

Dr Ewa Brzozowska

Załącznik 2

Autoreferat przedstawiający opis osiągnięć w języku polskim

AUTOREFERAT

Dr Ewa Brzozowska

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

Wrocław 30.07.2018

1. Imię i nazwisko: **Ewa Brzozowska**
2. Dane kontaktowe: Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda
Polska Akademia Nauk
ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, Polska
tel: 71 337-11-72 wew. 389, 397
e-mail: ezuziak@iitd.pan.wroc.pl
3. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

16.04.2009 - Doktor nauk biologicznych, nadany przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, tytuł rozprawy: „Badania obecności przeciwciał przeciwfagowych w surowicy ludzkiej”, promotor w przewodzie doktorskim prof. dr hab. Andrzej Gamian.

21.06.2002 – Magister biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, tytuł pracy dyplomowej: „Nowe roślinne inhibitory proteinaz serynowych. Izolacja inhibitora trypsyny z bulw czosnku”, promotor dr Irena Lorenc-Kubis.

Wykształcenie uzupełniające, najważniejsze pozycje:

12.05.2012 Dyplom studiów podyplomowych „Zarządzanie projektem badawczym i komercjalizacja wyników badań”, uzyskany na Politechnice Wrocławskiej

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

19.04.2009 – obecnie

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda, PAN we Wrocławiu, stanowisko adiunkt

02.02.2009-18.04.2009

Wrocławskie Centrum Badań EIT+ Sp. z o.o., stanowisko adiunkt

01.10.2010-31.01.2014

Wrocławskie Centrum Badań EIT+ – Broker Technologii i Własności Intelektualnej

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 4, objęty tytułem:

Wykorzystanie białek ogonka bakteriofagów w detekcji bakteryjnych skażeń środowiskowych oraz w zwalczaniu biofilmu bakterii patogennych.

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład cyklu monotematycznego = 33,219

Sumaryczna wartość punktów MNiSW publikacji cyklu monotematycznego = 320

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy), * - oznacza autora korespondencyjnego.

1. **E. Brzozowska***, M. Śmietana*, M. Koba, S. Górską, K. Pawlik, A. Gamian, W. J. Bock, 2015, "Recognition of bacterial lipopolysaccharide using bacteriophage-adhesin-coated long-period gratings," Biosensors and Bioelectronics, vol. 67, 93-99, DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.027, IF₂₀₁₅: **7,476**, MNiSW: **40**, Lc: **35**

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 70%: jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem manuskryptu. Eksperymenty dotyczące części biologicznej (izolacja i oczyszczanie lipopolisacharydów (LPS) oraz białek fagowych, analiza dichroizmu kołowego (CD) białka, Western blot, biotynylacja LPS, testy oddziaływań LPS-białko tj. ELISA i Powierzchniowy Rezonans Plazmonowy (SPR) z użyciem systemu BIAcore, biofunkcjonalizacja czujnika światłowodowego) zostały przeze mnie zaplanowane oraz wykonane. Dokonałam także analizy i interpretacji uzyskanych wyników eksperymentalnych. Jestem autorką rysunków 2, 3 i 4, a także napisałam wstępną wersję manuskryptu z pominięciem części eksperymentalnej dotyczącej pomiarów z wykorzystaniem czujników światłowodowych. Brałam udział w ostatecznej edycji manuskryptu łącznie z przygotowaniem odpowiedzi dla recenzentów. Ponadto zapewniłam finansowanie części badań ujętych w publikacji, jak i finansowanie wydania publikacji w ramach grantu, którego byłam kierownikiem.

2. **E. Brzozowska***, M. Koba*, M. Śmietana, S. Górską, M. Janik, A. Gamian, W. J. Bock, "Label-free Gram-negative bacteria detection using bacteriophage-adhesin-coated long-period gratings" Biomedical Optics Express, vol. 7, no. 3, 829-840, 2016. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.000829>, IF₂₀₁₆: **3,337**, MSiNW: **35**, Lc: **9**

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 75%: jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem manuskryptu. Eksperymenty dotyczące części biologicznej (izolacja i oczyszczanie białek fagowych, przygotowanie preparatów bakteryjnych, testy oddziaływań białka fagowego z bakteriami tj. ELISA i Powierzchniowy Rezonans Plazmonowy (SPR) z użyciem systemu BIAcore, biofunkcjonalizacja czujnika światłowodowego) zostały przeze mnie zaplanowane oraz wykonane. Brałam udział w części eksperymentalnej, dotyczącej użycia czujnika światłowodowego do detekcji komórek bakteryjnych. Dokonałam także analizy i interpretacji uzyskanych wyników eksperymentalnych. Napisałam wstępną wersję manuskryptu (pomijając część dotyczącą wytworzenia struktur czujnika LPG) łącznie z przygotowaniem tabeli i rysunków 1, 2, 3. Brałam udział w ostatecznej edycji manuskryptu wraz z przygotowaniem odpowiedzi dla recenzentów. Ponadto zapewniłam finansowanie części badań ujętych w publikacji, jak i finansowanie wydania publikacji w ramach grantu, którego byłam kierownikiem.

3. **E. Brzozowska***, A. Leśniewski*, S. Sęk, R. Wieneke, R. Tampé, S. Górską, M. Jönsson-Niedziółka and J. Niedziółka-Jönsson*, Interactions of bacteriophage T4 adhesin with selected lipopolysaccharides studied using atomic force microscopy, Scientific Reports

8, Article number: 10935 2018, DOI: 10.1038/s41598-018-29383-w brak IF za 2018,
IF₂₀₁₇: 4,122, MNiSW: 40, Lc: 0

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 45%: jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem manuskryptu. Eksperymenty dotyczące części biologicznej (izolacja i oczyszczanie białek fagowych, LPS, testy oddziaływań białka fagowego z LPS tj. Powierzchniowy Rezonans Plazmonowy (SPR) z użyciem systemu Octet RED96 system (Pall ForteBio, 154 Fremont, CA, USA)) zostały przeze mnie zaplanowane oraz wykonane. Dokonałam także analizy i interpretacji uzyskanych wyników eksperymentalnych. Jestem pomysłodawcą publikacji, napisałam wstępną wersję manuskryptu (pomijając część dotyczącą pomiarów AFM). Przygotowałam rysunek nr 1. Brałam udział w ostatecznej edycji manuskryptu łącznie z przygotowaniem odpowiedzi dla recenzentów. Ponadto zapewniłam finansowanie części badań ujętych w publikacji w ramach grantu, którego byłam kierownikiem. Zapewniłam finansowanie wydania publikacji w ramach konkursów Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018.

4. E. Brzozowska*, A. Pyra*, K. Pawlik, M. Janik, S. Górka, N. Urbańska, Z. Drulis-Kawa, A. Gamian. Hydrolytic activity determination of Tail Tubular Protein A of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages towards saccharide substrates, Scientific Reports 7, Article number: 18048 2017, doi:10.1038/s41598-017-18096-1, IF₂₀₁₇: 4,122, MNiSW: 40, Lc: 0

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 45%: jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem manuskryptu. Brałam udział w planowaniu oraz koordynowaniu prac eksperymentalnych dotyczących testów aktywności hydrolitycznej. Dokonałam analizy i interpretacji uzyskanych wyników. Napisałam wstępną wersję manuskryptu, a następnie brałam udział w przygotowaniu ostatecznej wersji do druku. Jestem autorką rysunków oraz rycin zamieszczonych w publikacji. Zapewniłam finansowanie wydania publikacji w ramach konkursów Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018.

5. E. Brzozowska*, J. Bazan, A. Gamian, The functions of bacteriophage proteins, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Advances in Hygiene and Experimental Medicine); 65:167-76, 2011, IF₂₀₁₁: 0,654, MNiSW: 15, Lc: 4

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 90%: jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem manuskryptu, pomysłodawcą treści i organizacji publikacji. Zebrałam dostępne w literaturze informacje źródłowe i je usystematyzowałam. Publikacja została napisana przeze mnie w całości, a także przygotowana do druku. Jestem pomysłodawcą szaty graficznej manuskryptu.

6. A. Pyra*, E. Brzozowska*, K. Pawlik, A. Gamian, M. Dauter & Z. Dauter, Tail tubular protein A: a dual-function tail protein of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage KP32, Scientific Reports 7, Article number: 2223, 2017, doi:10.1038/s41598-017-02451-3, IF₂₀₁₇: 4,122, MNiSW: 40, Lc: 2

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: jestem drugim autorem korespondencyjnym w publikacji. Brałam udział w uzyskaniu białek rekombinowanych od utworzenia konstruktorów genetycznych poprzez ekspresję i oczyszczanie. Uzyskałam

egzopolisacharydy bakteryjne. Dokonałam analizy aktywności biologicznej białka fagowego wobec szczepów K. pneumoniae, a mianowicie metody obserwacji tysinek na murawie bakteryjnej hodowanej na płytkach agarowych oraz badań mikroskopowych. Zaplanowałam i przeprowadziłam testy aktywności białka fagowego wobec oczyszczonego egzopolisacharydu bakteryjnego (zymogram oraz analiza poziomu cukrów redukujących w preparatach). Dokonałam analizy porównawczej białka fagowego przy użyciu dostępnych narzędzi bioinformatycznych. Dokonałam analizy i interpretacji części uzyskanych wyników eksperymentalnych. Brałam udział w przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji jak i w odpowiedziach na zarzuty recenzentów. Jestem autorką rysunków 1, 2, 3 i 6. Ponadto zapewniłam finansowanie wydania publikacji w ramach grantu, którego byłam kierownikiem, a także zdobyłam finansowanie w ramach konkursów Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018.

7. M. Śmietana, M. Koba, **E. Brzozowska**, K. Krogulski, J. Nakonieczny, L. Wachnicki, P. Mikulic, M. Godlewski, W. J. Bock, "Label-free sensitivity of long-period gratings enhanced by atomic layer deposited TiO₂ nano-overlays" Optics Express, vol. 23, no. 7, 8441-8453, 2015, <https://doi.org/10.1364/OE.23.008441>, IF₂₀₁₅: **3,148**, MNiSW: **40**, Lc: **36**

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: *jestem pomysłodawcą oraz wykonawcą części eksperymentalnej dotyczącej biofunkcjonalizacji powierzchni czujnika pokrytego warstwą TiO₂. Brałam udział w części eksperymentalnej, dotyczącej użycia czujnika światłowodowego w detekcji endotoksyny bakteryjnej, a także w badaniach z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego. Oczyszczałam białko fagowe oraz lipoopolisacharyd bakteryjny. Na podstawie badań eksperymentalnych zoptymalizowałam metodę chemicznej funkcjonalizacji powierzchni czujnika z osadzoną warstwą TiO₂. Dokonałam także analizy i interpretacji uzyskanych wyników eksperymentalnych. Brałam udział w ostatecznej edycji manuskryptu. Ponadto zapewniłam finansowanie części badań ujętych w publikacji ramach grantu, którego byłam kierownikiem.*

8. M. Koba*, M. Śmietana, **E. Brzozowska**, S. Górka, P. Mikulic, W. J. Bock, 2015, "Reusable Bacteriophage Adhesin-coated Long-period Grating Sensor for Bacterial Lipopolysaccharide Recognition," Journal of Lightwave Technology, vol. 33, no. 12, 2518-2523, IF₂₀₁₅: **2,567**, MNiSW: **35**, Lc: **7**

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 40%: *jestem pomysłodawcą badań opisanych w publikacji. Brałam udział w uzyskaniu oczyszczonego białka fagowego oraz przygotowałam komórki bakteryjne do doświadczeń. Wykonałam biofunkcjonalizację powierzchni czujnika oraz brałam udział w części eksperymentalnej, dotyczącej użycia czujnika światłowodowego w detekcji bakterii. Brałam udział w ostatecznej edycji manuskryptu. Ponadto zapewniłam finansowanie części badań ujętych w publikacji ramach grantu, którego byłam kierownikiem.*

9. M. Koba*, M. Śmietana, **E. Brzozowska**, S. Górka, M. Janik, P. Mikulic, A. Cusano, W. J. Bock, "Bacteriophage Adhesin-Coated Long-Period Grating-Based Sensor: Bacteria Detection Specificity," Journal of Lightwave Technology, vol. 34, no. 20, 2016, IF₂₀₁₆: **3,671**, MNiSW: **35**, Lc: **9**

Indywidualny wkład w powstanie tej pracy szacuję na 35%: jestem pomysłodawcą badań opisanych w publikacji. Brałam udział w uzyskaniu oczyszczonego białka fagowego oraz przygotowałam komórki bakteryjne do doświadczeń. Zaplanowałam badania adhezji białka fagowego do komórek bakteryjnych z wykorzystaniem testu ELISA. Wykonałam biofunkcjonalizację powierzchni czujnika oraz brałam udział w części eksperymentalnej dotyczącej użycia czujnika światłowodowego w detekcji bakterii. Dokonałam analizy i interpretacji uzyskanych wyników eksperymentalnych. Jestem autorką rysunku nr 6, a także brałam udział w ostatecznej edycji manuskryptu. Ponadto zapewniłam finansowanie części badań ujętych w publikacji ramach grantu, którego byłam kierownikiem.

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

Prace stanowiące cykl publikacji, dotyczą możliwości praktycznego wykorzystania białek bakteriofagowych, głównie białek ogonka, do detekcji skażeń środowiskowych, a także jako czynników zwalczających biofilm bakteryjny. Cele naukowe powstałych prac można podzielić na dwa główne; a mianowicie: **1. Uzyskanie wysoce selektywnego czujnika światłowodowego, bez znacznikowego do wykrywania bakteryjnych endotoksyn oraz całych bakterii w środowisku wodnym** (publ. 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 pkt 4.b, zał. 3. pkt I.B, poz. 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 oraz zał. 4, poz. 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9), **2. Określenie specyficzności substratowej białek bakteriofagowych o podwójnej funkcji, uznawanych do tej pory za białka strukturalne, które wykazują aktywność hydrolaz (poli)sacharydów.** W obliczu odkrycia funkcji enzymatycznej fagowych białek tubularnych, celem było także określenie ich aktywności wobec polisacharydów bakterii patogennych tworzących biofilm (publ. 4 i 6 pkt 4b, zał.3 pkt I.B, poz. 4 i 6 oraz zał. 4. Poz. 4 i 6).

Wprowadzenie

Bakteryjne wirusy, zwane bakteriofagami (fagami), stanowią najliczniejszą i jednocześnie najbardziej zróżnicowaną grupę wirusów¹. Po raz pierwszy fagi zostały odkryte na początku dwudziestego stulecia przez Ernesta Hankina, który zauważył, że wody z rzek Ganges i Jumna mają właściwości przeciwbakteryjne². Z kolei, za twórcę nauki o bakteriofagach uważa się d'Hërelle'a, który stworzył pojęcie Bacteriophagum intestinale – drobnoustroju żyjącego kosztem bakterii jelitowych. d'Hërelle badał bakteriofagi wszechstronnie. Zajmował się procesem lizy i jej warunkami, własnościami antygenowymi fagów, szczepami bakteryjnymi opornymi na fagi itd. On stworzył teorię korpuskularnej i ożywionej natury fagów. Bliższe poznanie tych wirusów pozwoliło na ich zastosowanie w medycynie, w terapii takich schorzeń jak czerwonka bakteryjna, dur brzuszny, infekcje ropne wywołane przez gronkowce i paciorkowce³. Wraz z rozwojem techniki mikroskopii elektronowej więcej uwagi poświęcono badaniom morfologii i ultrastruktury fagów. Fagi mogą być sześcienne, nitkowate i ogonkowe. Ogólnie, zbudowane są z białkowej otoczki zwanej kapsydem, wewnątrz której znajduje się kwas nukleinowy w postaci jednoniciowego DNA – ssDNA, bądź dwuniciowego DNA – dsDNA,

¹H. W. Ackermann; 5500 Phages examined in electron microscope. Brief Review; Arch. Virol. 152, 2007; 227-243

²E. Kutter, Phage Therapy: Bacteriophages as natural, self-limiting antibiotics, Pharm. Nat. Med. 2005; 1147-1161

³M. Kańtoch; Wybrane zagadnienia z nauki o bakteriofagach; Postępy Hig. Med. Dośw. 10; 1956; 47-86,

a także jednoniciowego RNA- ssRNA i dwuniciowego RNA - dsRNA⁴. Obecnie International Committee for Taxonomy of Viruses uznaje istnienie 18 rodzin fagów, spośród których 96% stanowią fagi ogonkowe (Caudovirales), a pozostałe to fagi wielościenne, filamentowe (nitkowate) i pleomorficzne (wielopostaciowe). Klasyfikacja fagów opiera się na podstawie ich morfologii i rodzaju kwasu nukleinowego, ale może uwzględniać także ich specyficzność, pokrewieństwo filogenetyczne, czy wrażliwości na czynniki fizyczne i chemiczne⁵.

Bakteriofagi zostały wykryte wszędzie tam, gdzie obecne są bakterie. Na jedną komórkę bakteryjną przypada nawet kilka cząstek fagowych. Licznie występują one zarówno w wodach słodkich jak i oceanach, w glebie, a także w organizmach ludzi i zwierząt^{6,7}. Fagi namnażają się wyłącznie w żywych bakteriach, które posiadają specjalne receptory na swojej powierzchni. W rozpoznaniu komórki gospodarza biorą udział białka adhezyjne, które wiążą się z komórką bakteryjną jako pierwsze i inicjują cały proces infekcji. Następnie, kolejne białka fagowe dołączają do procesu adsorpcji, czyniąc ją nieodwracalną. W przypadku fagów ogonkowych białka adhezyjne znajdują się na włóknienkach ogonkowych i kotwiczą faga na powierzchni bakterii w taki sposób, by zaszedł proces przekazania materiału genetycznego⁸. Od momentu adsorpcji bakteriofaga do komórki bakteryjnej rozpoczyna się okres latencji, który trwa aż do lizy komórki⁹. Bakteriofagi zakażając bakterie, wywołują w nich różne zmiany w funkcjonowaniu. Można wyróżnić kilka cykli: cykl lityczny, lizogenny, pseudolizogenny, oraz cykl przewlekłej infekcji¹⁰. W przypadku cyklu litycznego bakteriofagi przekształcają metabolizm bakterii w taki sposób, że zaczyna ona produkować nowe cząstki fagowe. Wraz z lizą komórki gospodarza wydostają się one na zewnątrz. Cykl lizogenny polega na zespoleniu genomu fagowego z genomem gospodarza i tym samym fag (konkretnie, jego materiał genetyczny) zostaje wprowadzony w stan uśpienia. Forma taka określana jest mianem profaga, a fagi inicjujące proces lizogenii określa się mianem fagów łagodnych, umiarkowanych, utemperowanych (temperate phages)¹¹. Infekcja przewlekła charakteryzuje się tym, że potomne cząstki fagowe są produkowane przez zainfekowane komórki bakteryjne w równych odstępach czasowych i wydzielane do środowiska w pęcherzykach. Podczas tego procesu nie zachodzi liza komórki bakteryjnej. Wyróżniono także stan zakażenia trwałego (ang. persistent infection) określanego także, jako stan pseudolizogenny¹⁰.

Wśród bakteriofagów są takie, które zakażają ściśle określony szczep bakterii, jak i takie, które wykazują specyficzność wobec kilku szczepów bakteryjnych. Bakteriofagi zdolne do

⁴H. W. Ackermann, Bacteriophage observations and evolution; Res. Microbiol. 154; 2003; 245-251,

⁵H. W. Ackermann, D. Prangishvili, Prokaryote viruses studied by electron microscopy. Arch Virol. 157, 2012:1843-9.

⁶J. Demuth, H. Neve, K. P. Witzel, Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage population in Lake Plußsee, Appl. Env. Microbiol. 59; 1993; 3378-3384,

⁷A. Górski, B. Weber-Dąbrowska; The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens; Cell. Molec. Life Scien. 62; 2005; 511-519,

⁸S. P. Boudko, S. V. Strelkov, J. Engel, J. Stetefeld; Design and crystal structure of bacteriophage T4 mini – fibrin NCCF; J. Molec. Biol. 339; 2004; 927-935,

⁹M. H. Adams; Bacteriophages; Interscience publishers, INC; New York 1959,

¹⁰M. Weinbauer; Ecology of prokaryotic viruses; FEMS Microbiol. Rev. 28; 2004; 127-181

¹¹L. Letter, P. Boulanger, M. De Frutos, P. Jacquot; Channeling phage DNA through membranes: from in vivo to in vitro; Res. Microbiol. 154; 2003; 283-287

zakażenia tylko jednego szczepu bakteryjnego nazywane są monowalentnymi, natomiast te, które zakażają kilka różnych szczepów bakteryjnych, określa się jako poliwalentne¹².

Fagi dzięki swojej specyficzności względem bakterii były od dawna wykorzystywane do diagnostyki infekcji bakteryjnych oraz lizotypii^{13,14}. Za specyficzność fagową odpowiadają wspomniane powyżej białka adhezyjne (adhezyny). Znajdują się one na ogonkach i/lub włóknienkach i uczestniczą w procesie rozpoznania i wiązania się cząstek fagowych z bakteriami. Białka adhezyjne (adhezyny) bakteriofagów można uznać za białka markerowe, które z powodzeniem można wykorzystać do diagnostyki skażeń bakteryjnych. Użycie białek do konstrukcji biosensorów jest korzystniejsze niż użycie całych cząstek fagowych ze względu na lepszą stabilność, czystość, a także możliwość wprowadzania kontrolowanych zmian w białku (np. ekspresja ze znacznikami) w celu ich immobilizacji do nośnika w ściśle określonej orientacji. **Wybrane prace oryginalne będące przedmiotem niniejszej rozprawy habilitacyjnej, dotyczą zagadnień związanych z wykorzystaniem adhezyny gp37 faga T4 do konstrukcji wysoce czułego biosensora światłowodowego, wykrywającego skażenia bakteryjne, a także do wykrywania obecności endotoksyny bakteryjnej w środowisku wodnym. Ponadto w pracach opisano po raz pierwszy badania nad specyficznością adhezyny gp37 względem różnych LPS-ów bakteryjnych w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae*.**

W swoich badaniach poszukiwałam białek adhezyjnych należących do ogonka bakteriofagów *Klebsiella pneumoniae*. Badania te doprowadziły mnie do odkrycia, iż białka należące do rodziny białek tubularnych (Tail tubular proteins) oprócz funkcji adhezyjnej, posiadają także aktywność enzymatyczną wobec powierzchniowych polisacharydów bakteryjnych. **W wybranych pracach oryginalnych będących przedmiotem niniejszej rozprawy habilitacyjnej opisana została nowo odkryta aktywność enzymatyczna białek ogonka bakteriofagów KP. Wspomniane białka okazały się być enzymami hydrolizującymi substraty (poli)cukrowe i wykazującymi aktywność przeciwko tworzeniu się biofilmu bakteryjnego.** Białkom tubularnym dotychczas przypisywano jedynie funkcję strukturalną/budulcową. Wiedza ta została zweryfikowana. Białka tubularne mogą być także enzymami. Określane są obecnie jako białka o podwójnej funkcji: dual-function phage proteins. Funkcja białek ogonków bakteriofagów nieustannie jest poznawana. Najnowsze badania wskazują, że wiele białek uznawanych za strukturalne posiada jednocześnie funkcje enzymatyczne wobec substratów pochodzenia bakteryjnego. W obrębie tych białek istnieje ogromna różnorodność nie tylko substratowa ale i różnorodność zarówno pod względem ich masy cząsteczkowej, jak i domen katalitycznych¹⁵.

Adhezyna gp37 faga T4 jako cząsteczka biosensorowa do konstrukcji czujnika światłowodowego skażeń bakteryjnych

¹²M. Kańtoch; Wybrane zagadnienia z nauki o bakteriofagach; Post.Hig.Med.Dośw. 10; 1956; 47-86

¹³A. Przondo-Hessek; Podstawy lizotypii pałeczek *Klebsiella*, 1. Rola struktur powierzchniowych pałeczek *Klebsiella* w wiązaniu bakteriofagów; Post. Hig. Med. Dośw.39; 264-310, (1985)

¹⁴A. Przondo-Hessek; Podstawy lizotypii pałeczek *Klebsiella*. II. Lizotypia w epidemiologii zakażeń pałeczkami *Klebsiella*; Post.Hig. Med. Dośw.39; 407-439, (1985)

¹⁵D. P. Pires, H. Oliveira, L. D. R. Melo, S. Sillankorova, J. Azeredo; Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications; Appl. Microbiol Biotechnol 100, 2141-2151 (2016)

Fag T4 rozpoznaje i wiąże O-swoisty region LPS bakterii *E. coli* B, a także rozpoznaje białka błony zewnętrznej OmpC¹⁶. Za to rozpoznanie i wiązanie odpowiada białko adhezyjne gp37. Gp37 jest jednym z czterech białek wchodzących w skład długich włókien ogonkowych bakteriofaga T4 i jest umiejscowione na końcu części dystalnej włókna¹⁷. Adhezyna gp37 jest trimerym o długości nieco ponad 20 nm, w którym można wyróżnić domenę stanowiącą kołnierz (szerokość ok. 0,45 nm) wydłużoną domenę igły (szerokość ok. 0,15 nm) i domenę głowy o szerokości ok. 0,25 nm. Domena tworząca głowę jest najbardziej dystalnym fragmentem białka gp37 i to ona bierze udział w rozpoznaniu i wiązaniu się z bakterią¹⁸. Uzyskanie rekombinowanej formy białka gp37 wymaga obecności dwóch białek pomocniczych (białka gp57 i gp38), dzięki którym adhezyna jest prawidłowo pofałdowana i co gwarantuje jej późniejszą stabilność¹⁷. Badania wykazały, że gp37 wiąże się niezwykle specyficznie i z dużym powinowactwem do LPS bakterii *E. coli* B. Stała dysocjacji (KD) uzyskana dla wiązania gp37 z LPS *E. coli* B jest rzędu 10^{-7} M, co stanowi stałą dla wiązania się enzymu z substratem. Dzięki badaniom z użyciem mikroskopii sił atomowych ustalono z kolei siłę, jaka jest potrzebna do rozerwania tego kompleksu i jest to 70 ± 29 pN (**Publikacje 1, 3** wykazane w pkt b, zał. 3 pkt I.B poz. 1, 3 oraz zał. 4 publ. 1 i 3).

Według postulatu Prehm'a oraz Washizaki'ego oddziaływanie między adhezyną gp37 a LPS zajdzie pod warunkiem, że posiada on w swojej strukturze przynajmniej jedną końcową glukozę bez rozgałęzień^{19,20}. W wyniku przeprowadzonych badań powyższy postulat nie został potwierdzony, choćby w przypadku braku wiązania do LPS *Hafnia alvei* PCM 1189 (który posiada resztę glukozy nierozgałęzionej w łańcuchu O-specyficznym) przez gp37 (**Publikacje 1, 2, 3** wykazane w pkt b, zał. 3 pkt I.B, poz. 1, 2, 3 oraz zał. 4 poz. 1, 2, 3). Sugeruje to, że muszą być spełnione dodatkowe warunki determinujące zajście tego oddziaływania.

Adhezyna gp37 bakteriofaga T4 stanowi model, który posłużył do opracowania metody biofunkcjonalizacji powierzchni światłowodów z siatkami długookresowymi - LPFG (Long-Period Fiber Grating) (**Publikacje 1, 2, 7, 8, 9** wykazane w pkt. B, zał. 3, pkt I.B, poz. 3 oraz zał. 4 poz. 1, 2, 7, 8, 9). Ze względu na obecność znacznika histydynowego (6H) na N-końcu białka możliwa jest jego immobilizacja poprzez tworzenie kompleksów z jonami niklu. Ten rodzaj immobilizacji sprawia, iż adhezyna jest przyłączona do powierzchni czujnika w ściśle określony sposób, eksponując swoją część dystalną (odpowiadającą za rozpoznanie i wiązanie bakterii) do rozpuszczalnika. Metoda tworzenia kompleksów niklowych ze znacznikiem histydynowym w białku jest powszechnie znana, jednakże w przypadku funkcjonalizacji powierzchni światłowodowych została w przytoczonych publikacjach opisana po raz pierwszy. Została ona tak dopracowana, by z jednej strony nie zniszczyć delikatnej powierzchni światłowodu,

¹⁶D. Montag, S. Hashemolhosseini, U. Henning. Receptor-recognizing Proteins of T-even Type Bacteriophages The Receptor-recognizing Area of Proteins 37 of Phages T4 Tula and Tulb, J. Mol. Biol. 216, 327-334. (1990).

¹⁷M. E. Cerritelli, J. S. Wall, M. N. Simon, J. F. Conway, and A. C. Steven, Stoichiometry and domainal organization of the long tail-fiber of bacteriophage T4: a hinged viral adhesin., J. Mol. Biol., vol. 260, pp. 767-780, 1996

¹⁸S. G. Bartual, J. M. Otero, C. Garcia-Doval, A. L. Llamas-Saiz, R. Kahn, G. C. Fox, and M. J. van Raaij, "Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip.," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 107, pp. 20287-20292, 2010

¹⁹P. Prehm, B. Jann, K. Jann, G. Schmidt, S. Stirm, Bacteriophage-T3 and bacteriophage-T4 receptor region within cell wall lipopolysaccharide of Escherichia coli-B. J Mol Biol. 101;277-81 (1976).

²⁰A. Washizaki, T. Yonesaki, Y. Otsuka, Characterization of the interactions between Escherichia coli receptors, LPS and OmpC, and bacteriophage T4 long tail fibers Microbiol., 5;1003-1015, (2016)

a z drugiej, by możliwe było uzyskanie trwałej modyfikacji chemicznej. Ponadto metoda biofunkcjonalizacji powierzchni LPFG pozwala na wielokrotne użycie czujnika, co jest bardzo dużą jego zaletą (**Publikacja 8** wykazana w pkt b, zał. 3 pkt I.B, poz. 8 oraz zał. 4 poz. 8). Uzyskany czujnik zawierający adhezynę gp37 jako cząsteczkę biosensorową można wykorzystać do detekcji niektórych bakterii Gram ujemnych, w tym także groźnych patogenów (**Publikacje 2, 9**, wykazane w pkt. B, zał. 3 pkt I.B, poz. 2, 9 oraz zał. 4 poz. 2, 9).

Białka fagowe o podwójnej funkcji - wykorzystanie w zwalczaniu biofilmu bakteryjnego

Poszukiwania białek adhezyjnych w obrębie bakteriofagów *K. pneumoniae* doprowadziły do spostrzeżenia, iż białka tubularne, uznawane powszechnie za białka budulcowe/strukturalne (tworzące ogonek), posiadają aktywność enzymatyczną (**Publikacje 4, 6** wykazane w pkt b, zał. 3, pkt I.B, poz. 4, 6 oraz zał. 4 poz. 4, 6). Jest to istotne odkrycie, świadczące o ogromnej zmienności bakteriofagów i ich możliwości przystosowawczych do otaczającego środowiska (gospodarzy).

Ogólnie wiadomo, iż do skutecznej infekcji bakterii fagi potrzebują enzymów depolimeryzujących polisacharydy wchodzące w skład otoczek, LPS, czy peptydoglikanu, a także do niszczenia polisacharydów wydzielanych na zewnątrz przez bakterie. Polisacharydy te tworzą gęsty śluz i wchodzi w skład biofilmu bakteryjnego. Do tej pory opisano szereg fagowych depolimeraz polisacharydów, które różnią się zarówno pod względem masy cząsteczkowej, specyficzności substratowej, wymaganiami pH czy temperatury. Można je podzielić na hydrolazy (polisaharazy) (EC 3.2.1.X) oraz liazy polisacharydów (EC 4.2.2.X)²¹. Hydrolazy (najczęściej endoglukozydazy, endogalaktozydazy lub endoramnozydazy) rozszczepiają wiązanie glikozydowe, podczas gdy liazy trawią wiązanie między monosacharydem przy czwartym atomie węgla (C4) kwasu uronowego, z jednoczesnym wprowadzeniem podwójnego wiązaniem między czwartym a piątym atomem węgla tego kwasu (mechanizm β -eliminacji)¹⁹. **Szczególnie ważną funkcją, z punktu widzenia terapii zakażeń patogennych mikroorganizmów, jest zdolność depolimeraz polisacharydów do degradacji egzopolisacharydów wchodzących w skład biofilmu.**

Tail tubular protein A (TTPA) to grupa białek, posiadająca nowoodkryte funkcje enzymatyczne. TTPAgp31 z faga KP32 i TTPAgp44 z faga KP34 są białkami o zbliżonej masie cząsteczkowej (ok. 21 kDa), wykazują jednak niewielki stopień homologii struktury pierwszorzędowej (ok. 21%) i posiadają odmienną specyficzność substratową. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż TTPAgp31 jest α -1,4-glukozydazą, podczas gdy TTPAgp44 wykazuje aktywność trehalozydazy. W opisanej strukturze krystalicznej TTPAgp31 stwierdzono obecność domeny lektynowej, wiążącej substraty cukrowe, a także wyznaczono potencjalne reszty katalityczne. Oba białka w znacznym stopniu redukują powstawanie biofilmu bakteryjnego, odpowiednio TTPAgp31 wobec szczepu *S. aureus* i *E. faecalis*, a TTPAgp44 wobec *E. faecium*, *P. aeruginosa* i *B. subtilis* (**Publikacje 4, 6** wykazane w pkt b, zał. 3, pkt I.B, poz. 4, 6 oraz zał. 4 poz. 4, 6). Większość z wymienionych szczepów jest patogenna,

²¹I. W. Sutherland, Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. Carbohydr. Polym., 38: 319-328, (1999)

a dzięki biofilmowi stają się one odporne na stosowane leczenie antybiotykami. Białka TTPA dzięki swojej aktywności enzymatycznej są interesujące pod kątem ich potencjalnego zastosowania w zwalczaniu oporności na antybiotyki, wywołanej przez utworzenie bariery fizycznej, jaką jest biofilm bakteryjny.

Podsumowanie wyników opisanych w wybranych do oceny publikacjach

1. **E. Brzozowska***, M. Śmietana*, M. Koba, S. Górską, K. Pawlik, A. Gamian, W. J. Bock, 2015, "Recognition of bacterial lipopolysaccharide using bacteriophage-adhesin-coated long-period gratings," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 67, 93-99, DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.027, IF₂₀₁₅: 7,476, MNiSW: 40, Lc: 35

Przedstawiona publikacja jest pierwszym doniesieniem dotyczącym zastosowania adhezyny bakteriofaga do konstrukcji biosensora światłowodowego LPFG. Obecnie, wiele uwagi poświęca się konstruowaniu bez znacznikowych biosensorów do detekcji skażeń bakteryjnych. Głównym celem jest szybkie wykrywanie (w czasie rzeczywistym) danego rodzaju bakterii, bez konieczności stosowania koniugatów enzymatycznych czy fluorochromów. Światłowodowe sensory LPFG są niezwykle atrakcyjnym rozwiązaniem, ponieważ posiadają wiele zalet: czułość, odporność na zakłócenia elektromagnetyczne, małe rozmiary oraz niską wagę, możliwość pracy w ekstremalnych warunkach, a także, jak wspomniano wyżej, możliwość detekcji w czasie rzeczywistym. W tego typu biosensorach istotna jest interakcja pola zanikającego modu prowadzonego, czyli pola elektromagnetycznego obejmującego zarówno wnętrze światłowodu, jak i niewielki obszar wokół niego, z otaczającym środowiskiem. Parametrem, który jest mierzony to współczynnik załamania środowiska – RI (Refractive Index). Biofunkcjonalizacja powierzchni czujnika polega na silanizacji z użyciem 3-glicydyloksypropyltrymetoksyilanu w celu wyeksponowania grup epoksydowych, a następnie ich reakcji z grupą aminową kwasu N-(-5-amino-1-karboksypentylo) iminodwuoctowego. Kolejnym etapem jest przyłączenie jonów niklu, które tworzą kompleks z histydynami znacznika 6H pochodzącego z białka gp37. Białko fagowe jest immobilizowane do powierzchni czujnika, eksponując do środowiska domenę wiążącą bakteryjny receptor. Tak przygotowany czujnik w sposób jednoznaczny wykrywa oddziaływanie między białkiem, a LPS kontroli pozytywnej, w odróżnieniu do LPS kontroli negatywnej.

W publikacji opisano badania oddziaływań między adhezyną gp37 faga T4, a różnymi LPS-ami bakteryjnymi. Badania miały na celu sprawdzenie, z jakimi LPS-ami, innymi niż LPS *E. coli* B, oddziałuje gp37. Wykorzystano metody biochemiczne takie jak Western blot i ELISA, ale także powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR) w systemie BIAcore. Okazało się, że adhezyna oddziałuje wysoce selektywne jedynie z LPS *E. coli* B. Nie oddziałuje natomiast z LPS *E. coli* O56 PCM 2372 czy LPS *Hafnia alvei* PCM 1189. Badania z wykorzystaniem biosensora LPFG także to potwierdziły.

Po raz pierwszy użyto fagowej adhezyny do detekcji endotoksyny bakteryjnej w biosensorze światłowodowym z siatkami LPFG. Białko jest stabilniejsze niż cała cząstka fagowa, a jego immobilizacja do powierzchni czujnika nie jest przypadkowa (przez losowo wybrane reszty aminokwasowe), a odbywa się przy udziale znacznika histydynowego i jest

ściśle ukierunkowana. Wykorzystano metodę immobilizacji białka rekombinowanego ze znacznikiem histydynowym przy udziale jonów niklu. Biorąc pod uwagę fakt, iż większość białek rekombinowanych zawiera taki znacznik, metoda immobilizacji może być uniwersalna, wykorzystana do wielu innych różnych białek. Czujnik dzięki takiej metodzie funkcjonalizacji może być użyty wielokrotnie po usunięciu powstałego kompleksu biologicznego. Usuwanie kompleksu przeprowadzić można np. przy użyciu kwasu wersenowego (EDTA) o stężeniu 350 mM.

2. **E. Brzozowska***, M. Koba*, M. Śmietana, S. Górską, M. Janik, A. Gamian, W. J. Bock, "Label-free Gram-negative bacteria detection using bacteriophage-adhesin-coated long-period gratings" *Biomedical Optics Express*, vol. 7, no. 3, 829-840, 2016. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.000829>, IF₂₀₁₆: 3,337, MSiNW:35. Lc: 9

Niniejsza publikacja stanowi kontynuację badań opisanych w poprzednim artykule i dotyczy detekcji komórek bakteryjnych, a nie jak przedstawiono wyżej, bakteryjnych endotoksyn (LPS). W przedstawionej publikacji po raz pierwszy zaprezentowano użycie czujnika LPFG zawierającego adhezynę gp37 faga T4 do detekcji bakterii w środowisku wodnym. W wyniku prowadzonych prac badawczych skonstruowano biosensor, który oprócz bakterii *E. coli* B (kontrola pozytywna) wykrywa także bakterie *E. coli* K-12, *E. coli* O111, *Klebsiella pneumoniae* O1, a także *Yersinia enterocolitica* O1. Jako kontrolę negatywną użyto bakterii *Lactobacillus casei* (LOCK919), które należą do grupy bakterii Gram-dodatnich. Wykazano, iż adhezyna gp37 jest selektywna i nie wykrywa bakterii *E. coli* O56, a także *Salmonella enterica*. Jako metodę referencyjną wykorzystano metodę SPR z użyciem systemu BIAcore a także ELISA. W systemie BIAcore wykonano pomiary w układzie analogicznym, jak w przypadku biosensora LPFG. Adhezyna gp37 była immobilizowana do powierzchni (ligand) za pomocą jonów niklowych, bakterie znajdowały się w roztworze (analit). Wyniki uzyskane z analizy w systemie BIAcore były niejednoznaczne. Np. zaobserwowano wątpliwy wynik dla oddziaływania bakterii *E. coli* K-12 z adhezyną, podczas gdy czujnik LPFG wskazał jednoznacznie, że wiązanie to z pewnością występuje. Dzięki przeprowadzonym badaniom udało się wykazać zalety biosensora LPFG w stosunku do metod referencyjnych. Ponadto potwierdzono fakt, że gp37 wykorzystuje inne niż LPS receptory na powierzchni komórek bakteryjnych, prawdopodobnie białka OmpC.

3. **E. Brzozowska***, A. Leśniewski*, S. Sęk, R. Wieneke, R. Tampé, S. Górską, M. Jönsson-Niedziółka and J. Niedziółka-Jönsson*, Interactions of bacteriophage T4 adhesin with selected lipopolysaccharides studied using atomic force microscopy, *Scientific Reports* 8, Article number: 10935, -brak IF za 2018, IF₂₀₁₇: 4,122, MNiSW: 40, Lc:0

W przedstawionej publikacji po raz pierwszy wykonano badania dotyczące oddziaływań adhezyny gp37 faga T4 z LPS *E. coli* B metodą spektroskopii sił atomowych z użyciem mikroskopu sił atomowych (ang. atomic force microscopy AFM). Jako kontrole negatywne użyto LPS-ów niewiążących się z adhezyną, a mianowicie LPS *E. coli* O111:B i LPS *Hafnia alvei* PCM 1189. W badaniach prezentowanych w publikacji, próbkę badaną (warstwę miki) modyfikowano przy pomocy LPS, a sondę AFM modyfikowano białkiem gp37. Sondę zbliżano do powierzchni modyfikowanej LPS-em, a następnie oddalano, rejestrując siłę działającą na belkę. Wyznaczono siłę potrzebną do rozerwania kompleksu LPS *E. coli* B-gp37 (kontrola

pozytywna), która wynosiła 70 ± 29 pN. Odnotowano także niespecyficzne oddziaływania między adhezyną, a LPS-ami kontroli negatywnych, dla których siła potrzebna do zerwania powstałych kompleksów wynosiła około 45 pN. W publikacji po raz pierwszy przedstawiono dane dotyczące stałej dysocjacji (KD) kompleksu LPS *E. coli* B –gp37, która wynosi 1.05×10^{-7} M. Świadczy ona o wysokim powinowactwie adhezyny do LPS *E. coli* B i jest rzędu stałej charakterystycznej dla oddziaływania enzym-substrat. W publikacji wykazano, że metoda spektroskopii sił atomowych jest przydatna do pomiarów oddziaływań między LPS, a białkami fagowymi.

4. M. Śmietana, M. Koba, E. Brzozowska, K. Krogulski, J. Nakonieczny, L. Wachnicki, P. Mikulic, M. Godlewski, W. J. Bock, "Label-free sensitivity of long-period gratings enhanced by atomic layer deposited TiO₂ nano-overlays" *Optics Express*, vol. 23, no. 7, 8441-8453, 2015, IF2015: 3,148, MNiSW: 40, Lc: 36

W prezentowanej publikacji po raz pierwszy przedstawiono badania dotyczące polepszenia czułości biosensora LPFG poprzez opłaszczanie powierzchni sensora dwutlenkiem tytanu (TiO₂). TiO₂ posiada wysoki indeks załamania światła (ang. High refractive index *n*), co wpływa na większą czułość biosensora, jest odporny na wysokie temperatury oraz wysokie napięcia elektryczne. Ponadto jest wysoce trwały, posiada niską absorpcję optyczną i daje się modyfikować biochemicznie. W prezentowanej publikacji po raz pierwszy została pokazana modyfikacja powierzchni pokrytej TiO₂ przy użyciu kwasu N-(5-amino-1-karboksypentylo) aminodioctowego. Jest to metoda służąca do immobilizacji białek posiadających znacznik histydynowy. W prezentowanej publikacji przedstawiono zmodyfikowaną (ulepszoną) metodę biofunkcjonalizacji powierzchni czujnika LPFG względem metody pierwotnej, przez co delikatna struktura światłowodu oraz naniesiona powierzchniowa warstwa TiO₂ nie są uszkodzane. Ponadto zoptymalizowana metoda jest tańsza, szybsza i mniej kłopotliwa. Według badań opisanych w publikacji czułość czujnika LPFG z warstwą dwutlenku tytanu wzrasta trzykrotnie w stosunku do czujnika pozbawionego warstwy TiO₂.

5. M. Koba*, M. Śmietana, E. Brzozowska, S. Górka, P. Mikulic, W. J. Bock, 2015, "Reusable Bacteriophage Adhesin-coated Long-period Grating Sensor for Bacterial Lipopolysaccharide Recognition," *Journal of Lightwave Technology*, vol. 33, no. 12, 2518-2523, IF2015: 2,567, MNiSW: 35, Lc: 7

W prezentowanej publikacji przedstawiono możliwość regeneracji biosensora LPFG, którego powierzchnię biofunkcjonalizowano przy użyciu kwasu N-(5-amino-1-karboksypentylo) aminodioctowego. Metoda ta polega na tworzeniu kompleksów jonu niklowego z resztami histydynowymi pochodzącymi ze znacznika białkowego (6H). Metoda funkcjonalizacji powierzchni czujnika jest kilkuetapowa i na etapie przyłączenia jonów niklu może być odwracalna. W wyniku działania 0,35 M kwasu wersenowego (EDTA) usuwany jest kompleks białko-Ni²⁺, a następnie można ponownie dokonać immobilizacji białka poprzedzoną immobilizacją jonów niklu. W prezentowanej publikacji po raz pierwszy wykonano badania, w których niszczone utworzony kompleks: jony niklu – białko – LPS i ponownie tą samą powierzchnię czujnika poddawano biofunkcjonalizacji. Możliwość regeneracji czujnika LPFG jest ogromną zaletą i oszczędza zarówno czas, jak i zmniejsza koszty detekcji.

6. M. Koba*, M. Śmietana, **E. Brzozowska**, S. Górską, M. Janik, P. Mikulic, A. Cusano, W. J. Bock, "Bacteriophage Adhesin-Coated Long-Period Grating-Based Sensor: Bacteria Detection Specificity," *Journal of Lightwave Technology*, vol. 34, no. 20, 2016, IF₂₀₁₆: 3,671, MNiSW: 35, Lc: 9

W prezentowanej publikacji przedstawione są badania i szczegółowa analiza danych uzyskanych z pomiarów oddziaływań biosensora LPFG zawierającego adhezynę gp37 faga T4 z bakteriami: *E. coli* B, *E. coli* K12, *Salmonella enterica*. Jest to kontynuacja wcześniejszych prac, w których wykazano, że gp37 oprócz szczepów *E. coli* B rozpoznaje także szczepy *E. coli* K12. Jako metody referencyjnej użyto testu ELISA, w której uzyskane wyniki były zbieżne z wynikami uzyskanymi po pomiarach z wykorzystaniem biosensora LPFG. Najwyższy sygnał detekcji odnotowano dla *E. coli* B (kontrola pozytywna), przy czym sygnał detekcji dla *E. coli* K-12 był dwukrotnie niższy w stosunku do kontroli pozytywnej. Dane w publikacji po raz kolejny potwierdziły fakt, iż opracowany czujnik LPFG jest doskonałym narzędziem do bez znacznikowej detekcji bakterii w środowisku wodnym, w czasie rzeczywistym.

7. **E. Brzozowska***, A. Pyra*, K. Pawlik, M. Janik, S. Górską, N. Urbańska, Z. Drulis-Kawa, A. Gamian. Hydrolytic activity determination of Tail Tubular Protein A of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages towards saccharide substrates, *Scientific Reports* 7, Article number: 18048 2017, doi:10.1038/s41598-017-18096-1, IF₂₀₁₇: 4,122 MNiSW: 40, Lc:0

W przedstawionej publikacji po raz pierwszy opisano białka tubularne z grupy A, należące do białek ogonka bakteriofagów, które oprócz funkcji strukturalnej posiadają także aktywność enzymatyczną wobec substratów sacharydowych. W publikacji opisano dwa białka TTPAgp31 oraz TTPAgp44, które pochodziły od dwóch różnych bakteriofagów *K. pneumoniae*. Pomimo iż oba białka pod względem strukturalnym, jak i masy cząsteczkowej, wykazują duże podobieństwo, to ich specyficzność różni się. Białko TTPAgp31 jest α -1,4-glukozydazą, dla której substratami są zarówno maltoza jak i skrobia. Białko TTPAgp44 wykazuje aktywność wobec trehalozy i nie trawi maltozy. Oba białka wykazują aktywność wobec biofilmu bakteryjnego, TTPAgp31 hamuje wzrost biofilmu szczepów *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae*, natomiast TTPAgp44 jest aktywne wobec biofilmu szczepów *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *E. faecium*. Należy podkreślić, że odkryta funkcja białek tubularnych wskazuje na ogromną różnorodność wśród depolimeraz fagowych i zdolności przystosowawcze tych wirusów do otaczającego środowiska. W celu poznania mechanizmu katalitycznego obu białek wytypowano reszty aminokwasowe, które mogą być odpowiedzialne za hydrolizę substratów cukrowych. Wymaga to eksperymentalnego potwierdzenia.

8. A. Pyra*, **E. Brzozowska***, K. Pawlik, A. Gamian, M. Dauter & Z. Dauter, Tail tubular protein A: a dual-function tail protein of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage KP32, *Scientific Reports* 7, Article number: 2223, 2017, doi:10.1038/s41598-017-02451-3, IF₂₀₁₇: 4,122, MNiSW: 40, Lc:1

W prezentowanej publikacji po raz pierwszy opisano strukturę krystaliczną białka TTPAgp31 należącego do bakteriofaga KP32. Białko to w kryształach przyjmuje postać tetrameru zawierającego zwartą domenę α -helikalną z jednej strony, oraz β -skręty i pętle z drugiej. Monomery są niemalże identyczne. Białko TTPAgp31 posiada domenę lektyno-podobną, która odpowiada za wiązanie substratów cukrowych, a także domenę katalityczną zlokalizowaną na

C-końcu białka. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, iż białko to hydrolizuje egzopolisacharyd otoczkowy szczepu *K. pneumoniae*, a także egzopolisacharyd wchodzący w skład śluzu bakteryjnego, co oznacza, że może być ono wykorzystane do niszczenia biofilmu bakteryjnego. Publikacja została wyróżniona Diamentem za najlepszą publikację z dziedziny krystalografii białek za rok 2017 przez Komitet Krystalografii PAN.

9. **E. Brzozowska***, J. Bazan, A. Gamian, The functions of bacteriophage proteins, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Advances in Hygiene and Experimental Medicine)*; 65:167-76, 2011, IF₂₀₁₁: 0,654, MNiSW: 15, Lc:4

W prezentowanej publikacji zebrany jest opis dotyczący roli białek fagowych, ze szczególnym uwzględnieniem białek adhezyjnych (adhezyn) oraz białek enzymatycznych. Zaprezentowane są możliwości wykorzystania białek fagowych w życiu człowieka; np. wykorzystanie enzymów fagowych do zwalczania zakażeń bakteryjnych, czy wykorzystanie adhezyn do detekcji skażeń i/lub zakażeń bakteryjnych.

Bakteriofagi stanowią niewyczerpane źródło do badań. Horyzontalny przepływ genów jest przyczyną ich zmienności genetycznej, a co za tym idzie, jest przyczyną pojawiania się białek, które nabywają różne funkcje. Badając białka fagowe, poznajemy niezwykłą naturę fagów, uczymy się ich współdziałania ze środowiskiem. Bakteriofagi dostarczają nam narzędzi, które wykorzystujemy z powodzeniem do poprawy naszego życia.

Cechą wspólną przedłożonych publikacji jest praktyczne wykorzystanie białek bakteriofagowych do detekcji i zwalczania patogennych bakterii, które mogą zagrażać zdrowiu i życiu ludzi i zwierząt. Użycie białek jest korzystniejsze niż użycie całych cząstek fagowych, ze względu na to, iż białka są bardziej stabilne, manipulacja w obrębie białka powoduje bardziej przewidywalne efekty niż manipulacja na całym bakteriofagu, który dodatkowo zmienia się ze względu na horyzontalny transfer genów. W prezentowanych publikacjach po raz pierwszy adhezyna fagowa została wykorzystana do konstrukcji niezwykle zaawansowanego biosensora do detekcji skażeń środowiska. Przy udziale metod SPR, tj. BIAcore i Pall ForteBio: Octet RED96 System, a także AFM i ELISA uzupełniono wiedzę dotyczącą oddziaływania adhezyny gp37 faga T4 z receptorem LPS. Odkryto nową funkcję białek tubularnych należących do ogonków fagowych fagów KP. Wspomniana funkcja to hydroliza substratów cukrowych, która pozwala na stosowanie tych białek np. w przemyśle spożywczym, ale także farmaceutycznym.

ZA NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘTE REZULTATY UWAŻAM:

- Opracowanie uniwersalnej metody biofunkcjonalizacji powierzchni biosensorów LPFG, pozwalającej na odwracalną immobilizację białek posiadających znacznik histydynowy. Metoda, która pozwala na regenerację powierzchni czujnika, bez utraty jego czułości, a immobilizacja biocząsteczki jest ściśle ukierunkowana.
- Wytworzenie wysoce czułego, bez znacznikowego biosensora LPFG zawierającego adhezynę gp37 faga T4 do detekcji w czasie rzeczywistym obecności w środowisku wodnym bakterii oraz endotoksyn.

- Określenie specyficzności adhezyny gp37 faga T4 wobec bakteryjnych Lipopolisacharydów (LPS), a także wobec szczepów bakteryjnych.
- Wyznaczenie siły wiązania i określenie powinowactwa adhezyny gp37 faga T4 do LPS *E. coli* B.
- Odkrycie nieznanej dotąd funkcji enzymatycznej fagowych białek tubularnych (TTPA) uznawanych dotychczas za białka strukturalne/budulcowe.
- Określenie specyficzności substratowej białek TTPA wobec substratów cukrowych, a także wobec bakteryjnych polisacharydów.
- Wykazanie potencjalnego zastosowania białek TTPA do zwalczania biofilmu bakteryjnego.
- Określenie struktury krystalicznej białka TTPA.

Przedstawiony do oceny cykl prac obejmuje zagadnienia badawcze stanowiące przedmiot moich zainteresowań naukowych:

- badanie funkcji białek ogonka bakteriofagów, w tym funkcji adhezyjnych i enzymatycznych,
- badanie oddziaływań międzycząsteczkowych,
- badania z zakresu biologii molekularnej, tworzenie konstruktów genetycznych i wydajne uzyskanie białek rekombinowanych w bakteryjnych systemach ekspresyjnych,
- badania strukturalne białek bakteriofagowych,
- badanie natury biologicznej bakteriofagów,
- wykorzystanie białek fagowych do wysokoczułej, bez znacznikowej detekcji skażeń bakteryjnych poprzez konstrukcję czujników LPFG.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Podsumowanie

Mój dorobek naukowy w sumie obejmuje współautorstwo w **35** artykułach oryginalnych i przeglądowych: **27** pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (jako pierwszy autor - **5** prac, autor korespondencyjny – **8** prac), współautorstwo w **8** pracach spoza bazy JCR, **19** komunikatach zjazdowych oraz **4** referatach wygłoszonych na konferencjach naukowych. Jestem współautorem **5** patentów (w tym **4** międzynarodowych). Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, impact factor) wszystkich prac wynosi **84,519**, a suma punktów MNiSW: **852**. Do dnia 13.07.2018 r., według bazy Web of Science (WoS All Database) (dla Brzozowska, Zuziak), prace były cytowane **191** (157 bez autocytowań) razy, indeks Hirscha wynosi **7**.

Łączny IF dziewięciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi **33,219** (320 punktów MNiSW) przy ilości cytowań **102** (13.07.2018)

Obecnie, w ramach działalności naukowej jestem kierownikiem projektu badawczego SONATA BIS 7 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz wykonawcą w projekcie TANGO 2 (Wspólne przedsięwzięcie Narodowego Centrum Nauki i Narodowego Centrum Badań i Rozwoju). Byłam kierownikiem grantu SONATA 2 (2012-2017), a także wykonawcą w ramach grantu SONATA 3 (2013-2017) i OPUS 9 finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Brałam udział w realizacji dwóch grantów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz jednego grantu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych. Byłam członkiem zespołu w dwóch międzynarodowych projektach badawczych finansowanych ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Współpracy Transgranicznej Republika Czeska - Rzeczpospolita Polska 2007 – 2013. Brałam udział w pracach projektowych kanadyjskiego ośrodka Photonics Research Center (PRC) UQO: Discovery, Strategic i Engage Grant, ufundowane przez kanadyjski Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Byłam wykonawcą w projekcie kluczowym Biomed (WCB EIT+) realizowanym w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, a także byłam wykonawcą w projekcie finansowanym przez Unię Europejską z europejskiego funduszu rozwoju regionalnego i budżetu państwa.

A) PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

W latach 1997-2002 studiowałam na ówczesnym Wydziale Nauk Biologicznych na kierunku Biotechnologia na Uniwersytecie Wrocławskim. W 2002 roku obroniłam pracę magisterską zatytułowaną: "Nowe roślinne inhibitory proteinaz serynowych. Izolacja inhibitora trypsyny z bulw czosnku". Pracę magisterską realizowałam pod kierunkiem dr Ireny Lorenc-Kubis w Zakładzie Enzymologii Instytutu Biochemii i Biologii Molekularnej kierowanym przez prof. dr hab. Tadeusza Wilusza. Podczas swojej pracy magisterskiej wyizolowałam z czosnku inhibitor trypsyny, który został przeze mnie scharakteryzowany pod względem masy cząsteczkowej oraz sekwencji aminokwasowej. W tym samym roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w Zakładzie Krystalografii pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Lisa. Przez dwa lata uczyłam się dziedziny krystalografii, a głównie krystalografii białek. Zajmowałam się izolacją inhibitorów proteinaz serynowych z nasion dziurawca (*Mirabilis jalapa*) oraz ich charakterystyki pod względem struktury pierwszorzędowej, a także aktywności inhibitorowej wobec trypsyny (zał. 3 pkt II.A, poz. 16). Podczas tego okresu prowadziłam także zajęcia dydaktyczne z zakresu chemii organicznej ze studentami z Wydziału Nauk Biologicznych na kierunkach Biologii i Biotechnologii. W 2004 roku rozpoczęłam pracę jako wolontariuszka przy projekcie realizowanym w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu. W tym samym roku zmieniłam kierunek swoich badań i rozpoczęłam studia doktoranckie w IITD, PAN pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Gamiana. Tematem mojej rozprawy doktorskiej były badania dotyczące obecności naturalnych przeciwciał przeciwfagowych w surowicy ludzkiej. Badania prowadzone były w ramach projektu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (KBN) 3P05A/020/23 i dotyczyły pośredniego wpływu przeciwciał przeciwfagowych w terapii fagowej. W ówczesnym czasie przy IITD powstawał Ośrodek Terapii Bakteriofagowej, którego założycielem jest prof. dr hab. Andrzej Górski, i zagadnienie dotyczące naturalnie wytworzonych przeciwciał przeciwfagowych było niezwykle istotne do ewentualnego wyjaśnienia przyczyn

niepowodzenia stosowanej terapii. W tamtym czasie były dostępne doniesienia literaturowe, na temat powstawania przeciwciał przeciwko bakteriofagom u ludzi poddanych terapii fagowej, nie było doniesień dotyczących przeciwciał powstałych samoistnie (bez celowego indukowania odpowiedzi immunologicznej na antygeny fagowe). Ponadto skupiano się także na opracowaniu metody oczyszczania bakteriofagów do ich stosowania terapeutycznego. Takie preparaty lecznicze powinny być zawierać aktywne fagi i jak najmniej bakteryjnych zanieczyszczeń w postaci lipopolisacharydów, które mogą wywoływać wstrząs septyczny. W ramach pracy doktorskiej opracowałam wydajną metodę namnażania oraz oczyszczania bakteriofagów ogonkowych, modelowego faga T4 oraz dwóch fagów obecnych w ówczesnym czasie w populacji ludzkiej na terenie Wrocławia. Celem opracowanej metody miało być uzyskanie możliwie najwyższego miana bakteriofagów pozbawionych zanieczyszczeń bakteryjnych, głównie LPS (zał. 3 pkt II.B, poz. 1, 2, 3). Po raz pierwszy do określenia ilości przeciwciał przeciwfagowych został użyty test ELISA, a także techniki Western blot. Opracowałam test do oznaczania przeciwciał przeciwfagowych dla trzech bakteriofagów, a także opracowałam warunki długotrwałego przechowywania preparatów fagowych w formie zliofilizowanej. Na przeprowadzenie części badań w ramach pracy doktorskiej uzyskałam finansowanie w postaci grantu promotorskiego finansowanego przez Ministerstwo nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) N402 072 32/2319. Większość wyników powstałych podczas mojego doktoratu jest przedmiotem patentów (zał. 3 pkt II.B, poz. 1, 2, 3), a także zostały prezentowane na wyjazdach konferencyjnych (zał. 3, pkt II.E poz.1, pkt II.K, poz. 2, 3, pkt III.B, poz. 4)

Podczas studiów doktoranckich opanowałam metodykę oznaczania endotoksyny w preparatach biologicznych z wykorzystaniem testu LAL. W tym celu przeszłam specjalistyczne szkolenia z zakresu przeprowadzania i interpretacji wyników uzyskanych w tym teście. Trudność wykonania testu metodą LAL (Limulus Amebocyte Lysate) ogólnie polega na całkowitym wyeliminowaniu endotoksyny bakteryjnej z otoczenia. W swoich badaniach wielokrotnie stosowałam test LAL do oznaczania endotoksyny w próbkach biologicznych takich, jak surowica (zał. 3, pkt II.A, poz. 6, pkt II.B, poz. 1, pkt II.K, poz. 1, pkt III.B, poz. 3). Byłam zaangażowana również w analizę obecności endotoksyny w preparatach mikroRNA stosowanych do leczenia chorób niedokrwienych u ludzi. Oznaczenia endotoksyny wykonywałam na zlecenie dr Dagmary Baczyńskiej z Zakładu Technik Molekularnych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

B) PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po obronie pracy doktorskiej w 2009 roku zostałam początkowo zatrudniona w EIT+ na stanowisku adiunkta, a następnie objęłam stanowisko asystenta w IITD, PAN. W roku 2014 startowałam w konkursie na Adiunkta w IITD i konkurs ten wygrałam. W IITD, PAN pracuję do dnia dzisiejszego

Praca naukowa od czasów studiów I-szego stopnia (licencjackich) stała się moją pasją i od tamtego czasu rozwijałam i rozwijam nadal swoje zainteresowania naukowe dotyczące zagadnień opisanych poniżej. Większość tematów badawczych realizuję we współpracy z koleżankami i kolegami z IITD PAN oraz z innych ośrodków naukowych, krajowych jak i zagranicznych. Mój udział w różnych projektach i zadaniach badawczych zaowocował

powstaniem publikacji, patentów, a także doniesień naukowych prezentowanych na konferencjach, co zebrałam szczegółowo i opisałam w załączniku nr 3. Duża część tematów była przedmiotem prac magisterskich, które wykonane były pod moją opieką (zał. 3, pkt III.J, poz.1). Bardzo chętnie dzielę się swoją wiedzą i doświadczeniem ze studentami i czuję się w obowiązku, żeby zapewnić im jak najwyższą jakość przekazywanej im wiedzy. Jestem niezwykle usatysfakcjonowana, jeśli udaje mi się zaszczepić pasję badawczą i chęć poznawania i zgłębiania wiedzy przez młodych ludzi.

B.1. Wykorzystanie adhezyn fagowych w detekcji bakteryjnych skażeń środowiskowych z użyciem nowoczesnych czujników światłowodowych oraz czujników mikrofalowych

Adhezyny bakteriofagowe i możliwości ich wykorzystania są głównym zagadnieniem badawczym, którym zajmuję się w swojej pracy naukowej. Początkowo adhezyny interesowały mnie pod kątem wykorzystania ich do opracowania metodologii oznaczania przeciwciał antyfagowych u ludzi, co było istotne z punktu widzenia terapii fagowej. Następnie, rozwijałam koncepcję użycia tych białek jako cząstek specyficznie rozpoznających receptory powierzchniowe bakterii, co miało na celu detekcję zakażeń i skażeń środowiskowych bakteriami patogennymi, a także zwalczanie patogenów. Swoje badania rozpoczęłam początkowo na białku gp37, adhezyne modelowego faga T4. Izolacja i oczyszczanie tego białka z materiału biologicznego w ilości miligramowej jest w praktyce niemożliwa, z tego też względu dzięki uprzejmości prof. Mark J van Raaij z Narodowego Centrum Biotechnologii w Hiszpanii, uzyskałam gotowy konstrukt genetyczny do ekspresji tego białka. W toku prowadzonych przeze mnie badań dokonałam charakterystyki specyficzności gp37 wobec bakterii oraz LPS, a także białek OmpC różnych szczepów bakteryjnych z rodziny *Enterobacteriaceae* (publ. pkt b, poz. 1, 2, 3, 9, zał. 3 pkt I.B, poz.1, 2, 3, 9 oraz zał. 4 poz. 1, 2, 3, 9). Przy użyciu syntetycznych peptydów określiłam krótkie sekwencje aminokwasowe, które determinują oddziaływanie tego białka z LPS pochodzącego z *E. coli* B (zał. 3, pkt II.D poz. 1), a także określiłam siłę wiązania i stałą dysocjacji do receptora bakteryjnego (publ. pkt b, poz. 3, zał. 3, pkt I.B, poz. 3 oraz zał. 4, poz. 3).

Praktyczne możliwości wykorzystania adhezyny gp37 zostały ukazane podczas prac interdyscyplinarnych nad nowoczesnymi układami biosensorowymi. Badania prowadzone były we współpracy z zespołem dr hab. inż. Mateusza Śmietany z Politechniki Warszawskiej, zespołem dr hab. inż. Joanny Niedziółki-Jöhnsson z Instytutu Chemii Fizycznej PAN, a także z zespołem prof. Wojtka Bocka z Photonics Research Center w Kanadzie. Badania zostały rozszerzone także o opracowanie czujnika mikrofalowego przy współpracy z zespołem dr hab. inż. Sławomira Gruszczyńskiego z Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Dzięki wyżej wspomnianej współpracy skonstruowano prototyp bez znacznikowego czujnika LPGF o bardzo wysokiej czułości do detekcji wybranych bakterii oraz endotoksyn bakteryjnych w środowisku wodnym. Badania dotyczące prac nad konstrukcją czujnika światłowodowego realizowane były w ramach projektu, którego byłam kierownikiem (nr 2011/03/D/NZ7/02054) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. Większość uzyskanych wyników była opisana w publikacjach stanowiących cykl habilitacyjny, (zał. 3, pkt I.B, poz. 1, 2, 3, 7, 8, zał. 3, pkt II.A, poz. 1) oraz były prezentowane na konferencjach naukowych (zał. 3, pkt III.B, poz. 8, 9, 14).

Obecnie prowadzone są badania nad czujnikiem wykrywającym skażenia bakterią *E. coli* O157H7. Patogen ten odpowiada za schorzenia w obrębie układu pokarmowego oraz moczowego. Jest przyczyną powikłań schorzeń nadnerczy oraz może prowadzić do groźnego zespołu hemolityczno-mocznicowego. Jest to najczęściej występujący patogen w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie. Z tego też względu, w ramach projektu: „NSERC/SPI Industrial Research Chair in photonic sensor systems for safety and security monitoring” (No: 491271 – 14) finansowanego przez Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) i Security & Protection International (SPI), trwają prace nad skonstruowaniem biosensora LPFG. Do tej pory przy użyciu metody phage display wytypowany został peptyd, który specyficznie rozpoznaje *E. coli* O157:H7. Badania dotyczące jego specyficzności są prowadzone z wykorzystaniem techniki BIAcore. Ponadto trwają prace nad skonstruowaniem biosensora LPFG do wykrywania *E. coli* O157:H. Będą one przedmiotem pracy doktorskiej Moniki Janik, w której pełnię funkcję promotora pomocniczego (zał. 3, pkt III.K, poz. 1).

B.2. Dwu-funkcyjne białka ogonka bakteriofagów- określenie funkcji oraz mechanizmu działania wobec substratów (poli)sacharydowych

Poszukiwania białek adhezyjnych w bakteriofagach *K. pneumoniae* skutkowało odkryciem, iż białka tubularne ogonka, uznawane dotychczas za białka strukturalne posiadają aktywność enzymatyczną. Białka tubularne ogonka (TTP) bakteriofagów tworzą dwie rodziny białek A i B. Do białek TTPA należą białka o niskiej masie cząsteczkowej (ok. 20 kDa), a do białek TTPB białka o masie cząsteczkowej wynoszącej ok. 90 kDa. Szybka analiza porównawcza homologi sekwencji aminokwasowej z wykorzystaniem bazy NCBI wykazała, iż jest ponad 100 białek TTP w obrębie obu grup u różnych bakteriofagów. Kolejnym ciekawym zagadnieniem jest różnorodna specyficzność tych białek wobec substratów cukrowych. Mechanizm działania tych nowo odkrytych enzymów jest obecnie przedmiotem moich badań. W tym celu zajmuję się wprowadzaniem mutacji punktowych aminokwasów potencjalnie wchodzących w skład triady katalitycznej tych enzymów. Następnie, sprawdzana jest aktywność enzymatyczna w odniesieniu do niezmutowanego białka. Badania dotyczące białek TTP były i nadal są prowadzone we współpracy z dr Krzysztofem Pawlikiem z Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów w IITD, prof. dr hab. Zuzanną Drulis-Kawą z Uniwersytetu Wrocławskiego, a także z prof. Mikaelem Skurnikiem z Uniwersytetu Helsińskiego. Bardzo ważną częścią badań białek TTP są badania strukturalne we współpracy z dr Anną Pyrą z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz zespołem prof. Zbigniewa Dautera z National Center Institute w USA, a także prof. Gino Cingolani z Jefferson University w USA. Dzięki badaniom strukturalnym została wytypowana domena wiążąca substraty cukrowe, domena katalityczna oraz domena odpowiedzialna za dimeryzację białka gp31 TTPA pochodzącego z faga KP32. Obie grupy białek tubularnych A i B są badane w bakteriofagach *Yersinia enterocolitica*. Dotychczasowe wyniki były przedmiotem jednego zgłoszenia patentowego (zał. 3, pkt II.B, poz. 5) zostały opisane w publikacjach (Publikacja 4, 6 pkt b, zał. 3, pkt I.B, poz. 4, 6, zał. 4, poz. 4, 6), oraz były prezentowane na konferencjach naukowych (zał. 3, pkt III.B, poz. 12, 15, 17, 18, pkt II.K, poz. 4). Uzyskane wyniki będą przedmiotem rozprawy doktorskiej pani Karoliny Filik, w której pełnię funkcję promotora pomocniczego (zał. 3, pkt III.K, poz. J).

B.3 Immunochemiczna i biochemiczna charakterystyka bakteryjnych receptorów rozpoznawanych przez fagi.

Szczepy *Pseudomonas aeruginosa* należą do szczepów patogennych, a dodatkowo nabywają oporność wobec stosowanych antybiotyków. W badaniach użyto dwóch izolatów *P. aeruginosa* pochodzących z niegojącej się rany „stopy cukrzycowej” pacjenta. Wyizolowano dwa szczepy odporne na antybiotyki. Po zastosowaniu preparatu faga F8, bakterie szczepu oznaczonego jako PAR50 ulegały zniszczeniu. Dalsze badania wykazały, że za niszczenie bakterii odpowiada białko fagowe zidentyfikowane jako PP141_gp30. Kolejne badania ujawniły, że białko to jest proteinazą serynową, a głównym jego receptorem na powierzchni komórki bakteryjnej jest białko porynowe. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego jednoznacznie pokazują, że w wyniku działania tego białka komórki szczepu PAR50 ulegają całkowitej degradacji, podczas gdy komórki szczepu PAR21 (inny izolat odporny na antybiotyki) w znacznym stopniu zmieniają swoją morfologię. Opisane badania są przedmiotem pracy doktorskiej. W części dotyczącej badań z bakteriofagiem i białek fagowych pełniłam opiekę merytoryczną (zał. 3, pkt III.B, poz. 10). Wyniki uzyskane z tych badań znalazły się w publikacji, która jest obecnie recenzowana.

B.4. Charakterystyka immunoreaktywnych antygenów białkowych obecnych na powierzchni *Streptococcus agalactiae*

Paciorkowce grupy B (*Streptococcus agalactiae*, Group B Streptococcus, GBS) to bakterie komensalne zasiedlające układ pokarmowy człowieka. U kobiet mogą także bytować w pochwie. Ich nosicielstwo nie powoduje zazwyczaj żadnych objawów, ale bakterie te stają się niezwykle groźne w momencie, gdy na zakażenie GBS narażony zostanie płód lub noworodek. W latach 70tych śmiertelność noworodków zarażonych *Streptococcus agalactiae* wynosiła aż 50%. Obecnie około 10-30% kobiet w ciąży jest zarażonych paciorkowcem z grupy B, a problem związany z infekcjami u noworodków nadal występuje. W celu niedopuszczenia do infekcji noworodków przez GBS, stosuje się diagnostykę prenatalną, a w przypadku nosicielstwa, podawane są antybiotyki. GBS są również niebezpieczne dla osób z obniżoną odpornością oraz dla osób starszych. Najlepszym rozwiązaniem zapobiegającym zakażeniom powodowanym przez GBS jest szczepionka. Dr hab. Monika Brzychczy-Włoch z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie prowadzi badania nad wytypowaniem immunoreaktywnych białek należących do szczepów GBS i możliwości zastosowania ich jako antygenów, składowych szczepionki, a także w celach diagnostycznych. W ramach projektu nr 2013/09/B/NZ6/00801, finansowanego w latach 2014 – 2018 ze środków Narodowego Centrum Nauk wspólnie udało nam się dokonać analizy białek pochodzących z 60 szczepów GBS pod kątem ich immunoreaktywności wobec surowic pacjentek (nosicieli lub kobiet zakażonych GBS, a także zakażonych noworodków). W wyniku przeprowadzonych badań wytypowano cztery białka szczepów GBS, które były immunoreaktywne wobec surowic osób zakażonych lub nosicieli. Wyniki badań są zawarte w publikacji (zał. 3, pkt II.A, poz. 5), były prezentowane na konferencjach naukowych, a także są przedmiotem patentu (zał. 3, pkt II.B, poz. 4, pkt II.C, poz. 1). Kolejnym etapem naszej współpracy było określenie epitopów znajdujących się na białkach immunoreaktywnych (antygenach), ich synteza chemiczna i próba

opracowania testu diagnostycznego, a także szczepionki przeciwko zakażeniom GBS (zał. 3, pkt II.A, poz. 4). Prace w dalszym ciągu trwają i są prowadzone w ramach projektu TANGO 2 nr wniosku: 340018 ze środków Wspólnego Przedsięwzięcia Narodowego Centrum Nauki i Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. W chwili obecnej została podpisana umowa licencyjna z firmą CHDE Polska S.A. na korzystanie z prawa do uzyskania patentów / patentów oraz o współpracy w zakresie realizacji fazy B+R przedsięwzięcia pt. „Innowacyjny test diagnostyczny do wykrywania zakażeń *Streptococcus agalactiae* i nosicielstwa wśród ciężarnych”. Jest to kolejny krok w kierunku komercjalizacji badań naukowych, w których mam przyjemność uczestniczyć.

B.5. Wpływ mikrobiomu na zdrowie i funkcjonowanie organizmu człowieka. Rola polisacharydowych składników ściany komórkowej probiotycznych bakterii *Lactobacillus casei* oraz *Lactobacillus paracasei* w przebiegu chorób o podłożu alergicznym.

W ostatnich czasach dużo uwagi poświęca się badaniom mikrobiomu ludzkiego oraz jego wpływu na zdrowie i funkcjonowanie organizmu ludzkiego. W przewodzie pokarmowym człowieka występuje około 5000 różnych szczepów bakteryjnych należących głównie do podkrólestwa *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Wywierają one wpływ na ludzki metabolizm, fizjologię oraz na funkcjonowanie układu immunologicznego, a także nerwowego. W ogromnej mierze skład mikroflory jelitowej, a konkretniej, zwiększona liczba szczepów Gram ujemnych, wpływa na różnego rodzaju dysfunkcje i może być przyczyną nieswoistego zapalenia jelita, zespołu jelita drażliwego (IBS), celiakii, alergii, astmy, zespołu metabolicznego, chorób układu krążenia, otyłości, a nawet raka. Dobroczynny wpływ na funkcjonowanie organizmu ludzkiego przypisuje się obecnie bakteriom probiotycznym, a zagadnienie ich suplementacji jest atrakcyjnym tematem badań. Badane są mechanizmy działania bakterii probiotycznych, udział poszczególnych komponentów zewnątrzkomórkowych w interakcji z komórkami ludzkimi i efekt fizjologiczny, jaki ostatecznie wywierają. Dr hab. inż. Sabina Górską z Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej w IITD zajmuje się badaniami nad określeniem mechanizmów działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i ich antygenów powierzchniowych na układ odpornościowy, poszukiwaniem nowych preparatów o właściwościach probiotycznych, a także poznaniem ich roli jaką odgrywają w rozwoju chorób układu pokarmowego czy chorób o podłożu alergicznym. Wspólnie realizowaliśmy projekt dotyczący trzech szczepów *Lactobacillus*, których antygeny powierzchniowe badane były pod kątem właściwości immunomodulatorowych i możliwości ich zastosowania w zapobieganiu/leczeniu alergii na modelu mysim. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że polisacharydy probiotyków wykazują duży potencjał w kierunku modulowania układu odpornościowego (zał. 3, pkt II.B, poz. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). Badania antygenów powierzchniowych bakterii *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* były prowadzone w ramach międzynarodowych projektów badawczych finansowanych ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Współpracy Transgranicznej Republika Czeska - Rzeczpospolita Polska 2007 – 2013: nr CZ.3.22/2.1.00/09.01574 oraz CZ.3.22/2.1.00/13.03892 oraz projektu SONATA: 2012/05/D/NZ7/02494 (2013-2017) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Badania dotyczące poznania struktury oraz funkcji biologicznej antygenów powierzchniowych *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900, *L. johnsonii* 142, *L. animalis/murinus* 148, *L. animalis/murinus* 116, *L. reuteri* 115 są zawarte w publikacjach (zał. 3, pkt II.B, poz. 7, 9, 10, 11, 12) oraz były prezentowane na konferencjach naukowych (zał. 3, pkt III.B, poz. 11, 16). Badania dotyczące struktury oraz funkcji antygenów powierzchniowych *Bifidobacterium longum* są zawarte w publikacjach i były prezentowane na konferencjach naukowych (zał. 3, pkt II.B, poz. 8, 14).

Według najnowszych badań wiadomo, iż komensalne bakterie jelitowe mają zdolność syntezy neuroprzekazników i neuromodulatorów, takich jak kwas γ -aminomasłowy, serotonina, dopamina, noradrenalina, acetylocholina, GABA, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, co umożliwia bezpośrednią komunikację mikroflory z komórkami układu nerwowego. Zaś bakterie, które wywierają niekorzystny wpływ na organizm człowieka, produkują i wydzielają szereg związków, które zmniejszają szczelność bariery jelitowej, ułatwiając kontakt mikrobiomu jelitowego z podśluzówkową tkanką limfatyczną. W rezultacie dochodzi do ogólnoustrojowych reakcji zapalnych, które upośledzają barierę krew-mózg i sprzyjają zapaleniu nerwów i ostatecznie neurodegeneracji. Istnieją dobrze udokumentowane przesłanki, iż skład mikrobiomu układu pokarmowego człowieka ma także ogromny wpływ na rozwój choroby Alzheimera. Zagadnieniem etiologii tej niezwykle poważnej choroby od lat zajmuje się dr hab. med. Jerzy Leszek z Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Na jego zaproszenie wzięłam udział we wspólnym przedsięwzięciu, jakim było opracowanie publikacji przeglądowej na temat wpływu mikrobiomu przewodu pokarmowego w patogenezie choroby Alzheimera. Publikacja została przyjęta do druku (zał. 3, pkt II.A, poz. 18).

B.6. Klonowanie i oczyszczanie bakteriocyn LafA i LafX produkowanych przez bakterie *Lactobacillus johnsonii*.

Bakteriocyny to peptydy o działaniu antybakteryjnym. Są one produkowane przez określone szczepy bakteryjne w celu zwalczania innych szczepów konkurujących w środowisku. Bakteriocyny mogą być stosowane jako środki konserwujące żywność oraz do zmniejszenia lub eliminowania niektórych patogenów. Laktacyna F to bakteriocyna produkowana przez bakterie *Lactobacillus johnsonii*. Początkowo laktoferyna F jest produkowana jako dwa oddzielne peptydy LafA i LafX, które ostatecznie tworzą kompleks. W badaniach, których rezultaty były prezentowane na konferencjach naukowych (zał. 3, pkt III.B, poz. 6, 7, 13) zostały uzyskane peptydy LafA i LafX na drodze nadekspresji w komórkach *E. coli* BL21(DE3)plysS na małą skalę. Celem prowadzonych badań było uzyskanie oczyszczonych bakteriocyn w ilości umożliwiającej podjęcie prób ich krystalizacji. Ostatecznie nie udało się uzyskać bakteriocyn w formie rozpuszczalnej, w ilościach miligramowych, ich krystalizacji i rozwiązania struktury krystalicznej. Zmagania badawcze dotyczące zagadnienia bakteriocyn LafA i LafX zostały opisane w pracy magisterskiej, w której pełniłam rolę pomocnika naukowego z zakresu preparacji peptydów i ich analizy.

B.7. Przeciwnowotworowy czynnik produkowany przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* są zdolne do wytwarzania kilku czynników wirulencji, wywierając działanie cytotoksyczne wobec komórek gospodarza. W badaniach prowadzonych we współpracy z zespołem prof. dr hab. med. Andrzeja Szkaradkiewicza z Uniwersytetu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu analizowano działanie medium pochodzące z różnych szczepów bakteryjnych z rodzaju *Enterococcus* pod kątem aktywności przeciw proliferacyjnej komórek nowotworowych. Do eksperymentów wykorzystano linie komórek nowotworowych: komórki gruczolaka - AGS (ATCC CRL-1739) powodującego nowotwory żołądka, komórki raka szyjki macicy - HeLa (ATCC CCL-2) i gruczolaka powodującego nowotwory piersi - MDA-MB-231 (ATCC HTB-26). W celu zidentyfikowania czynnika hamującego podziały komórek nowotworowych prowadzono oczyszczanie, frakcjonując cząsteczki biologiczne zawarte w płynie pochodzącym. W wyniku prowadzonych badań określono aktywny czynnik przeciwnowotworowy, którym jest peptyd o masie 7.066 kDa. Mój udział w prowadzeniu wyżej opisanych badań polegał na oczyszczeniu oraz analizie elektroforetycznej, a także określeniu masy cząsteczkowej aktywnego peptydu. Wyniki prowadzonych prac były prezentowane na konferencjach naukowych (zał. 3, pkt III.B, poz. 5).

30.07.2018

Ewa Brzozowska