

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Krzysztof Jakub Pawlik

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

Tytuł magistra biotechnologii:

nadany przez Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych,
w dniu 12.01.1995. Tytuł pracy magisterskiej: „Charakterystyka macierzy jądrowych
otrzymanych trzema metodami”.

Stopień doktora nauk biologicznych.

nadany przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
we Wrocławiu w dniu 12.04.2002, za pracę pt. „Ekspresja genów syntazy
poliketydowej typu I *Streptomyces coelicolor* A3(2)”

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

Jestem zatrudniony w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN od
25.10.1994 – do tej pory

w Międzyzakładowej Pracowni Analizy Instrumentalnej i Preparatyki:

na stanowiskach: adiunkta (1.04.2021 do tej pory)

asystenta (1.02.2021 - 1.04.2021)

w Zakładzie Mikrobiologii, Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów:

na stanowiskach: asystenta (1.07.2016 - 1.02.2021)

adiunkta (1.01.2007 - 1.07.2016)

asystenta (1.03.1996 - 1.01.2007)

biotechnologa (25.10.1994 - 1.03.1996)

Byłem zatrudniony na Uniwersytecie Medycznym im Piastów Śląskich we Wrocławiu
w Katedrze i Zakładzie Toksykologii, w wymiarze 1/2 etatu na stanowisku adiunkta
w okresie od 1.10.2009 do 30.9.2010 oraz od 1.10.2012 do 30.09.2014.

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 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

- a. tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego Cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

Odkrycie nowego związku poliketydowego – coelimycyny i rola wybranych białek zespołu genów cpk w metabolizmie *Streptomyces coelicolor* A3(2).

- b. łączna wartość wskaźników bibliometrycznych prac składających się na osiągnięcie naukowe: **IF = 22,581 Punkty MNiSW = 414**
- c. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- 1) Kotowska M ✉, **Pawlik K**, Smulczyk-Krawczyszyn A, Bartosz-Bechowski H, Kuczek K. Type II thioesterase ScoT, associated with *Streptomyces coelicolor* A3(2) modular polyketide synthase Cpk, hydrolyzes acyl residues and has a preference for propionate. Appl Environ Microbiol. 2009 Feb;75:887-96. DOI:10.1128/AEM.01371-08

IF: 3,686; punkty MNiSW: 32. (22 cyt. – Web of Science, 20 cyt. Scopus)

Wkład habilitanta: udział w przygotowaniu koncepcji i planowaniu badań, przygotowaniu konstruktów plazmidowych do syntezy zmutowanych białek, udział w oczyszczaniu zmodyfikowanych białek, udział w dyskusji wyników, przygotowaniu manuskryptu i odpowiedzi dla recenzentów. Eksperymenty przeprowadzone w tej pracy zostały sfinansowane z funduszy grantu KBN nr 3 P04B 004 25, którego habilitant był kierownikiem.

- 2) **Pawlik K ✉**, Kotowska M, Kolesiński P. *Streptomyces coelicolor* A3(2) produces a new yellow pigment associated with the polyketide synthase Cpk. J Mol Microbiol Biotechnol. 2010 19: 147-151. DOI: 10.1159/000321501

IF: 2,648; punkty MNiSW 27. (21 cyt. – Web of Science, 21 cyt. Scopus)

Wkład habilitanta: wiodący udział w przygotowaniu koncepcji i planowaniu badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych, pomiary poziomów produkowanych poliketydów, habilitant przygotował szczep z komplementacją genu cpkC, miał wiodący udział w analizie i dyskusji wyników, przygotowaniu pierwotnej i ostatecznej wersji manuskryptu oraz odpowiedzi dla recenzentów. Badania opublikowane w tej pracy zostały sfinansowane z grantu nr N N302 1384 33 którego habilitant był kierownikiem.

- 3) Kotowska M.✉, Ciekot J., **Pawlik K.** Type II thioesterase ScoT is required for coelimycin production by the modular polyketide synthase Cpk of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Acta Biochimica Polonica* 2014, 61(1): 141-147. PMID: 24660171
IF: 1,153; punkty MNiSW 15 (8 cyt. – Web of Science, 8 cyt. Scopus)
Wkład habilitanta: udział w przygotowaniu koncepcji i planowaniu badań, udział w prowadzeniu eksperymentów, udział w przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Badania przedstawione w tej pracy były sfinansowane w ramach grantu N N405 355639, w którym habilitant był wykonawcą i grantu nr 3 P04B 004 25, którego habilitant był kierownikiem.
- 4) Bednarz B., Kotowska M., **Pawlik K.**✉. Multi-level regulation of coelimycin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Review. Appl Microbiol Biot* 103, 6423–6434 (2019) doi.org/10.1007/s00253-019-09975-w
IF: 3.53; punkty MNiSW: 100. (15 cyt. – Web of Science, 18 cyt. Scopus)
Wkład habilitanta: przygotowanie koncepcji pracy i danych literaturowych, udział w dyskusji danych literaturowych i przygotowaniu manuskryptu w wersji pierwotnej i ostatecznej, oraz w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.
- 5) Bednarz B., Millan-Oropeza A., Kotowska M., Świat M., Quispe Haro J.J., Henry C., **Pawlik K.J.**✉. Coelimycin synthesis activatory proteins are key regulators of specialized metabolism and precursor flux in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Front. Microbiol.*, (2021) doi: 10.3389/fmicb.2021.616050
IF: 5,64; punkty MNiSW: 100. (3 cyt. – Web of Science, 2 cyt. Scopus)
Wkład habilitanta: wiodący udział w przygotowaniu koncepcji badań, w przygotowaniu szczepów delecyjnych, w pozyskaniu materiału do badań proteomicznych, nadzór i konsultacje przebiegu eksperymentów wykonywanych przez przez technika Michała Świata doktoranta Bartosza Bednarza, i magistranta Juana Quispe Haro*, udział w analizie wyników, w przygotowaniu manuskryptu w wersji pierwotnej i ostatecznej, nawiązanie współpracy i uzyskanie finansowania badań proteomicznych wykonanych na platformie PAPPISO (francja) w ramach grantu naukowego z funduszy KNOW. *habilitant był promotorem pomocniczym przewodu doktorskiego dr Bartosza Bednarza oraz promotorem pracy magisterskiej mgr Juana Qisepe Haro.*
- 6) **Pawlik K.J.**✉, Zelkowski, M., Biernacki, M., Litwińska, K., Jaworski, P., Kotowska, M. GntR-like SCO3932 Protein Provides a Link between Actinomycete Integrative and Conjugative Elements and Secondary Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11867. doi.org/10.3390/ijms222111867
IF: 5,924; punkty MNiSW: 140. (0 cyt. – Web of Science, 0 cyt. Scopus)
*Wkład habilitanta: opracowanie koncepcji badań, bezpośredni udział we wszystkich procedurach eksperymentalnych i nadzór nad pracą technika Pawła Jaworskiego, oraz magistrantów Mateusza Zelkowskiego, Mateusza Biernackiego, i Katarzyny Litwińskiej, analiza danych, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na recenzje. *habilitant był promotorem prac magisterskich M. Zelkowskiego, M. Biernackiego i K. Litwińskiej.*

Wprowadzenie

Inspiracją do prowadzenia opisanych poniżej badań były wyniki uzyskane w mojej pracy doktorskiej, w której opisałem obecny w genomie bakterii *Streptomyces coelicolor* A3(2) nowy, wcześniej nieznaną klaster genów syntazy poliketydowej nazwany CPK (ang: *coelicolor polyketide*) oraz wykazałem, że geny tej syntazy podlegają ekspresji w przejściowej fazie wzrostu tych bakterii^{1,2}. Badania przedstawione w ramach osiągnięcia naukowego stanowią kontynuację i rozwinięcie wątków wynikających z mojej pracy doktorskiej. **Celem badań przedstawionych prac było poznanie roli niedawno odkrytego zespołu genów cpk w biologii szczepu modelowego *Streptomyces coelicolor* A3(2). Poniżej opisane badania dotyczą odkrycia produktu syntazy CPK - coelimycyny, oraz określenia roli wybranych białek, kodowanych przez geny klastra, które okazały się niezwykle istotne nie tylko dla regulacji genów syntazy CPK, ale także dla całego metabolizmu *S. coelicolor* A3(2).**

Streptomyces to Gram-dodatnie glebowe bakterie tlenowe, o złożonym cyklu życiowym obejmującym wzrost grzybni i tworzenie zarodników³. Wytwarzają farmaceutycznie użyteczne związki, między innymi przeciwnowotworowe, immunosupresyjne i antybiotyki. Mikroorganizmy z rodziny *Streptomyces* produkują całą gamę metabolitów wtórnych. Są to związki syntezowane w odpowiedzi na różne czynniki zewnętrzne. Ich produkcja jest sprzężona z różnicowaniem morfologicznym populacji. Ważną grupę metabolitów wtórnych stanowią antybiotyki: aminoglikozydy, antracykliny, chloramfenikole, beta-laktamy, makrolidy, tetracykliny i wiele innych. Dwie trzecie stosowanych współcześnie antybiotyków pochodzenia naturalnego jest produkowana przez bakterie z rodzaju *Streptomyces*.

Gatunek *Streptomyces coelicolor* A3(2) jest gatunkiem modelowym dla rodzaju *Streptomyces*. Jego badania rozpoczęły się w latach 40 ubiegłego wieku. *S. coelicolor* A3(2) szybko stał się popularnym szczepem w badaniach genetycznych rodzaju *Streptomyces* ze względu na dobrze widoczne wydzielane barwniki poliketydowe: czerwoną undecyloprodigiozynę i niebieską aktynorodynę. Był to pierwszy gatunek z rodzaju *Streptomyces*, którego genom zsekwencjonowano w roku 2001⁴. Jeśli weźmie się pod uwagę wielkość genomu *S. coelicolor* - 8 667 tys. par zasad, oraz dostępne wtedy techniki sekwencjonowania, można powiedzieć, że było to duże wyzwanie, podkreślające znaczenie badań nad *Streptomyces* zarówno dla nauki jak i przemysłu biotechnologicznego

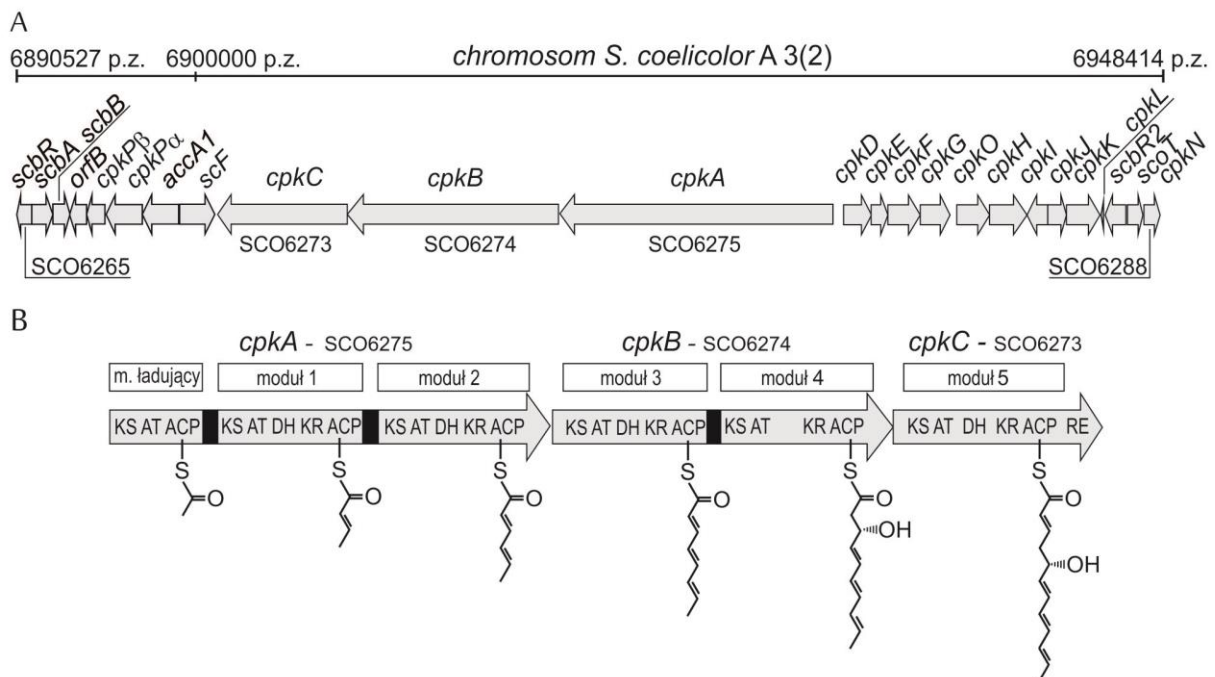
i farmaceutycznego. Obecnie dostępnych jest bardzo wiele informacji i narzędzi wspomagających badania biologii tego gatunku. W bazie PubMed dostępnych jest ponad 3 tys. publikacji dotyczących tego gatunku. Utworzona została publicznie dostępna biblioteka klonów kosmidowych⁵ oraz biblioteka kosmidów, w których większość genów została przerwana przez wprowadzony transpozon Tn5062⁶. Stale aktywnie uzupełniana jest baza danych StrepBD gromadząca informacje o *S. coelicolor* (dostępna pod adresem <http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). Dostępna jest również proteomiczna baza danych gatunku *S. coelicolor*, opisująca wszystkie białka zidentyfikowane w technice elektroforezy dwukierunkowej, proteom.biomed.cas.cz/streptomyces-coelicolor. Mimo tego, wiele procesów zachodzących w *Streptomyces coelicolor* A3(2) nie jest do końca poznanych, szczególnie tych związanych z metabolizmem wtórnym tych bakterii, np., synteza poliketydów.

Poliketydy to organiczne związki chemiczne, których szkielet węglowy powstaje w wyniku kolejnych kondensacji reszt acylowych. Poliketydami jest wiele antybiotyków jak np. erytromycyna, tetracykliny, nystatyna, immunosupresanty, barwniki czy inne związki stosowane w przemyśle. Poliketydy są produktami metabolizmu wtórnego bakterii, roślin oraz grzybów. Biosynteza poliketydów przebiega w sposób analogiczny do biosyntezy kwasów tłuszczowych. Obejmuje ona szereg reakcji kondensacji dekarboksylacyjnej, w których do wydłużanego łańcucha dobudowywane są jednostki dwuwęgłowe pochodzące z acylo-koenzymu A. Poliketydy są syntetyzowane przez wieloenzymatyczne kompleksy – syntazy poliketydowe (PKS, ang. *polyketide synthase*). Wyróżnia się trzy typy syntaz poliketydowych. PKS typu I to kompleksy wysokocząsteczkowych, wieloenzymatycznych białek, w których centra aktywne konieczne do pojedynczego cyklu wydłużania łańcucha poliketydowego zgromadzone są w moduły. W typie I syntazy poliketydowej za każdą reakcję kondensacji odpowiada inny moduł. W typie II poszczególne centra aktywne znajdują się na odrębnych białkach i jako kompleks enzymatyczny te same białka wielokrotnie uczestniczą w wydłużaniu jednego łańcucha poliketydowego. Typ III PKS to syntazy iteracyjne, które w przeciwieństwie do syntaz typu I i II nie są kowalencyjnie związane z wydłużanym łańcuchem poliketydowym i reagują z substratami związanymi z koenzymem A.

Zespół (klaster) genów syntazy coelimycyny (CPK) na chromosomie *Streptomyces coelicolor* A3(2) zlokalizowany jest od 6,894,148 do 6,948,414 nukleotydu i obejmuje 24 geny oznaczone numerami od SCO6266 do SCO6288 (Rys. 1)¹. Klaster CPK należy do syntaz typu I

i zawiera: (i) 3 geny kodujące główne podjednostki syntazy SCO6273-SCO6275, oznaczone *cpkA*, *cpkB* i *cpkC*), (ii) 2 geny kodujące białka regulatorowe typu SARP (ang: *streptomyces antibiotics regulatory protein*) gen *cpkO* SCO6280 i gen *cpkN* SCO6288, (iii) gen kodujący represor homologiczny do białek wiążących γ -butyrolaktony *scbR2* SCO6286, (iv) gen tioesterazy typu II *scoT* SCO6287, (v) gen kodujący błonowe białko transportujące *cpkF* SCO6278, (vi) geny modyfikacji post poliketydowych: *scF*-SCO6272, *cpkD* SCO6276, *cpkE* SCO6277, *cpkG* SCO6279, *cpkH*-SCO6281. Funkcja pozostałych genów nie jest wyjaśniona.

Główne podjednostki syntazy, czyli trzy multienzymatyczne białka CpkA, CpkB i CpkC zbudowane z odpowiednio 4558, 3576 i 2152 aminokwasów zawierają 28 centrów aktywnych zgrupowanych w sześć modułów. Obecność sześciu modułów skutkuje powstawaniem 12 węglowego łańcucha poliketydowego zawierającego trzy wiązania podwójne, który następnie w reakcjach post-poliketdowych jest modyfikowany, transportowany poza komórkę i ostatecznie w kolejnych modyfikacjach pozakomórkowych przyjmuje postać coelimycyny P1 lub P2⁷. Prawdopodobnie powstają też inne formy coelimycyny, które jak dotąd nie zostały opisane.



Rysunek 1. Organizacja zespołu genów CPK (A) i układ domen enzymatycznych w genach głównych podjednostek syntazy CPK (B). Górna linia schematycznie locus chromosomu *S. coelicolor A3(2)* kodujący klastery. Domeny enzymatyczne przedstawione na rysunku to KS – ketosyntaza, AT – acylotransferaza, ACP – białko przenoszące acyl, DH – dehydrogenaza, KR – ketoreduktaza. Pokazano przewidywane wydłużane łańcuchy poliketydowe. (na podstawie Pawlik i współpr. 2007)

W pracy pt.: "*Streptomyces coelicolor* A3(2) produces a new yellow pigment associated with the polyketide synthase Cpk." Pawlik K, Kotowska M, Kolesiński P. J Mol Microbiol Biotechnol. 2010 19: 147-151; opisałem odkrycie produktu syntazy poliketydowej CPK i warunki, w jakich synteza tego produktu zachodzi.

Pierwszych, incydentalnych obserwacji żółtego pigmentu produkowanego przez *S. coelicolor* A3(2) dokonałem w Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów tworząc szczepy *S. coelicolor* A3(2) nadprodukujące białko regulatorowe CpkN⁸. W tym momencie nie był znany mechanizm aktywacji syntezy związku o żółtym zabarwieniu ani rola białka CpkN, które jak opisano w dalszych publikacjach nie jest kluczowym aktywatorem klastra CPK. Te obserwacje, sugerujące produkcję przez *S. coelicolor* nieznanego dotychczas związku, zachęciły mnie do poszukiwań warunków, w których powstaje produkt syntazy CPK. Poszukiwania prowadziłem testując różne podłoża hodowlane, źródła węgla, źródła azotu, warunki wzrostu i czynniki stresowe.

Produkcję żółtego pigmentu uzyskałem zarówno w hodowlach stałych, jak i płynnych. Wykazano, że pigment jest wydzielany do podłoża, nie zaobserwowano obecności pigmentu w lizacie pochodzącym z rozbitych komórek. W hodowli na podłożu stałym wydzielanie pigmentu rozpoczyna się w 22-26 godzinie wzrostu hodowli bakterii przy zagęszczeniu, co najmniej 10⁴ komórek na płytkę, co odpowiada fazie przejściowej wzrostu (ang. *transition phase*) i jest zbieżne z ekspresją genów *cpkC*¹ oraz *scoT*⁹. W fazie przejściowej u *Streptomyces* kończy się wzrost grzybni podstawowej (substratowej) i rozpoczyna się wzrost grzybni powietrznej zakończony przekształceniem grzybni powietrznej w łańcuchy zarodników. U *S. coelicolor* A3(2) czerwony barwnik –undecyloprodigiosyna jest wydzielany w początkowej fazie wzrostu grzybni powietrznej, a barwnik niebieski aktynorodyna bezpośrednio przed rozpoczęciem sporulacji.

Dokonałem wstępnej charakterystyki badanego żółtego związku. Wykazałem, że odkryty związek później nazwany coelimycyną jest stabilny w różnych warunkach pH. Nie jest rozpuszczalny w rozpuszczalnikach niepolarnych jak heptan, heksan, octan etylu i chloroform. Nie stwierdziłem, aby odkryty związek miał aktywność antybiotyczną wobec testowanych gatunków *Bacillus cereus* PCM 2019, *Candida albicans* PCM 2566, *Escherichia coli* PCM 2057, *Staphylococcus aureus* PCM 2054 i *Pseudomonas aeruginosa* PCM 2058. Nie zaobserwowano właściwości cytotoksycznych tego związku.

Na podstawie badań nad zmutowanymi szczepami *S. coelicolor* wykazałem zależność pomiędzy syntezą nowo zaobserwowanego pigmentu a wcześniej opisaną syntazą CPK. Porównałem hodowle szczepu dzikiego, szczepu P100, w którym przerwałem ciągłość genu *cpkC* oraz szczepu P111 powstałego na bazie szczepu P100, w którym wprowadziłem dodatkową kopię genu *cpkC*. Szczep P100 nie był zdolny do syntezy coelimityny a skomplementowanie uszkodzenia genu *cpkC* dodatkową kopią ekspresjonowaną pod kontrolą konstytutywnego promotora *ermEp** przywracało zdolność syntezy coelimityny na poziomie podobnym do szczepu dzikiego.

W toku prac wykazałem, że synteza coelimityny przez szczep dziki jest zależna od kilku czynników, które muszą być spełnione jednocześnie, aby zaszła synteza. I tak, stwierdziłem, że konieczne jest osiągnięcie pewnej minimalnej gęstości zarodników w hodowli. W prowadzonych eksperymentach minimalna gęstość zarodników wynosiła 10^4 zarodników na płytkę, lub 10^6 zarodników na 1 ml w przypadku hodowli płynnej. Konieczność osiągnięcia minimalnej gęstości hodowli wynika z zaangażowania w regulację syntezy coelimityny mechanizmu quorum-sensing opartego na γ -butyrolaktonach. Bezpośrednio w sąsiedztwie genów kodujących klaster CPK znajdują się dwa geny systemu butyrolaktonowego: *scbR* – kodujący represor zależny od γ -butyrolaktonów i *scbA* kodujący syntazę γ -butyrolaktonów (Rys. 1)¹⁰. System ten pozwala na komunikację bakterii w kolonii lub w hodowli. Gdy łatwo przenikająca pomiędzy komórkami cząsteczka γ -butyrolaktonu, w całej kolonii osiągnie stężenie wystarczające do związania się z białkiem ScbR, następuje uwolnienie związanych wcześniej sekwencji promotorowych i aktywacja kolejnych genów prowadząca do syntezy coelimityny.

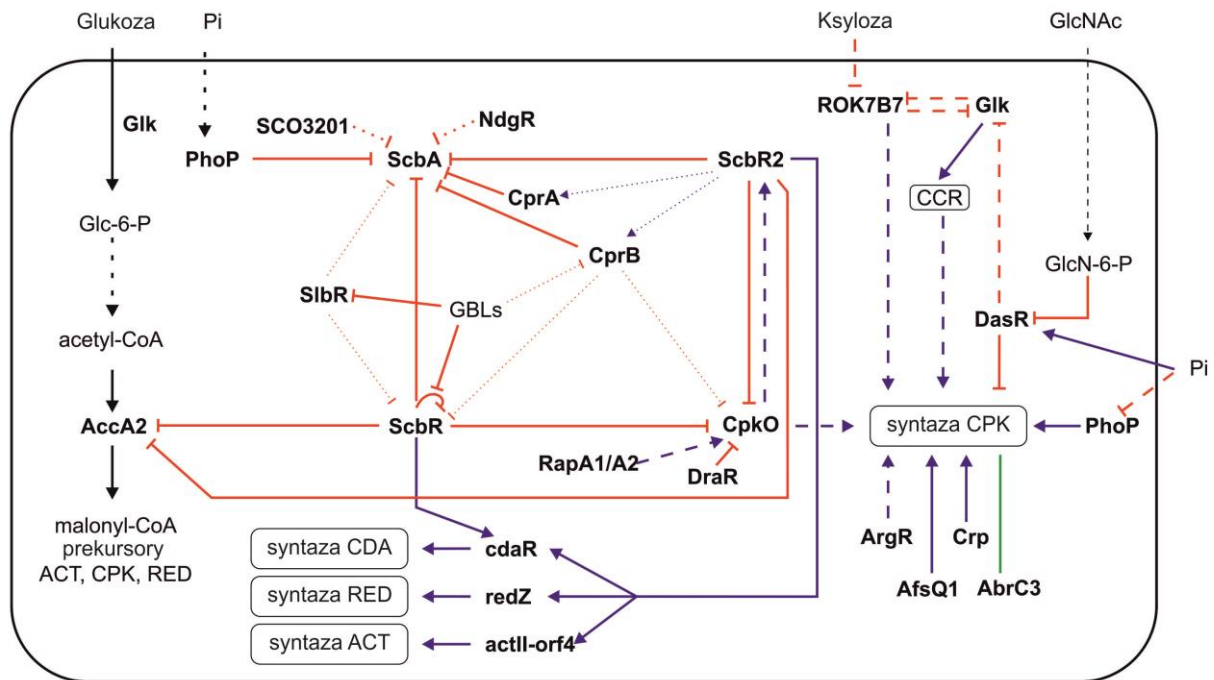
Drugim czynnikiem koniecznym do syntezy coelimityny okazało się zastosowanie bogatego podłoża 79 bez glukozy. Mechanizm, który powoduje aktywację syntezy coelimityny na podłożu 79 zawierającym pepton, ekstrakt drożdżowy i hydrolizat kazeiny do dziś pozostaje niewyjaśniony. Hamujący wpływ glukozy może być związany z mechanizmem represji zależnym od źródła węgla¹¹.

Trzecim istotnym czynnikiem dla syntezy coelimityny jest bardzo intensywne napowietrzanie w przypadku prowadzenia hodowli na podłożu płynnym. Konieczne okazało się prowadzenie hodowli na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej w objętości nie większej niż 1/10 objętości kolby, lub użycie fermentora pozwalającego na mieszanie brzojki z dużą prędkością.

W tej pracy zauważyłem też, że włączenie syntezy coelimycyny znacznie obniża poziom syntezy undecyloprodigiozyny i aktynorodyny. Jest to spójne z obserwacją dokonaną przez Takano i współpracowników¹⁰, w której wykazano, że usunięcie genu *scbA* spowodowało podwyższenie poziomów syntezy undecyloprodigiozyny i aktynorodyny a usunięcie genu *scbR* spowodowało opóźnienie syntezy undecyloprodigiozyny. Te obserwacje skierowały moje dalsze zainteresowania naukowe w kierunku badania systemu regulacji i aktywacji syntezy coelimycyny.

Wcześniejsze obserwacje i wyniki uzyskane w czasie poszukiwań warunków wzrostu i czynników wpływających na regulację procesu syntezy coelimycyny oraz coraz liczniejsze doniesienia literaturowe utwierdziły mnie w przekonaniu, że proces syntezy jest regulowany bardzo ściśle, a w regulacji uczestniczy wiele czynników. Przed kontynuacją tej tematyki dokonaliśmy wraz z zespołem podsumowania stanu wiedzy w publikacji Multi-level regulation of coelimycin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Bednarz B., Kotowska M., Pawlik K. Review. Appl Microbiol Biot 2019: 103, 6423–6434. W regulację aktywności zespołu CPK zaangażowane są zarówno białka CSR (ang. *cluster situated regulator*) kodowane w obrębie klastra, w tym białka SARP CpkO i CpkN. jak i szereg regulatorów pleiotropowych aktywnych w regulacji metabolizmu *S. coelicolor* A3(2) (Rys.2). Istotne są też białka ScbR i ScbR2 które są regulatorami pleiotropowymi kodowanymi w obrębie klastra CPK.

Wśród regulatorów związanych z regulacją klastra CPK trzeba wymienić systemy dwuskładnikowe: system AfsQ1/Q2, który jest zaangażowany w regulację metabolizmu węgla, fosforanów i azotu wraz z syntezą antybiotyków; system dwuskładnikowy DraR/K reguluje fizjologiczne i morfologiczne zróżnicowanie *S. coelicolor* A3(2) oraz metabolizm wtórny w sposób zależny od medium; system dwuskładnikowy PhoR/P wykrywa głód fosforanowy, hamuje centralny metabolizm, rozwój i metabolizm wtórny, aż do odzyskania wystarczającej ilości fosforanów do różnicowania morfologicznego. Wykazano też powiązania klastra CPK ze słabiej poznanymi systemami RapA1/A2, i AbrC1/C2/C3. Kolejną klasą regulatorów powiązanych z metabolizmem coelimycyny są białka rodziny TetR, wiążące DNA jak SCO3201, CprA i CprB, SlbR. Wspomnieć też trzeba o regulatorach Glk i Rok7B7 oraz DasR, ArgR, Crp, NdgR, GntR i RNAzie III, która również pełni funkcje regulatorowe.



Rysunek 2. Ogólny schemat regulacji klastra CPK. Na diagramie powiązano sygnały składników odżywczych z regulatorami pleiotropowymi i regulatorami specyficznymi dla szlaku wpływające na syntezę coelimycyny. Pokazano również efekt sprzężenia zwrotnego genów z zespołu CPK. Niebieskie linie zakończone strzałką oznaczają aktywację. Czerwone linie zakończone kreską represję. Zielona linia bez końca wskazuje na wiązanie DNA, ale wpływ na transkrypcję jest nieznan. Linie ciągłe wskazują bezpośredni efekt (wiązanie DNA lub ligandu), linie przerywane reprezentują efekt pośredni, a linie kropkowane wskazują proponowane, ale bezpośrednie interakcje. Cienkie czarne linie wskazują transport lub przemianę związków chemicznych. Tylko wpływ białek układu butanolidowego ScbR i ScbR2 na inne klastry genów biosyntetycznych zostały uwzględnione na schemacie, ponieważ najdokładniej odzwierciedlają one oddziaływanie transkrypcji genów klastra CPK na produkcję innych antybiotyków. CCR – represja zależna od źródła węgla. (Rysunek na podstawie Bednarz i współpr. 2019)

Na podstawie moich badań i obserwacji zaproponowałem badania zmierzające do określenia funkcji białek typu SARP CpkN i CpkO, których wyniki przedstawiono w pracy pt.: “Coelimycin synthesis activatory proteins are key regulators of specialized metabolism and precursor flux in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”. Bednarz B., Millan-Oropeza A., Kotowska M., Świat M., Quispe Haro J.J., Henry C., Pawlik K.J. Front. Microbiol. 2021 21.

W trakcie badań związanych z syntazą CPK prowadzonych w naszym laboratorium wcześniej kilkakrotnie podejmowałem ten temat. Barię uniemożliwiającą znalezienie celów działania białek CpkN i CpkO były trudności w izolacji tych białek syntezowanych zarówno w komórkach *E. coli* jak i *Streptomyces*. Dopiero analizując proteomy szczepów *S. coelicolor* A3(2) z usuniętymi genami tych białek uzyskaliśmy dane pozwalające na poznanie powiązań pomiędzy badanymi regulatorami a innymi elementami metabolizmu pierwotnego

i wtórnego. Wnioski wyciągnięte na podstawie analiz proteomicznych zostały potwierdzone w eksperymentach z sondami reporterowymi i obserwacjami fenotypów.

Nasze badania ujawniły, że zarówno białko CpkO, jak i CpkN są aktywatorami wymaganymi do biosyntezy coelimityny, ich efekty regulacyjne wpływają na inne szlaki metabolizmu wtórnego i nie tylko. CpkO aktywuje większość genów zespołu CPK w tym *scbR2*, a także geny strukturalne, jednak nie jest ono autoaktywatorem. Proponujemy, że CpkO jest aktywatorem genu *cpkN* a białko CpkN jest aktywatorem *scoT*. Z literatury wiadomo, że CpkO jest hamowane przez receptor γ -butyrolaktonów ScbR i pseudo receptor γ -butyrolaktonów ScbR2¹². W sekwencji promotora genu *cpkO* są miejsca wiązania białek ScbR i ScbR2. Nasze wyniki wskazują na to, że region promotorowy genu *cpkN* jest wiązany przez oba białka w podobny sposób. Obecność nakładających się miejsc wiązania białek ScbR i ScbR2 w promotorach genów *cpkO* i *cpkN* sugeruje istnienie punktu kontrolnego syntezy coelimityny, zachodzi konkurencja dwóch białek, lub działanie ScbR i ScbR2 jest rozdzielone czasowo. Delecja badanych genów wpłynęła na syntezę undecyloprodigiozyny – jak i słabiej poznanych poliketydów jak antybiotyk wapnio-zależny (CDA) czy arseno-poliketyd. Zauważono też wpływ delecji na białka z zespołu syntazy hopenu i amino-trihydroksybakteriohopanu (ATBH), celicheliny oraz zespołu SCO0381-SCO0401. Usunięcie genu *cpkO* spowodowało znaczną aktywację genów *red* kodujących syntazę undecylprodigosyny i genów ECR (*expression correlated with RED*). Poziomy syntezy zostały podniesione od 4 razy dla oksydoreduktazy RedK do 58-razy dla podjednostki syntazy RedL. Nie zaobserwowano zmian poziomu ekspresji tych genów w szczepie delecyjnym genu *cpkN*. Efekty delecji opisywanych genów na ekspresję zespołu genów kodujących antybiotyk wapnio-zależny były odwrotne, usunięcie genu *cpkO* znacznie aktywowało ten zespół genów a usunięcie genu *cpkN* obniżało ekspresję zespołu CDA. W przypadku syntazy arsenopoliketydu delecja każdego z regulatorów powodowała znaczne obniżenie aktywności całego zespołu genów w porównaniu ze szczepem dzikim. Pomiar proteomiczny białek zespołu aktynorodyny były utrudnione z powodu tego, że próbki były zbierane w fazie przejściowej wzrostu a synteza aktynorodyny zachodzi w późnej fazie wzrostu grzybni powietrznej. Obserwacje fenotypowe szczepu delecyjnego *cpkO* wskazują na podwyższoną ekspresję genów zespołu *act*.

W szczepach z usuniętymi białkami regulacyjnymi zaobserwowano wiele powiązań ze szlakami metabolizmu pierwotnego. I tak białka związane z syntezą lipidów były obfitsze w

szczepie z delecją *cpkN* i słabiej syntetyzowane w szczepie Δ *cpkO*, natomiast białka odpowiedzialne za degradację lipidów miały przeciwny profil ekspresji więcej było ich w szczepie Δ *cpkO* a mniej w Δ *cpkN*. Taki profil białek degradujących lipidy w pracy Wang i wspólr. 2020¹³ został skorelowany ze zużywaniem energii zamagazynowanej w triacylglicerolach dla celów produkcji aktynorodyny.

Przytoczone wyniki wskazują na to, że białka regulatorowe typu SARP, uważane dotąd za regulatory oddziaływujące jedynie na własny zespół genów mogą mieć znaczenie dla regulacji całego metabolizmu. W opisywanym przypadku zespołu CPK białka te są ściśle związane z systemem butanolidowym. Należy pamiętać, że białko ScbA jest jedyną syntazą γ -butyrolaktonów kodowaną w chromosomie *S. coelicolor* A3(2), natomiast represorów wiążących γ -butyrolaktony jest, co najmniej kilka. Oprócz potwierdzonych represorów ScbR i SlbR, potencjalnie takimi represorami są np. SCO3201 i AtrA (dane nieopublikowane). Podobnie nie bez znaczenia jest fakt, że u *S. coelicolor* A3(2) odkryto osiem różnych cząsteczek butyrolaktonów¹⁴. Uzyskane przez nas wyniki wskazują na możliwe sprzężenie zwrotne pomiędzy białkiem CpkO a ScbA poprzez białko ScbR2. Może być to ścieżka regulacyjna wpływająca na inne procesy przez system butanolidowy. Nie można też wykluczyć bezpośredniego oddziaływania białek CpkN i CpkO na inne klastry metabolizmu wtórnego i szlaki syntezy. Wielu badaczy zajmujących się biologią *Streptomyces* rozważa hipotezę, że coelimycyna jest cząsteczką sygnałową. Potencjalna sygnalizacyjna rola CPK, w tym określenie, który prekursor CPK jest cząsteczką aktywną, wymaga dalszych badań. Niewątpliwie system regulacji syntazy CPK pełni centralną rolę w regulacji metabolizmu wtórnego *S. coelicolor* A3(2) i istotnie wpływa na metabolizm podstawowy.

Poszukując innych czynników regulujących ekspresję zespołu genów CPK odnalazłem białko SCO3932, pochodzące z elementu integracyjnego podobnego do plazmidu pSam2. Wyniki opisane są w pracy pt.: „GntR-like SCO3932 Protein Provides a Link between Actinomycete Integrative and Conjugative Elements and Secondary Metabolism.” Pawlik. K.J., Zelkowski, M., Biernacki, M., Litwińska, K.; Jaworski, P.; Kotowska, M. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11867.

Elementy integracyjne i koniugacyjne ICEs (ang. *integrative and conjugative elements*) genomów bakteryjnych mają zarówno cechy plazmidowe, jak i bakteriofagowe. Mają zdolność do wycinania z chromosomu, koniugacji z nowym gospodarzem i integracji w

specyficznym miejscu chromosomu gospodarza przez rekombinację. Promieniowcowe elementy integracyjne i koniugacyjne AICE (ang. *actinomycete integrative and conjugative elements*) dodatkowo mają zdolność do autonomicznej replikacji jak plazmidy. Białko SCO3932 jest homologiem białka KorSA z plazmidu insercyjnego pSam2 ze *Streptomyces ambofaciens*¹⁵. Białko SCO3932 należy do rodziny regulatorów transkrypcji GntR i klasyfikowane jest w podrodzinie HutC¹⁶.

Charakterystyczną cechą niektórych elementów AICE jest fenotyp występujący w czasie procesu koniugacji, np. plazmidu pSam2 jak i jego homologów obecnych u *S. coelicolor* A3(2). W procesie tym wokół komórki donora plazmidu tworzy się 2-4 milimetrowa strefa komórek pobierających plazmid, w których jest zahamowany wzrostu i sporulacja tzw. *pock*. Prawdopodobnie za ten fenotyp odpowiedzialny jest system regulacyjny *kil-kor* składający się z genu *kil*, którego ekspresja jest letalna dla komórek i jego represora *kor*¹⁷. Bazując na homologii do plazmidu pSam2 można założyć, że białko SCO3932 ma funkcję elementu Kor, i kontroluje białko SCO3934 – przypuszczalny element Kil poprzez białko SCO3933.

W eksperymentach *in vitro* i *in vivo* wykazaliśmy, że białko SCO3932 wiąże promotory genów *cpkD* i *actII-ORF4* oraz region międzygenowy pomiędzy genami SCO3932 i SCO3933. W szczepie nadprodukującym białko SCO3932 zaobserwowaliśmy podwyższoną ekspresję genów *cpkD* i *actII-ORF4*. Wiązanie do regionu międzygenowego w tym do własnego promotora może być związane z aktywnością systemu Kil-Kor.

Zgodnie z moją wiedzą jest to pierwszy raport dowodzący powiązania pomiędzy procesami syntezy metabolitów wtórnych a aktywnością elementów insercyjnych typu AICE u *Streptomyces* na poziomie molekularnym. Proces koniugacji, w którym uczestniczą elementy AICE, wprowadza komórki akceptujące plazmid w specjalny stan fizjologiczny, gdzie najważniejszym celem jest osiągnięcie poziomu replikacji plazmidu na poziomie wystarczającym do wprowadzenia do komórek akceptora¹⁷. Pozostałe procesy fizjologiczne związane z rozwojem grzybni powietrznej są zahamowane. Nie są jasne przyczyny, dla których takie powiązanie regulacyjne istnieje. Niewątpliwie istnieją czynniki regulacyjne wiążące te procesy i białko SCO3932 jest jednym z elementów tego systemu.

W pracy pt.: “Type II thioesterase ScoT, associated with *Streptomyces coelicolor* A3(2) modular polyketide synthase Cpk, hydrolyzes acyl residues and has a preference for propionate.” Kotowska M, Pawlik K, Smulczyk-Krawczyszyn A, Bartosz-Bechowski H, Kuczek K. Appl Environ Microbiol. 2009 Feb; 75:887-96 opisano specyficzność substratową tioesterazy typu II (ScoT) z zespołu genów CPK. Określono wartości parametrów kinetycznych oraz wskazano aminokwasy budujące centrum aktywne enzymu.

W procesie syntezy poliketydów przez syntazy poliketydowe typu I wydłużany łańcuch węglowy jest związany kowalencyjnie z syntazą poprzez wiązanie tioestrowe do grupy fosfopantoteinowej domeny ACP (ang: *acyl carrier protein*). Gotowy łańcuch poliketydowy zazwyczaj jest odcinany od syntazy poliketydowej przez domenę tioesterazową zlokalizowaną na C-końcu ostatniego modułu syntazy. W wielu zespołach genów syntaz poliketydowych typu I występuje również gen kodujący odrębne białko - tioesterazę typu II. Rola tioesterazy typu II w syntazach PKS typu I polega na usuwaniu niereaktywnych reszt acylowych blokujących wieloenzymatyczny kompleks syntazy¹⁸, wykazano, że tioesteraza typu II w niektórych syntazach pełni rolę enzymu zwalniającego wydłużany łańcuch poliketydowy lub odpowiada za selekcję substratu w module ładującym¹⁹. W zespole genów CPK na C końcu ostatniego modułu nie ma domeny tioesterazowej. W tym miejscu obecna jest domena epimerazowa, która ma aktywność reduktazy. Wcześniejsza publikacja naszego zespołu, Kotowska i współpr. 2002⁹ potwierdziła edytującą rolę tioesterazy ScoT z klastra CPK.

Przystępując do badań tioesterazy ScoT nie znano produktu syntazy CPK. Badania tego zagadnienia były prowadzone równolegle.

W pierwszej części omawianej pracy uzyskano dzięki białko ScoT metodą ekspresji heterologicznej w komórkach *E. coli* i przeprowadzono testy enzymatyczne stosując, jako substraty estry *p*-nitrofenylowe (*p*-NF) kwasu octowego, propionowego i masłowego oraz tioestry N-acetylocysteaminowe (NAC) tych samych kwasów. Dla pochodnych NAC określono parametry k_{cat} , K_M , i k_{cat}/K_M , a dla pochodnych *p*-NF określono jedynie parametr k_{cat}/K_M . Uzyskane wartości wynosiły dla pochodnych NAC: k_{cat} = (octan / propionian / maślan) 109 ± 7 / 450 ± 67 / 54 ± 8 [min^{-1}]; K_M = 56 ± 6 / 34 ± 10 / 52 ± 14 [mM]; k_{cat}/K_M = 33 / 221 / 17 [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$] dla pochodnych *p*-NF k_{cat}/K_M = (octan / propionian / maślan) 788 / 3567 / 485 [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]. Na podstawie tych wyników stwierdzono, że enzym ScoT ma preferencje wobec pochodnych kwasu propionowego.

Na podstawie homologii sekwencji zaproponowano, że tioesteraza ScoT jest enzymem należącym do rodziny α/β hydrolaz. Przygotowano zestaw konstruktów ekspresyjnych do uzyskania białek rekombinowanych, w których aminokwasy triady katalitycznej charakterystycznej dla α/β hydrolaz podstawiono innymi aminokwasami. Zaplanowano podstawienie seryny 90 alaniną i cysteiną, kwasu asparaginowego w pozycjach 194 i 196 asparaginą, histydyn 210 i 224 tyrozyną. Uzyskano białka rekombinowane dla konstruktów ScoT_S90A, ScoT_S90C, ScoT_H210Y i ScoT_H224Y. Pozostałe muteiny nie ulegały ekspresji lub ekspresja była na tak niskim poziomie, że nie udało się oczyścić wystarczającej ilości tych białek. Aktywność enzymatyczną mutein testowano wobec pochodnej *p*-nitrofenylowej kwasu propionowego i tioestru N-acetylocysteaminu i kw. propionowego. Wykazano, że Seryna 90 jest aminokwasem koniecznym dla aktywności enzymatycznej tioesterazy ScoT. Wyniki dotyczące wymienionych Histydyn 210 i 224 wskazały, że to histydyna 224 jest aminokwasem budującym centrum aktywne. Nie udało się uzyskać wystarczającej ilości preparatów pozostałych mutein, aby określić, który z kwasów asparaginowych 194 czy 196 stanowi trzeci element triady katalitycznej. W pomiarach spektrometrii mas udało się zaobserwować produkt przejściowy reakcji hydrolizy estru paranitrofenylowego kwasu masłowego.

Jeśli porównamy aktywność tioesterazy ScoT z homologicznymi enzymami pochodzącymi z innych klastrów PKS: TyLO (*S. fradiae*) i PikAV (*S. venezuelae*) to zauważymy, że różnica preferencji wobec pochodnych kwasu propionowego jest kilka do kilkunastu razy większa. Jest to zgodne z wnioskami wynikającymi z teoretycznego przewidywania substratów dla syntazy CPK gdzie zakładano¹, że łańcuch poliketydowy powstaje w wyniku kondensacji sześciu cząsteczek malonylo koenzymu A.

Publikacja „Type II thioesterase ScoT is required for coelimycin production by the modular polyketide synthase Cpk of *Streptomyces coelicolor* A3(2).” Kotowska M., Ciekot J., Pawlik K. *Acta Biochimica Polonica* 2014, 61(1): 141-147. PMID: 24660171 opisuje eksperymentalne potwierdzenie roli tioesterazy ScoT w procesie syntezy coelimycyny. Konstruując szczep delecyjny genu *scoT*, i szczep komplementacyjny tego genu i porównując poziomy syntezy coelimycyny wykazano, że enzym ScoT jest bezpośrednio zaangażowany w syntezę coelimycyny. Zaskakującą obserwacją był fakt, że delecja genu *scoT* całkowicie

znosi syntezę coelimycyny. Całkowite zahamowanie produkcji związków poliketydowych jest typowym efektem delecji tioesteraz typu II uwalniających łańcuchy²⁰, zaś podczas dezaktywacji TEII, które posiadają funkcje edycyjne zwykle obserwowany jest umiarkowany spadek wydajności syntezy produktu²¹. Nasze poprzednie wyniki wskazują na edycyjną rolę tioesterazy ScoT⁹. Stwierdzono, że jest aktywna *in vitro* wobec substratów, które naśladują krótkie reszty acylowe blokujące „linię montażową” poliketydów. Co więcej, gen *scoT* był w stanie komplementować delecję genu *tylO* w *S. fradiae*⁹.

Wykazano, że białko ScoT może hydrolizować dodekany *paranitrofenylu*. Test enzymatyczny wykazał, że szybkość reakcji dla tego związku jest około 7500 razy niższa niż dla preferowanego substratu — propionianu. Stąd hipoteza, że tioesteraza ScoT może uwalniać końcowy łańcuch poliketydowy z syntazy Cpk wydaje się mało prawdopodobna. Tak powolna hydroliza produktu byłaby etapem ograniczającym biosyntezę i ułatwiałaby hydrolizę krótszych półproduktów przyłączonych do poprzedzających modułów przez tę samą tioesterazę. Jednakże, wynik ten wskazuje, że tioesteraza ScoT ma szeroki zakres substratów, i może trawić acylowe łańcuchy, które są wystawione na jej działanie przez wystarczająco długi czas.

W tej publikacji zaprezentowano również szybką i precyzyjną metodę pomiaru poziomu coelimycyny w medium hodowlanym. Gomez-Escribano i współpracownicy w 2012 roku ustalili strukturę chemiczną coelimycyny P1⁷. Coelimycyna jest syntetyzowana, jako 12 węglowy łańcuch zawierający trzy wiązania podwójne, zakończony grupą aminową. W takiej postaci coelimycyna jest transportowana na zewnątrz komórki gdzie zachodzą reakcje epoksydacji wiązań podwójnych oksydacji grupy hydroksylowej przy węglu 9 i cyklizacji⁷. Taka cząsteczka reaguje ze związkami znajdującymi się w medium hodowanym. Reakcja coelimycyny z N-acetylocysteiną powoduje powstanie coelimycyny P1 a reakcja z glutaminianem sodu prowadzi do powstania coelimycyny P2. Prawdopodobnie istnieje wiele odmiennych wersji coelimycyny. Wersje P1 i P2 są związkami barwnymi i łatwymi w detekcji przy użyciu metod spektrofotometrycznych. Zastosowanie minimalnego medium zawierającego 50mM glutaminian sodu w hodowlach pozwoliło na opracowanie ilościowej metody HPLC do pomiaru coelimycyny P2 bezpośrednio w medium hodowlanym.

Podsumowanie

Cykl przedstawionych przeze mnie prac miał na celu poznanie biologii syntazy poliketydowej Typu I ze *Streptomyces coelicolor* A3(2). Do roku 2010 syntaza ta była opisywana, jako „ukryta” (ang. *cryptic*). Obecnie w dobie masowego sekwencjonowania genomów bakteryjnych stanowi przykład nieaktywnego zespołu genów, których wiele jest opisywanych w coraz to nowych genomach. Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- **Odkrycie coelimycyny i ustalenie warunków aktywacji zespołu genów CPK.** Przez ponad 50 lat badań laboratoryjnych nad bakterią *S. coelicolor* A3(2) brak było doniesień naukowych opisujących obserwację tego metabolitu wtórnego, pomimo jego wyraźnego zabarwienia. Wynika to ze ścisłej kontroli produkcji coelimycyny przez skomplikowane mechanizmy regulacyjne, w tym zjawisko *quorum sensing* i represję kataboliczną oraz działanie regulatorów plejotropowych. Odkrycie jest o tyle istotne, że znanych jest obecnie bardzo wiele nieaktywnych zespołów genów syntaz metabolitów wtórnych, których aktywacja może prowadzić do uzyskania nowych potencjalnie użytecznych związków poliketydowych. Zastosowane podejście polegające na poszukiwaniu warunków, w których dziki szczep produkuje poszukiwany związek ma tę przewagę nad metodami opartymi o modyfikacje genetyczne takie jak delecja represora, nadprodukcja aktywatorów, czy ekspresja heterologiczna w innym szczepie, że uzyskujemy związek kompletny taki jak występuje w środowisku naturalnym.
- **Udział w opisanu roli białek regulatorowych CpkO i CpkN.** Dotychczas białka typu SARP uważane były za bezpośrednie aktywatory zespołu genów, w którym są kodowane. Przedstawione wyniki pokazują znacznie bardziej złożony mechanizm regulacji syntezy poliketydów, w którym wszystkie regulatory zarówno te dotychczas opisane, jako związane z konkretną syntazą jak i regulatory plejotropowe oraz regulatory centralne związane z systemem *quorum sensing* tworzą rozbudowaną sieć wzajemnych zależności. To nowe spojrzenie jest istotne dla rozwoju badań nad produkcją związków poliketydowych mających zastosowanie praktyczne gdzie dąży się do uzyskania jak najbardziej wydajnych szczepów.
- **Wskazanie powiązania elementów AICE z syntezą coelimycyny i aktynorodyny.** Genetyczne elementy mobilne jak transpozony, fagi, czy plazmidy stanowią duży problem w wielkoskalowych hodowlach bakteryjnych, w jakich prowadzi się produkcję antybiotyków czy innych użytecznych metabolitów wtórnych. Mechanizmy wiążące transfer tych elementów z

fizjologią komórki są dotychczas słabo poznane. Zaprezentowane dane stanowią krok w kierunku poznania biologii tego procesu.

- **Udział w opisanu roli tioesterazy ScoT.** Podobnie jak w przypadku zrozumienia systemów regulacji, zrozumienie funkcji tioesteraz typu II ma znaczenie praktyczne w tworzeniu i rozwoju nowych związków poliketydowych. Opisana tioesteraza jest już eksperymentalnie stosowana w projektach komercyjnych, których celem jest uzyskiwanie dużych ilości krótko łańcuchowych poliketydów.

Uważam, że prace wchodzące w skład cyklu znacznie poszerzyły wiedzę o biologii gatunku *Streptomyces coelicolor* A3(2) i jednocześnie całego rodzaju *Streptomyces*. Wyniki uzyskane w moich pracach stały się istotnym punktem odniesienia dla naukowców zajmujących się zarówno badaniami podstawowej biologii *Streptomyces*, jak również badaniami aplikacyjnymi w zakresie związków poliketydowych. Przedstawione wyniki wniosły nowe spojrzenie na poszukiwanie dotychczas nieznanych związków poliketydowych. Istotny wpływ wywierają też na prace nad modyfikacjami procesów syntezy znanych związków i tworzenia z nich nowych kombinacji metodami biologii syntetycznej.

Bibliografia

1. Pawlik, K., Kotowska, M., Chater, K. F., Kuczek, K. & Takano, E. A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch. Microbiol.* **187**, 87–99 (2007).
2. Kuczek, K., Pawlik, K., Kotowska, M. & Mordarski, M. *Streptomyces coelicolor* DNA homologous with acyltransferase domains of type I polyketide synthase gene complex. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 195–200 (1997).
3. Hopwood, D. A. *Streptomyces in nature and medicine : the antibiotic makers*. (Oxford University Press, 2007).
4. Bentley, S. *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141–147 (2002).
5. Redenbach, M. *et al.* A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**, 77–96 (1996).
6. Fernández-Martínez, L. T. *et al.* A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **99**, (2011).
7. Gomez-Escribano, J. P. *et al.* Structure and biosynthesis of the unusual polyketide alkaloid coelimycin P1, a metabolic product of the cpk gene cluster of *Streptomyces coelicolor* M145. *Chem. Sci.* **3**, 2716 (2012).
8. Piotr Kolesinski. Nadekspresja białka KasN w komórkach *Streptomyces coelicolor* A3(2). Praca magisterska, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Kierunek Biotechnologia, 2006.
9. Kotowska, M. *et al.* Type II thioesterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **148**, (2002).

10. Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y. & Bibb, M. J. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **41**, 1015–1028 (2001).
11. Gubbens, J., Janus, M., Florea, B. I., Overkleeft, H. S. & Van Wezel, G. P. Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Mol. Microbiol.* **86**, 1490–1507 (2012).
12. Wang, J. *et al.* A novel role of ‘pseudo’ γ -butyrolactone receptors in controlling γ -butyrolactone biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* **82**, 236–250 (2011).
13. Wang, W. *et al.* Harnessing the intracellular triacylglycerols for titer improvement of polyketides in *Streptomyces*. *Nat. Biotechnol.* **38**, (2020).
14. Sidda, J. D. *et al.* Overproduction and identification of butyrolactones SCB1–8 in the antibiotic production superhost *Streptomyces* M1152. *Org. Biomol. Chem.* 1–4 (2016). doi:10.1039/C6OB00840B
15. Pernodet, J. L., Simonet, J. M. & Guérineau, M. Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2. *MGG Mol. Gen. Genet.* **198**, (1984).
16. Tsyplik, O. *et al.* Transcriptional regulators of GntR family in *Streptomyces coelicolor* A3(2): analysis in silico and in vivo of YtrA subfamily. *Folia Microbiol. (Praha)*. **61**, (2016).
17. Hagege, J. *et al.* Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens*: Characterization of a kil-kor system associated with transfer. *J. Bacteriol.* **175**, 5529–5538 (1993).
18. Heathcote, M. L., Staunton, J. & Leadlay, P. F. Role of type II thioesterases: evidence for removal of short acyl chains produced by aberrant decarboxylation of chain extender units. *Chem. Biol.* **8**, 207–220 (2001).
19. Kotowska, M. & Pawlik, K. Roles of type II thioesterases and their application for secondary metabolite yield improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 7735–7746 (2014).
20. Liu, T. *et al.* Identification of NanE as the thioesterase for polyether chain release in nanchangmycin biosynthesis. *Chem. Biol.* **13**, 945–955 (2006).
21. Butler, A. R., Bate, N. & Cundliffe, E. Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *Chem. Biol.* **6**, 287–292 (1999).

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 okresie od 01.12.2002 do 30.11.2003 odbyłem staż podoktorski na Uniwersytecie Paris Sud XI, w Institut de Génétique et Microbiologie (Paryż, Francja). Staż finansowany był przez Francuskie Ministerstwo Młodzieży, Edukacji i Badań. Temat stażu „pSam2 as a model to study conjugative transfer among bacteria of the genus *Streptomyces*”. W czasie stażu prowadziłem prace badawcze mające na celu wyjaśnienie mechanizmu transferu międzykomórkowego plazmidów zintegrowanych z chromosomem *S. coelicolor* A3(2). Staż odbywałem pod kierunkiem prof. Jean-Luc Pernodet’a.
- Współpraca naukowa z prof. Eriko Takano w zakresie badania aktywności genów syntazy poliketydowej CPK. W ramach tej współpracy od 24.09 do 18.11.2005 odbyłem staż krótko terminowy na Uniwersytecie Eberharda Karola w Tybindze. Wynikiem współpracy była publikacja Pawlik i wspótp. 2007 (pozycja 7 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych).
- Praca naukowa i dydaktyczna w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. W okresach od 1.10.2009 do 30.9.2010 i od 1.10.2012 do 30.09.2014 byłem zatrudniony na stanowisku adiunkta w wymiarze ½ etatu w w/w Katedrze. W ramach zatrudnienia prowadziłem prace badawcze i pracę dydaktyczną polegającą na prowadzeniu ćwiczeń z toksykologii dla studentów farmacji oraz prowadzeniu prac magisterskich. W tym okresie byłem promotorem trzech prac magisterskich: Marty Durlak, Beaty Agnieszki Kotarskiej i Joanny Piechowicz (pozycje 8, 10 i 14 na liście w pkt. 6 tego dokumentu). W ramach pracy badawczej brałem udział w realizacji projektu pt.: „Badanie własności biologicznych nowych pochodnych izoksazolo- i pirazolopirydyny” wyniki tego projektu zostały zaprezentowane w formie plakatu (poz. 54 w rozdziale II.7 wykazu osiągnięć naukowych) oraz opublikowane w pracy Poręba i wspótp. 2015 (poz 24 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych). Efektem pracy w Katedrze i Zakładzie Toksykologii były również publikacje Kazubek i wspótp. 2010, Kazubek-Zemke i wspótp. 2014, oraz Szymańska i wspótp. 2017 (poz 10, 20 i 29 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych). W tym okresie powstał również patent nr P.402290 (poz. 1 w rozdziale III.3 wykazu osiągnięć naukowych)
- Współpraca naukowa z prof. Markiem Samociem i jego zespołem z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Współpraca dotyczyła funkcjonalizowania cząstek biologicznych (DNA, białek) nanocząstkami o właściwościach fluorescencyjnych. W ramach współpracy zrealizowano międzynarodowy grant NCN - HARMONIA nr 2012/04/M/ST5/00340 (poz. 3 w rozdziale II.9 wykazu osiągnięć naukowych). Wynikiem współpracy były prace oryginalne: Hańczyc i wspótp. 2011, Olesiak-Bańska i wspótp. 2011, Gordel i wspótp. 2012, Delplanque i wspótp. 2015, Klekotko i wspótp. 2015 (poz 11, 12, 16, 21, 25 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć

naukowych). W wyniku współpracy zaprezentowano również szereg doniesień zjazdowych, są to pozycje 28, 29, 30, 31, 32, 37, 38, 45, 58, 60, 61, 63, 67, 72, 73, 76 w rozdziale II.7 wykazu osiągnięć naukowych.

- Współpraca naukowa z dr hab. Katarzyną Matczyszyn z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Współpraca dotyczyła oddziaływań azobenzenów z białkami i kwasami nukleinowymi. Wynikiem tej współpracy były trzy prace oryginalne Deiana i współpr. 2017a, Deiana i współpr. 2017b, oraz Dudek i współpr. 2018 (pozycje 28, 30, 32 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych).

- Od roku 2018 współpracuję naukowo z dr hab. Katarzyną Matczyszyn z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. i z prof. Iforem Samuelem z Uniwersytetu w St. Andrews (W. Brytania) realizując temat „Fototerapia antybakteryjna w zwalczaniu patogenów stopy cukrzycowej” W ramach tej współpracy powstały prace oryginalne Chen i współpr. 2019, Maldonado-Carmona N., i współpr. 2020 (pozycje 36 i 38, w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych). Przedstawiono również szereg doniesień zjazdowych: pozycje 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 19, w rozdziale II.7 wykazu osiągnięć naukowych. Ta współpraca jest kontynuowana, w przygotowaniu są kolejne prace oryginalne.

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

a) Osiągnięcia dydaktyczne

Promotorstwo pomocnicze pracy doktorskiej:

dr Bartosz Bednarz, Promotor dr hab. Jacek Rybka. Praca pt.; "Rola białek regulatorowych CpkO i CpkN w procesie syntezy coelimycyny oraz w szlakach produkcji innych antybiotyków u *Streptomyces coelicolor* A3(2)" dyplom uzyskany 14.10.2021

Promotorstwo prac magisterskich (podano nazwisko magistranta, tytuł pracy, IITD/uczelnię macierzystą rok obrony)

1. Juan José Quispe Haro, Studying the effects of cpkN and cpkO deletion on antibiotic gene clusters in *S. coelicolor* A3(2). IITD/MONABIPHOT-Saclay-Politechnika Wroclawska 2019.
2. Barbara Dąbrowska, Analiza potencjału uzyskania metabolitów wtórnych ze *Streptomyces osmaniensis*. IITD/ Politechnika Wroclawska 2019.
3. Aleksandra Gosiewska. Charakterystyka fenotypowa szczepów *Streptomyces coelicolor* A3(2), z podwyższonym poziomem ekspresji regulatorów typu SARP. IITD/ Politechnika Wroclawska 2018.
4. Nikola Nowot, Badanie wpływu białka CpkN na aktywność promotorów z zespołu genów syntazy poliketydowej Cpk. IITD/ Politechnika Wroclawska 2018.

5. Olga Kozińska, Charakterystyka funkcjonalna białek wiążących gamma-butyrolaktony ze *Streptomyces coelicolor* A3(2) IITD/ Politechnika Wrocławska 2016.
 6. Anna Lech, Analiza oddziaływań białka SCO7102 z innymi białkami u *Streptomyces coelicolor* A3(2). IITD/ Politechnika Wrocławska 2015.
 7. Katarzyna Litwińska, Charakterystyka białka SCO7102 ze *Streptomyces coelicolor* A3(2). IITD/ Politechnika Wrocławska 2014.
 8. Joanna Piechowicz, Znaczenie estradiolu w procesie peroksydacji lipidów wywołanej etanolem. Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny 2013.
 9. Mateusz Biernacki, Białko SCO3932, jako potencjalny regulator syntezy metabolitów wtórnych u *Streptomyces coelicolor* A3(2). IITD/ Politechnika Wrocławska 2013
 10. Beata Agnieszka Kotarska, Właściwości fizykochemiczne i biologiczne pochodnych 2-aminobenzimidazolu i pochodnych imidazo[4,5-b]pirydyny. Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny 2013.
 11. Mateusz Zelkowski, Badanie oddziaływań białka SCO3932 z sekwencjami promotorowymi genów cpk ze *Streptomyces coelicolor*. IITD/ Politechnika Wrocławska 2012.
 12. Tomasz Buhl, Udział białka CpkF ze *Streptomyces coelicolor* A3(2) w transporcie biocydów IITD/ Politechnika Wrocławska 2011.
 13. Wojciech Pasławski, Ekspresja i charakterystyka białka błonowego CpkF ze *Streptomyces coelicolor* A3(2) IITD/ Politechnika Wrocławska 2010.
 14. Marta Durlak, Zależność ekspresji wybranych genów syntazy poliketydowej CPK ze *Streptomyces coelicolor* od białka CpkN. IITD/ Akademia Medyczna, Wrocław 2010.
 15. Piotr Hańczyc, Study of liquid crystal phases and ordering properties of plasmid DNA IITD/ Politechnika Wrocławska-Monabiphot 2009.
 16. Katarzyna Hanczaryk, Białko regulatorowe CpkN ze *Streptomyces coelicolor* A3(2) IITD/ Politechnika Wrocławska 2009.
 17. Sylwia Szczur, Rola białka CpkF ze *Streptomyces coelicolor*. IITD/ Politechnika Wrocławska 2008.
 18. Piotr Kolesiński, Nadekspresja białka KasN w komórkach *Streptomyces coelicolor* IITD/ Politechnika Wrocławska 2006.
- Promotorstwo prac licencjackich i inżynierskich (podano nazwisko magistranta, tytuł pracy, uczelnię macierzystą, rok obrony) (Lic.) praca licencjacka, (Inż.) Praca inżynierska.
1. Wiktor Zborowski. Molekularne podstawy aktywności kolagenazowej *Streptomyces pratensis*. Molecular basis of collagenolytic activity of *Streptomyces pratensis*. Wydział Nauk Biologicznych Uniwersytet Wrocławski 2021. (Lic.)
 2. Mateusz Wenecki. Wpływ nadekspresji białek aktywatorowych CpkO i CpkN na zespół genów cpk ze *Streptomyces coelicolor* A3(2). Wydział Nauk Biologicznych Uniwersytet Wrocławski 2020. (Lic.)

3. Aleksandra Gosiewska. Charakterystyka oddziaływań białka CpkN z DNA u *Streptomyces coelicolor* A3(2). Politechnika Wrocławska 2017. (Inż.)
4. Katarzyna Litwińska, Konstrukcja wektorów ekspresyjnych białka SCO3932 do utworzenia mutantów *Streptomyces coelicolor*. Politechnika Wrocławska 2013. (Inż.)
5. Paulina Polinceusz, Małe niekodujące cząsteczki RNA w procesach regulacji metabolizmu u *Streptomyces*. Politechnika Wrocławska 2012. (Inż.)
6. Anna Łukawska, Rola Tioesterazy typu II przy produkcji związków poliketydowych Uniwersytet Wrocławski 2006. (Lic.)

Opiekun praktyk studenckich

Ponad 44 osoby z wrocławskich uczelni odbyło pod moim kierunkiem praktyki studenckie w latach 2005-2020.

b) Osiągnięcia organizacyjne

1. Prowadzenie grantów

Po uzyskaniu stopnia doktora I odbyciu stażu podoktorskiego, kierowałem grantami badawczymi:

- a) Grantem KBN nr 3 P04B 004 25 pt.: „Analiza i modulacja aktywności kinetycznej tioesterazy typu II ze *Streptomyces coelicolor* A3(2).”
- b) Grantem MNiSW nr N N302 1384 33 pt.: „Izolacja, poznanie właściwości biologicznych oraz określenie struktury i badanie procesu biosyntezy nowego związku poliketydowego ze *Streptomyces coelicolor* A3(2).”

Granty te dotyczyły tematyki związanej z badaniami syntazy poliketydowej CPK. Były realizowane przez zespół składający się ze mnie, dr Magdaleny Kotowskiej, prof. Andrzeja Gamiana, oraz młodych naukowców zatrudnionych czasowo na etatach techników po uzyskaniu tytułu magistra. W badania zaangażowani byli też studenci realizujący prace magisterskie licencjackie i inżynierskie.

- c) W okresie 20.12.2012 – 19.10.2016 realizowałem w ramach konsorcjum IITD PAN z Politechniką Wrocławską grant NCN Harmonia (nr 2012/04/M/ST5/00340) pt.: „Funkcjonalizowane nanostruktury w nieliniowym obrazowaniu optycznym i dla nanofotoniki.” Kierownikiem projektu był prof. Marek Samoć, ja odpowiadałem za zadania realizowane przez IITD PAN. Główne moje wyzwania organizacyjne i naukowe związane były z koordynacją prac eksperymentalnych z zakresu chemii fizycznej z pracami w dziedzinie biologii prowadzonymi w IITD PAN.

2. Projekt BINWIT - www.binwit.pl

W okresie od 21.09.2016 do 30.05.2018 kierowałem pracami nad przygotowaniem i złożeniem aplikacji o finansowanie projektu wg. mojego pomysłu pt.: „Baza Informacji Naukowych Wspierających Innowacyjne Terapie – BINWIT” z

funduszy Programu Operacyjnego Polska Cyfrowa. Prace obejmowały kierowanie: przygotowaniem założeń bazy, inwentaryzacją kolekcji naukowych IITD PAN przeznaczonych do digitalizacji i udostępnienia, koordynację prac laboratoriów przygotowujących wstępne informacje, przygotowaniem dokumentacji aplikacyjnej (wniosek, studium wykonalności i pozostałe dokumenty), trzykrotnym składaniem aplikacji (10.01.2017, 31.05.17, 15.01.2018). W procesie przygotowania aplikacji uczestniczyło oprócz mnie dziewięcioro pracowników IITD PAN i pięcioro pracowników firm zewnętrznych.

Wniosek uzyskał finansowanie i od 1.08.2018 do 29.10.2021 kierowałem realizacją projektu BINWIT. W projekcie brały udział następujące laboratoria: Samodzielne Lab. Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych, Samodzielne Lab. Bakteriofagowe, Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów i utworzone dla potrzeb projektu Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki. Całkowity koszt projektu wyniósł **18 867 895,65 zł**, w tym koszty inwestycyjne stanowiące głównie zakup aparatury badawczej wynosiły 11 485 998,93 zł. Jako kierownik projektu byłem odpowiedzialny: (i) za zakup aparatury badawczej – nadzorowałem trzy przetargi europejskie, i realizację umów z ośmioma wyłonionymi dostawcami, za zakup odczynników i drobnego wyposażenia – nadzorowałem cztery przetargi europejskie, i realizację 27 umów z dostawcami oraz za przetargi i realizację umów z podwykonawcami. Do moich obowiązków należała również koordynacja współpracy, nadzór i wsparcie prac wykonywanych przez dostawców usług.

W zakresie dokumentacji i raportowania moje obowiązki obejmowały korespondencję z Centrum Projektów Polska Cyfrowa (CPPC), uzgadnianie zmian i przygotowywanie aneksów, raportowanie postępów realizacji projektu do CPPC, raportowanie do Komitetu Rady Ministrów do spraw Cyfryzacji (KRMK).

W projekcie sumarycznie zatrudnionych było 56 osób. W szczytowym okresie nasilenia prac, jednocześnie zatrudnione były 44 osoby. Przeprowadzono szereg szkoleń specjalistycznych z obsługi zakupionych urządzeń badawczych.

Projekt zakończył się sukcesem, wynikiem jego realizacji jest:

- Zinwentaryzowane, opisane i zarchiwizowane zasobów kolekcji bakteriofagów IITD PAN. Dostępne na stronie <https://db.binwit.pl/pl>.
- Zinwentaryzowane, opisane i zarchiwizowane danych dotyczących mezenchymalnych komórek macierzystych pozostających w dyspozycji Sam. Lab. Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych.
- Doposażenie w aparaturę naukową Sam. Lab. Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych oraz Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów.
- Rozwój zespołów badawczych wszystkich laboratoriów biorących udział w projekcie
- Utworzenie nowych jednostek organizacyjnych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu – opisane poniżej pkt. 6 b) 3 i 4.
- Promocja Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu – patrz pkt. 6 b) 5.

Wykład podsumowujący wyniki projektu jest dostępny online pod adresem: <https://binwit.pl/blog/2021/10/26/wyklad-dr-krzysztofa-pawlika-prezentacja-projektu-binwit-iitd-pan/>

3. Organizacja pracowni transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

W ramach projektu BINWIT” zorganizowałem pracownię transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Przeprowadzenie digitalizacji kolekcji bakteriofagów zgromadzonej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej wymagało całkowicie nowego podejścia technologicznego i organizacyjnego do obrazowania bakteriofagów. W projekcie założono digitalizację około 400 bakteriofagów w ciągu 36 miesięcy trwania projektu. Dotychczas IITD PAN dysponował jednym 30 letnim elektronowym mikroskopem transmisyjnym. Zapewnienie digitalizacji bakteriofagów było jednym z krytycznych wyzwań organizacyjnych w ramach projektu, dlatego jako kierownik projektu realizowałem to osobiście. W ramach organizacji pracowni:

- brałem wiodący udział w przygotowaniu koncepcji wyposażenia pracowni i wyborze konfiguracji mikroskopu transmisyjnego,
- uczestniczyłem w procedurze przetargowej i zakupie mikroskopu JEOL JEM F-200, oraz wyposażenia do preparatyki,
- organizowałem i nadzorowałem remont pomieszczeń, w których powstała nowa pracownia składająca się z laboratorium preparatyki mikroskopowej, pomieszczenia mikroskopów i pomieszczenia maszynowni.
- prowadziłem rekrutację specjalistów mikroskopii i preparatyki,
- nadzorowałem remont i relokację mikroskopu elektronowego Jeol 1200 EX.

W ramach realizacji projektu wykonano ponad 3000 zdjęć w okresie 22 miesięcy. Pracownia działa nadal i jest wykorzystywana przez pracowników IITD PAN oraz przez badaczy z wrocławskiego środowiska naukowego.

Pracownia jest wyposażona w Mikroskop JEOL 1200 EX, Mikroskop JEOL JEM F-200 posiadający możliwość obrazowania w trybie CRYO-EM, w konfiguracji: działło z zimną emisją o maksymalnym napięciu przyspieszającym 200 kV, nabiegunnik CR, o największym dostępnym kontraście i niskim współczynniku kontaminacji, dedykowany do zastosowań niskotemperaturowych oraz ogólnego obrazowania biologicznego, detektor EDS JEOL CENTURIO DRY SD30GV, tryb mikroskopii STEM z detektorami BF (bright-field) i HAADF (high-angle annular dark-field), kamera CMOS TVIPS TemCam-XF416 o rozdzielczości 16 MPx i powierzchni 5 x 63.5 mm². Pozostałe wyposażenie to uchwyt wysokopochyłowy do tomografii w temperaturach otoczenia, uchwyt mrożeniowy FISCHIONE 2550 Cryo-Transfer Holder z możliwością tomografii. Ultramikrotom Leica EM UC7 z przystawką mrożeniową FC7, System witrifikacji próbek Leica EM GP2, napyłarka wysokopróżniowa Quorum Technologies K975X, plazma cleaner Targeo-EM i procesor tkankowy EMP 5160.

4. Organizacja Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki

W ramach projektu BINWIT zajmowałem się organizacją Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki. Działania organizacyjne prowadziłem wspólnie z dr hab. Łukaszem Łaczańskim. Digitalizacja bakteriofagów oprócz oznaczenia morfotypu i opisu biologii wymagała również zsekwencjonowania genomów fagowych. W celu realizacji tego zadania powstało opisywane laboratorium. Działania organizacyjne, w których brałem udział obejmowały:

- procedury przetargowe i zakup wyposażenia,
- rekrutację pracowników,
- organizację szkolenia zatrudnionego personelu i opracowanie procedur bioinformatycznych.

Aktualnie po zakończeniu projektu laboratorium rozwija własną działalność badawczą i współpracę z innymi jednostkami naukowymi. Laboratorium jest wyposażone w: sekwenatory II generacji MiSEQ, NextSEQ (Illumina) i sekwenatory III generacji: MinION (ONT) oraz urządzenia do walidacji bibliotek NGS, automatycznej izolacji kwasów nukleinowych, i inne konieczne do prowadzenia analiz NGS.

d) Popularyzacja Nauki

W projekcie BINWIT istotnym składnikiem była promocja i docieranie z informacją o udostępnianych danych naukowych do jak najszerszego grona odbiorców. W projekcie przygotowano: 3 filmy instruktarzowe dotyczące użytkowania bazy, 3 animacje wyjaśniające zasady stosowanych technik badawczych, wywiady z kierownikami zespołów specjalistycznych. Przeprowadzono nagrania dwudziestu wykładów zorganizowanych w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki 2020. Nagrania zostały sformatowane i udostępnione na stronie informacyjnej projektu <https://binwit.pl/dfn-2020/>. Przeprowadzono konferencje otwierającą i zamykającą. Konferencja zamykająca projekt była –transmitowana w mediach społecznościowych jest dostępna pod adresem <https://www.facebook.com/binwit/videos/618489919153687>. Nad całością tych działań sprawowałem nadzór organizacyjno-merytoryczny, jako kierownik projektu.

Osobiście byłem zaangażowany w:

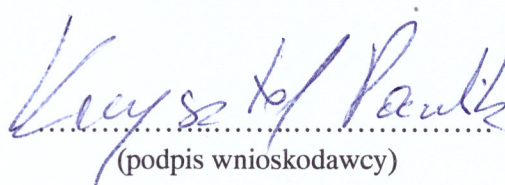
- a) przygotowanie scenariusza do filmu pt.: „Bakteriofagi zamiast ANTYBIOTYKÓW? Nasza broń przeciw superbakteriom!” prezentowanego na kanale Okiem chemika w serwisie YouTube. Do dnia 5.02.2022 film miał 33 314 odtworzeń. Film jest dostępny pod adresem <https://youtu.be/3MyDKqwZoFc>.
- b) w przygotowanie koncepcji, organizację i korektę filmu pt.: „Kogo uzdrowią komórki macierzyste?” prezentowanego na kanale Naukowy Bełkot w serwisie YouTube. Do dnia 5.02.2022 film miał 138 900 odtworzeń. Film jest dostępny pod adresem <https://youtu.be/J1iVMWQW-gM>.

- c) przygotowanie konferencji zamykającej projekt, która odbyła się 7.10.2021 i była transmitowana na żywo w mediach społecznościowych. Wykłady z tej konferencji są dostępne na stronach projektu: <https://binwit.pl/konferencje-binwit/>; <https://binwit.pl/blog/2021/10/26/konferencja-baza-informacji-naukowych-wspierajacych-innowacyjne-terapie-binwit/>.
- d) udzieliłem wywiadu telewizji TVP3 Wrocław. Wywiad odbył się 22.10.2020 i był zatytułowany „BINWIT, czyli rzetelna wiedza o najnowszych naukowych osiągnięciach” wywiad jest dostępny pod adresami

<https://wroclaw.tvp.pl/50449460/binwit-czyli-rzetelna-wiedza-o-najnowszych-naukowych-osiagnieciach> i <https://youtu.be/I00zJ1x2LH4>

Poza tematyką projektu BINWIT razem z dr hab. Łukaszem Łaczmąński w początkowym okresie pandemii COVID-19 przygotowałem film pt.: „Test na koronawirusa” Film jest dostępny pod adresem <https://youtu.be/-NTdd89s-E>.

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


(podpis wnioskodawcy)