

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Wiesław Świętnicki

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

1995 - Ph.D., Biochemia i Biologia Molekularna, Uniwersytet w Gainesville, Florida, USA. Tytuł pracy doktorskiej: Analiza mechanizmu enzymatycznego i kinetyki proteazy 3C z wirusowego zapalenia wątroby typu A, enzymu procesującego białka wirusowe.

1981 - Magister, Chemia, specjalność Chemia Fizyczna, Uniwersytet Wrocławski, PL.

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

- Okres: 2012-obecnie- naukowiec- **Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN**, Wrocław
- Okres: 2012-2015 – Lider Merytoryczny - **Wrocławskie Centrum Badawcze EIT+**, Wrocław
- Okres: 2010-2011 – naukowiec- **Uniformed Services University**, Bethesda, MD
- Okres: 2008- 2010 – kierownik projektu - **Research and Development Command-Edgewood Chemical Biological Center**, Aberdeen Proving Ground, MD, USA
- Okres: 2003- 2008- pracownik naukowy -**U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases**, Ft. Detrick, MD, USA
- Okres: 2000-2003 -starszy adiunkt- **U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases**, Ft. Detrick, MD, USA
- Okres: 1996- 2000 – adiunkt-Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak

i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Zgodnie z treścią w/w ustawy, dołączonym do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, osiągnięciem naukowym jest cykl powiązanych tematycznie prac objętych wspólnym tytułem: —**Modelowanie białek i ich kompleksów z ligandami oraz zastosowanie wyników do opracowania terapeutyków i szczepionek**

1. Publikacja

Bzdion L, Krezel H, Wrzeszcz K, Grzegorek I, Nowinska K, Chodaczek G, **Swietnicki W.** *Design of small molecule inhibitors of type III secretion system ATPase EscN from enteropathogenic Escherichia coli.* Acta Biochim Pol. 2017;64(1):49-63.

IF: 1.5 (Web of Science)

Liczba cytowań: 9 (Web of Science report 21-2-2021)

Autor korespondencyjny, pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

2. Publikacja

Swietnicki, W., Carmany, D., Retford, M., Guelta, M., Dorsey, R., Bozue, J., Lee, M.S., and Olson, M.A. 2011. *Identification of small molecule inhibitors of Yersinia pestis YscN ATPase*, Public Library of Science One, 6(5):e19716.

IF=2.74 (2021, Web of Science)

Liczba cytowań: 39 (Pubmed report 21-2-2021)

Autor korespondencyjny, pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

3. Publikacja

Swietnicki, W., O'Brien, S., Holman, K., Cherry, S., Brueggemann, E., Tropea, J.E., Hines, H.B., Waugh, D.S., and Ulrich, R.G., 2004. *Novel protein-protein interactions of the Yersinia pestis type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry*. Journal of Biological Chemistry, 279(37): p. 38693-700.

IF: 4.238 (2020, Web of Science report)

Liczba cytowań: 27 (Web of Science report 21-2-2021)

Autor korespondencyjny, pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

4. Publikacja

Raab, R. and **Swietnicki, W.** 2008. *Yersinia pestis YopD 150-287 fragment is partially unfolded in the native state*. Protein Expression and Purification. 58(1): p. 53-60.

IF: 1.513 (2021, Web of Science Report)

Liczba cytowań: 5 (Web of Science report 21-2-2021)

Autor korespondencyjny, pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

5. Publikacja

Bozue, J., Cote, C.K., Webster, W., Bassett, A., Tobery, S., Little, S., and **Swietnicki, W.** 2012. *A Yersinia pestis YscN ATPase mutant functions as a live attenuated vaccine against bubonic plague in mice*, FEMS Microbiology Letters, 332(2): p.113-21.

IF: 1.987 (2021, Web of Science Report)

Liczba cytowań: 9 (Web of Science report 21-2-2021)

Autor korespondencyjny, pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

6. Publikacja

Swietnicki, W., B.S. Powell, and J. Goodin, 2005. *Yersinia pestis Yop secretion protein F: purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague*. Protein Expression and Purification, 42(1): p. 166-72.

IF: 1.513 (2021, Web of Science Report)

Liczba cytowań: 31 (Web of Science report 21-2-2021)

Autor korespondencyjny, pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

7. Publikacja

Swietnicki, W., Petersen, R., Gambetti, P., and Surewicz, W.K. 1997. *pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231)*. Journal of Biological Chemistry, 272(44): p. 27517-20.

IF: 4.238 (2021, Web of Science Report)

Liczba cytowań: 239 (Web of Science report 21-2-2021)

Pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

8. Publikacja

Swietnicki, W., Petersen, R.B., Gambetti, P., Surewicz, W.K. 1998. *Familial mutations and the thermodynamic stability of the recombinant human prion protein*. Journal of Biological Chemistry, 273(47): p. 31048-52.

IF: 4.238 (2021, Web of Science Report)

Liczba cytowań: 167 (Web of Science report 12-4-2017)

Pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

9. Publikacja

Zhang, Y., **Swietnicki, W.**, Zagorski, M.G., Surewicz, W.K., and Soennichsen, F.D., 2000. *Solution structure of the E200K variant of human prion protein. Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases*. Journal of Biological Chemistry, 275(43): p. 33650-4.

IF: 4.238 (2021, Web of Science Report)

Liczba cytowań: 100 (Web of Science report 12-4-2017)

Zaplanowanie, przygotowanie i produkcja izotopowo-znaczonego białka prionowego do eksperymentów NMR.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 20%.

10. Publikacja

Knaus, K.J., Morillas, M., **Swietnicki, W**, Malone, M., Surewicz, W.K., and Yee, V.C. 2001. *Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization.* Nature Structural Biology, 8(9): p. 770-4.

IF: 11.98 (2021, Web of Science Report)

Liczba cytowań: 415 (Web of Science report 21-2-2021)

Pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i otrzymanie białka prionowego odpowiedniego do analizy strukturalnej, udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 50%.

11. Publikacja

Swietnicki, W., Barnie, A.M., Dyas, B.K., and Ulrich, R.G., 2003. *Zinc binding and dimerization of Streptococcus pyogenes pyrogenic exotoxin C are not essential for T-cell stimulation.* Journal of Biological Chemistry. 278(11): p. 9885-95.

Autor korespondencyjny, pomysłodawca tematu, zaplanowanie, przygotowanie i wykonanie doświadczeń, wiodący udział w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu do druku.

Indywidualny wkład w autorstwo oceniam na 75%.

IF: 4.238 (2021, Web of Science Report)

Liczba cytowań: 2 (Pubmed report 21-2-2021)

1. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/pracach i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Struktura białek jest określona poprzez sekwencję aminokwasową. Typowo, struktura drugorzędowa określona jest poprzez oddziaływania bliskiego zasięgu a struktura trzeciorzędowa - poprzez oddziaływania dalekiego zasięgu. Przejścia pomiędzy strukturami białek są spowodowane czynnikami rozfałdującymi i typowo są to chemiczne denaturaty, pH lub temperatura. Obowiązująca teoria jest że struktura białka jest kodowana na poziomie sekwencji DNA a maszyneria komórkowa syntezuje te białka w jednej konformacji. Jednakże, w chorobach prionowych białko prionowe zmienia własną konformację z normalnego, rozpuszczalnego, w zagregowane i nierozpuszczalne. Ze względu na brak podłoża wirusowego w tych chorobach, Prusiner zasugerował że białko prionowe może samo zmieniać swoją

konformację. Zgodnie z tą hipotezą, białko powinno posiadać warunki *in vitro* które spowodują taką zmianę. Analiza białka była problematyczna ze względu na agregację podczas nadekspresjonowania i potwierdzenie hipotezy nie było możliwe. W związku z tym, przeprowadzono analizę bioinformatyczną struktury drugorzędowej oraz modelowanie w oparciu dostępne dane strukturalne dla mysiego białka. W oparciu o te dane, wybrano fragmenty z minimalną ilością nieokreślonej struktury typu random coil do potencjalnego nadekspresjonowania. W 1997, Swietnicki *et al.* pokazali że normalne białko prionowe może być nadekspresjonowane w miligramowych ilościach przy zastosowaniu procedury refaldowania na kolumnie.

Procedura wykorzystuje fizyczne przyłączenie białka połączonego do tagu zawierającego sześć histydyn, który ma powinowactwo do matrycy naładowanej jonami Ni^{+2} . Wiązanie jest stabilne w zakresie pH 6,8-8,5 i może wytrzymać czynniki denaturujące, takie jak chlorowodorek guanidyny i mocznik. Fizycznie przyłączając białko do matrycy, białko może być rozfałdowane chemicznie denaturatami bez agregacji. Ponowne fałdowanie białka przeprowadza się przez powolne, minimum 2 godziny, usunięcie środka denaturującego i zastąpienie go pożądanym roztworem. Usuwanie jest zwykle wykonywane przy użyciu konfiguracji gradientu. Białko wymywa się stężonym (250-500 mM) roztworem imidazolu, często obniżając pH roztworu wymywającego do pH = 5,8 w celu wymycia białek, które nie są całkowicie poprawnie sfałdowane. W przypadku białka prionowego ponowne fałdowanie przeprowadzono w obecności środka redukującego, 10 mM zredukowanego glutationu, który pozwala na odtworzenie pojedynczego mostka dwusiarczkowego Cys174-Cys214. Białko prionowe zachowywało się jak typowe białko w warunkach fizjologicznych. Jednakże, potrafiło ono zmienić swoją konformację z alfa helisowej na strukturę beta pod wpływem 1 M chlorowodoru guanidyny w pH=4.0 i poniżej. Taka zmiana spowodowała agregację i formację formy określonej PrP^{Sc} która jest oporna na trawienie proteinazą K. Pod względem diagnostyki klinicznej, skonwertowane białko zachowywało się jak typowy preparat z mózgu osób zmarłych na choroby prionowe. Analiza białka za pomocą spektroskopii Ramana po wymianie wodoru na deuter potwierdziła strukturę beta. Ponadto, konwersja była przyspieszona w obecności membran fosfolipidowych oraz wymagała obecności soli gdyż sama denaturacja w moczniku i niskim pH nie była w stanie spowodować konwersji do struktury beta.

W celu określenia wpływu mutacji w białku na strukturę, białko prionowe z mutacją E200K, normalnie występującą u osób z dziedziczną chorobą prionową, zostało nadekspresjonowane w medium znakowanym izotopowo N^{15} i C^{13} dla analizy NMR. Analiza struktury NMR pokazała że mutacje nie wpływały na zmianę ogólnej struktury. Analiza termodynamiczna krzywych denaturacji w moczniku i chlorowodoru guanidyny wykazała również brak zmian w stabilności mutantu względem dzikiego szczepu. Jednakże, struktura otrzymana z badań krystalograficznych wykazała że białko może istnieć w 2 konformacjach: jako monomer i jako dimer. Powierzchnia kontaktu w dimerze odpowiadała dokładnie mutacjom obserwowanym w rodzinnej formie chorób prionowych. Zaproponowano więc że białko prionowe może istnieć w 2 formach wzajemnie konwertujących. Jednakże, zaburzenie tej konwersji poprzez stabilizację formy dimeru stabilizowanej przez mutacje może spowodować tworzenie potencjalnych źródeł do konwersji reszty białka. Hipoteza została potwierdzona w dalszych badaniach w grupie Surewicza ale struktura krystalograficzna białka została głównie potraktowana jako artefakt związany z warunkami krystalizacji.

Badania źródła konwersji zostały rozszerzone na badania immunologiczne za pomocą przeciwciał do fragmentów białka prionowego. Fragment N-końcowy (a.a. 23-145), normalnie brakujący struktury drugorzędowej, nie powinien mieć roli w stabilności białka i nie powinien mieć trwałego kontaktu z fragmentem C-końcowym (a.a. 90-231). Jednakże, przeciwciała monoklonalne do pełnego białka (a.a.23-231) rozpoznawały epitopy które były w oddalonych częściach białka. Specyficznie, przeciwciała do epitopu liniowego z fragmentu 23-145

blokowały wiązanie przeciwciał specyficznych do liniowego epitopu z C-końcowego fragmentu. Wynik ten oznacza że fragment N-końcowy może oddziaływać z fragmentem C-końcowym i wpływać na konformacje C-końcowego fragmentu.

Kwestia stabilności białka prionowego była poruszona w analizie bioinformatycznej struktury białka. Strukturę skanowano pod kątem reszt wewnętrznych i hydrofobowych, najlepiej Phe lub Tyr, które można zastąpić Trp. Mutacje *in silico* przeprowadzono przy użyciu SwissPdb-Viewer i wybrano pozycje rotameru, aby zminimalizować ograniczenia steryczne i geometryczne. Ze względu na ograniczone możliwości obliczeniowe programu nie przeprowadzono pełnej optymalizacji strukturalnej po mutacjach. Wewnętrzne mutacje w rdzeniu białka zostały zaproponowane w celu możliwości śledzenia kinetyki rozfałdowania/fałdowania białka. Jeden z mutantów okazał się bardziej stabilny niż dzikie białko. Zwiększenie stabilności białka prionowego prowadziło do braku konwersji tego mutantu białka prionowego w formę PrP^{Sc} oraz braku objawów choroby prionowej w transgenicznej myszy w przeciwieństwie do myszy produkującej dzikie białko. Eksperyment potwierdził hipotezę że choroby prionowe są związane ze stabilnością białka prionowego. Ponadto, wynik pozwolił na zaproponowanie potencjalnej terapii chorób prionowych, przynajmniej u zwierząt, poprzez zmianę stabilności białka prionowego.

Po skończeniu pracy nad białkami prionowymi, uwaga została skupiona nad białkami wydzielanymi przez *Streptococcus pyogenes*. Patogen posiada specyficzny mechanizm obejścia odpowiedzi immunologicznej gospodarza oparty na sekrecji specyficznych białek. Jedno z nich, białko Spe-C, tzw. superantygen, powoduje niespecyficzną ekspansję populacji komórek typu T w organizmie gospodarza. Ze względu na niespecyficzną stymulację, system odpornościowy nie potrafi wygenerować przeciwciał specyficznych do atakującego patogenu i przechodzi w stan anergii po wyczerpaniu możliwości produkcji klonów komórek typu T. To opóźnienie pozwala na inwazję organizmu gospodarza. Ze względu na rolę w obchodzeniu oporności immunologicznej gospodarza, białko Spe-C jest potencjalnym celem szczepionek przeciwko *S. pyogenes*.

Mechanizm stymulacji przez superantygen Spe-C został zaproponowany jako zależny od wiązania jonów cynku w kompleksie MHC II-receptor komórek typu T w oparciu o strukturę krystaliczną kompleksu superantygenu z cząsteczką MHC II. Struktura wykazywała wyraźne wiązanie cynku w kompleksie oraz formację dimeru. W oparciu o struktury łańcucha beta receptora z białkiem MHC II, proponowany mechanizm byłby inny niż obserwowany dla superantygeny SEB z patogenu *Staphylococcus aureus*. Modelowanie interakcji Spe-C przeprowadzono *in silico* przy użyciu istniejących struktur Spe-C, innych superantygenów i struktur MHCII z Protein Data Bank. Wstępne modele mutantów skonstruowano za pomocą oprogramowania Tripos przy użyciu standardowych technik modelowania w oparciu o homologie. Początkowe pozycje stratowe do dokowania białek zostały wybrane w przybliżeniu na podstawie istniejących danych strukturalnych rozwiązanych kompleksów, a ostateczne rozwiązania dokowania zostały znalezione za pomocą modułu FlexiDock oprogramowania. Program wykorzystuje translacje i rotacje początkowych pozycji, aby znaleźć optymalne rozwiązanie dokowania. Algorytm wykorzystywał ograniczoną elastyczność łańcuchów bocznych białek do uwzględnienia potencjalnych zmian konformacyjnych liganda i receptora. Ze względu na wyższy odsetek wyników fałszywie dodatnich, dla opcji uwzględniającej pełną elastyczność białek, opcja takiego wyszukiwania została wyłączona, a po zadokowaniu przeprowadzono ewentualne korekty łańcucha bocznego. Obliczenia energetyczne przeprowadzono w próżni ze względu na ograniczenia oprogramowania. Pozy oceniano na podstawie zastrzeżonej funkcji oceny Tripos, a ostateczne modele porównano ze znanymi strukturami i wykorzystano do wnioskowania o konserwatywnych resztach aminokwasowych białek. Ze względu na ograniczoną moc obliczeniową systemów obliczeniowych w tamtym

czasie, nie przeprowadzono symulacji dynamiki molekularnej w celu oceny stabilności przewidywanych pozycji.

Wstępne modelowanie i analiza oddziaływania białek Spe-C oraz białek MHC II i receptora komórek typu T wykazała że białko Spe-C może oddziaływać z receptorem MHC II w konformacji podobnej do obserwowanej dla białka SEB bez udziału jonów cynku i tworzenia dimeru. Jednakże, pętla w Spe-C proponowana do oddziaływania wymagała zmiany konformacji lub białko same musiałyby się zreorientować w celu utworzenia kompleksu. W celu weryfikacji hipotezy, wariant C27S białka Spe-C został nadekspresjonowany i zrefaldowany na kolumnie Ni-agaroz. Refaldowanie było wymagane ze względu na agregację białka Spe-C podczas nadekspresjonowania. Zrefaldowane białko posiadało taką samą aktywność biologiczną w teście stymulacji komórek typu T jak dzikie białko Spe-C wydzielane przez *S. pyogenes* i nie tworzyło dimeru w stężeniach wielokrotnie wyższych niż wymaganych do stymulacji komórek typu T. Mutacja reszt aminokwasowych H167, His201 i D203 zaproponowanych w wiązanie jonów cynku usunęła wiązanie do MHC II w dużej części. Mutacje nie usunęły jednak możliwości stymulacji komórek typu T dla mutantu H167A ale zmniejszyły ją znacznie dla pozostałych mutantów. Mutacje w pętli potencjalnie wiążącej białko MHC II do Spe-C nie spowodowały drastycznej zmiany w powinowactwie Spe-C do MHC II. Aktywacja komórek T była zmniejszona drastycznie po mutacji Y76A która, na podstawie modelowania komputerowego, powinna być ważna dla wiązania z receptorem komórek typu T. Aminokwas Y76 jest w miejscu strukturalnie zachowanych dla superantygenów i znanym z wiązania superantygenu SEB oraz zaproponowanym do wiązania innych superantygenów (TSST, SEC).

Na podstawie wyników eksperymentów, zaproponowano alternatywny model aktywacji komórek typu T przez białko Spe-C. Model był oparty na dokowaniu białek do ligandów białkowych. W proponowanym modelu, wiązanie cynku jest nieodzowne do wiązania z białkiem Spe-C w orientacji wymagającej udziału jonów cynku jak zaproponowano na podstawie struktury krystalicznej kompleksu MHC II-Spe-C-Zn. Aktywacja komórek typu T wymaga jednak reorientacji antygeny Spe-C na powierzchni MHC II w celu przyjęcia struktury obserwowanej dla superantygeny SEB.

Wyniki modelowania molekularnego i prac eksperymentalnych były użyte do opracowania kandydata na szczepionkę przeciwko *S. pyogenes*. Modele proponowanych kompleksów superantygenów z MHC II i TCR zostały również opublikowane. One są własnością rządu Stanów Zjednoczonych.

Następnym etapem prac był system sekrecji typu III z *Yersinii pestis* oraz mechanizm jego składania i funkcjonowania. *Yersinia pestis* jest patogenem odzwierzęcym i czynnikiem etiologicznym w epidemii czarnej dżumy. Bakteria używa wyspecjalizowany system wydzielania typu III (T3SS) który dostarcza efekторы, wydzielane białka, bezpośrednio do komórek gospodarza. System był mało poznany w tamtym czasie i nie było danych na temat kryteriów wyboru efektorów przez chaperony do sekrecji ani wewnętrznych oddziaływań w systemie. Z tego powodu, podjęto systemową analizę oddziaływań na wyizolowanych białkach używając macierzy białkowej skonstruowanej na podstawie indywidualnych oddziaływań określonych za pomocą spektrometrii masowej (pierwsza selekcja) oraz ich siły i typu za pomocą powierzchniowego rezonansu plazmonowego (druga selekcja). W oparciu o macierz oddziaływań, ich typ i siłę, zasugerowano mechanizm wyboru efektorów dla wybranych białek. W szczególności, pokazano że białka YscM2 z *Yersinii enterocolitica* i LcrQ z *Yersinii pestis*, poprzednio opisane jako ligandy dla specyficznego chaperonu SycH, tworzyły nieznane poprzednio trwale kompleksy ze specyficznym chaperonem SycE. Dodatkowo, pokazano istnienie nieznanych poprzednio kompleksów pomiędzy YscE i regulatorem translokacji TyeA oraz regulatorem temperaturowym YmoA i liczne inne oddziaływania dla

białek YscE, YopK, YopH i LcrH. Scharakteryzowane oddziaływania były stabilne i prawdopodobnie występują przed lub po translokacji przez injektosom. Jednym z interesujących wyników była hipoteza dotycząca kolejności wydzielania białek YopH i YopE. W oparciu o analizę, zaproponowano że białko YscM1 może usunąć białko YopH z kompleksu SycH-YopH ze względu na większe powinowactwo YopH do YscM1 niż SycH. Ponieważ białko YscM1 posiada również większe powinowactwo do efektora YopE niż specyficzny chaperon SycE, białko YscM1 może działać jako chaperon dla YopH i transportować YopH do pory translokacyjnej preferencyjnie względem białka YopE. Po wyczerpaniu zapasu białka YopH, białko YopE będzie dostarczane do pory przez YscM1 w drugiej kolejności.

Ustalenie hierarchii wydzielania za pomocą alternatywnych metod nie było możliwe i zaproponowana hipoteza pozwoliła wyjaśnić część mechanizmu sekrecji w oparciu o dane dotyczące kompleksów międzybiałkowych. Taka strategia może być zastosowana do innych systemów, nie tylko sekrecji, w celu zrozumienia mechanizmu procesów.

Analiza systemu T3SS za pomocą metod bioinformatycznych zidentyfikowała białko YscF z igły *Yersinia pestis* jako potencjalny kandydat na szczepionkę na podstawie roli (tunel do transportu białek na zewnątrz bakterii) oraz zachowania w każdym systemie i niezbędności do procesu sekrecji. Ze względu na agregacje białka, użyto refałdowania na kolumnie ze złożem Ni-agarozy. Białko zostało wyczyszczone i analiza biofizyczna pokazała że białko rzeczywiście agreguje. Pomimo to, było ono rozpuszczalne w niskim stężeniu. Immunizacja myszy białkiem rekombinowanym pokazała że dostarcza ono częściową ochronę przed infekcją *Y. pestis* w dawce $LD_{50} = 200$.

Białka translokatorowe YopB i YopD w *Y. pestis* muszą być dostarczone najpierw do pory w celu transportu do błon na powierzchni komórek gospodarza. Mechanizm wyboru translokatorów do transportu nie jest znany. Analiza struktur białek chaperonowych zasugerowała że białka mogą być bardzo rozfałdowane poprzez wiązanie z chaperonem. Jako rozfałdowane białka, ich transport przez porę do komórki gospodarza powinien być szybszy niż reszty białek. Obydwa białka były zanalizowane za pomocą metod bioinformatycznych i fragment YopD a.a. 150-287 został wybrany do nadekspresjonowania. Wybór był podyktowany wstępną selekcją nadekspresjonowalności w systemie *E. coli*. Białko YopD, fragment 150-287, zostało nadekspresjonowane jako natywne oraz jako refałdowane. Obydwie formy były rozpuszczalne w warunkach fizjologicznych i wykazywały niską zawartość struktury drugorzędowej. Jednakże, obniżenie temperatury do 260°K spowodowało dramatyczną zmianę w konformacji białka z nieokreślonej na wysoce alfa helisową do wartości bliskiej dla obliczonej teoretycznie. Zmiana struktury drugorzędowej pokazuje że białko YopD 150-287 potrafi zmienić konformację i być może ta fleksybilność jest warunkiem preferencyjnego wyboru do transportu przez porę.

Analiza systemu T3SS wykazała że posiada on, jak każdy inny system T3SS, jedyną ATPazę, YscN dla *Y. pestis*, która jest inna niż białka ludzkie. Modelowanie struktury pokazało że jedynym zachowanym elementem jest miejsce katalityczne i przypuszczalnie powierzchnie wymagane do heksameryzacji. Pomimo tego, miejsce katalityczne posiada wystarczającą ilość zmian w obrębie 6 Å od dokowanego substratu ATP aby można było podjąć się opracowania selektywnych inhibitorów ATPazy blokujących miejsce aktywne. W celu potwierdzenia tej hipotezy, został skonstruowany mutant $\Delta yscN$ w *Y. pestis*. Mutant posiadał wirulencje osłabioną co najmniej 1 milion razy w porównaniu do dzikiego szczepu i jego wzrost był nieodróżnialny od wzrostu dzikiego szczepu. To potwierdziło że białko YscN może być celem rozwoju nowej terapii antybakteryjnej opartej na inhibitorach ATPazy YscN.

Inhibitory zostały wyszukane obliczeniowo poprzez dokowanie związków drobnocząsteczkowych w miejsce aktywne ATPazy YscN a następnie weryfikację eksperymentalną najlepszych hitów z przeszukiwania obliczeniowego. Metodologia obliczeniowa została oparta na pakiecie DOVIS zaprojektowanym i uruchamianym na klastrach

obliczeniowych armii amerykańskiej. Podczas gdy podstawowa metodologia opiera się na publicznie dostępnym pakiecie AutoDock, pakiet wymagał ręcznej korekty wyników po wielu krokach: generowaniu konformerów 3D z SMILES, wyborze pozycji dokowania na podstawie bliskościżądanego obszaru dokowania i selekcji wyników po symulacjach dynamiki molekularnej.

Najlepsze hity obliczeniowe nie były najlepszymi inhibitorami ATPazy w teście hydrolizy ale okazały się jednymi z najlepszych w teście blokady sekrecji efektorów przez *Y. pestis*. Dwa związki posiadały aktywność biologiczną poniżej 10 μM w teście blokowania sekrecji i były nietoksyczne dla komórek ludzkich HeLa w teście toksyczności MTT. Jednakże, ich zdolność do blokady niszczenia komórek HeLa przez wydzielane efekторы była znacznie mniejsza.

Na podstawie tych eksperymentów, ustalono że ATPaza YscN może być celem nowatorskiej terapii antybakteryjnej selektywnej dla bakterii patogennych. Mutant $\Delta yscN$, ze względu na brak wirulencji w modelu mysim, został zaproponowany do testów szczepionki przeciwko *Y. pestis*. Testy pokazały że ochrona przed infekcją w dawce 100 LD₅₀ była skorelowana z ilością podanych bakterii. Ten wynik może być zinterpretowany jako pozytywne potwierdzenie konceptu żywej, zatenuowanej szczepionki przeciwko *Y. pestis*. Poprawienie ochrony wymagałoby zwiększenia zjadliwości patogenu co nie jest zawsze bioetycznie dozwolone.

Sukces w pracy nad inhibitorami wirulencji *Y. pestis* pozwolił na zaproponowanie podobnej strategii dla enteropatogennej *E. coli*. Analiza systemu wirulencji została przeprowadzona poprzednio ale wyszukiwanie związków blokujących wirulencję zostało opracowane na nowo używając wyszukiwania obliczeniowego.

Związki wybrano obliczeniowo przy użyciu pakietu oprogramowania Schrodinger. Metodologia opiera się na obliczeniowym dopasowaniu siatek wyprowadzonych dla obszaru aktywnego z siatkami dla wybranych siatek o zminimalizowanej energii dla małych cząsteczek. Siatki są zbudowane pod kątem wiązań elektrostatycznych, hydrofobowych i wodorowych przy użyciu zastrzeżonej metodologii firmy Schrodinger. Selekcja odbywa się w 3 etapach, z których każdy zachowuje najlepsze związki i dodaje więcej stopni swobody dla wybranych cząsteczek. Na ostatnim etapie najlepsze związki są używane do oszacowania względnej energii wiązania za pomocą uogólnionego modelu Borna w symulowanym środowisku rozpuszczalnika. Oszacowanie obejmowało korektę konformacyjną reszt receptora w obrębie 5Å związanego liganda, odległość odpowiednią dla większości obliczeń energii. Zastosowanie symulowanego środowiska rozpuszczalnika pozwala na radykalne skrócenie czasu obliczeniowego (około 8 minut na związek) w porównaniu z metodami opartymi na zakłóceniach swobodnej energii (FEP).

Wyniki obliczeniowe zostały zweryfikowane eksperymentalnie w testach blokady hydrolizy ATP, blokady sekrecji efektorów EspG1 oraz blokady tworzenia filamentów aktyny podczas internalizacji bakterii w modelu komórkowym infekcji. Po optymalizacji obliczeniowej i chemicznej, najlepszy związek posiadał $K_i = 16 \pm 2 \mu\text{M}$, całkowicie blokował tworzenie klastrów aktyny w stężeniu 100 μM oraz był nietoksyczny dla komórek ludzkich w testach interferencji z potencjałem mitochondrialnym, cyklem komórkowym, żywotnością oraz indukcji apoptozy. Praca potwierdziła że jest możliwe selektywne opracowanie inhibitorów T3SS dla enteropatogennej *E. coli*.

Podsumowując, praca nad białkami prionowymi pokazała że struktura drugo- i trzeciorzędowa białek są zmienne i mogą być kodowane w konformacji białek a nie na poziomie DNA. Zmienność jest związana ze stabilnością termodynamiczną białka i może być usunięta *in vivo* poprzez inżynierię genetyczną białka. Takie podejście oferuje również możliwość uniknięcia chorób prionowych.

Praca nad białkiem superantygenowym Spe-C z *S. pyogenes* pokazała że białko Spe-C może wiązać się receptorem ludzkim MHC II na 2 sposoby: pierwszy, niespecyficzny i niezwiązany z aktywacją receptorów komórek typu T, wymaga obecności jonów cynku; drugi, specyficzny, wymaga reorientacji na powierzchni receptora MHC II w celu związania z receptorem komórek typu T w konformacji wymaganej dla aktywacji systemu odpornościowego. Modele białek w kompleksie zostały użyte do opracowania kandydata na szczepionkę przeciwko *S. pyogenes*.

Praca nad systemem sekrecji T3SS z *Y. pestis* pokazała że stochastyczna analiza oddziaływań w systemie sekrecji może ujawnić oddziaływania normalnie nieobserwowalne biologicznie z różnych względów. Taka analiza pozwoliła na określenie kolejności sekrecji w systemie sekrecji w oparciu o powinowactwo międzybiałkowe. Możliwość alternatywnego określenia takiej kolejności nie była możliwa poprzednio.

Kolejność sekrecji białek przez porę może być również podyktowana przez fleksybilność białek. Białko translokatorowe YopD brakuje struktury drugorzędowej w temperaturze pokojowej. Jednakże, taka struktura może być zaindukowana poprzez obniżenie temperatury co sugeruje wewnętrzną fleksybilność białka. Białko YopD może przypuszczalnie być wydzielane przez T3SS preferencyjnie ponieważ brakuje mu określonej struktury i system sekrecji nie musi go rozfałdowywać przed transportem.

Praca nad mechanizmem sekrecji T3SS w *Yersinii pestis* pokazała że system posiada unikalną ATPazę YscN którą można użyć jako cel dla opracowania nowych związków antybakteryjnych potencjalnie obchodzących istniejącą oporność antybiotykowa. Związki można wyszukać obliczeniowo używając modeli komputerowych i testować w aktywności biologicznej. Analogiczne podejście dla T3SS z enteropatogennej *E. coli* EPEC z etapem optymalizacji pokazało że te związki można polepszyć do etapu specyficzności i nietoksyczności dla komórek ludzkich. Taką samą strategię można użyć do opracowania nowych terapeutyków przeciwko dowolnemu patogenowi używając sekwencji DNA jako punktu startowego.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć naukowo-badawczych

1. Pokazanie że struktura białka prionowego może być zmienna i propagowana do innych struktur poprzez swoją konformację. Generacja zmiennej konformacji może być osiągnięta za pomocą zmiany w pH środowiska.
2. Mutacje związane z rodzinnymi chorobami prionowymi mogą być połączone z zakłóceniem równowagi monomer-dimer obecnej w normalnym białku prionowym. Mutacje nie zmieniają stabilności białka ale jej zwiększenie uniemożliwia wystąpienie choroby prionowej.
3. Aktywacja ludzkiego systemu immunologicznego przez superantigen Spe-C z *S. pyogenes* przebiega dwustopniowo. Pierwszy stopień wymaga obecności cynku do zwiększenia lokalnej koncentracji białka. Drugi stopień wymaga reorientacji superantygeny i aktywacji systemu zgodnie z wcześniejszym modelem obserwowanym dla superantygeny SEB.
4. Mechanizm kolejności sekrecji białek w systemie wydzielania typu III z *Yersinii pestis* jest zależny od powinowactwa chaperonów do efektorów jak również ich dostępności.
5. ATPaza YscN systemu wydzielania typu III w patogenie *Yersinia pestis* jest niezbędna dla jego wirulencji. Może być ona również celem specyficznych terapeutyków antybakteryjnych o szerokim spektrum i działaniu pośrednim jako alternatywa dla antybiotyków.
6. Genetycznie inżynierowaną żywą szczepionką przeciwko *Y. pestis* może być skonstruowana poprzez usunięcie genu kodującego niezbędną ATPazę YscN. Strategia

może być zastosowana do opracowania innych żywych szczepionek dla ludzkich patogenów.

7. Opracowanie terapeutyków skierowanych przeciwko ATPazie EscN i YscN może być osiągnięte za pomocą kombinacji metod obliczeniowych z innymi metodami. Związki mogą być specyficzne dla ATPaz pomimo niskiej masy cząsteczkowej.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

Praca **Swietnicki W**, Caspi R. Prediction of Selected Biosynthetic Pathways for the Lipopolysaccharide Components in *Porphyromonas gingivalis*. *Pathogens*. 2021 Mar 20;10(3):374. doi: 10.3390/pathogens10030374. PMID: 33804654; PMCID: PMC8003790 omawia rekonstrukcje ścieżek biosyntetycznych lipopolisacharydu w patogenie *Porphyromonas gingivalis* na podstawie sekwencji DNA oraz korekcji w oparciu o dostępne dane eksperymentalne. Ścieżka syntezy O-antygeny swoistego została w pełni zrekonstruowana i rekonstrukcja zgadza się z danym eksperymentalnymi dotyczącego jego struktury. Ścieżka syntezy antygeny A-swoistego nie została zaproponowana ze względu na niekompatybilne modele strukturalne antygenów w literaturze a ścieżka syntezy K-swoistego antygeny (antygen kapsularny) nie była zaproponowana ze względu na brak danych strukturalnych. Ścieżki syntetyczne 3 antygenów zostały porównane w szczepach *P. gingivalis*. Modele strukturalne wybranych enzymów zostały skonstruowane i zaproponowano mechanizm ich reakcji enzymatycznych.

Praca **Swietnicki W**, Brzozowska E. In silico analysis of bacteriophage tail tubular proteins suggests a putative sugar binding site and a catalytic mechanism. *J Mol Graph Model*. 2019 Nov;92:8-16. doi: 10.1016/j.jmgm.2019.07.002. Epub 2019 Jul 7. PMID: 31302501, omawia wyszukiwanie miejsc aktywnych dla glikolitycznych enzymów bakteriofagowych za pomocą metod obliczeniowych, ich analizę i mechanizm hydrolizy enzymatycznej. Dane obliczeniowe postulują że białka bakteriofagowe nie są zoptymalizowane dla wiązania substratu ale przypuszczalnie dla efektywności enzymatycznej.

Praca **Swietnicki W**, Czarny A, Antkowiak L, Zaczynska E, Kolodziejczak M, Sycz J, Stachowicz L, Alicka M, Marycz K. Identification of a potent inhibitor of type II secretion system from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Jun 4;513(3):688-693. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.055. Epub 2019 Apr 12. PMID: 30987825, omawia użycie metod obliczeniowych do opracowania najbardziej potentnego inhibitora systemów sekrecji dla przykładu systemu wydzielania typu II z *Pseudomonas aeruginosa*. Inhibitor wykazał potencję $IC_{50} = 1.2 \mu M \pm 0.3 \mu M$ w teście blokady sekrecji białka ExoA przez bakterie i był w stanie częściowo zahamować niszczenie komórek ludzkich przez sekrecje patogenu w symulowanym modelu infekcji komórkowej oraz był nietoksyczny do tych samych komórek w teście metabolicznym.

Praca **Swietnicki W**, Czarny A, Urbanska N, Drab M. Identification of small molecule compounds active against *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Dec 2;506(4):1047-1051. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.189. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30409430, omawia zastosowanie skrynowania fenotypowego do identyfikacji nowych związków hamujących wzrost patogenów bakteryjnych. Jeden związek miał charakter bakteriostatyczny dla *S. aureus* natomiast dla *P. mirabilis* inny związek okazał się bakteriobójczy. Efekty antybakteryjne były obserwowane w stężeniach poniżej wartości wykazujących toksyczność metaboliczną dla komórek ludzkich.

Pełny dorobek naukowy obejmuje:

DOROBEK NAUKOWY SPRZED UZYSKANIA STOPNIA DOKTORA FILOZOFII	<i>n</i>	Współczynnik wpływu <i>IF</i>	Punktacja MNiSW
PUBLIKACJE NAUKOWE	3	52.8	50
Prace oryginalne	3	52.8	50
<input type="checkbox"/> autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	-		
współautor	3	52.58	50
Prace poglądowe			
<input type="checkbox"/> autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	-	-	-
współautor			
DONIESIENIA KONFERENCYJNE	6	-	-
międzynarodowe	6		
krajowe	0		

DOROBEK NAUKOWY PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH	<i>n</i>	Współczynnik wpływu <i>IF</i>	Punktacja MNiSW
PUBLIKACJE NAUKOWE	28	-	-
Prace oryginalne*	28	77.86	1440
<input type="checkbox"/> autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	10	35.51	710
współautor	18	42.35	730
Prace poglądowe	2	13.08	160
<input type="checkbox"/> autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	1	8.28	140
współautor	1	4.8	20
Prace wskazane jako znaczące osiągnięcie <i>zgodnie z art.16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.)</i>	9	26.32	490
<input type="checkbox"/> autor korespondencyjny i/lub pierwszy autor	2	16.18	80
współautor			
DONIESIENIA KONFERENCYJNE	6	-	-
międzynarodowe	6		
krajowe	-		

Liczba cytowań 2186

Liczba cytowań bez autocytaowań 2156

Indeks Hirsza 19

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

Zatrudnienie

1. 2015-obecnie

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN;

Stanowisko: naukowiec / kierownik projektu

Adres: ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław, PL

Praca w Instytucie Immunologii PANu jest skoncentrowana nad szczepionką przeciwko periodontozie. Projekt jest fundowany przez Narodowe Centrum Nauki, konkurs OPUS. Jego celem jest badanie glikolipidów oraz ścieżek ich syntezy w patogenie *Porphyromonas gingivalis* w celu opracowania szczepionki opartej na tej informacji. Projekt jest realizowany we współpracy z Uniwersytetem w Toronto w Kanadzie w celu testowania rozwiązań na modelu zwierzęcym. Teoretyczne prace dotyczące odtwarzania ścieżek metabolicznych biosyntezy glikolipidów bakteryjnych są prowadzone we współpracy z dr. Caspi z Południowego Instytutu Badawczego (SRI) w Kalifornii.

Drugim celem prac w Instytucie są związki drobnocząsteczkowe posiadające efekt bakteriobójczy lub bakteriostatyczny względem wybranych patogenów. Praca nad takimi rozwiązaniami jest prowadzona we współpracy z dr. hab. Tomaszem Goszczyńskim, IITD PAN, oraz prof. dr. hab. Krzysztofem Maryczem z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Trzecim obszarem działalności naukowej są systemy wirulencji patogenów ludzkich. Prace są skoncentrowane na wyszukiwaniu obliczeniowym i/lub eksperymentalnym związków drobnocząsteczkowych blokujących sekrecję toksyn bakteryjnych przez te systemy. Opracowany został model symulowanej infekcji kultury komórkowej w oparciu o oddzielenie fizyczne patogenów od komórek ludzkich z zachowaniem możliwości sekrecji toksyn patogenów. Badania są prowadzone we współpracy z prof. Stenssem z Uniwersytetu Stanforda, Kalifornia, którego zainteresowaniem jest oddziaływanie pomiędzy komórkami patogennych grzybów ludzkich oraz bakterią *Pseudomonas aeruginosa*.

Dodatkowe projekty są w oparciu o współpracę dotyczącą metod obliczeniowych w badaniach nad mechanizmami enzymów bakteriofagowych (dr. hab. Brzozowska) lub oddziaływania receptorów białkowych związanych z metabolizmem witaminy D z ligandami białkowymi i drobnocząsteczkowymi (prof. dr. hab. Wietrzyk).

Publikacje z wyżej opisanych prac:

1. **Swietnicki W**, Caspi R. Prediction of Selected Biosynthetic Pathways for the Lipopolysaccharide Components in *Porphyromonas gingivalis*. *Pathogens*. 2021 Mar 20;10(3):374. doi: 10.3390/pathogens10030374. PMID: 33804654; PMCID: PMC8003790.
2. **Swietnicki W**, Brzozowska E. In silico analysis of bacteriophage tail tubular proteins suggests a putative sugar binding site and a catalytic mechanism. *J Mol Graph Model*. 2019 Nov;92:8-16. doi: 10.1016/j.jmgm.2019.07.002. Epub 2019 Jul 7. PMID: 31302501.
3. **Swietnicki W**, Czarny A, Antkowiak L, Zaczynska E, Kolodziejczak M, Sycz J, Stachowicz L, Alicka M, Marycz K. Identification of a potent inhibitor of type II secretion system from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Jun 4;513(3):688-693. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.055. Epub 2019 Apr 12. PMID: 30987825.
4. **Swietnicki W**, Czarny A, Urbanska N, Drab M. Identification of small molecule compounds active against *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Dec 2;506(4):1047-1051. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.189. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30409430.
5. Milczarek M, Filip-Psurska B, **Świątnicki W**, Kutner A, Wietrzyk J. Vitamin D analogs combined with 5-fluorouracil in human HT-29 colon cancer treatment. *Oncol Rep*. 2014 Aug;32(2):491-504. doi: 10.3892/or.2014.3247. Epub 2014 Jun 11. PMID: 24919507; PMCID: PMC4091879.

2. 2012-2015

Wrocławskie Centrum Badań EIT + (obecnie PORT)

Stanowisko: Lider Projektu

Adres: ul. Stablowicka 147, 54-066 Wrocław, PL

Praca była skoncentrowana na opracowaniu drobnocząsteczkowych związków blokujących wirulencje enteropatogennej *E. coli*. Projekt był finansowany przez Narodowe Centrum Badan i Rozwoju. Badania były prowadzone od etapu wyszukiwania obliczeniowego związków wiążących się do miejsca aktywnego ATPazy EscN, testowania ich w blokadzie hydrolizy przez rekombinowane białko oraz blokadzie sekrecji efektorów i infekcji komórek ludzkich. Wyniki prac są przedmiotem wniosków patentowych oraz publikacji.

Publikacje:

1. Bzdzion L, Krezel H, Wrzeszcz K, Grzegorek I, Nowinska K, Chodaczek G, **Swietnicki W**. Design of small molecule inhibitors of type III secretion system ATPase EscN from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Acta Biochim Pol.* 2017;64(1):49-63. doi: 10.18388/abp.2016_1265. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27864920.

Patenty w Polskim Urzędzie Patentowym:

1. PAT.226024: New application of N-[2-[4-(4-methoxyphenyl)-1,3-thiazol-2-yl]ethyl]-2-oxo-1,5,6,7-tetrahydrocyclopenta[b]pyridino-3-carboxamide
2. Application# P.409676: New application of 2-(phenylsulfanyl)-acetamide derivatives, Patent application in progress.

3. 2010-2011

Uniformed Health Services University

Stanowisko: naukowiec

Adres: 4301 Jones Bridge Rd., 20-814 Bethesda, MD, USA

Praca koncentrowała się na badaniach ligazy ubikwitynowej Cullin 3 oraz potencjalnych oddziaływań tego białka z innymi białkami w chorobie myopatii nemalinowej. Choroba jest schorzeniem genetycznym ludzi i prowadzi do zaniku mięśni. Mechanizm choroby nie jest znany ale badania nad jej mechanizmem

zasugerowały hipotezę że jedno z białek jest ciągle recyklingowane u zdrowych ludzi ale nie u osób które są chore. Modelowanie molekularne białek oraz dokowanie ich zasugerowały potencjalny mechanizm oddziaływań. Wyniki zostały opublikowane.

Publikacje:

1. Sambuughin N, **Swietnicki W**, Techtmann S, Matrosova V, Wallace T, Goldfarb L, Maynard E. KBTBD13 interacts with Cullin 3 to form a functional ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 18;421(4):743-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.074. Epub 2012 Apr 20. PMID: 22542517; PMCID: PMC5148137.

4. 2009-2010

Centrum Biologii Chemicznej Edgewood

Stanowisko: Lider Projektu

Adres: 5183 Blackhawk Rd., 21010-5424 Aberdeen Proving Ground, MD, USA

Praca koncentrowała się na opracowaniu drobnocząsteczkowych związków blokujących ATPazy systemu sekrecji typu III z *Yersinii pestis* oraz *Burkholderia mallei*. Projekt był kontynuacją pracy zaczętej w USAMRIID i fundowanej przez amerykańską agencję Defense Threat Reduction Agency (DTRA). Związki były wyszukiwane obliczeniowo, testowane w teście blokady hydrolizy ATP przez rekombinowane białka oraz w teście blokady sekrecji efektorów bakteryjnych i niszczenia komórek ludzkich.

Drugim projektem był wewnętrzny projekt dotyczący mechanizmu sekrecji i wirulencji patogenów. Tylko część wyników została opublikowana.

Publikacje:

1. **Swietnicki W**, Carmany D, Retford M, Guelta M, Dorsey R, Bozue J, Lee MS, Olson MA. Identification of small-molecule inhibitors of *Yersinia pestis* Type III secretion system YscN ATPase. *PLoS One*. 2011;6(5):e19716. doi:

10.1371/journal.pone.0019716. Epub 2011 May 18. PMID: 21611119; PMCID: PMC3097197.

2. Guelta, M, Dorsey, R., Carmany, D., **Swietnicki, W.** Purification and characterization of the type III secretion system from *Burkholderia mallei*.
https://www.cbc.cdc.army.mil/wp-content/uploads/2018/04/2010_ILIR_Report.pdf

5. 2000-2008

United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases

Stanowisko: naukowiec / kierownik naukowy

Adres: 1725 Porter Street, 21-702 Ft. Detrick, MD, USA

Praca w instytucie koncentrowała się na zagadnieniach dotyczących obronności Stanów Zjednoczonych. Wczesny projekt dotyczył mechanizmowe oddziaływania superantygeny Spe-C z patogenu *Streptococcus pyogenes* z ludzkim układem odpornościowym. Projekt był kierowany przeze mnie w ramach grantu z amerykańskiej agencji National Science Foundation (NSF). Jego celem było zrozumienie mechanizmu oddziaływania białka Spe-C z receptorami limfocytów typu T oraz białkami MHC typu II z komórek typu B. Białko antygeny posiada zdolność niespecyficznego stymulowania ludzkiego układu odpornościowego poprzez wiązanie receptorów limfocytów typu T z receptorami MHC II z komórek B poprzez obszary nie związane z rozpoznawaniem ligandów peptydowych. Wiązanie prowadzi do zapoczątkowania ścieżki sygnałowej pobudzającej produkcje niespecyficznym klonów receptorów typu T i uniknięcia neutralizacji przez przeciwciała. Nowy mechanizm oddziaływań został zasugerowany dla białek tego typu.

Drugim projektem były badania dotyczące mechanizmu sekrecji w systemie wydzielania typu III w *Yersinia pestis* oraz potencjalne zastosowania wyników tych badań do opracowania szczepionki przeciwko temu patogenowi.

Trzecim projektem były badania dotyczące opracowania związków blokujących wirulencje patogenu *Yersinia pestis* jako alternatywnego celu terapeutycznego pozwalającego na ochronę przed genetycznie inżynierowaną bronią biologiczną. Projekt był mi przyznany przez amerykańską agencję Defense Threat Reduction Agency (DTRA) i był kontynuowany po moim przejściu do ECBC.

Publikacje z tych badań:

1. **Swietnicki W**, Powell BS, Goodin J. *Yersinia pestis* Yop secretion protein F: purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague. *Protein Expr Purif.* 2005 Jul;42(1):166-72. doi: 10.1016/j.pep.2005.02.016. Epub 2005 Mar 17. PMID: 15939303.
2. **Swietnicki W**, O'Brien S, Holman K, Cherry S, Brueggemann E, Tropea JE, Hines HB, Waugh DS, Ulrich RG. Novel protein-protein interactions of the *Yersinia pestis* type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry. *J Biol Chem.* 2004 Sep 10;279(37):38693-700. doi: 10.1074/jbc.M405217200. Epub 2004 Jun 22. PMID: 15213222.
3. **Swietnicki W**, Barnie AM, Dyas BK, Ulrich RG. Zinc binding and dimerization of *Streptococcus pyogenes* pyrogenic exotoxin C are not essential for T-cell stimulation. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):9885-95. doi: 10.1074/jbc.M206957200. Epub 2002 Dec 8. PMID: 12473669.

6. 1996-2000

Uniwersytet Case Western Reserve

Stanowisko: stypendysta podoktorancki

Adres: 10900 Euclid Ave, 44116-497 Cleveland, OH, USA

Praca na Uniwersytecie Case Western Reserve koncentrowała się wokół białka prionowego Prp które było implikowane w choroby prionowe poprzez swoją patogenną formę Prp^{Sc}. Forma patogenna jest odporna na trawienie proteinazą K i mechanizm infekcji był postulowany jako nieużywający matrycy DNA do kodowania

swojej konformacji białkowej. Produkcja rekombinowanego białka prionowego i badanie jego właściwości pokazało że konformacja jest zmienna i forma patogenna może być wygenerowana poprzez manipulacje pH. Struktury NMR mutantów oraz X-ray dzikiego białka ludzkiego pokazały że mutacje obserwowane w rodzinnej chorobie prionowej nie zmieniały jej stabilności a jedynie mogły przesuwac równowagę pomiędzy formą monomeryczną i dimeryczną. Zmiana mogła być spowodowana przez oddziaływanie z membranami oraz poprzez kontakt z agregowana forma białka prionowego. Rekombinowane białko potrafiło również spowodować chorobę prionowa u myszy co potwierdziło hipotezę że choroby prionowe mogą być powodowane przez inna formę normalnego białka poprzez kontakt z forma patogenna. Hipoteza została oryginalnie zaproponowana przez Stanley Prusiner a który otrzymał za nią nagrodę Nobla.

Prace opublikowane z tych badan:

1. Kong Q, Mills JL, Kundu B, Li X, Qing L, Surewicz K, Cali I, Huang S, Zheng M, **Swietnicki W**, Sönnichsen FD, Gambetti P, Surewicz WK. Thermodynamic stabilization of the folded domain of prion protein inhibits prion infection in vivo. *Cell Rep.* 2013 Jul 25;4(2):248-54. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.030. Epub 2013 Jul 18. PMID: 23871665; PMCID: PMC3766954.
2. Derrington E, Gabus C, Leblanc P, Chnaidermann J, Grave L, Dormont D, **Swietnicki W**, Morillas M, Marck D, Nandi P, Darlix JL. PrPC has nucleic acid chaperoning properties similar to the nucleocapsid protein of HIV-1. *C R Biol.* 2002 Jan;325(1):17-23. doi: 10.1016/s1631-0691(02)01388-4. PMID: 11862616.
3. Knaus KJ, Morillas M, **Swietnicki W**, Malone M, Surewicz WK, Yee VC. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol.* 2001 Sep;8(9):770-4. doi: 10.1038/nsb0901-770. PMID: 11524679.
4. Gabus C, Auxilien S, Péchoux C, Dormont D, **Swietnicki W**, Morillas M, Surewicz W, Nandi P, Darlix JL. The prion protein has DNA strand transfer properties similar to retroviral nucleocapsid protein. *J Mol Biol.* 2001 Apr 6;307(4):1011-21. doi: 10.1006/jmbi.2001.4544. PMID: 11286552.

5. Gabus C, Derrington E, Leblanc P, Chnaiderman J, Dormont D, **Swietnicki W**, Morillas M, Surewicz WK, Marc D, Nandi P, Darlix JL. The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem*. 2001 Jun 1;276(22):19301-9. doi: 10.1074/jbc.M009754200. Epub 2001 Feb 27. PMID: 11278562.
6. Li R, Liu T, Wong BS, Pan T, Morillas M, **Swietnicki W**, O'Rourke K, Gambetti P, Surewicz WK, Sy MS. Identification of an epitope in the C terminus of normal prion protein whose expression is modulated by binding events in the N terminus. *J Mol Biol*. 2000 Aug 18;301(3):567-73. doi: 10.1006/jmbi.2000.3986. PMID: 10966770.
7. Zhang Y, **Swietnicki W**, Zagorski MG, Surewicz WK, Sönnichsen FD. Solution structure of the E200K variant of human prion protein. Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases. *J Biol Chem*. 2000 Oct 27;275(43):33650-4. doi: 10.1074/jbc.C000483200. PMID: 10954699.
8. **Swietnicki W**, Morillas M, Chen SG, Gambetti P, Surewicz WK. Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry*. 2000 Jan 18;39(2):424-31. doi: 10.1021/bi991967m. PMID: 10631004.
9. Morillas M, **Swietnicki W**, Gambetti P, Surewicz WK. Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem*. 1999 Dec 24;274(52):36859-65. doi: 10.1074/jbc.274.52.36859. PMID: 10601237.
10. **Swietnicki W**, Petersen RB, Gambetti P, Surewicz WK. Familial mutations and the thermodynamic stability of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem*. 1998 Nov 20;273(47):31048-52. doi: 10.1074/jbc.273.47.31048. PMID: 9813003.
11. **Swietnicki W**, Petersen R, Gambetti P, Surewicz WK. pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231). *J Biol Chem*. 1997 Oct 31;272(44):27517-20. doi: 10.1074/jbc.272.44.27517. PMID: 9346881.

7. 1989-1995

University of Florida, School of Medicine, Department of Biochemistry and
Molecular Biology

Stanowisko: Asystent

Adres: 1200 Newell Drive, 32610-0245 Gainesville, FL, USA

Praca naukowa podczas studio doktoranckich była ograniczona i jej głównym celem było realizowanie planu badan związanych z otrzymanie doktoratu oraz spełnienie wymogów Uniwersytetu.

Publikacje z tej pracy:

1. Johansson PJ, Malone C, **Swietnicki W**, Dunn BM, Williams RC Jr. Fv structure of monoclonal antibody II-481 against herpes simplex virus Fc gamma-binding glycoprotein gE contains immunodominant complementarity determining region epitopes that react with human immunoglobulin M rheumatoid factors. *J Exp Med.* 1994 Nov 1;180(5):1873-88. doi: 10.1084/jem.180.5.1873. PMID: 7964464; PMCID: PMC2191741.
 2. Dunn BM, Scarborough PE, Davenport R, **Swietnicki W**. Analysis of proteinase specificity by studies of peptide substrates. The use of UV and fluorescence spectroscopy to quantitate rates of enzymatic cleavage. *Methods Mol Biol.* 1994;36:225-43. doi: 10.1385/0-89603-274-4:225. PMID: 7697110.
 3. Jewell DA, **Swietnicki W**, Dunn BM, Malcolm BA. Hepatitis A virus 3C proteinase substrate specificity. *Biochemistry.* 1992 Sep 1;31(34):7862-9. doi: 10.1021/bi00149a017. PMID: 1510973.
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.
- a) Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych:
- Kierowanie projektem Narodowego Centrum Nauki OPUS dotyczącym opracowania szczepionki przeciwko *Porphyromonas gingivalis*, okres maj 2017- maj 2022
 - Kierowanie projektem dotyczącym rozwoju nowych związków antybakteryjnych przeciwko enteropatogennej *E. coli* projekt 3.6 „Opracowanie

inhibitorów na chorobotwórczą *E. coli*” w ramach projektu BioMed, okres styczeń 2012-kwiecień 2015.

- Kierowanie projektem dotyczącym opracowania drobnocząsteczkowych związków blokujących wirulencje *Yersinii pestis* finansowanego przez agencję amerykańską DTRA (Defence Threat Reduction Agency), okres sierpień 2008-czerwiec 2010.
- Współkierowanie projektem wewnętrznym dotyczącym mechanizmu sekrecji w systemie wydzielania typu III w bakterii *Burkholderia mallei* finansowanego przez Armie Stanów Zjednoczonych, okres maj 2009-maj 2010

b) Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych:

- Enzyme inhibitors, Organizer and Plenary Speaker, IITD PAN, Wrocław, PL, Jun 14th, 2019
- Structure and computational design of therapeutics directed against proteins, Organizer and Plenary Speaker, IITD PAN, Wrocław, PL, Jun 12th, 2018
- 1st *In Silico* Drug Discovery Conference, Invited Speaker: Identification of small molecule inhibitors of type III secretion system EscN ATPase from enteropathogenic *E. coli*, Durham, NC, USA, Dec 3-4th, 2014
- 2009 Defense Threat Reduction Agency/Joint Science and Technology Office, Dallas, TX
- 2004, Spring Research Festival National Cancer Institute, Frederick, MD, USA – Novel protein-protein interactions in the type III secretion system of *Y. pestis*, **Swietnicki**, O'Brien, S., Holman, K. et al. - 2nd place
- FASEB Meeting, San Diego, 2005 – prezentacja pt. *Intra- and inter-domain interactions between Yersinia pestis virulence proteins YopB, YopD, and the chaperone SycD*, **Swietnicki**, W., O'Brien, S., Nystrom, S., Dyas, B., Ruthel, G. et al.

c) Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki:

- Wykład gościnny pt. *Opracowanie związków antybakteryjnych na przykładzie wybranych patogenów*, Studenckie Koło Naukowe, Wydział Farmacji, Uniwersytet Wrocławski, Głuchołazy, 8-9 kwiecień, 2017

- Wykład gościnny pt. *Opracowanie związków antybakteryjnych na przykładzie wybranych patogenów*, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław, 26 kwiecień 2017
- d) Współpraca z instytucjami, organizacjami i towarzystwami naukowymi w kraju i za granicą:
- Laboratorium Neolek przy Instytucie immunologii i Terapii doświadczalnej PAN - stała współpraca naukowa (2014-obecnie)
 - Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, współpraca naukowa (2017-obecnie)
 - California Institute of Medical Research, San Jose, CA, USA, współpraca naukowa (2020-obecnie)
 - University of Toronto, Toronto, ON, CA, współpraca naukowa (2021-obecnie)
- e) Recenzowanie manuskryptów w czasopismach międzynarodowych lub krajowych:
- Biochemistry – jeden recenzowany manuskrypt w 1994.
 - DTRA recenzent- jeden grant w 2010
 - MDPI Microorganisms -recenzent – 5 prac, 2020-2021
 - MDPI Molecules -recenzent – 2 prace 2020-2021
 - MDPI Antibiotics – recenzent – 3 prace 2020-2021
 - MDPI IJMS -recenzent -1 praca 2020-2021
 - Current Proteomics- recenzent - 4 prace, 2017-2020
 - Edytor Gościnny, Specjalna Edycja MDPI Biomolecules: Virulence Systems of Human Pathogens as Targets for Novel Therapeutics and Prophylactics
 - Edytor Gościnny, Specjalna Edycja MDPI IJMS: Secondary Metabolites as Therapeutics of Human Pathogens
- f) Kierowanie międzynarodowymi lub krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach:
- Wewnętrzny projekt badawczy ECBC, DTRA/Armia Stanów Zjednoczonych – Analiza mechanizmu sekrecji w *B. mallei* - ko-wykonawca projektu 2009-2010

- Opracowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów wirulencji systemu sekrecji *Y. pestis* – DTRA, USA – numer projektu poufny, 2008-2010- kierownik projektu
- Projekt badawczy pt. *Opracowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów wirulencji enteropatogennej E. coli*- projekt nr. 3.6, Wrocławskie Centrum Badawcze EIT+, 2012-2015 - kierownik projektu
- Projekt badawczy pt. *Badanie glikolipidów z Porphyromonas gingivalis zrekonstruowanych w E .coli jako podstawy nowej szczepionki przeciwko periodontozie*- projekt nr. 2016/21/B/NZ6/02028, Narodowe Centrum Nauki, konkurs OPUS, 2017-2022

g) Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną:

- Narodowe Centrum Nauki, Projekt OPUS- drugi najlepszy projekt w Polsce w grupie
- Narodowe Centrum Badan I Rozwoju, Projekty Wrocławskiego Centrum Badan EIT+- jeden z 3 najlepszych projektów w 2012.
- DTRA Conference, USA, 2010- Top 3 projects
- Nagrody zespołowa za prace, 2-gie miejsce, Spring Research Festival, Ft. Detrick, US-2004

h) Główny obszar zainteresowań:

- Systemy sekrecji patogenów i ich mechanizmy transportu białek
- Analiza systemów biologicznych i jej zastosowanie w projektowaniu leków i szczepionek
- Zastosowanie przesiewowych metod obliczeniowych w ramach strategii gene-to-drug design

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje,

ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

.....
(podpis wnioskodawcy)

