

AUTOREFERAT

Dr Barbara Kędzierska

**Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański**

Gdańsk, 2022

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

29.06.1998 - tytuł magistra biologii (specjalność: biologia molekularna); Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii (obecnie Wydział Biologii) Uniwersytetu Gdańskiego; opiekun pracy: dr (obecnie prof. dr hab.) Michał Obuchowski; tytuł pracy: „Genetyczna analiza oddziaływań aktywatora CII bakteriofaga λ z polimerazą RNA Escherichia coli w rejonach promotorów p_I i p_{aQ} ”

12.12.2003 - stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii; Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii (obecnie Wydział Biologii) Uniwersytetu Gdańskiego; promotor: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn; tytuł rozprawy: „Mechanizm aktywacji transkrypcji przez białko CII bakteriofaga λ ”. Praca doktorska obroniona z wyróżnieniem.

- 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

01.10.1998 do 30.09.2002 - doktorantka Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego

01.05.2000 do 01.08.2000 – stażystka w Laboratory of Molecular Microbiology, University of Sheffield Medical School, Wielka Brytania w ramach EMBO Short Term Fellowship

03.06.2002 do 03.09.2002 – stażystka w School of Bioscience, University of Birmingham, Wielka Brytania w ramach FEBS Collaborative Experimental Scholarship for Central & Eastern Europe

01.10.2002 do 14.10.2006 - asystent w Katedrze Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego

12.01.2004 do 12.08.2006 - postdoctoral research assistant w Manchester Interdisciplinary Biocentre, University of Manchester, Wielka Brytania

15.10.2006 do 31.12.2016 - adiunkt w Katedrze Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii, Geografii i Oceanologii, a od 2009 roku Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

09.11.2006 do 30.09.2007 - urlop macierzyński i wychowawczy

03.08.2009 do 01.03.2010 - urlop macierzyński

01.01.2017 do chwili obecnej - adiunkt w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

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

a). Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie przedstawione do oceny stanowi cykl **siedmiu** powiązanych tematycznie publikacji (5 prac oryginalnych i 2 przeglądowe), które ujęłam wspólnym tytułem:

„Molekularne podstawy regulacji ekspresji genów i mechanizmu specyficzności pomiędzy homologicznymi systemami toksyna-antytoksyna z bakterii *Escherichia coli* i *Enterococcus faecium*”

b). Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

[1] Kędzierska B, Lian LY, Hayes F*. (2007). Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression. *Nucleic Acids Res.* 35: 325-39.

IF₂₀₀₇=6.954; MNiSW₂₀₀₇=40; według najnowszej punktacji MEiN₂₀₂₁=200

[2] Boss L, Labudda L, Węgrzyn G, Hayes F, Kędzierska B*. (2013). The Axe-Txe complex of *Enterococcus faecium* presents a multilayered mode of toxin-antitoxin gene expression regulation. *PLoS One.* 8: e73569.

IF₂₀₁₃=3.534; MNiSW₂₀₁₃=40; według najnowszej punktacji MEiN₂₀₂₁=100

[3] Połom D, Boss L, Węgrzyn G, Hayes F, Kędzierska B*. (2013). Amino acid residues crucial for specificity of toxin-antitoxin interactions in the homologous Axe-Txe and YefM-YoeB complexes. *FEBS J.* 280: 5906-18.

IF₂₀₁₃=3.986; MNiSW₂₀₁₃=30; według najnowszej punktacji MEiN₂₀₂₁=100

[4] Hayes F*, Kędzierska B*. (2014). Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs. *Toxins (Basel)* 6: 337-58.

IF₂₀₁₄=3.229; MNiSW₂₀₁₄=30; według najnowszej punktacji MEiN₂₀₂₁=100

[5] Kędzierska B*, Hayes F*. (2016). Emerging Roles of Toxin-Antitoxin Modules in Bacterial Pathogenesis. *Molecules.* 2: pii: E790.

IF₂₀₁₆=2.861; MNiSW₂₀₁₆=30; według najnowszej punktacji MEiN₂₀₂₁=140

[6] Kędzierska B*, Potrykus K, Szalewska-Pałasz A, Wodzikowska B. (2020). Insights into Transcriptional Repression of the Homologous Toxin-Antitoxin Cassettes *yefM-yoeB* and *axe-txe*. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9062.

IF₂₀₂₀= 4.556; MNiSW₂₀₂₀=140

[7] Kędzierska B*, Potrykus K. (2021). Minigene as a Novel Regulatory Element in Toxin-Antitoxin Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13389.

IF₂₀₂₁= 6,208; MNiSW₂₀₂₁=140

* - autor korespondujący

Współczynnik oddziaływania (IF) oraz punktacja ww. publikacji zostały podane zgodnie z rokiem opublikowania oraz zgodnie z najnowszą punktacją MEiN.

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania to **31.328**

Liczba cytowań tych prac wg bazy Google Scholar to **330**; wg bazy Web of Science to **226**; wg bazy Scopus to **245**, w tym **225** bez autocytowań (dane z dnia 14.11.2022 roku)

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 I2**.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Celem naukowym wyżej wymienionych prac było zbadanie molekularnych mechanizmów regulujących ekspresję i specyficzność homologicznych systemów toksyna-antytoksyna (TA) *yefM-yoeB* i *axe-txe*, pochodzących odpowiednio z chromosomu *Escherichia coli* oraz plazmidu pRUM *Enterococcus faecium*. Ponadto ważne było umiejscowienie otrzymanych wyników w szerszym kontekście różnych strategii regulacyjnych modułów TA oraz ich potencjalnej roli w patogenezie chorób bakteryjnych.

Systemy toksyna-antytoksyna są małymi modułami, zwykle złożonymi z pary zachodzących na siebie genów kodujących toksynę i jej antidotum. Są szeroko rozpowszechnione na plazmidach oraz chromosomach większości gatunków bakterii i niektórych *Archaea*, często w wielu kopiach (Yamaguchi et al., 2011). Toksyna jest czasem określana mianem wewnątrzkomórkowej bomby molekularnej, gdyż jej uwolnienie z kompleksu z antytoksyną powoduje zahamowanie wzrostu lub nawet śmierć komórek. Stąd też ekspresja obu genów musi być właściwie zrównoważona, gdyż zbyt duży poziom toksyny może być zabójczy dla komórki. Zdecydowana większość poznanych toksyn atakuje proces translacji, działając jako endorybonukleazy tnące wolne, bądź związane z rybosomem, mRNA. Jednak są też takie, które działają jako inhibitory procesu replikacji, syntezy peptydoglikanu czy też powodują dezintegrację błony komórkowej. Ze względu na naturę i sposób działania antytoksyny do tej pory wyróżniono osiem typów systemów TA (Jurénas et al., 2022; Singh et al., 2021). Najlepiej poznane i najszerzej rozpowszechnione wśród bakterii są moduły typu II, w których zarówno trucizna jak i jej antidotum są białkami, a zniesienie toksyczności następuje po fizycznym zablokowaniu centrum aktywnego toksyny przez antytoksynę. Większość z nich charakteryzuje podobna budowa i sposób regulacji ekspresji. Składają się z pary zachodzących na siebie genów tworzących operon, z których pierwszy koduje wrażliwą na działanie proteaz

komórkowych (Lon lub Clp) odtrutkę, a drugi stabilną trucizną. Silne i specyficzne oddziaływania pomiędzy toksyną i jej antidotum, jak również ścisła regulacja ekspresji tych genów, są cechami charakterystycznymi wszystkich poznanych modułów TA typu II. Kontrolowana produkcja toksyny i antytoksyny w tych systemach jest zwykle osiągnięta poprzez negatywną autoregulację na poziomie transkrypcji - antytoksyna wiąże się swoją N-terminalną częścią do palindromowych sekwencji w obrębie promotora, przez co jest bezpośrednio odpowiedzialna za represję, natomiast C-końcową domeną wiąże toksynę, która działa jako korepresor zwiększając powinowactwo i stabilność całego kompleksu (Kędzierska & Hayes, 2016). Dodatkowo, w niektórych systemach wykazano, że kooperatywne wiązanie kompleksu do DNA następuje tylko wtedy, jeśli oba białka występują w odpowiednich ilościach stechiometrycznych, gdyż nadmiar toksyny powoduje derepresję operonu poprzez uwolnienie kompleksu z operatora (Cataudella et al., 2012). Pierwsze plazmidowe moduły TA zostały opisane w latach 80., natomiast dopiero dekadę później zidentyfikowano pierwsze chromosomalne kasety tego typu (Hayes & Van Melderen, 2011). Rola plazmidowych modułów nie budzi wątpliwości i jest nią stabilne utrzymywanie tych elementów genetycznych w populacji komórek bakteryjnych. Jest to związane z mechanizmem addykcji, który polega to na posegregacyjnej eliminacji komórek bez plazmidów. W komórkach potomnych, które nie odziedziczyły modułu TA, degradacja podatnej na proteolizę antytoksyny i brak jej syntezy *de novo*, powoduje uwolnienie stabilnej toksyny, która łącząc się ze specyficznym dla siebie celem komórkowym prowadzi do śmierci komórki lub do zahamowania jej procesów metabolicznych. W ten sposób komórki stają się „uzależnione” od modułów TA zlokalizowanych na plazmidach. Wiele plazmidowych genów addykcyjnych ma swoje homologi na chromosomach bakteryjnych, ale ich funkcja ciągle nie jest do końca jasna i stanowi przedmiot szerokiej dyskusji w środowisku naukowym. Uważa się, że mogą one pełnić rolę stabilizującą ruchome elementy genomów, działać anty-addykcyjnie w stosunku do plazmidowego DNA, chronić przed infekcjami bakteriofagowymi, umożliwiać komórkom dostosowanie metabolizmu w zmiennych warunkach środowiska, ale również wskazuje się na ich rolę w tworzeniu biofilmu, komórek przetrwałych i wirulencji bakterii (Jurénas et al., 2022; Singh et al., 2021).

Jednym z chromosomalnych systemów odkrytych w genomie *E. coli* jest kasetta *yefM-yoeB* (Pomerantsev et al., 2001). Pokazano, że moduł ten funkcjonuje jako aktywny system toksyna-antytoksyna oraz że jego homologi są rozpowszechnione w genomach i na plazmidach różnych gatunków bakterii (Grady & Hayes, 2003). Moim zadaniem podczas stażu doktorskiego, który odbyłam w laboratorium dr Finbarra Hayesa w University of Manchester w Wielkiej Brytanii, było poznanie molekularnych podstaw regulacji ekspresji genów tej kasety, a wyniki tych badań zostały zebrane w **publikacji nr 1**. Pracę rozpoczęłam od wyznaczenia miejsca startu transkrypcji genów operonu *yefM-yoeB*, co pomogło mi zidentyfikować boksy „-10” i „-35” promotora, który nazwaliśmy p_{yy} , oraz kodon start dla antytoksyny YefM. Otrzymane przeze mnie wyniki ujawniły, że **do opublikowanych wcześniej doświadczeń błędnie użyto antytoksynę YefM o 10 aminokwasów dłuższą, wykorzystując jako kodon startowy ATG leżące w obrębie wyznaczonego przeze mnie heksameru „-10” promotora** (Cherny et al., 2005; Cherny & Gazit, 2004). W obu tych pracach opisano YefM jako naturalnie niesfałdowane białko, które ulega strukturyzacji dopiero po związaniu z toksyną YoeB. Natomiast moje badania pokazały, że YefM posiada znaczne

rejony w postaci α -helis i β -krotek oraz struktury trzeciorzędowe, a rejon nieustrukturyzowany zlokalizowany jest jedynie na C-końcu tego białka i rzeczywiście ulega sfałdowaniu po związaniu toksyny. Pokazałam również, że antytoksyna występuje głównie w postaci dimeru, a kompleks jako trimer YefM₂YoeB, co było zbieżne z opublikowaną w tamtym czasie strukturą krystaliczną (Kamada & Hanaoka, 2005). Następnie za pomocą technik *in vivo* i *in vitro* zbadalam funkcjonowanie promotora p_{yy} - samego, a także w obecności YefM oraz kompleksu YefM-YoeB. Te wyniki pokazały, że antytoksyna jest słabym represorem własnego promotora, a toksyna działa jako specyficzny korepresor wzmacniając i stabilizując to oddziaływanie. Ponadto w obrębie promotora p_{yy} zidentyfikowałam sekwencje, do których wiąże się antytoksyna. Są to dwa palindromowe powtórzenia o wspólnym rdzeniu TGTACA, których środki rozdziela 12 nukleotydów. Jedno z nich obejmuje region „-10”, natomiast drugie otacza miejsce startu transkrypcji tego promotora. Pokazałam również, że pierwsze z tych miejsc jest rozpoznawane przez antytoksynę w pierwszej kolejności i jego obecność jest kluczowa do kooperatywnego związania tego białka (lub kompleksu TA) w drugim miejscu. Podsumowując, z przeprowadzonych przeze mnie badań wynika, że **chromosomalny moduł *yefM-yoeB* *E. coli* jest regulowany w sposób typowy dla większości systemów TA typu II i podlega negatywnej autoregulacji na poziomie inicjacji transkrypcji, gdzie dwa kompleksy YefM₂YoeB wiążą się w rejonie promotora p_{yy} blokując tym samym miejsce polimerazie RNA (RNAP).** W ten sposób stężenie toksyny jest kontrolowane i utrzymywane na poziomie bezpiecznym dla komórki. Przeanalizowaliśmy również sekwencje homologów kasety *yefM-yoeB* z różnych gatunków bakterii i okazało się, że wiele z nich, choć nie wszystkie, posiadają podobny układ odwróconych powtórzeń TGTACA.

Jednym z takich homologicznych do *yefM-yoeB* systemów TA jest moduł *axe-txe*, który został zidentyfikowany na plazmidzie pRUM z *E. faecium* w laboratorium dr Finbarra Hayesa (Grady & Hayes, 2003). Zainteresowało mnie, czy regulacja genów tego operonu wygląda podobnie jak chromosomalnej kasety *yefM-yoeB* *E. coli*. Przeprowadzone wcześniej doświadczenia udowodniły, że moduł *axe-txe* efektywnie działa nie tylko u enterokoków, ale również w ewolucyjnie odległych gatunkach bakterii, takich jak *E. coli* czy też *Bacillus sp.* (Grady & Hayes, 2003). Zatem ze względu na ograniczony dostęp, liczbę i czułość narzędzi genetycznych dla enterokoków, nasze eksperymenty przeprowadziliśmy w komórkach modelowego organizmu, jakim jest pałeczka okrężnicy (**publikacja nr 2**). Badania do tej i do kolejnych prac, przeprowadzono głównie w ramach kierowanego przeze mnie projektu MNiSW (nr 519/B/P01/2009/36). Uzyskane przez nas wyniki pokazały, że operon *axe-txe* zdecydowanie różni się stopniem skomplikowania od wcześniej opisanych modułów TA, w tym od swojego homologa *yefM-yoeB*. Zidentyfikowaliśmy aż trzy transkrypty powstające w tym operonie. Geny antytoksyny oraz toksyny ulegają wspólnej ekspresji z promotora p_{at} , który jest niezwykle silny i ulega represji przez kompleks Axe-Txe, ale tylko do pewnego stopnia. Pokazaliśmy, że dodatkowa ilość toksyny powstaje z leżącego w obrębie genu antytoksyny promotora p_{axe} . Promotor ten wydaje się działać konstytutywnie, gdyż ani białka badanego modułu, ani też żadne z białek komórkowych, nie wpływają na jego aktywność. Unieczynnienie p_{axe} powoduje rozchwianie właściwego balansu pomiędzy toksyną i antytoksyną, przez co, jak wykazaliśmy, system traci zdolność do stabilnego utrzymywania plazmidu w populacji bakteryjnej. Wykryliśmy również trzeci transkrypt, tym razem powstający z promotora znajdującego się wewnątrz genu *txe*, w orientacji odwrotnej do kasety,

który nazwaliśmy p_{txe} , i który wydaje się stanowić kolejny element regulacyjny. Transkrypt ten jest komplementarny do transkryptów z promotorów p_{at} i p_{axe} . Ponieważ niekodujące RNA mogą znacząco wpływać na regulację ekspresji genów, taki transkrypt może obniżać poziom produkcji białek Txe i/lub Axe przez blokowanie translacji lub przez kolizję kompleksów transkrypcyjnych produkujących sensowne i antysensowne RNA. Dodatkowym elementem regulacyjnym wydaje się też być (zidentyfikowana w tej pracy) szpilka terminacyjna zlokalizowana tuż za genem toksyny. Zaobserwowaliśmy, że bakterie niosące plazmid z kasetą *axe-txe* pozbawioną tej sekwencji wykazują znaczne zahamowanie wzrostu. Wydaje nam się, że struktura szpilki może być rozpoznawana przez RNazy potencjalnie związane z degradosomem. To powodowałoby obniżenie stabilności transkryptów i prowadziłyby do powstawania mniejszej ilości białka toksyny. Zarówno sposób działania transkryptu pochodzącego z promotora p_{txe} , jak i szpilki terminacyjnej, wymagają weryfikacji eksperymentalnej, jednakże przedstawione w tej pracy wyniki jednoznacznie pokazują, że **system *axe-txe*, chociaż homologiczny do *yefM-yoeB*, jest regulowany w skomplikowany i wielopłaszczyznowy sposób, przynajmniej w komórkach *E. coli*.**

Co więcej, gdy przeanalizowałam sekwencję 114-nukleotydowego odcinka liderowego transkryptu powstającego z promotora p_{axe} , zauważyłam trzy potencjalne kodony startu translacji (dwa ATG i jeden GTG), wszystkie w tej samej ramce odczytu z kodonem stop TAA. Wszystkie te triplety znajdują się również w tej samej ramce odczytu, co kodon ATG dla toksyny Txe. To odkrycie skłoniło mnie do sprawdzenia, czy ich obecność w jakiś sposób wpływa na ekspresję *txe* (**publikacja nr 7**). Bezpośrednią inspiracją do podjęcia eksperymentów była publikacja pochodząca z laboratorium prof. Steve'a Busby'ego, u którego, wiele lat wcześniej, odbyłam jeden z moich staży (stypendium EMBO w University of Birmingham w Wielkiej Brytanii, w 2002 roku). Praca ta dotyczy dwukodonowego minigeny zidentyfikowanego w transkrypcie operonu *LEE1* enterokrwotocznego szczepu *E. coli* (EHEC), którego obecność okazała się bezpośrednio wpływać na aktywność leżącego poniżej genu *ler* (Islam et al., 2012). W ostatnich latach pojawiło się też wiele analiz bioinformatycznych, a także transkryptomicznych i profilowania rybosomów, które wykazały, że małe otwarte ramki odczytu (ang. open reading frames - ORFs) są licznie obecne w genomach bakteryjnych, w tym w rejonach nie ulegających translacji zlokalizowanych na końcach 5' wielu genów (ang. 5'-untranslated regions – 5'-UTR). Jednak do tej pory opisano mechanizmy działania tylko nielicznych mini-ORFów. Obecność minigeny może mieć pozytywny lub negatywny wpływ na ekspresję genu leżącego poniżej i może ją modulować na różne sposoby. W swojej pracy zastosowałam badania genetyczne wykorzystując fuzje translacyjne z genem reporterowym *lacZ*. Najpierw wykazałam, że kodon ATG2 (wraz z otaczającą sekwencją nukleotydową) wykazuje silny potencjał translacyjny i jest tripletem startowym dla dwukodonowego minigeny. Następnie pokazałam, że unieczynnienie tego mini-ORFu poprzez wprowadzenie mutacji spowodowało ponad ośmiokrotny spadek ekspresji genu reporterowego. Co ciekawe, całkowite usunięcie rejonu liderowego dało efekt odwrotny. Taki wynik z pozoru może wydawać się nielogiczny, jednakże wskazuje na prawdopodobny mechanizm, w jaki minigen reguluje ekspresję *txe*. Tutaj z pomocą przyszła mi praca, w której pokazano, że mRNA dla genu *esp* operonu *LEE4* komórek EHEC jest chronione przed atakiem ze strony rybonukleazy E (RNazy E) przez rybosom związany do sześciokodonowego minigeny obecnego w odcinku liderowym (Lodato et al., 2012). Rejon liderowy transkryptu z

promotora p_{axe} zawiera co najmniej dwa ciągi bogate w nukleotydy AU zlokalizowane przed kodonami ATG1 i ATG2. Takie sekwencje są potencjalnie rozpoznawane nie tylko przez rybosomalne białko S1, niezbędny składnik maszyny translacyjnej odpowiedzialny za selekcję mRNA i wzmocnienie wydajności tego procesu, ale także przez RNazę E, która również posiada tak zwaną domenę S1 odpowiedzialną za rozpoznawanie substratów. Tak więc, prawdopodobnie następuje konkurencja pomiędzy rybosomem a RNazą E o miejsce działania. W związku z tym zasadne wydaje się przypuszczenie, że związanie rybosomu chroni odcinek liderowy transkryptu powstającego z promotora p_{axe} przed degradacją przez rybonukleazę, zwiększając w ten sposób jego stabilność oraz wydajność translacyjną. Ten hipotetyczny mechanizm wydaje się wiarygodny, ale wymaga potwierdzenia eksperymentalnego. W opisywanej pracy pokazałam również, że minigen działa tylko w układzie *in cis* oraz że jego nadekspresja nie jest toksyczna dla komórek *E. coli*, jak to ma miejsce w przypadku niektórych syntetycznych minigenów (Cruz-Vera et al., 2003). W dalszej części tej pracy postanowiłam odpowiedzieć jeszcze na dwa bardziej ogólne i uniwersalne pytania: 1) czy to, w jakiej ramce odczytu znajdują się minigen oraz gen przez niego regulowany ma znaczenie? 2) czy odległość pomiędzy minigenem, a genem przez niego regulowanym jest istotna? Moje badania pokazały, że mini-ORF może znajdować się w każdej z trzech ramek odczytu w stosunku do genu leżącego poniżej, ale działa wtedy z różną wydajnością. Natomiast odpowiednia odległość pomiędzy oboma cistronami jest bardziej kluczowym parametrem i zmiana nawet o jeden kodon powoduje osłabienie tego efektu. Podejrzewam, że ma to związek z mechanizmem tzw. sprzężenia translacyjnego (ang. translation coupling), zgodnie z którym geny ulegają translacji przez jeden kompleks rybosomalny wtedy, gdy dystans pomiędzy nimi jest odpowiednio mały. Pokazałam, że stopniowe zwiększanie tej odległości prowadziło do powolnej utraty wpływu minigenu na ekspresję genu reporterowego i zahamowanie jego aktywności. Dzieje się tak, gdy dystans jest zbyt duży na "translation coupling" a zbyt mały, aby dwa osobne kompleksy rybosomalne mogły się zmieścić. Zatem wydaje się, że **poza ochroną mRNA przed degradacją ze strony rybonukleazy, sprzężenie translacyjne jest dodatkowym mechanizmem, dzięki któremu minigen w odcinku liderowym transkryptu p_{axe} wpływa na ekspresję toksyny Txe.** Ponadto, jest to **pierwszy opisany przypadek, w którym minigen reguluje ekspresję toksyny w systemie toksyna-antytoksyna.** Przy pomocy programu komputerowego, stworzonego przez mojego studenta, przeanalizowaliśmy 140 sekwencji antytoksyn z kilku różnych rodzin systemów TA typu II na obecność dwukodonowych ORFów i wśród nich zidentyfikowaliśmy 17 zawierających minigeny. To pokazuje, że takie elementy genetyczne mogą być szerzej rozpowszechnione jako mechanizm regulacyjny modułów toksyna-antytoksyna.

Celem mojej kolejnej pracy było poznanie mechanizmów determinujących ścisłą specyficzność białek systemów *yefM-yoeB* oraz *axe-txe* w stosunku do swoich partnerów biologicznych (**publikacja nr 3**). Badania filogenetyczne pokazują, że białka daleko spokrewnionych systemów TA zwykle nie wykazują interakcji krzyżowych, podczas gdy białka homologiczne bliskich sobie modułów często są w stanie oddziaływać również z nie swoimi partnerami (De Bast et al., 2008). Biorąc pod uwagę niebezpieczną dla komórki bakteryjnej naturę toksyn oraz to, że różne kasety toksyna-antytoksyna mogą współwystępować w jednym genomie w wielu kopiach, zarówno na chromosomach,

plazmidach czy też bakteriofagach, to unikanie przez nie niespecyficznego, przypadkowego reakcji krzyżowych wydaje się kluczowe. Ponieważ struktura krystaliczna kompleksu YefM-YoeB była już znana (Kamada & Hanaoka, 2005), na jej podstawie, we współpracy z dr Anną Czerwoniec z firmy VitaInSilica, wykonaliśmy modelowanie homologiczne kompleksu Axe-Txe. Ze względu na stosunkowo wysoką identyczność sekwencji aminokwasowej (25% dla antytoksyn i 50% dla toksyn) oraz duże podobieństwo otrzymanego modelu Axe-Txe oraz struktury trzeciorzędowej YefM-YoeB, postanowiłam zidentyfikować determinanty specyficzności oraz wytypować reszty aminokwasowe kluczowe dla oddziaływania pomiędzy białkami tych kompleksów TA. Za pomocą bakteryjnego systemu dwuhybrydowego oraz doświadczeń zniesienia toksyczności po produktywnym utworzeniu kompleksu TA potwierdziliśmy, że oddziaływania obu naturalnych kompleksów są wysoko specyficzne i praktycznie nie zaobserwowaliśmy oddziaływań krzyżowych. Analiza sekwencji aminokwasowych oraz struktur obu kompleksów pozwoliły nam na wytypowanie reszt aminokwasowych potencjalnie determinujących różnice w domenach wiążących białka toksyny i antytoksyny. Dalsze doświadczenia z użyciem mutantów w tych miejscach umożliwiły identyfikację mutantu Asp83Tyr w Txe, który wykazywał efektywne oddziaływanie tej toksyny z antytoksyną YefM oraz pokazały, że tak utworzony kompleks białkowy był skutecznym represorem promotora p_{yy} . Reszta Tyr82 w YoeB, która odpowiada Asp83 w Txe, oddziałuje z Tyr53 YefM. Wzajemne ułożenie pierścieni aromatycznych w tych łańcuchach bocznych jest stabilizowane przez wiązania wodorowe każdej z grup hydroksylowych z grupami karbonyłowymi znajdującymi się w łańcuchu naprzeciwko. Stąd też substytucja Asp83Tyr w Txe wystarczająco upodabnia to białko do YoeB i umożliwia jego oddziaływanie z antytoksyną YefM. Co więcej, przeprowadzone przez nas analizy pokazały, że oddziaływania pomiędzy białkami Axe i Txe mają inny charakter. Pozycjom Tyr82 w YoeB i Tyr53 w YefM odpowiadają negatywnie naładowana reszta Asp83 w Txe i dodatnio naładowana reszta Arg54 w Axe. Tak więc, **odmienna natura kluczowych oddziaływań fizykochemicznych w tych pozycjach – jonowe oddziaływania w Axe-Txe versus odpowiednie ułożenie pierścieni aromatycznych w YefM-YoeB - jest prawdopodobnie odpowiedzialna za brak interakcji krzyżowych pomiędzy białkami obu systemów.** Te wnioski znajdują potwierdzenie w wykonanej przeze mnie analizie sekwencji białkowych homologów kasety *yefM-yoeB* pochodzących z różnych gatunków bakterii oraz dostępnych danych eksperymentalnych, dotyczących obecności bądź też braku oddziaływań homologicznych pomiędzy nimi. Otóż pokazano, że białka tej kasety z *E. coli* oraz *Streptococcus pneumoniae* nie wykazują interakcji, a porównanie sekwencji obu kompleksów wskazuje, że YY_{Spm} jest bardziej podobny do Axe-Txe niż do YY_{Ecoli} , przy czym Asp83 w Txe oraz Arg54 w Axe znajdują się w odpowiadających miejscach w YY_{Spm} (Nieto et al., 2007). Z kolei Kumar i in. (2008) udowodnili, że YefM z *Mycobacterium tuberculosis* jest w stanie neutralizować toksyczność spowodowaną przez nadprodukcję YY_{Ecoli} . Białka obu tych kompleksów również posiadają wysoki stopień homologii sekwencji, a dodatkowo białka YY_{Mtub} mają w odpowiednich miejscach reszty tyrozyny, podobnie jak YY_{Ecoli} . Podsumowując, po utworzeniu kompleksu reszty aminokwasowe odpowiedzialne za toksyczność YoeB są zasłonięte przez antytoksynę YefM. Reszty Glu46, Arg65, His83 oraz Tyr84 odpowiadają za toksyczność i są konserwowane w homologach YoeB. Związanie antytoksyny YefM wymusza zmianę konformacji trzech ostatnich aminokwasów YoeB – Tyr82, His83 i Tyr84, co

destabilizuje centrum katalityczne tej endorybonukleazy (Kamada & Hanaoka, 2005). Reszty YefM odpowiedzialne za tę zmianę to Glu50, Tyr53, Ser57, Asn60 oraz Arg63. Wśród nich tylko Tyr53 oraz Asn60 różnią się pomiędzy YefM i Axe. Zatem jedyna para reszt aminokwasowych, która oddziałuje ze sobą i posiada znaczące różnice fizykochemiczne, to Tyr82 w YoeB i Tyr53 w YefM. W związku z tym, te reszty są kluczowe dla specyficzności homologicznych, lecz nie oddziałujących ze sobą toksyn i antytoksyn, które posiadają nie odpowiadające sobie reszty aminokwasowe w tych pozycjach.

Pomysł na moją następną pracę powstał z obserwacji, że pomimo podobnej budowy rejonów promotorowych oraz sekwencji operatorowych wiążących białka obu kompleksów TA, aktywność transkrypcyjna promotorów p_{yy} i p_{at} oraz poziom ich represji są znacząco odmienne. Podczas gdy promotor p_{yy} jest słabszy i całkowicie ulega inhibicji przez kompleks YefM-YoeB, to promotor p_{at} okazał się niezwykle silny i jest tylko częściowo hamowany przez białka Axe-Txe (**publikacje 1 i 2**). Postanowiłam zatem ustalić molekularne podłoże tych różnic (**publikacja 6**). Najpierw pokazałyśmy, że różnice w sile obu promotorów wynikają głównie z odmiennej sekwencji heksamery „-35” obu promotorów. Następnie wykazałyśmy, że zarówno wiązanie antytoksyn, jak i kompleksów TA do własnego i homologicznego operatora, zachodzi na podobnym poziomie. Nie jest to zaskakujące, skoro oba rejony operatorowe wykazują wysokie podobieństwo w głównych miejscach wiązania represora. W obydwu przypadkach są to dwie pary odwróconych powtórzeń z identycznym rdzeniem (5'-TGTACA-3'), których środki są oddzielone od siebie o 12 nukleotydów (**publikacja nr 1**). Jednak podczas dokładnej analizy obu tych sekwencji zauważyłam, że chociaż oba palindromy mają prawie identyczną sekwencję nukleotydową, to są one inaczej ułożone w stosunku do głównych elementów promotora. Ta obserwacja skłoniła nas do przypuszczenia, że być może **w każdym z tych przypadków zakłócony jest inny etap procesu inicjacji transkrypcji**. Główne miejsce wiązania represora do promotora p_{yy} pokrywa boks „-10”, natomiast drugi palindrom obejmuje miejsce startu transkrypcji z tego promotora. Taki sposób ułożenia sekwencji operatora sugeruje powstanie przeszkody sterycznej dla związania polimerazy RNA, co potwierdziliśmy eksperymentalnie. Z kolei główne miejsce wiązania represora w rejonie promotora p_{at} znajduje się w obrębie łącznika pomiędzy boksami „-10” i „-35”, podczas gdy drugi palindrom częściowo obejmuje heksamer „-10”. Takie ułożenie elementów operatora potencjalnie umożliwia równoczesne związanie polimerazy RNA oraz represora i inhibicja inicjacji transkrypcji prawdopodobnie zachodzi na dalszym etapie tego procesu. W naszych doświadczeniach potwierdziliśmy, że do sekwencji promotora p_{at} możliwe jest jednoczesne związanie kompleksu represora i RNAP. Zgodnie z naszą wiedzą, we wszystkich opisanych do tej pory przypadkach, w których białko wiązało się do sekwencji łącznika, następowało zablokowanie etapu tworzenia kompleksu otwartego podczas inicjacji transkrypcji. Wynika to z faktu, że do efektywnego otwarcia promotora, fizyczne deformacje powodujące zmiany konformacji w obrębie łącznika zachodzą równolegle z rozerwaniem wiązań wodorowych w boksie „-10” (Sztiller-Sikorska et al., 2011). Tak więc, każde białko wiążące się w tym rejonie DNA musi zablokować tworzenie kompleksu otwartego. Negatywna autoregulacja na poziomie inicjacji transkrypcji jest cechą charakterystyczną większości operonów systemów TA typu II, jednakże dla żadnego z nich konkretny etap tego wielostopniowego procesu do tej pory nie był dokładnie zbadany. Kolejnym elementem, który zidentyfikowaliśmy w ramach prac do tej publikacji, jest **dotatkowy promotor zlokalizowany 40 nukleotydów powyżej**

promotora p_{at} , który nazwaliśmy p_{at2} . Jak wynika z przeprowadzonych przez nas doświadczeń, przyczynia się on pozytywnie do ekspresji genów *axe-txe*, a że nie jest regulowany przez białka systemu, transkrypcja z tego promotora maskuje poziom represji promotora p_{at} . To wyjaśnia potrzebę istnienia dodatkowych czynników regulatorowych, które kontrolowałyby właściwą równowagę w produkcji toksyny i antytoksyny. Tak więc, obecność takich elementów, jak wewnętrzne promotory w obrębie genów *axe* i *txe*, a także szpilka terminacyjna za *txe*, czy też niedawno zidentyfikowany przeze mnie w odcinku liderowym transkryptu pochodzącego z promotora p_{axe} minigen, zapewniają właściwe funkcjonowanie tej kasety.

Dwie kolejne publikacje, które ujęłam w swoim osiągnięciu naukowym, są pracami przeglądowymi (**publikacje 4 i 5**). Pierwsza z nich (**publikacja 4**) dotyczy **różnych strategii regulacyjnych, jakie wykształciły się w systemach toksyna-antytoksyna typu II, w celu kontrolowania odpowiedniego poziomu obu białek w komórce bakteryjnej**. Pomysł na tę pracę powstał z potrzeby umiejscowienia uzyskanych przeze mnie wyników nad regulacją ekspresji operonów *yefM-yoeB* oraz *axe-txe* w szerszym kontekście i konfrontacji z danymi otrzymanymi w badaniach innych systemów TA. Zdecydowana większość poznanych do tej pory modułów TA typu II wykorzystuje do regulacji ekspresji swoich genów mechanizm negatywnej autoregulacji na poziomie inicjacji transkrypcji. W typowym systemie, geny trucizny i odtrutki ulegają ekspresji z jednego promotora, w obrębie którego znajdują się sekwencje operatora. Zwykle antytoksyna wiąże się bezpośrednio z miejscem operatorowym częściowo hamując transkrypcję z własnego promotora, a toksyna pełni rolę specyficznego korepresora wzmacniającego i stabilizującego to oddziaływanie. Jednakże wnikliwa analiza danych literaturowych dostarczyła nam wiele przykładów zróżnicowania tych procesów. Przedstawiliśmy systemy, w których rozpoznano dodatkowe elementy regulatorowe (geny, promotory), a także takie, w których toksyna lub zupełnie inne białko pełnią funkcje represora całego układu. Opisaliśmy też moduły, które w ogóle nie podlegają autoregulacji oraz przykłady białek TA, które regulują ekspresję różnych genów komórkowych. Dodatkowo przeanalizowaliśmy możliwe do zastosowania oraz już opublikowane, strategie sztucznej indukcji toksyny, w tym przez zaburzenie regulacji jej ekspresji, w celu opracowania potencjalnych metod zwalczania zakażeń bakteryjnych na zasadzie „samobójstwa od wewnątrz”.

Druga praca przeglądowa dotyczy roli systemów toksyna-antytoksyna w patogenezie chorób wywoływanych przez bakterie (**publikacja nr 5**). Podsumowaliśmy w niej ówczesną wiedzę na temat **molekularnych mechanizmów, przez które systemy TA** (w tym YefM-YoeB z *E. coli* i jego homologi z patogennych gatunków bakterii) **są bezpośrednio i aktywnie zaangażowane w wirulencję bakterii, produkcję komórek przetrwałych (ang. persister cells) oraz tworzenie biofilmu**. Pokazaliśmy skomplikowane i wielopłaszczyznowe sieci powiązań białkowych koordynujących te procesy i miejsca modułów TA w tych układach. Co prawda obecnie niektórzy naukowcy uważają, że rola systemów TA w powstawaniu komórek przetrwałych nie jest wiarygodnie udokumentowana (Song & Wood, 2020), nie mniej jednak istnieją przesłanki na to, że potencjalnie mogą one taką funkcję pełnić.

Za swoje najważniejsze osiągnięcia przedstawione w cyklu prac uważam:

- poznanie i opisanie mechanizmu regulacji ekspresji genów systemu *yefM-yoeB*;
- udowodnienie, że antytoksyna YefM nie jest natywnie niesfałdowanym białkiem, jak wcześniej uważano, lecz posiada znaczące struktury drugo- i trzeciorzędowe;
- wykazanie, że regulacja ekspresji genów *axe-txe* (badana w komórkach *E. coli*) jest bardzo skomplikowana, co wyróżnia ten system spośród innych do tej pory opisanych;
- odkrycie minigenu jako nowego czynnika regulatorowego w systemach toksyna-antytoksyna i zaproponowanie potencjalnego mechanizmu działania tego elementu genetycznego na ekspresję toksyny Txe;
- wyjaśnienie mechanizmu determinującego wysoką specyficzność obu modułów i brak interakcji krzyżowych pomiędzy partnerami białkowymi; pokazaliśmy, że jest on związany z odmienną naturą oddziaływań fizykochemicznych pomiędzy kluczowymi resztami aminokwasowymi białek trucizny i odtrutki (jonowe oddziaływania pomiędzy Asp83-Txe i Arg54-Axe *versus* odpowiednie ułożenie pierścieni aromatycznych w Tyr82-YoeB i Tyr53-YefM);
- wykazanie, że za różną wydajność inhibicji transkrypcji z promotorów p_{yy} i p_{at} odpowiada odmiennie rozmieszczenie sekwencji wiązania represora względem głównych elementów promotora, co wpływa na to, że inne etapy tego procesu są zablokowane w przypadku każdego z tych promotorów (p_{yy} - blokowanie miejsca RNAP; p_{at} - uniemożliwienie utworzenia kompleksu otwartego);
- szczegółowy przegląd i analizę różnorodnych mechanizmów regulujących ekspresję genów systemów TA typu II;
- pokazanie skomplikowanych i wielopłaszczyznowych sieci powiązań białkowych koordynujących procesy wirulencji, powstawania komórek przetrwałych oraz biofilmów i umiejscowienie modułów TA w tych układach.

Literatura uzupełniająca (obejmuje tylko najważniejsze pozycje):

Cataudella, I., Trusina, A., Sneppen, K., Gerdes, K., & Mitarai, N. (2012). Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery. *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6424–6434. <https://doi.org/10.1093/nar/gks297>

Cherny, I., & Gazit, E. (2004). The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins: Implications as a novel antibacterial target. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8252–8261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308263200>

Cherny, I., Rockah, L., & Gazit, E. (2005). The YoeB toxin is a folded protein that forms a physical complex with the unfolded YefM antitoxin: Implications for a structural-based differential stability of toxin-antitoxin systems. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30063–30072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506220200>

Cruz-Vera, L. R., Hernández-Ramón, E., Pérez-Zamorano, B., & Guarneros, G. (2003). The rate of peptidyl-tRNA dissociation from the ribosome during minigene expression depends on the nature of the last decoding interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 26065–

26070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301129200>

De Bast, M. S., Mine, N., & Van Melderen, L. (2008). Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as antiaddiction modules. *Journal of Bacteriology*, *190*(13), 4603–4609. <https://doi.org/10.1128/JB.00357-08>

Grady, R., & Hayes, F. (2003). Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiology*, *47*(5), 1419–1432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03387.x>

Hayes, F., & Van Melderen, L. (2011). Toxins-antitoxins: Diversity, evolution and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *46*(5), 386–408. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.600437>

Islam, M. S., Shaw, R. K., Frankel, G., Pallen, M. J., & Busby, S. J. W. (2012). Translation of a minigene in the 5' leader sequence of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* LEE1 transcription unit affects expression of the neighbouring downstream gene. *Biochemical Journal*, *441*(1), 247–253. <https://doi.org/10.1042/BJ20110912>

Jurénas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(6), 335–350. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>

Kamada, K., & Hanaoka, F. (2005). Conformational Change in the Catalytic Site of the Ribonuclease YoeB Toxin by YefM Antitoxin. *Molecular Cell*, *19*(4), 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.004>

Kędzierska, B., & Hayes, F. (2016). Transcriptional Control of Toxin-Antitoxin Expression: Keeping Toxins Under Wraps Until the Time is Right. In *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch42>

Kumar, P., Issac, B., Dodson, E. J., Turkenburg, J. P., & Mande, S. C. (2008). Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* YefM Antitoxin Reveals that it is Not an Intrinsically Unstructured Protein. *Journal of Molecular Biology*, *383*(3), 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.067>

Lodato, P. B., Hsieh, P.-K., Belasco, J. G., & Kaper, J. B. (2012). The ribosome binding site of a mini-ORF protects a T3SS mRNA from degradation by RNase E. *Molecular Microbiology*, *86*(5), 1167. <https://doi.org/10.1111/MMI.12050>

Nieto, C., Cherny, I., Seok, K. K., De Lacoba, M. G., Wai, T. C., Chew, C. Y., Gazit, E., & Espinosa, M. (2007). The yefM-yoeB toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: Functional and structural correlation. *Journal of Bacteriology*, *189*(4), 1266–1278. <https://doi.org/10.1128/JB.01130-06>

Pomerantsev, A. P., Golovliov, I. R., Ohara, Y., Mokrievich, A. N., Obuchi, M., Norqvist, A., Kuoppa, K., & Pavlov, V. M. (2001). Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10. *Plasmid*, *46*(3), 210–222. <https://doi.org/10.1006/plas.2001.1548>

Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., & Rathore, J. S. (2021). Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. *Current Research in Microbial*

Sciences, 2, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100047>

Song, S., & Wood, T. K. (2020). Toxin/Antitoxin System Paradigms: Toxins Bound to Antitoxins Are Not Likely Activated by Preferential Antitoxin Degradation. *Advanced Biosystems*, 4(3), 1–5. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900290>

Sztiller-Sikorska, M., Heyduk, E., & Heyduk, T. (2011). Promoter spacer DNA plays an active role in integrating the functional consequences of RNA polymerase contacts with -10 and -35 promoter elements. *Biophysical Chemistry*, 159(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2011.05.008>

Yamaguchi, Y., Park, J.-H., & Inouye, M. (2011). Toxin-Antitoxin Systems in Bacteria and Archaea. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 61–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132412>

d). Obecne badania i przyszłe plany naukowe

Badania opisane wyżej pokazały, że regulacja ekspresji genów *yefM-yoeB* jest typowa dla większości znanych systemów TA typu II i polega na negatywnej autoregulacji na etapie inicjacji transkrypcji, natomiast przypadku modułu *axe-txe* jest bardzo skomplikowana, co wyróżnia ten system spośród innych do tej pory poznanych. Obecność bardzo silnego promotora p_{at} umożliwiła dostrzeżenie niezwykle złożonego mechanizmu kontrolującego ekspresję tego operonu, gdzie poza typową, negatywną autoregulacją, wewnątrz kasety zidentyfikowaliśmy dodatkowe elementy regulatorowe. Niemniej jednak dalsze badania są potrzebne, aby poznać dokładny mechanizm regulacji ekspresji tych genów i wzajemne współdziałanie wszystkich istniejących elementów tego skomplikowanego układu.

Obecnie kontynuuję prace nad wyjaśnieniem mechanizmów działania szpilki terminacyjnej zlokalizowanej za genem *txe*, antysensownego transkryptu z promotora p_{txe} oraz minigeny zidentyfikowanego w odcinku liderowym transkryptu z promotora p_{axe} . W funkcjonowaniu tych wszystkich elementów genetycznych potencjalną rolę odgrywają rybonukleazy bakteryjne. Ponadto, jakiś czas temu rozpoczęłam doświadczenia zmierzające do wyjaśnienia, w jaki sposób kasetta *axe-txe* jest regulowana w naturalnym gospodarzu, czyli enterokokach. Wykorzystywany przeze mnie do tej pory i praktycznie jedyny stosowany w badaniach enterokoków, system reporterowy z genem *lacZ* w plazmidzie pTCVlac, umożliwił mi dostrzeżenie jedynie najsilniejszego elementu, jakim jest promotor p_{at} , dlatego zaczęłam prace nad stworzeniem systemu opartego na genach *lux*, który powinien być bardziej czuły. Oczyściłam również polimerazę RNA pochodzącą z tych bakterii, co umożliwia mi wykonanie potrzebnych doświadczeń *in vitro*. W pierwszych eksperymentach transkrypcji *in vitro* z tą RNAP udało mi się pokazać wszystkie trzy transkrypty powstające z promotorów zidentyfikowanych przeze mnie wcześniej w obrębie kasety *axe-txe*. Uważam, że moduł Axe-Txe stanowi znakomity model do badań regulacji ekspresji genów TA, ale może także dostarczyć cennych informacji na temat różnorodnych strategii wykorzystywanych przez bakterie w celu precyzyjnej kontroli ekspresji genów, w ogóle.

Jednym z takich elementów regulatorowych, który mnie najbardziej zainteresował są minigeny. Zamierzam im poświęcić swój kolejny projekt, o którego finansowanie zwrócę się do NCN. Z danych bioinformatycznych wynika, że małe otwarte ramki odczytu są szeroko rozpowszechnione w genomach bakteryjnych, ale do tej pory niewiele z nich zostało

opisanych. W literaturze istnieje zaledwie kilka udokumentowanych przykładów wpływu minigenów na ekspresję innego cistronu, a jedynie w jednym przypadku zaproponowano mechanizm takiego działania. W związku z tym, widzę duże możliwości do dalszego rozwoju naukowego na tym polu.

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

W 1993 roku rozpoczęłam pięcioletnie studia magisterskie na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę dyplomową wykonywałam w Katedrze Biologii Molekularnej kierowanej przez prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, pod bezpośrednią opieką dr (obecnie prof. dr hab.) Michała Obuchowskiego. W tym czasie jeden z głównych nurtów badawczych w Katedrze dotyczył molekularnych mechanizmów warunkujących rozwój bakteriofaga λ . Po zakażeniu komórek gospodarza fag λ musi wybrać jedną z dwóch alternatywnych dróg rozwoju – lizę lub lizogenię. Rozwój lityczny prowadzi do wytworzenia wirionów potomnych i uwolnienia ich po lizie komórek bakteryjnych, natomiast w cyklu lizogenicznym genom faga integruje się z chromosomem gospodarza przyjmując formę profaga. Decyzja, którą z tych dróg wybrać, jest kluczowa dla rozwoju wirusa i zależy od aktywności białek CI, CII oraz CIII. Białko CI jest represorem głównych promotorów litycznych - p_R i p_L , ale z drugiej strony jest aktywatorem swojego własnego promotora – p_M . Tuż po zakażeniu komórki bakteryjnej promotor p_M jest nieaktywny i za wczesną ekspresję genu cI odpowiada promotor p_E . Jest on, wraz z dwoma innymi promotorami - p_I i p_{aQ} , aktywowany przez białko CII. Promotor p_I odpowiada za ekspresję integrazy, natomiast z promotora p_{aQ} powstaje transkrypt antysensowny do genu kodującego białko antyterminatorowe Q. Białko CII jest szybko degradowane przez komórkową proteazę FtsH (HflB), którego inhibitorem jest białko CIII, więc jego aktywność pośrednio stabilizuje CII.

Pomysł na moje badania zrodził się z wcześniej opublikowanych wyników pokazujących, że bakteriofag λ nie może wejść w cykl lizogeniczny w mutancie *Escherichia coli rpoA341*. Mutacja ta powoduje pojedynczą zmianę aminokwasową K271E w C-terminalnej domenie podjednostki α (α CTD) bakteryjnej polimerazy RNA (RNAP), co skutkuje defektem w aktywacji transkrypcji przez fagowe białka CI i CII. Najpierw postanowiliśmy zbadać wpływ wyżej wspomnianej mutacji na wydajność aktywacji transkrypcji z promotorów zależnych od białka CII za pomocą fuzji transkrypcyjnych. Efektem tych badań była moja praca magisterska pt. „Genetyczna analiza oddziaływań aktywatora CII bakteriofaga λ z polimerazą RNA *Escherichia coli* w rejonach promotorów p_I i p_{aQ} ”, która powstała w 1998 roku, a jej wyniki zostały także przeze mnie zaprezentowane na XXIV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku (Załącznik 4, pkt 7a [1]). Ponadto część wyników weszła w skład publikacji wydanej w *Acta Biochimica Polonica* w tym samym roku, w której pokazaliśmy, że mechanizm aktywacji transkrypcji z wszystkich trzech promotorów zależnych od białka CII musi być odmienny, z uwagi na to, że każdy z nich wykazywał inny stopień aktywacji w mutancie *rpoA341* – aktywność promotora p_E była najbardziej upośledzona, promotor p_I okazał się częściowo aktywny, natomiast aktywność promotora p_{aQ} była prawie niezaburzona (Załącznik 4, pkt 4a [1]).

Po ukończeniu studiów, w **1998** roku, zostałam słuchaczką Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. W ramach pracy doktorskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna, kontynuowałam badania nad rolą podjednostki α bakteryjnej polimerazy RNA w aktywacji transkrypcji przez białka CI i CII. Dzięki współpracy nawiązanej przez mojego Promotora z dr Markiem Thomasem z University of Sheffield Medical School w Wielkiej Brytanii, otrzymaliśmy kolekcję plazmidów zawierających kompletny skan alaninowy C-terminalnej domeny podjednostki α RNAP. Dzięki temu, w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem fuzji transkrypcyjnych badanego promotora z genem reporterowym *lacZ*, byliśmy w stanie wytypować reszty aminokwasowe w α CTD odpowiedzialne za oddziaływanie z białkiem CI przy aktywacji promotora p_M oraz z białkiem CII przy aktywacji promotora p_E . Jednak żeby potwierdzić, że otrzymane wyniki pokazują bezpośrednie oddziaływania pomiędzy tymi białkami zaistniała potrzeba wykonania badań *in vitro*. W tym celu odbyłam **dwie trzymiesięczne staże w Wielkiej Brytanii**, podczas których zdobyłam doświadczenie w różnorodnych technikach umożliwiających badanie procesu transkrypcji metodami *in vitro*. Na pierwszy z nich pojechałam w **2000** roku do laboratorium dr Marka Thomasa w University of Sheffield Medical School w ramach przyznanego mi stypendium **EMBO Short Term Fellowship**. Będąc tam sklonowałam kilkanaście, wybranych na podstawie moich wcześniejszych badań, wariantów alaninowych α CTD do wektora ekspresyjnego umożliwiającego oczyszczenie tych białek na złożu niklowym. W międzyczasie przygotowałam pozostałe podjednostki RNAP w postaci ciał inkluzyjnych, a następnie dokonałam rekonstytucji całych holoenzymów z wcześniej oczyszczonymi wariantami podjednostki α . Przeprowadziłam również pierwsze próbne reakcje transkrypcji *in vitro*, aby sprawdzić działanie oczyszczonych RNAP oraz zoptymalizować warunki reakcji, które dokończyłam już w kraju. Wyniki otrzymane w doświadczeniach *in vivo* i *in vitro* okazały się całkowicie spójne, jednak żeby precyzyjnie określić miejsca oddziaływania α CTD oraz białka aktywatorowego z rejonem promotora, potrzebne były dalsze szczegółowe badania. Dlatego też na drugi staż, w **2002** roku, pojechałam do laboratorium prof. Steve'a Busby'ego w University of Birmingham. Profesor Busby jest jednym z najbardziej cenionych na świecie ekspertów zajmujących się procesem regulacji ekspresji genów bakteryjnych na poziomie inicjacji transkrypcji. Na ten wyjazd otrzymałam stypendium **FEBS Collaborative Experimental Scholarship for Central & Eastern Europe**. Podczas pobytu w Birmingham wykonałam serię doświadczeń typu footprinting, stosując zarówno DNazę I jak i zupełnie nową w tamtym czasie, nukleazę FeBABE. Użycie tej drugiej metody umożliwiło mi bardzo precyzyjne określenie pozycji oddziaływania α CTD z DNA obu badanych promotorów, jak również określenie orientacji, w jakiej znajduje się podjednostka α w obecności obu białek aktywatorowych. W **2003** roku pojechałam kolejny raz do prof. Busby'ego, tym razem na dwutygodniowe konsultacje naukowe, podczas których analizowaliśmy wcześniej otrzymane wyniki i omawialiśmy koncepcje publikacji. Pod koniec tego pobytu wzięłam udział w dwudniowych warsztatach - **XVth RNA Polymerase Workshop**, na których wygłosiłam referat (**Załącznik 4, pkt 7a [10]**). Owocem tych staży naukowych były dwie publikacje w czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, które ukazały się już po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora, jedna w **2004** roku, a druga w **2007** roku (**Załącznik 4, pkt 4b [5 i 7]**). W pierwszej z tych prac pokazaliśmy, że podczas aktywacji promotora p_E przez białko CII α CTD wiąże się

swoją determinantą 265 do DNA w pozycji -41, licząc od miejsca startu transkrypcji, i jest usytuowana w taki sposób, że jej determinanta 261 jest skierowana w stronę podjednostki σ RNAP, natomiast białko CII przyjmuje nietypową lokalizację wiążąc się po przeciwnej stronie podwójnej helisy niż RNAP. Z kolei w drugiej publikacji wykazaliśmy, że α CTD podczas aktywacji przez białko CI, wiąże się w rejonie -54 promotora p_M pomiędzy miejscami O_{R1} i O_{R2} zajętej przez CI. W ten sposób determinanta 265 podjednostki α oddziałuje bezpośrednio z DNA, a jej determinanty 261 i 287 odpowiednio z dwoma dimerami białka CI.

W skład mojej rozprawy doktorskiej, oprócz badań nad rolą podjednostki α w regulacji transkrypcji z promotorów zależnych od białka CII, weszły jeszcze prace nad próbą wyjaśnienia sposobu, w jaki dochodzi do ochrony białka CII przez białko CIII oraz nad mechanizmem toksyczności białka CII w stosunku do komórek *E. coli*. W pierwszej z nich pokazaliśmy, że białko CIII wpływa nie tylko na poziom białka CII, blokując działanie proteazy FtsH, ale również może działać jako swoiste białko opiekuńcze, szczególnie przy wysokich stężeniach CII. Te wyniki zostały opublikowane na łamach *Virus Genes* w **2001** roku (**Załącznik 4, pkt 4a [2]**). W kolejnej pracy postanowiliśmy wyjaśnić, dlaczego nadprodukcja białka CII jest silnie toksyczna dla komórek *E. coli*. Hipotezą, która z początku nam się nasuwała, było działanie CII jako regulatora transkrypcji jakiegoś/jakichś genów gospodarza, jednak po dokładniejszym zbadaniu okazało się, że nadmiar CII drastycznie hamuje proces replikacji bakteryjnego DNA, prawdopodobnie oddziałując bezpośrednio z którymś ze składników komórkowej maszynerii replikacyjnej. Wyniki tych badań ukazały się w **2003** roku w *Virology* (**Załącznik 4, pkt 4a [4]**). W czasie studiów doktoranckich uczestniczyłam także w badaniach nad białkiem SeqA, które jest negatywnym regulatorem inicjacji replikacji bakteryjnego chromosomu. Pokazaliśmy, że białko to uczestniczy również w rozwoju faga λ wspomagając aktywację promotorów p_I i p_{aQ} przez białko CII, natomiast nie odgrywa takiej roli w przypadku promotora p_E . Wykazaliśmy, że to działanie jest zależne od metylacji DNA oraz od rozmieszczenia w pobliżu tych promotorów miejsc GATC, rozpoznawanych przez SeqA. Te wyniki weszły w skład publikacji, która ukazała się w **2003** roku w *Molecular Microbiology* (**Załącznik 4, pkt 4a [3]**). Wyniki moich badań z tego okresu były prezentowane przeze mnie lub innych współautorów na licznych krajowych i międzynarodowych konferencjach, co zostało wyszczególnione w **Załączniku 4, pkt 7a [2-10]**.

Obrona mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Mechanizm aktywacji transkrypcji przez białko CII bakteriofaga λ ” odbyła się w grudniu **2003** roku. Recenzentami w przewodzie doktorskim byli prof. dr hab. Barbara Lipińska z Katedry Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz prof. dr hab. Zygmunt Wasylewski z Zakładu Biochemii Fizycznej w Instytucie Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

W styczniu **2004** roku rozpoczęłam **staż podoktorski** w laboratorium dr Finbarra Hayesa w Manchester Interdisciplinary Biocentre (MIB), University of Manchester w Wielkiej Brytanii. Zostałam głównym wykonawcą projektu pt. "Programmed cell death in bacteria: the *yefM-yoeB* module of *Escherichia coli*" w ramach grantu przyznanego dr Hayesowi przez The Wellcome Trust, którego celem było poznanie mechanizmów regulujących ekspresję genów chromosomalnego systemu toksyna-antytoksyna *yefM-yoeB* *E. coli*. Moje prace znów dotyczyły mechanizmów regulacyjnych na poziomie inicjacji transkrypcji, ale tym razem represji, a nie aktywacji tego procesu. W wyniku przeprowadzonych przeze mnie

eksperymentów udało nam się wykazać między innymi, że ekspresja genów operonu *yefM-yoeB* podlega negatywnej autoregulacji, pokazać rolę białek YefM i YoeB w tym procesie czy też zidentyfikować dokładne miejsca wiązania antytoksyny YefM z DNA. Wyniki te zostały opublikowane w **2007** roku w czasopiśmie *Nucleic Acids Research*. Wchodzą one w skład mojego osiągnięcia naukowego, w związku z czym zostały szczegółowo opisane w **rozdziale 4c**. Oprócz tego brałam udział w badaniach dotyczących poznania procesu partycji plazmidu pGENT pochodzącego z klinicznego izolatu *Enterococcus faecium*. Partycja, czyli aktywna segregacja cząstek plazmidowych do komórek potomnych jest istotnym mechanizmem w przypadku plazmidów niskokopijnych, które inaczej byłyby szybko gubione z populacji bakterii. W tej pracy zidentyfikowaliśmy i przeanalizowaliśmy sekwencje centromerowe plazmidu pGENT – *cenE*. Okazało się, że rejon ten ma bardzo specyficzną budowę - składa się z trzech miejsc CES, z których każde zawiera siedem boksów TATA. Poniżej *cenE* znajduje się operon kodujący geny *prgPO*, z których pierwszy koduje białko segregacyjne PrgP, a drugi białko PrgO będące homodimerem specyficznie wiążącym się z miejscami CES. Ponadto wykazaliśmy, że sekwencja *cenE* ma wewnątrznie zakrzywioną strukturę, która organizacyjnie przypomina centromery drożdżowe, co może wskazywać na podobne wymagania architektoniczne podczas składania kompleksu mitotycznego u drożdży i u bakterii. Wyniki te zostały opublikowane w czasopiśmie *PNAS* w **2008** roku (**Załącznik 4, pkt 4b [8]**). Rezultaty moich badań z okresu pobytu w Manchesterze były prezentowane przeze mnie lub innych współautorów na kilku konferencjach, co zostało wyszczególnione w **Załączniku 4, pkt 7b [12-14]**.

Po powrocie ze stażu podoktorskiego, w **2006** roku, zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta na etacie naukowo-dydaktycznym w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego. Następnie prawie przez rok przebywałam na urlopie macierzyńskim i wychowawczym związanym z urodzeniem pierwszego syna. Po powrocie do pracy zajęłam się przygotowaniem zajęć dydaktycznych, które zostały mi przydzielone w ramach pensum. Napisałam również projekt na badania własne na konkurs ogłoszony przez MNiSW, który zatytułowałam „Mechanizm działania systemu toksyna-antytoksyna, Axe-Txe, pochodzącego z patogennej bakterii *Enterococcus faecium*”. Pomysł na te badania zrodził się jeszcze podczas stażu w Manchesterze, kiedy oprócz eksperymentów związanych z regulacją genów chromosomalnej kasety toksyna-antytoksyna *yefM-yoeB* z *E. coli*, przeprowadziłam pilotażowe doświadczenia z innym systemem TA - *axe-txe*. Moduł ten został zidentyfikowany na plazmidzie pRUM pochodzącym z klinicznego izolatu *Enterococcus faecium* i wstępnie scharakteryzowany w laboratorium dr Hayesa kilka lat wcześniej. W grudniu **2008** roku otrzymałam dwie wiadomości – że spodziewam się drugiego syna oraz że mój wniosek grantowy został zakwalifikowany do finansowania. W związku z powyższym, realizację grantu rozpoczęłam dopiero po powrocie z urlopu macierzyńskiego w **2010** roku. Ponieważ wszystkie kolejne publikacje, poza jedną, są efektem realizacji tego projektu i wchodzą w skład osiągnięcia naukowego, zostały szerzej opisane powyżej, w **rozdziale 4c**. Jedyne, opublikowana w **2012** roku w *Acta Biochimica Polonica*, praca dotycząca roli białek szoku termicznego i kobalaminy w utrzymaniu aktywności syntetazy metioninowej jest efektem mojej krótkotrwałej współpracy z grupą prof. dr hab. Bogdana Baneckiego z Wydziału Biotechnologii UG i GUMed (**Załącznik 4, pkt 4b [9]**).

W **2013** roku poznałam dr Luisa Rios Hernandeza z University of Puerto Rico w Mayaguez (UPRM). Został on zaproszony na Uniwersytet Gdański w ramach współpracy z American Society for Microbiology (ASM) do poprowadzenia warsztatów z zakresu rozwoju kariery naukowej. Po warsztatach, dr Hernandez wygłosił w Katedrze Biologii Molekularnej wykład, w którym przedstawił swoje zainteresowania badawcze. Dotyczą one między innymi zastosowania bakterii z rodzaju *Enterococcus* jako bioindykatorów fekalnych zanieczyszczeń wód. W Puerto Rico wykorzystuje się enterokoki do oceny czystości wód rekreacyjnych w strefach przybrzeżnych. Tymczasem, wyniki badań przeprowadzonych w laboratorium dr Hernandeza pokazały, że bakterie te łatwo przystosowują się do życia w tym środowisku i ich obecność w badanych próbkach wody wcale nie musi wskazywać na aktualne zanieczyszczenie kałem. Pojawiło się zatem pytanie, czy istnieje możliwość odróżnienia enterokoków, które rzeczywiście stanowią źródło fekalnych zanieczyszczeń od tych, które już naturalnie bytują w wodach przybrzeżnych czy na plażach. Zaproponowałam, by przeanalizować szczepy enterokokowe różnego pochodzenia na obecność specyficznych plazmidów, które często zawierają determinanty oporności na antybiotyki, czynniki wirulencji oraz moduły adyukcyjne w postaci systemów toksyna-antytoksyna i zobaczyć, czy różnią się one między sobą w jakiś charakterystyczny sposób. Na te badania dr Hernandez napisał projekt pt. "The Polish connection: A tail of pheromones, addiction modules and survivability of *Enterococcus faecalis* in natural ecosystems in Puerto Rico" i otrzymał stypendium Amerykańskiej Fundacji Fulbrighta na roczny pobyt i prowadzenie badań naukowych w Katedrze Biologii Molekularnej UG. Od września **2015** do lipca **2016** roku pełniłam funkcję opiekuna i koordynatora merytorycznego tego projektu. W ramach prac eksperymentalnych zostało przetestowanych kilkadziesiąt przywiezionych przez dr Hernandeza izolatów enterokoków. Najpierw zastosowaliśmy elektroforezę w zmiennym polu elektrycznym – PFGE (ang. pulsed-field gel electrophoresis), która służy do różnicowania i identyfikacji szczepów bakteryjnych. Dostęp do aparatury uzyskaliśmy dzięki uprzejmości prof. dr hab. Michała Obuchowskiego na Wydziale Biotechnologii UG i GUMed, w Zakładzie Bakteriologii Molekularnej. W międzyczasie przeprowadziliśmy szereg reakcji multiplex PCR ze starterami specyficznymi do różnych typów *origin* replikacji plazmidów enterokokowych, genów wirulencji (*asa1*, *gelE*, *esp*, *hyl* i *cylA*) oraz systemów toksyna-antytoksyna - *par*, *axe-txe*, ω - ϵ - ζ , *relBE* i *mazEF*. Wstępne wyniki naszych prac zostały zaprezentowane w **2016** roku podczas konferencji *Forward Research & Innovation Summit* odbywającej się w Puerto Rico (**Załącznik 4 pkt 7b [21]**). Prace były kontynuowane po powrocie dr Hernandeza do swojej macierzystej jednostki, niestety huragan Maria, który spustoszył Puerto Rico we wrześniu **2017** roku, spowodował brak prądu przez wiele tygodni, co w znacznym stopniu unicestwiło kolekcję szczepów oraz enzymów i uniemożliwiło dokończenie badań. Ponadto UPRM drastycznie obniżyło dotacje na badania naukowe, w związku z czym dr Hernandez został zmuszony ograniczyć swoją działalność do dydaktyki akademickiej. Pomimo braku wymiernych korzyści w postaci publikacji, uważam, że współpraca z dr Luisem Hernandezem była bardzo cenna zarówno dla mnie, jak i dla naszego Wydziału. Podczas swojego pobytu, oprócz badań naukowych, dr Hernandez prowadził również zajęcia audytoryjne ze studentami biologii z przedmiotu pt. „Anaerobic Microbiology” oraz wygłosił kilka wykładów w ramach programu organizowanego przez Wydział Biologii „Zaproś naukowca do szkoły” dla uczniów trójmiejskich liceów.

W latach **2014-2018** brałam udział w realizacji projektu prof. dr hab. Katarzyny Potrykus z mojej macierzystej jednostki jako konsultant i ekspert. Ze względu na zmianę podejścia eksperymentalnego nie zostały przeprowadzone badania *in vitro*, które miałam osobiście wykonywać. Natomiast od **2020** roku aktywnie współpracuję z dr hab. Sabiną Kędzierską-Mieszkowską, prof. UG z Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej naszego Wydziału przy realizacji projektu dotyczącego alternatywnych czynników sigma - ECF (ang. extracytoplasmic function sigma factors) patogennego szczepu *Leptospira interrogans*. Zajmuję się badaniem oddziaływania i specyficzności kilku zidentyfikowanych w tym szczepie czynników σ^E w autoregulacji oraz w regulacji ekspresji genu *cplB* kodującego białko opiekuńcze ClpB, będące równocześnie jednym z ważnych czynników wirulencji u leptospir. Prace eksperymentalne do jednej z publikacji są już na końcowym etapie realizacji.

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

a). osiągnięcia dydaktyczne:

- Przygotowanie i prowadzenie zajęć dydaktycznych (**240** godzin pensum rocznie). Do swoich zajęć (wykładów, seminariów, ćwiczeń) wykorzystuję własne prezentacje i skrypty oraz skonstruowane przez siebie szczepy i wektory plazmidowe, a także inne materiały dydaktyczne.

[1] Elementy biologii molekularnej w ochronie środowiska - wykład (30 godz) i ćwiczenia (30 godz/grupę) – dla studentów III roku Ochrony Środowiska na Wydziale Chemii UG – od **2008** roku, z przerwami.

[2] Biologia molekularna i genetyka – wykład (20 godz) i ćwiczenia (30 godz/grupę) – dla studentów II roku Bioinformatyki na Wydziale Matematyki, Fizyki i Informatyki UG – od **2016** roku.

[3] Podstawy biologii – wykład (20 godz) i ćwiczenia (20 godz/grupę) – dla studentów I roku Bezpieczeństwa Jądrowego i Ochrony Radiologicznej na Wydziale Matematyki, Fizyki i Informatyki UG – od **2016** roku.

[4] Seminarium dla studentów III roku Biologii, Biologii Medycznej i Biologii i Genetyki Eksperymentalnej na Wydziale Biologii UG (30 godz/grupę) – od **2008** roku.

[5] Pracownie specjalnościowe i dyplomowe dla studentów I i II stopnia specjalizacji Biologia molekularna na Wydziale Biologii UG – od **2008** roku.

[6] Pracownia projektowa dla studentów III roku na Wydziale Biologii UG (60 godz/grupę) – w latach **2013 – 2015**.

[7] Ćwiczenia z mikrobiologii dla studentów II roku Ochrony Środowiska na Wydziale Chemii UG (30 godz/grupę) – **2011** rok.

[8] Ćwiczenia z Biologii molekularnej dla studentów II roku Biologii i Biologii Medycznej na Wydziale Biologii UG – w różnych latach.

[9] Pracownia półdzienna z Biologii molekularnej dla studentów III roku specjalizacji Biologia molekularna na Wydziale Biologii UG – w różnych latach.

- Opieka naukowa nad studentami. Staram się angażować studentów w swoje prace badawcze, dzięki temu troje z moich magistrantów zostało współautorami publikacji wchodzących w skład przedstawionego tu osiągnięcia naukowego.

[1] Pełniłam rolę **promotora pomocniczego** w przewodzie doktorskim pani Lidii Boss (rozprawa doktorska pt. „Mechanizm regulacji ekspresji genów systemu toksyna – antytoksyna, *Axe-Txe*, pochodzącego z patogennej bakterii *Enterococcus faecium*”). Praca została obroniona z wyróżnieniem w **2015** roku na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

[2] Sprawowałam opiekę promotorską nad **7** pracami magisterskimi studentów Biologii i Biologii medycznej Wydziału Biologii UG w latach **2010-2022**.

[3] Sprawowałam opiekę promotorską nad **18** pracami licencjackimi studentów Biologii i Biologii medycznej Wydziału Biologii UG w latach **2010-2022**.

[4] Sprawowałam opiekę merytoryczną nad studentem Bioinformatyki z Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki UG wykonującym praktyki zawodowe w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii UG w **2019** roku. W ramach tych praktyk Pan Jakub Przygodzki stworzył i przetestował program bioinformatyczny do poszukiwania dwukodonowych minigenów w sekwencjach systemów toksyna-antytoksyna, który został wykorzystany do uzyskania wyników opisanych w jednej z moich publikacji (**Załącznik 4 pkt 4b [15]**).

- Recenzje prac dyplomowych

Byłam recenzentem **25** prac licencjackich i magisterskich wykonanych w Katedrach: Biologii Molekularnej i Genetyki Molekularnej Bakterii UG w latach **2010-2022**.

- Inne

Praca pt. „Minigeny sekwencji liderowej transkryptu z promotora *paxe* operonu *axe-txe* pochodzącego z plazmidu pRUM *Enterococcus faecium*” mojej magistrantki Katarzyny Ogiejko została wyróżniona w konkursie im. Prof. Karola Taylora na najlepszą pracę magisterską wykonaną na Wydziale Biologii UG (**2017** rok).

b) osiągnięcia z zakresu popularyzacji nauki

W latach **2008** do **2012** brałam czynny udział w Bałtyckim Festiwalu Nauki, imprezie promującej Wydział Biologii UG organizując różnego rodzaju pokazy i warsztaty.

c) osiągnięcia organizacyjne:

- Koordynator sesji posterowych i egzaminów licencjackich w Katedrze
- Tutor w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii (od **2017** roku)
- Członek Wydziałowej Komisji ds. Nagród Rektora UG dla pracowników nb. nauczycielami akademickimi (kadencja **2016-2020**)
- Członek Uczelnianej Komisji Wyborczej UG (kadencja **2020-2024**)
- Członek Rady Programowej kierunku Biologia na Wydziale Biologii UG (od **2019** roku)
- Reprezentant adiunktów w Radzie Wydziału Biologii UG (od **2021** roku)
- Członek komisji przygotowującej raport samooceny kierunku Biologia dla Polskiej Komisji Akredytacyjnej (rok **2022**)

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

[1] Uczestniczyłam w konferencjach dydaktycznych organizowanych na Uniwersytecie Gdańskim: I, II i III Ogólnopolskiej Konferencji Dydaktycznej "Dydaktyka akademicka: tradycja i nowoczesność" (lata **2013, 2014, 2015**) oraz w dwóch warsztatach z cyklu Laboratorium Inicjatyw Dydaktycznych (rok akademicki **2017/2018**), a także w warsztatach z zakresu prawa autorskiego dla środowiska naukowego (**2019** rok).

[2] W lutym **2014** roku wzięłam udział w dwudniowym szkoleniu z zakresu Zarządzania Zespołem Naukowym, organizowanym przez FNP w ramach projektu Skills (prowadzone w języku angielskim przez Panią Susanne Marx).

[3] Uczestniczyłam w „Toxin-Antitoxin Online Seminars” organizowanych przez Laurence Van Melderen (ULB Brussels) i Pierre’a Genevaux (CNRS-University of Toulouse) w okresie od kwietnia **2021** do kwietnia **2022** roku (w sumie 21 spotkań).

[4] Nagrody i wyróżnienia:

- **2022** rok – nagroda zespołowa drugiego stopnia Rektora UG za wiodący udział w powstaniu osiągnięcia naukowego pt. „Mechanizmy interakcji bakterii ze środowiskiem”.
- **2021** rok - nagroda zespołowa drugiego stopnia Rektora UG za wiodący udział w powstaniu osiągnięcia naukowego pt. „Molekularne mechanizmy regulacji procesów adaptacyjnych u bakterii”.
- **2010** rok - nagroda zespołowa Polskiego Towarzystwa Genetycznego za najlepszy cykl publikacji genetycznych z polskich laboratoriów opublikowanych w latach 2007-2009.
- **2004** rok - nagroda zespołowa Polskiego Towarzystwa Genetycznego za najlepszy cykl publikacji wydanych w latach 2001-2003.
- **2003** rok - Wyróżnienie pracy doktorskiej.

[5] Do tej pory przygotowałam **28** recenzji artykułów do międzynarodowych czasopism naukowych, takich jak: Toxins, Genes, Molecular Microbiology, Scientific Reports, Acta Biochimica Polonica, Frontiers in Microbiology, Microorganisms, Processes, Plasmid, FEBS

Journal, FEMS Microbiology Reviews, ACS Chemical Biology, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.

[6] W **2014** roku zostałam zaproszona do wygłoszenia wykładu pt. „Bakteryjne systemy toksyna-antytoksyna” na posiedzeniu Komitetu Mikrobiologii PAN.

[7] W **2016** roku zostałam powołana na recenzenta wniosku projektowego złożonego do Research Foundation - Flanders (FWO), instytucji przyznającej granty na badania podstawowe w Belgii.

.....

(podpis wnioskodawcy)