, czy krystalografii białek i ich analizy. Wyniki wspólnie prowadzonych badań, m. in. przy krystalografii białek zaowocowała rozwiązaniem struktur przestrzennych trzech różnych enzymów, zdeponowanych w bazie PDB (**Autoreferat, Załącznik nr 3, pkt. 6.C**). Owocem wielozespołowej pracy są również publikacje (**Załącznik nr 4, pkt. 4, pozycja 2, 6 i 8**):

- A. Stefanska, A. K. Kaczorowska, **M. Plotka**, O. H. Fridjonsson, G. O. Hreggvidsson, S. Hjorleifsdottir, J. K. Kristjansson, S. Dabrowski, T. Kaczorowski: Discovery and characterization of RecA protein of thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* MAT72 phage Tt72 that increases specificity of a PCR-based DNA amplification. *J Biotechnol* 182-183, 2014, p. 1-10. (IF₂₀₁₅ 2.871; MNiSW₂₀₁₅ = 40).
- A. Stefanska, L. Gaffke, A. K. Kaczorowska, **M. Plotka**, S. Dabrowski, T. Kaczorowski: Highly thermostable RadA protein from the archaeon *Pyrococcus woesei* enhances specificity of simplex and multiplex PCR assays. *J Appl Genet* 57, 2016, p. 239-249. (IF₂₀₁₆ = 1.655; MNiSW₂₀₁₉ = 100)
- S. Freitag-Pohl, A. Jasilionis, M. Håkansson, L.A. Svensson, R. Kovačič, M. Welin, H. Watzlawick, L. Wang, J. Altenbuchner, **M. Plotka**, A-K. Kaczorowska, T. Kaczorowski, E. Nordberg, S. Al-Karadaghi, B. Walse, A. Aevarsson, E. Pohl, Crystal structures of the *Bacillus subtilis* prophage lytic cassette proteins XepA and YomS. *Acta Crystallographica*

section D 75(11), 2019, p. 1028-1039; <https://doi.org/10.1107/S2059798319013330> (IF₂₀₁₉ = 5.266; MNiSW₂₀₁₉ = 100).

C. Plany badawcze

Praca w wymienionych projektach pomogła mi w określeniu i rozwijaniu własnych zainteresowań badawczych dotyczących praktycznego zastosowania enzymów litycznych izolowanych z bakterii oraz bakteriofagów.

Na szczególne wyróżnienie w moim odczuciu zasługuje współpraca nawiązana przeze mnie z Prof. Yves Briers (Department of Biotechnology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium). Dotyczy ona otrzymywania i charakterystyki rekombinowanych białek fuzyjnych o działaniu przeciwbakteryjnym, których częścią są domeny badanych przeze mnie endolizyn. Wspólne badania rozpoczęte w 2017 r. (m. in. w ramach miesięcznego stażu naukowego odbytego przeze mnie w Gandawie, Belgia) przyniosły obiecujące wyniki wstępne. Będą one podstawą do napisania przeze mnie wniosku grantowego OPUS20, który mam nadzieję złożyć do 15 grudnia 2020 r.

Ponadto, wyniki badań dotyczące m. in. zaangażowania N-terminalnego regionu białka litycznego LysC w aktywności przeciwbakteryjnej skłoniły mnie do zbadania właściwości przeciwbakteryjnych syntetycznego peptydu Intestinaliny zaprojektowanego na podstawie sekwencji pierwszych 30 reszt aminokwasowych białka LysC. Badania nad aktywnością przeciwbakteryjną tego peptydu oraz jego strukturą przestrzenną prowadzę w ramach przyznanego mi finansowania działania naukowego MINIATURA 3 (DEC 2019/03/X/NZ1/00394): *Analiza struktury i funkcji syntetycznych peptydów stanowiących N-terminalne regiony białek litycznych ze szczególnym uwzględnieniem nowego peptydu antybakteryjnego Intestinaliny*. Część wyników będących efektem badań prowadzonych w ramach tego projektu została zamieszczona w publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego (**publikacja 4.5**). Inne uzyskane wyniki, w tym analiza struktury przestrzennej Intestinaliny z użyciem spektroskopii NMR (ang. nuclear magnetic resonance), będą wchodzić w skład kolejnej publikacji.

Obecnie, interesującym mnie zagadnieniem jest również, czy podobnie wysoko dodatnio-naładowane regiony innych potencjalnych białek litycznych również biorą udział w ich funkcji litycznej? Wyniki wstępne tych badań uzyskałam w ramach działania naukowego MINIATURA 3. W ramach projektu oczyściłam pięć enzymów, których N-końcowe domeny wykazują podobieństwo sekwencji aminokwasowej do N-końcowej części białka litycznego LysC *Clostridium intestinale* URNW. Obecnie jestem na etapie wstępnej charakterystyki oczyszczonych białek, a badania te będę kontynuować w przyszłości.

Kolejnym analizowanym aspektem mojej pracy eksperymentalnej jest **badanie podstaw termostabilności enzymów litycznych**. Punktem wyjścia jest tu fakt, że często pod względem struktury białka termostabilne przypominają ich mezofilne odpowiedniki. Tak jest chociażby w przypadku termostabilnej endolizyny Ts2631 i mezofilnego lizozymu T7 (**publikacja 4.3, Figura 4**). Jednak np. w przypadku endolizyny Ts2631 w sekwencji białka występuje znacznie więcej reszt tryptofanowych (4.49%) niż średnia ich liczba w przypadku białek mezofilnych (1.27%) (Kozłowski, 2017). Zwiększona ilość tryptofanów powoduje zwiększenie hydrofobowości oraz stabilności struktury białka poprzez zwiększenie oddziaływań kation- π (Dougherty, 1996; Pack i Yoo 2004). Efekt stabilizujący wywołuje również podwyższona ilość reszt proliny, czy argininy (ta ostatnia może stabilizować strukturę białek poprzez oddziaływania z jonami). Niezmiernie ciekawym dla mnie zagadnieniem jest to, czy obecność któryś z wymienionych aminokwasów ma istotny wpływ na termostabilność

badanych endolizyn Ts2631 oraz Ph2119? Jeśli tak, to czy zamiana odpowiedników tych reszt aminokwasowych u endolizyn (amidaz) mezofilnych spowoduje wzrost ich termostabilności? Na te pytania postaram się udzielić odpowiedzi w dalszych prowadzonych przeze mnie badaniach.

D. Podsumowanie

W swoim dorobku posiadam 14 artykułów opublikowanych w czasopismach z listy JCR, z których 10 powstało po uzyskaniu przeze mnie stopnia naukowego doktora. Pięć z nich stanowi przedstawione do oceny osiągnięcie. Jestem pierwszym autorem 8 publikacji (2 na zasadzie równorzędnego wkładu pracy), oraz autorem korespondencyjnym trzech prac. **Sumaryczny współczynnik IF** wszystkich moich publikacji wynosi **48,5**, natomiast liczba cytowań **125** (według bazy Scopus), Indeks Hirscha (według bazy Scopus) wynosi **8**. Sumaryczna punktacja MNiSW (wg Załącznika do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 18 grudnia 2019 r.) to **1510**, w tym **pięć prac za 140 punktów**.

Brałam udział w trzech międzynarodowych projektach badawczych, z których dwa to wielośrodkowe granty finansowane w ramach programów Unii Europejskiej. Wyniki badań zostały uhonorowane w 2020 r. nagrodą zespołową III stopnia JM Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcie: *Molekularna charakterystyka białek o potencjale biotechnologicznym na przykładzie unikatowych endonukleaz restrykcyjnych oraz endolizyn fagowych*. Wyniki prac prezentowałam na 31 konferencjach, w tym wygłosiłam 8 referatów (3 jako zaproszony prelegent). Byłam członkiem Rady Programowej (Advisory Board Member) dwóch konferencji międzynarodowych: Bacteriophage 2016 oraz Bacteriophage 2017 mających miejsce w Londynie w Wielkiej Brytanii. Recenzowałam zarówno oryginalne, jak i przeglądowe prace naukowe dla czasopism międzynarodowych z bazy JRC (14 recenzji). Biorę też aktywny udział w życiu Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego będąc przedstawicielem Katedry Mikrobiologii w Radzie Programowej Kierunku Genetyka i Biologia Eksperymentalna, czy wygłaszając wykłady dla uczniów pomorskich liceów w ramach projektów „Zaproś naukowca do szkoły” oraz „InnovaBio Pomorze” pod patronatem Pomorskiego Parku Naukowo-Technologicznego w Gdyni.

Literatura uzupełniająca

- Bastos MD, Coutinho BG, and Coelho ML. 2010. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals (Basel)* 3:1139-1161. 10.3390/ph3041139
- Borysowski J, Weber-Dabrowska B, and Górski A. 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:366-377.
- Briers Y, Lavigne R, Hertveldt K, Hanssens I, Engelborghs Y, and Volckaert G. 2007. Stability of phiKMV lysin gp36c reflects its role during bacteriophage infection. *Commun Agric Appl Biol Sci* 72:115-118.
- Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, Oliveira H, Azeredo J, Verween G, Pirnay JP, Miller S, Volckaert G, and Lavigne R. 2014. Engineered endolysin-based "Artilyns" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio* 5:e01379-01314. 10.1128/mBio.01379-14
- Cheng X, Zhang X, Pflugrath JW, and Studier FW. 1994. The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4034-4038.
- Desmarais SM, Cava F, de Pedro MA, and Huang KC. 2014. Isolation and preparation of bacterial cell walls for compositional analysis by ultra performance liquid chromatography. *J Vis Exp*:e51183. 10.3791/51183

- Dougherty DA. 1996. Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* 271:163-168.
- Frickey T, and Lupas A. 2004. CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity. *Bioinformatics* 20:3702-3704. 10.1093/bioinformatics/bth444
- Gerstmans H, Grimon D, Gutiérrez D, Lood C, Rodríguez A, van Noort V, Lammertyn J, Lavigne R, and Briers Y. 2020. A VersaTile-driven platform for rapid hit-to-lead development of engineered lysins. *Sci Adv* 6:eaa1136. 10.1126/sciadv.aaz1136
- Gutiérrez D and Briers Y. 2021. Lysins breaking down the walls of Gram-negative bacteria, no longer a no-go. *Current Opinion in Biotechnology* 68:15–22. 10.1016/j.copbio.2020.08.014
- Kozłowski LP. 2017. Proteome-pI: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res* 45:D1112-D1116. 10.1093/nar/gkw978
- Kumar S, Tsai CJ, and Nussinov R. 2000. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* 13:179-191. 10.1093/protein/13.3.179
- Lewis K. 2012. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature* 485:439-440. 10.1038/485439a
- Love MJ, Bhandari D, Dobson RCJ, and Billington C. 2018. Potential for Bacteriophage Endolysins to Supplement or Replace Antibiotics in Food Production and Clinical Care. *Antibiotics (Basel)* 7. 10.3390/antibiotics7010017
- Matsushita I, and Yanase H. 2008. A novel thermophilic lysozyme from bacteriophage phiIN93. *Biochem Biophys Res Commun* 377:89-92. 10.1016/j.bbrc.2008.09.101
- Nelson D, Loomis L, and Fischetti VA. 2001. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4107-4112. 10.1073/pnas.061038398
- Oliveira H, Melo LD, Santos SB, Nóbrega FL, Ferreira EC, Cerca N, Azeredo J, and Kluskens LD. 2013. Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *J Virol* 87:4558-4570. 10.1128/JVI.03277-12
- Oliveira H, São-José C, and Azeredo J. 2018. Phage-Derived Peptidoglycan Degrading Enzymes: Challenges and Future Prospects for In Vivo Therapy. *Viruses* 10. 10.3390/v10060292
- Oliveira H, Thiagarajan V, Walmagh M, Sillankorva S, Lavigne R, Neves-Petersen MT, Kluskens LD, and Azeredo J. 2014. A thermostable *Salmonella* phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PLoS One* 9:e108376. 10.1371/journal.pone.0108376
- O' Neill J. 2016. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations (The Review on Antimicrobial Resistance). https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf
- Pack SP, and Yoo YJ. 2004. Protein thermostability: structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins. *J Biotechnol* 111:269-277. 10.1016/j.jbiotec.2004.01.018
- Peng SY, You RI, Lai MJ, Lin NT, Chen LK, and Chang KC. 2017. Highly potent antimicrobial modified peptides derived from the *Acinetobacter baumannii* phage endolysin LysAB2. *Sci Rep* 7:11477. 10.1038/s41598-017-11832-7
- Schmelcher M, Donovan DM, and Loessner MJ. 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol* 7:1147-1171. 10.2217/fmb.12.97
- Thandar M, Lood R, Winer BY, Deutsch DR, Euler CW, and Fischetti VA. 2016. Novel Engineered Peptides of a Phage Lysin as Effective Antimicrobials against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2671-2679. 10.1128/AAC.02972-15
- Vermassen A, Leroy S, Talon R, Provot C, Popowska M, and Desvaux M. 2019. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Front Microbiol* 10:331. 10.3389/fmicb.2019.00331
- Vollmer W, Blanot D, and de Pedro MA. 2008a. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32:149-167. 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Vollmer W, Joris B, Charlier P, and Foster S. 2008b. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32:259-286. 10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x
- Ye T, and Zhang X. 2008. Characterization of a lysin from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:635-641. 10.1007/s00253-008-1353-1

- Yoshida H, Kinoshita K, and Ashida M. 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 271:13854-13860.
- Young R. 2014. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* 52:243-258. 10.1007/s12275-014-4087-z

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

A. Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki

- Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (lata 1999-2002; 2012)
Liczba godzin dydaktycznych rocznie = 240 godzin (lata 1999-2002) oraz = 65 godzin (rok 2012) w tym:
 - Mikrobiologia – ćwiczenia laboratoryjne dla studentów Farmacji, III rok
 - Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (lata 2003-2007)
Liczba godzin dydaktycznych rocznie w ramach Studium Doktoranckiego = 90 godzin w tym:
 - Podstawy inżynierii genetycznej dla studentów Biotechnologii I stopień, II rok
 - Katedra Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (lata 2014-obecnie):
Liczba godzin dydaktycznych rocznie w ramach pensum = 240 godzin w tym:
 - Mikrobiologia – ćwiczenia laboratoryjne dla studentów Biologii I stopień, II rok oraz dla studentów Biologii Medycznej I stopień, I rok
 - Elementy genetyki bakterii – ćwiczenia laboratoryjne dla studentów Biologii I stopnia, III rok
 - Pracownia specjalnościowa z mikrobiologii dla studentów Biologii II stopnia, II rok
 - Pracownia dyplomowa dla studentów Biologii i Biologii Medycznej II stopnia, II rok
 - Seminarium dla studentów Biologii II stopnia, II rok.
 - Badania naukowe na wydziale – ćwiczenia audytoryjne, studenci Biologii I stopnia, III rok
 - Pracownia projektowa dla studentów Biologii I stopnia, III rok
- Poza tym:
- Uczestnictwo w Radzie Programowej Kierunku Genetyka i Biologia Eksperymentalna Wydziału Biologii, 2020 – obecnie;
 - Wygłoszenie wykładu dla uczniów 7 klas liceów województwa pomorskiego w ramach spotkania z naukowcami projektu InnoBio Pomorze pod patronatem Pomorskiego Parku Naukowo-Technologicznego, Gdynia, wrzesień 2020 r.
 - Uczestnictwo w komisji przeprowadzającej egzamin dyplomowy dla studentów biologii (rok III, licencjat) w latach 2016-2020
 - Uczestnictwo w imprezach promujących Wydział Biologii, takich jak „Dzień antybiotyków” – prowadzenie warsztatów, listopad 2015 r. lub „Zaproś naukowca do

szkoły” – wygłoszenie 3 wykładów pt.: Jakie są alternatywy dla antybiotyków w zwalczaniu infekcji bakteryjnych? dla liceów z województwa pomorskiego, lata 2019-2020.

- Uczestnictwo w roli prowadzącego serii seminariów Katedry Ginekologii i Położnictwa, szpital John Radcliffe, Uniwersytet w Oksfordzie, Oxford, Wielka Brytania, lata 2008-2009 (około 10 spotkań).

B. Opieka naukowa nad studentami

1. Sprawowanie opieki naukowej w charakterze opiekuna merytorycznego pracy magisterskiej:

- Farmacja, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny = 1 osoba
- Biotechnologia, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed = 3 osoby
- Biologia i Biologia Medyczna, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański = 2 osoby

2. Sprawowanie funkcji promotora prac dyplomowych:

- Biologia i Biologia Medyczna, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański;
- w charakterze promotora pracy magisterskiej (2016-2020) = 6 osób
- w charakterze promotora prac licencjackich = 9 osób

3. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego:

- Biologia i Biologia Medyczna, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański;
- opiekun naukowy doktorantki Agnieszki Morzywołek; przewód doktorski otwarty 16.10.2015; tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka enzymów litycznych z bakterii z rodzaju *Clostridium* wykazujących podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan”
- opiekun naukowy doktorantki Moniki Szadkowskiej; brak otwartego przewodu doktorskiego

4. Recenzent prac dyplomowych:

- Biologia i Biologia Medyczna, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański;
- recenzje prac licencjackich = 7 osób
- recenzje prac magisterskich = 2 osoby

5. Sprawowanie opieki naukowej w charakterze opiekuna merytorycznego projektów badawczych realizowanych na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego:

- dwa projekty praktyczne w ramach matury międzynarodowej: Julia Lamparska, Konrad Drożdżewski, III Liceum Ogólnokształcące im. Bohaterów Westerplatte, Gdańsk (2015)
- projekt edukacyjny pt. „Jak wykazać obecność mikroorganizmów w najbliższym otoczeniu?” – uczniowie gimnazjum nr 13 im. Mikołaja Kopernika, Gdynia (2015)
- Opieka naukowa podczas stażu w ramach wymiany studenckiej Erasmus p. Ivany Charuosovej (Slovak University of Agriculture in Nitra – Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovakia); tytuł projektu: Development of a simple protocol to effectively isolate plasmid DNA from *Thermus flavus* and *Flavobacterium okeanokoites* for use in the downstream applications including automated sequencing” (2013).

6. Nagrody w ramach działalności dydaktycznej:

- Nagroda im. Prof. Karola Taylora za najlepszą pracę magisterską o charakterze bioinnowacyjnym wykonaną na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego – 26 września 2017 dla p. Sebastiana Dorawy za pracę pt: „Właściwości przeciwbakteryjne endolizyny bakteriofaga vB_Tsc2631 oraz analiza reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za wiązanie substratu”. – praca wykonana pod moim kierunkiem.

C. Inne osiągnięcia nie wymienione w punktach A, B.

- Zdeponowanie sekwencji DNA w GenBank NCBI:
GenBank: KF408298.1
Thermus phage 2119 lysozyme gene, complete cds
GenBank: KJ561354
Thermus phage 2631 LysT endolysin gene, complete cds
- Udział w zdeponowaniu struktur krystalicznych:
PDB: 6FHG; Crystal structure of the Ts2631 endolysin from *Thermus scotoductus* phage with the unique N-terminal moiety responsible for peptidoglycan anchoring
PDB: 6SU5; N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase Ph2119 from bacteriophage MAT2119
PDB: 6SSC; N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase LysC from *Clostridium intestinale* URNW
- Wprowadzenie jednego z enzymów litycznych do komercyjnej sprzedaży (firma Prokazyne, Islandia):
ThermoPhage™ Lysozyme (Product number: Lys164)
- Zdeponowanie w Kolekcji Plazmidów i Drobnoustrojów (KPD) Wydziału Biologii 44 szczepów bakterii w tym ośmiu szczepów klinicznych bakterii Gram-ujemnych:
KPD 205 *Acinetobacter baumannii* CRAB (ang. carbapenem-resistant)
KPD 217 *Escherichia coli* MBL (+) (ang. metallo-beta-lactamase producing)
KPD 218 *Citrobacter braakii* MBL (+)
KPD 219 *Citrobacter freundii* MBL (+)
KPD 297 *Enterobacter cloacae* MBL (+)
KPD 298 *Klebsiella pneumoniae* KPC (+) (ang. carbapenemase producing)

D. Aktywność w kierunku podnoszenia kwalifikacji zawodowych

Kwalifikacje pedagogiczne:

1. Ukończone czterosemestralne Studium Pedagogiczne w zakresie szkolnictwa zawodowego przy Politechnice Gdańskiej z wynikiem bardzo dobrym (2001)

Uczestnictwo w Sympozjach oraz kursach:

1. Bioinnovation International Summit, Pomorski Park Naukowo-Technologiczny w Gdyni (2011)

2. Gdański Uniwersytet Medyczny, kurs: Metodyka Zarządzania Projektami, International Project Management Association dla Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUM (2006)
3. 11th Advanced Course on Digital Microscopy and Fluorescence Techniques in Cell Biology, Heidelberg, Niemcy (2006)
4. TuBS Symposium on Genetic Engineering of Mice for Biology and Disease Models, BioCity, Turku, Finlandia (2002)
5. The 12th Annual BioCity Symposium. Recent breakthroughs in drug development, BioCity, Turku, Finlandia (2002)

E. Publikacje popularnonaukowe

1. Płotka M.: From bacteriophages to endolysins: a look at novel antibacterial agents. *The Biomedical Scientist* **2016**; 60 (4): 209-11, podsumowanie wystąpień konferencyjnych EuroSciCon Bacteriophage 2016 meeting, Londyn, styczeń 2016 r.

Szczegółowy spis wszystkich moich aktywności naukowych, popularyzatorskich i dydaktycznych znajduje się w załączniku nr 4.


.....

(podpis wnioskodawcy)