

AUTOREFERAT

DR INŻ. ANNA JARZĄB

**BADANIA STRUKTURALNE I FUNKCJONALNE BIAŁEK
W KONTEKŚCIE ICH TERMOLABILNOŚCI ORAZ IMMUNOGENNOŚCI**



**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk**

Wrocław, 17.04.2025

1. Imię i nazwisko.

ANNA JARZĄB

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

12.06.2014 **Doktor nauk biologicznych** nadany przez Radę Naukową **Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN we Wrocławiu** | specjalizacja: Mikrobiologia | Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych

Praca doktorska obroniona z wyróżnieniem: „Charakterystyka immunochemiczne białka OmpC rozpoznawanego przez przeciwciała krwi pępowinowej jako potencjalnego antygeny szczepionek koniugatowych”, Promotor: dr hab. Danuta Witkowska

13.07.2009 **Magister inżynier**, kierunek Biotechnologia, specjalizacja Biotechnologia Molekularna i Biokataliza | **Politechnika Wrocławska** | Wydział Chemiczny

Praca magisterska: “Badania strukturalne egzopolisacharydów z różnych gatunków Lactobacillus wyizolowanych z ludzkiego przewodu pokarmowego”, Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Wykształcenie uzupełniające z zarządzania projektami badawczymi:

25.01.2014 – 7.12.2014 Studia podyplomowe: **Menadżer projektu badawczo-rozwojowego**
Wyższa Szkoła Bankowa we Wrocławiu

27.05.2013 – 26.07.2013 Staż zagraniczny z komercjalizacji badań naukowych oraz zarządzania zespołem w ramach realizacji kursu: „**Science – Management – Commercialization**”
Haas School of Business, University of California, Berkeley, USA

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

01.09.2022 – obecnie | *Adiunkt*

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu, Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Badania nad rozwojem szczepionek antybakteryjnych oraz czynników determinujących labilność termiczną białek. Od 09.2024 - **lider Grupy badawczej Proteomiki i Analizy Immunoenzymatycznej**

01.01.2015 – 31.08.2022 | *Specjalista techniczno – inżynierski, Biotechnolog*

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu, Międzyzakładowa Pracownia Spektrometrii Mas i Analizy Preparatywnej

Badania nad rozwojem szczepionek antybakteryjnych

19.10.2015 – 30.06.2021 | *Postdoctoral Researcher*

Technical University of Munich, Chair of Proteomics and Bioanalytics, Grupa Prof. Bernharda Kuster

Badania mechanizmów nabytej oporności komórek nowotworowych na leki stosowane w klinice na modelu raka jelita grubego oraz badania czynników determinujących termiczną denaturację białek z wykorzystaniem proteomiki

01.10.2013 – 31.12.2014 | *Biotechnolog*

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu, Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Grupa Prof. Andrzeja Gamiana

Badania nad rozwojem szczepionek antybakteryjnych

01.06.2013 – 26.07.2013 | *Visiting Scholar*

University of California, Berkeley, USA, Bioengineering Department, Grupa Prof. Sanjaya Kumar

Badanie wpływu macierzy pozakomórkowych indukujących przekazywanie sygnałów biofizycznych do komórek oraz wpływających na fizjologię komórek

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.). Omówienie to winno dotyczyć **merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć**, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH ORAZ OSIĄGNIĘĆ TECHNOLOGICZNYCH

Osiągnięcia naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego zgodnie z 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.) opatrzone tytułem:

BADANIA STRUKTURALNE I FUNKCJONALNE BIAŁEK W KONTEKŚCIE ICH TERMOLABILNOŚCI ORAZ IMMUNOGENNOŚCI

Osiągnięcia ujęte w ramach cyklu są ze sobą powiązane tematycznie oraz opublikowane w **4 publikacjach** (zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt. **2b**) w czasopismach naukowych, które w roku opublikowania w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. B, a także w **1 patencie** oraz **1 zgłoszeniu patentowym** (zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt. **2c**, jako osiągnięcia technologiczne).

Prace wchodzących w skład cyklu opisującego osiągnięcia będące podstawą do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego dotyczą badań strukturalnych i funkcjonalnych białek w kontekście ich właściwości:

- termolabilnych: **Publikacje 1-2 (H1-H2)**
- immunogennych: **Publikacje 3-4, Patent 1 i Zgłoszenie patentowe 1 (H3-H6).**

Wszystkie osiągnięcia wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego uzyskano **po obronie pracy doktorskiej**. Pozycje H1-H2 powstały podczas realizacji stażu zagranicznego. Pozycje H3-H6 są **kontynuacją** badań prowadzonych podczas realizacji mojej pracy doktorskiej. Zgodnie z wytycznymi, w każdej z prac wskazałam własny wkład w jej powstanie.

Publikacja 1:H1 | Samaras P, Schmidt T, Frejno M, Gessulat S, Reinecke M, **Jarzab A**, Zecha J, Mergner J, Giansanti P, Ehrlich HC, Aiche S, Rank J, Kienegger H, Krcmar H, Kuster B, Wilhelm M. ProteomicsDB: a multi-omics and multi-organism resource for life science research. **Nucleic Acids Res.** 2020 Jan 8;48(D1):D1153-D1163

(IF = 16,971, pkt. MNiSW = 200, cytowania WoS= 141)

Wyniki opisujące krzywe topnienia białek ludzkich z kilkudziesięciu linii komórkowych oraz tkanek człowieka umieszczone w pracy zdeponowano w bazie danych:

- **ProteomicsDB**, dostępnej pod adresem:

<https://www.proteomicsdb.org/>

Indywidualny wkład habilitantki w autorstwo publikacji: przeprowadzenie eksperymentów TPP (ang. Thermal Proteome Profiling) oraz wytworzenie i opracowanie danych liczbowych zdeponowanych w bazie danych Proteomics DB (39% danych zdeponowanych podczas pracy nad tą publikacją to dane pochodzące z meltomów, opracowane przez habilitantkę), analiza oraz interpretacja wyników; udział przy pisaniu manuskryptu, krytyczna ocena ostatecznej wersji manuskryptu

Publikacja 2: H2 | **Jarzab A**, Kurzawa N, Hopf T, Moerch M, Zecha J, Leijten N, Musiol E, Maschberger M, Stoehr G, Daly C, Samaras P, Mergner J, Spanier B, Angelov A, Werner T, Bantscheff M, Wilhelm M, Klingenspor M, Lemeer S, Liebl W, Hahne H, Savitski MM, Kuster B: Meltome Atlas – thermal proteome stability across the tree of life. **Nature Methods** 2020 May 17(5):495-503

(IF = 28,547, pkt. MNiSW=200, cytowania WoS= 142)

Numeryczne oraz graficzne wyniki opisane w powyższej publikacji zostały opublikowane w postaci baz danych proteomicznych dostępnych na serwerach:

- **Meltome Atlas**, zawiera dane dotyczące krzywych topnienia białek z 13 różnych organizmów (dane graficzne w aplikacji Shiny App), dostępne pod adresem:

https://meltomeatlas.proteomics.wzw.tum.de/master_meltomeatlasapp/

- **Repozytorium PRIDE** z numerem dostępu (Accession Number): PXD011929, gdzie dostępne są dane surowe oraz dane przetworzone obrazujące termiczne profilowanie białek z 13 różnych organizmów:

<https://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PX011929>

Indywidualny wkład habilitantki w autorstwo publikacji: główny pomysłodawca i koordynator przeprowadzonych badań; samodzielne planowanie doświadczeń oraz optymalizacja eksperymentalnego protokołu TPP (ang. Thermal Proteome Profiling workflow); przeprowadzanie eksperymentów TPP na większości organizmów przedstawionych w pracy, m.in.: *P. torridus*, *G. stearothermophilus*, *T. thermophilus*, *E. coli*, *O. antarctica*, *B. subtilis*, *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. musculus*, *H. sapiens*; przeprowadzanie eksperymentów porównawczych powtarzalność wyników między współpracującymi laboratoriami; analiza i interpretacja wyników: korelacja termolabilności białek w różnych mikro-środowiskach oraz po ekspresji w różnych systemach, korelacja danych między temperaturą topnienia a właściwościami białek (m.in. długość białka, hydrofobowość, struktura drugorzędowa, analiza aminokwasów, itp.), analiza termolabilności białek w płynach ustrojowych człowieka; analiza danych mitochondrialnych; pisanie manuskryptu i przygotowanie pracy do druku, przygotowanie rysunków, tabel i informacji uzupełniających, korekta manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów; pozyskanie funduszy: grant badawczy od Fundacji Alexandra von Humboldta.

Publikacja 3: H3 | Jarzab A, Witkowska D, Ziomek E, Setner B, Czajkowska A, Dorot M, Szewczuk Z, Gamian A: Cyclic OmpC peptidic epitope conjugated to tetanus toxoid as a potential vaccine candidate against shigellosis. **Vaccine**. 2018 Jul 25;36(31):4641-4649

(IF=3,269, pkt. MNiSW=30, cytowania WoS = 7)

Indywidualny wkład habilitantki w autorstwo publikacji: główny pomysłodawca i koordynator przeprowadzonych badań; samodzielne planowanie doświadczeń oraz optymalizacja metod eksperymentalnych; przeprowadzone eksperymenty: hodowle bakteryjne, izolacja oraz oczyszczanie białka OmpC, synteza chemiczna peptydów na pinach polietylenowych, przeprowadzenie eksperymentów na zwierzętach, przeprowadzenie eksperymentów stabilności peptydów w surowicy mysiej, przeprowadzenie koniugacji peptyd-białko, przeprowadzenie analiz MALDI-TOF-MS, udział w produkcji przeciwciał monoklonalnych, wykonanie testów serologicznych (ELISA, Western-blot, dot-blot), przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem powierzchniowego rezonansu plazmowego (SPR - surface plasmon resonance), napisanie manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku, przygotowanie rysunków i tabel, korekta manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów.

Publikacja 4: H4 | Jarzab A , Dąbrowska A, Naporowski P, Krasna K, Szmyt A, Swiat M, Pawlik K, Witkowska D, Ziomek E, Gamian A: Outer membrane protein C is a protective and unique vaccine antigen against *Shigella flexneri* 3a. **Sci Rep**, 2024, 14, 25398

(IF=3,8, pkt. MNiSW=140, cytowania WoS= 0)

Indywidualny wkład habilitantki w autorstwo publikacji: główny pomysłodawca i koordynator przeprowadzonych badań; samodzielne planowanie doświadczeń oraz optymalizacja metod eksperymentalnych; przeprowadzone eksperymenty: ekspresja i oczyszczanie białka rekombinowanego (rOmpC), izolacja oraz oczyszczanie białka natywnego (nOmpC), testy serologiczne (ELISA, Western-blot, dot-blot), analiza MALDI-TOF MS, analiza dichroizmu kołowego (CD), analiza dynamicznego rozpraszania światła (DLS); opiekun merytoryczny Kariny Krasnej podczas analizy bioinformatycznej, testów serologicznych oraz analizy zanieczyszczeń lipopolisacharydami i kwasami nukleinowymi; analiza oraz interpretacja wyników; napisanie manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku, przygotowanie rysunków, tabel i informacji uzupełniających, korekta manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów; pozyskanie funduszy: kierownik grantu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBR) w ramach programu Leader XIII, (LIDER13/0093/2022; 1 500 000 zł; 03.2023-03-2026): „Opracowanie innowacyjnej szczepionki peptydowej chroniącej przed czerwonką bakteryjną”

Po obronie pracy doktorskiej uzyskałam patent o statusie polskim oraz międzynarodowym. Patent opisuje otrzymywanie oraz właściwości immunogenne koniugatu białko – peptyd (prototypu szczepionki, który jest oparty o białko nośnikowe oraz peptydy cykliczne). Ponadto, w tym roku (2025) uzyskaliśmy zgłoszenie patentowe na prototyp szczepionki białko nośnikowe – peptyd liniowy, które jest efektem prac w programie Lider XIII (NCBR), którego jestem kierownikiem.

Patent 1: H5 | Jarzab A, Witkowska D, Ziomek E, Gamian A | Patent międzynarodowy: WO2016/012951A1, 28.01.2016 oraz **patent polski:** PL235826B1, 02.11.2020 | „Immunogenic conjugate and its use in the prophylaxis and treatment of infections caused by *Enterobacteriaceae*”.

(patent międzynarodowy i polski)

Indywidualny wkład habilitantki jako twórcy patentu: pomysłodawca i koordynator przeprowadzonych badań; wykonawca wszystkich eksperymentów opisanych w przykładach do patentu (synteza peptydów na pinach polietylenowych, przygotowanie koniugatów peptyd-białko, analiza MALDI-TOF MS, analiza SDS-PAGE oraz wykonanie testów serologicznych: ELISA, Western-blot, dot-blot, przeprowadzenie badań na zwierzętach); analiza danych; merytoryczne przygotowanie zgłoszenia patentowego (opisanie stanu wiedzy, ang. „state of the art”, wykonanie analizy rynku oraz potencjalnych rozwiązań konkurencyjnych, opisanie nowości wynalazku, przygotowanie rycin, tabel i opisów)

Zgłoszenie patentowe 1: H6 | Krasna K, Jarzab A | Zgłoszenie nr: WIPO ST 10/C PL451249 z dn. 20.02.2025 „Koniugat zawierający antygenny peptyd i jego zastosowanie do zapobiegania zakażeniom bakteryjnym wywołanym przez bakterie *Shigella*”

(zgłoszenie patentowe)

Indywidualny wkład habilitantki jako twórcy zgłoszenia patentowego: pomysłodawca i koordynator przeprowadzonych badań; wykonawca części eksperymentów opisanych w przykładach do patentu (optymalizacja oraz synteza koniugatu białko-peptyd); opiekun merytoryczny Kariny Krasnej w analizie MALDI-TOF MS, SDS-PAGE, testach serologicznych (ELISA, Western-blot, dot-blot), technikach hodowli komórkowych; analiza danych, przygotowanie rycin i tabel; merytoryczne przygotowanie zgłoszenia patentowego (opisanie state of the art, wykonanie analizy rynku oraz potencjalnych rozwiązań konkurencyjnych, opisanie nowości wynalazku, przygotowanie rycin i opisów oraz przygotowanie ostatecznej wersji zgłoszenia; pozyskanie finansowanie na przeprowadzone badania z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBR) w programie Lider XIII, w ramach grantu: „Opracowanie innowacyjnej szczepionki peptydowej chroniącej przed rozwojem czerwonej bakteryjnej”

Summaryczna wartość punktacji cyklu publikacyjnego, w skład którego wchodzi cztery oryginalne i powiązane tematycznie publikacje naukowe wynosi **IF = 52,587**, co opowiada **MNiSW = 570 pkt**. Liczba cytowań według bazy Web of Science z dn. 21.03.2025 wynosi **290** (287 bez autocytowań).

Uwzględniono współczynnik IF oraz punkty MNiSW z roku, w którym prace zostały opublikowane. Dla publikacji, których IF nie został jeszcze określony podano IF z roku poprzedzającego publikację.

OPIS GŁÓWNYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

WPROWADZENIE | Białka to klasa makrocząsteczek, które pełnią różnorodne funkcje w komórce. Uczestniczą w metabolizmie oraz w szlakach przekazywania sygnałów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, zapewniają wsparcie strukturalne, pełnią funkcje nośników dla różnych substancji, a także rolę receptorów, enzymów, czy hormonów. Z drugiej strony białka oraz ich fragmenty – peptydy są ważnymi antygenami, które rozpoznawane przez układ immunologiczny prowadzą do wzbudzenia wysoce specyficznej odpowiedzi odpornościowej. Swoistość odpowiedzi na zadany antygen białkowy lub peptydowy jest ściśle zależna od ich sekwencji aminokwasowej i struktury przestrzennej.

Białka można zdefiniować za pomocą czterech poziomów strukturalnych: pierwszo-, drugo-, trzecio- i czwartorzędowego. Struktura pierwszorzędowa to unikalna sekwencja aminokwasów, które łączą się za pomocą wiązań peptydowych. Lokalne fałdowanie polipeptydów za pomocą wiązań wodorowych, takich jak α -helisy i β -kardki, stanowią strukturę drugorzędową. Ogólna struktura trójwymiarowa (3D) to struktura trzeciorzędowa. Składa się z trójwymiarowego kształtu, który powstaje, gdy „kręgosłup” łańcucha polipeptydowego wchodzi w interakcję ze środowiskiem wodnym oraz zaczyna się formować, gdy nowo

syntetyzowany łańcuch polipeptydowy opuszcza terminalny koniec kompleksu podjednostek rybosomu. Aby osiągnąć stabilność termodynamiczną łańcuch polipeptydowy sekwestruje hydrofobowe reszty i odsłania te, które są hydrofilowe. Stabilność termodynamiczna jest dodatkowo osiągana przez różne interakcje chemiczne, włączając w to wiązania wodorowe, siły van der Waalsa i wiązania jonowe. Gdy dwie lub więcej podjednostek białkowych łączy się, tworząc kompletną strukturę, konfiguracja ta przyjmuje strukturę czwartorzędową. Struktura i funkcja białka są ze sobą ściśle powiązane – każda zmiana kształtu spowodowana czynnikami chemicznymi lub fizycznymi np. zmianą temperatury lub pH może prowadzić do denaturacji białka i utraty jego właściwości. Z tego względu tak ważne jest monitorowanie oraz badanie zmian w strukturze, które zachodzą w różnych warunkach, a następnie wpływają na zmianę ich właściwości fizyko-chemicznych oraz aktywności w zakresie pełnionych przez nie funkcji [1, 2].

Temperatura ma ogromny wpływ na funkcjonalność wielu białek, włączając w to: interakcje białko-białko, ich aktywność enzymatyczną oraz podstawowe funkcje związane z ich aktywnością fizjologiczną i biologiczną, w tym utrzymanie homeostazy w komórce oraz zdolność komórek do adaptacji w zmieniających się warunkach środowiska [3]. Białka są cząsteczkami bardzo wrażliwymi na zmiany temperatury. Ich **termolabilność**, czyli skłonność do zmiany ich struktury pod wpływem podwyższonych temperatur ma kluczowe znaczenie w zachowaniu ich funkcjonalności. Wiadomo na przykład, że temperatura wpływa na przebieg reakcji enzymatycznych – podwyższona temperatura zwykle zwiększa szybkość reakcji ze względu na przyspieszony ruch cząsteczek. Jednakże, jeśli temperatura przekroczy optymalny zakres, aktywność enzymu może się następnie zmniejszyć z powodu postępującej denaturacji. Z tego względu, aby utrzymać optymalne warunki dla właściwego funkcjonowania białek organizmy często regulują swoją temperaturę wewnętrzną. Ponadto, niektóre organizmy, takie jak ekstremofile, ewoluowały, aby rozwijać się w ekstremalnych temperaturach.

W podwyższonych temperaturach zwiększona energia kinetyczna może zerwać słabe oddziaływania, które utrzymują drugo-, trzecio- i czwartorzędową strukturę tych cząsteczek. Znaczne podwyższenie temperatury otoczenia zmienia kształt białka i prowadzi do jego denaturacji. Tym samym prowadzi to do rozfałdowania białka oraz utraty jego funkcji. Ponadto, wyższe temperatury mogą destabilizować interakcje pomiędzy białkami oraz innymi cząsteczkami biologicznymi, potencjalnie wpływając na aspekty, takie jak sygnalizacja i regulacja metaboliczna. Podczas denaturacji dochodzi do zaburzeń struktury drugo-, trzecio- i czwartorzędowej funkcjonalnego białka, co powoduje zmiany jego cech fizycznych, chemicznych i biologicznych. Z tego względu temperatura jest krytycznym czynnikiem wpływającym na stabilność i funkcję białek. Z drugiej strony określone czynniki, w tym struktura I-, II-, III- i IV-rzędowa są często rozpatrywane jako czynniki determinujące termolabilność białek. Zrozumienie tych efektów jest kluczowe w takich dziedzinach jak biochemia, biologia molekularna, mikrobiologia i biotechnologia, gdzie kontrola temperatury musi być monitorowana podczas oczyszczania białek, badania aktywności enzymów i ich ogólnej funkcji komórkowej.

Z drugiej strony białka są cząsteczkami niezwykle immunogennymi i wpływają na wiele funkcji układu immunologicznego. **Immunogenność** białek jest rozumiana jako zdolność do

wzbudzania oraz modulowania odpowiedzi odpornościowej. Również w tym aspekcie struktura determinująca funkcjonalność białek pełniących rolę antygenów ma kluczowe znaczenie. Ludzki układ odpornościowy wykorzystuje złożony zbiór mechanizmów ochronnych do monitorowania i eliminowania substancji obcych i szkodliwych wnikających do organizmu. Aktywna reakcja na środowisko zewnętrzne jest definiowana jako odpowiedź immunologiczna, którą dzielimy na odpowiedź wrodzoną (pierwotną) i adaptacyjną (nabytą). Odpowiedź pierwotna jest niespecyficzną i szybką odpowiedzią na wszelkiego rodzaju patogeny i obejmuje bariery fizyczne, takie jak skóra i błony śluzowe, rozpuszczalne białka i bioaktywne małe cząsteczki, obecne w płynach ustrojowych np. białka dopełniacza lub uwalniane z komórek w miarę ich aktywacji, takie jak np. cytokiny. Adaptacyjna odpowiedź immunologiczna jest wyzwalana przeciwko specyficznym antygenom i opiera się przede wszystkim na receptorach usytuowanych na powierzchni limfocytów T i B, które generują silną i długotrwałą odpowiedź. Podczas pierwszej interakcji z nowym patogenem, organizm zaczyna produkować efekторы limfocytów T i B. Produkcję komórek efektorowych można podzielić na dwie różne odpowiedzi pierwotną, która jest wynikiem pierwszego narażenia na antygen oraz wtórną, która obejmuje komórki pamięci T i B [4]. Wtórna zdolność układu do odpowiedzi na wcześniej prezentowane antygeny jest w praktyce wykorzystywana do konstrukcji szczepionek, chroniących przed najgroźniejszymi patogenami.

Antygeny są rozpoznawane przez specyficzne receptory ekspozowane na powierzchni limfocytów B oraz T. W rzeczywistości limfocyty B rozpoznają determinanty antygenowe poprzez receptory antygenów, zwane receptorami komórek B (BCR), składające się z immunoglobulin związanych z błoną (przeciwciał), które mogą pośredniczyć w humoralnej odporności adaptacyjnej. Do wiązanie antygeny przez przeciwciała i BCR dochodzi w małej części fragmentu wiążącego antygen (Fab) określanego jako regiony determinujące komplementarność (ang. complementarity determining regions, CDR). Geny zmienne immunoglobuliny, które kodują CDR, przechodzą somatyczną hipermutację i dalszą selekcję pod kątem powinowactwa podczas kolejnych ekspozycji na antygen, co skutkuje wysoce specyficznym wiązaniem, zależnym zarówno od sekwencji jak i struktury antygeny. Regiony antygenów, które są wiązane przez CDR, nazywamy epitopami. Łańcuchy boczne aminokwasów CDR wiążą epitopy poprzez wiązania niekowalencyjne, które obejmują oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe, siły van der Waalsa i oddziaływania hydrofobowe. Fragment Fc (fragment krystalizujący) i regiony zawiasowe cząsteczek immunoglobulin nie biorą udziału w bezpośrednim kontakcie z antygenem; jednak regiony te mogą modulować ogólną strukturę przeciwciał, co może umożliwiać lub ograniczać wiązanie do epitopów strukturalnych [5]. Epitopy limfocytu B mogą być albo kolejnymi resztami aminokwasów w sekwencji białka antygeny, znanymi jako epitopy liniowe, albo mogą być nieciągłymi resztami aminokwasów, które oddziałują ze sobą, aby złożyć sekwencję białka w trójwymiarową strukturę konformacyjną, znaną jako epitopy konformacyjne [6]. Receptory komórek T (TCR), zlokalizowane na powierzchni komórek T, umożliwiają rozpoznawanie antygenów prezentowanych na powierzchni komórek prezentujących antygen (APC) związanych z cząsteczkami głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC). Epitopy te są prezentowane przez cząsteczki MHC I i MHC II, które są rozpoznawane przez dwa odrębne podzbiory komórek T: odpowiednio komórki T

CD4⁺ i CD8⁺. W tej sytuacji odpowiedź immunologiczna musi być starannie kontrolowana, aby zapobiec uwolnieniu tych szkodliwych mechanizmów przeciwko własnym tkankom gospodarza, a tym samym przeciwdziałać reakcjom autoimmunizacji. [7].

Limfocyty B odgrywają niezwykle ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej ssaków. Różnicują się w komórki plazmatyczne w odpowiedzi na stymulację antygenową przez bakterie i wirusy, wytwarzając przeciwciała zwalczające zakażenia bakteryjne i wirusowe. Identyfikacja epitopów limfocytów B w znacznym stopniu przyczyniła się do rozwoju biomedycyny, na przykład w ogólnym zrozumieniu mechanizmów odpowiedzi immunologicznej w odniesieniu do projektowania i opracowywania odpowiednich szczepionek. Identyfikacja i charakterystyka białek terapeutycznych jako antygenów jest niezwykle ważna z farmaceutycznego punktu widzenia. Do grupy tej zaliczamy zarówno białka w postaci przeciwciał terapeutycznych, jak i całe antygeny białkowe oraz ich fragmenty – peptydy, wykazujące zdolności do wzbudzania odpowiedzi układu immunologicznego. Z tego względu białka są idealnymi antygenami do konstrukcji szczepionek, w szczególności ze względu na to, iż niwelują występowanie skutków ubocznych, a także zapewniają wysoką specyfikę wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej.

Podczas pracy doktorskiej pracowałam nad wyznaczeniem immunogennych epitopów białka OmpC obecnego na powierzchni komórek *S. flexneri* 3a z wykorzystaniem szeregu technik bioinformatycznych, immunoenzymatycznych oraz chemicznej syntezy peptydów, aby wyznaczyć antygenowe fragmenty tego białka. Spośród kilku pętli obecnych w strukturze przestrzennej OmpC wytypowałam w drodze modelowania molekularnego oraz zastosowania technik bioinformatycznych zidentyfikowałam jedną reaktywną determinantę (epitop), którą testowałam w dalszych badaniach. W okresie tym zsyntetyzowałam również pierwsze koniugaty oparte o białka nośnikowe (BSA, KLH, OVA, TT) oraz liniowy peptyd stanowiący sekwencję epitopu, które wykazywały umiarkowaną reaktywność oraz immunogenność. Wyniki te zostały opublikowane w ramach mojej rozprawy doktorskiej (**Publikacje 5-8**, opisane poza cyklem habilitacyjnym). Tematykę związaną z projektowaniem prototypu szczepionki chroniącej przed rozwojem czerwonej bakteryjnej kontynuowałam po doktoracie oraz kontynuuję aktualnie po powrocie do kraju. W latach 2015-2022 przebywałam w Niemczech na stażu naukowym, gdzie prowadziłam badania nad termolabilnością białek z wykorzystaniem proteomiki. Dzięki zdobytym umiejętnościom, aktualnie kontynuuję badania nad termolabilnością białek w ramach realizacji projektu Meltome Atlas, jak również badania nad szczepionką chroniącą przed czerwonym bakteryjną z wykorzystaniem technik proteomicznych. Nowe metody proteomiczne, jakie poznałam podczas stażu pozwalają mi aktualnie badać sposób funkcjonowania prototypu szczepionki na poziomie molekularnym i zmierzać do wyjaśnienia mechanizmu jej działania na układ immunologiczny.

Podsumowując, od wielu lat prowadzę badania nad strukturą i funkcją białek oraz ich wzajemną korelacją. W głównej mierze koncentrowałam się nad poznaniem czynników wpływających na labilność termiczną białek, jak również patrzyłam na konsekwencje ich termicznej denaturacji. Dodatkowo, dużą część swojej pracy poświęciłam na badania immunogenności tych cząsteczek, w szczególności badanie wpływu konformacji białek i peptydów na wzbudzanie ochronnej odpowiedzi immunologicznej w kontekście ich

zastosowania jako antygenów do szczepionek podjednostkowych. Struktura białka odgrywa kluczowe znaczenie w tym zakresie oraz determinuje ich antygenowość i immunogenność.

OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ | Wybrane prace stanowią jednotematyczny cykl poświęconych badaniom nad charakterystyką struktury i funkcji białek prokariotycznych i eukariotycznych, w szczególności w ocenie ich właściwości termolabilnych i immunogennych. **Publikacja 1** jest efektem mojego wkładu w rozwój i rozbudowę bazy danych proteomicznych ProteomicsDB. Dzięki moim wynikom w ramach realizacji tego przedsięwzięcia baza ProteomicsDB została poszerzona o ~13 000 białek ludzkich pochodzących z meltomów (proteomów mierzonych w gradiencie temperatury) *Homo sapiens*. **Publikacja 2** stanowi efekt moich prawie **4-letnich badań** i jest poświęcona tematyce termolabilności białek wchodzących w skład organizmów modelowych znajdujących się na różnych poziomach drzewa filogenetycznego, poczynając od archeonów, poprzez bakterie, drożdże, robaki, ryby, myszy i kończąc na człowieku (łącznie ~ 48 000 białek). Ponadto, publikacja ta powiązana jest z utworzeniem bazy danych proteomicznych Meltome Atlas, która jest publicznie dostępna oraz stanowi cenne źródło informacji dla innych naukowców. Obie publikacje powstały w ramach realizacji mojego stażu doktorskiego w Katedrze Proteomiki i Bioanalizy na Politechnice w Monachium. Zrealizowane oraz będące aktualnie w toku realizacji projekty naukowe powiązane tematycznie z cyklem habilitacyjnym są przeze mnie kontynuowane w ramach grantów NCN (**Miniatura 7** – projekt zrealizowany; **Sonata Bis 13** – projekt w trakcie realizacji; oba granty dotyczą badań nad termolabilnością białek oraz rozbudową Meltome Atlas). Dwie pozostałe publikacje (**Publikacja 3 i 4**) związane są głównie z badaniem zdolności białek i peptydów bakteryjnych o różnych konformacjach do wzbudzania odpowiedzi immunologicznej. **Publikacja 3** powstała w ramach mojej pracy w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, IITD PAN we Wrocławiu. Badania przedstawione w tej publikacji są kontynuacją cyklu prac powstałych podczas mojej pracy doktorskiej (cykl prac, jaki powstał podczas mojego doktoratu został opisany poniżej, poza cyklem habilitacyjnym). Ponadto **Patent 1** uzyskany na ochronę koniugatów białko-peptyd jest związany z pracami nad immunogennością białek oraz ich wykorzystaniem do konstrukcji szczepionek antybakteryjnych. Badania nad prototypem szczepionki kontynuuję od 2 lat w ramach realizacji grantu NCBR (Lider XIII – grant mający na celu opracowanie prototypu szczepionki przeciwko czerwonce bakteryjnej). Projekt ten znajduje się w końcowej fazie realizacji, a jego efektem jest **Publikacja 4** oraz **Zgłoszenie patentowe 1**, wchodzące w skład cyklu habilitacyjnego. Dodatkowo, aktualnie realizuję grant **Fundacji Alexandra von Humboldta (AvH Research Linkage Grant)** na finansowanie współpracy międzynarodowej oraz kształcenia młodej kadry naukowej.

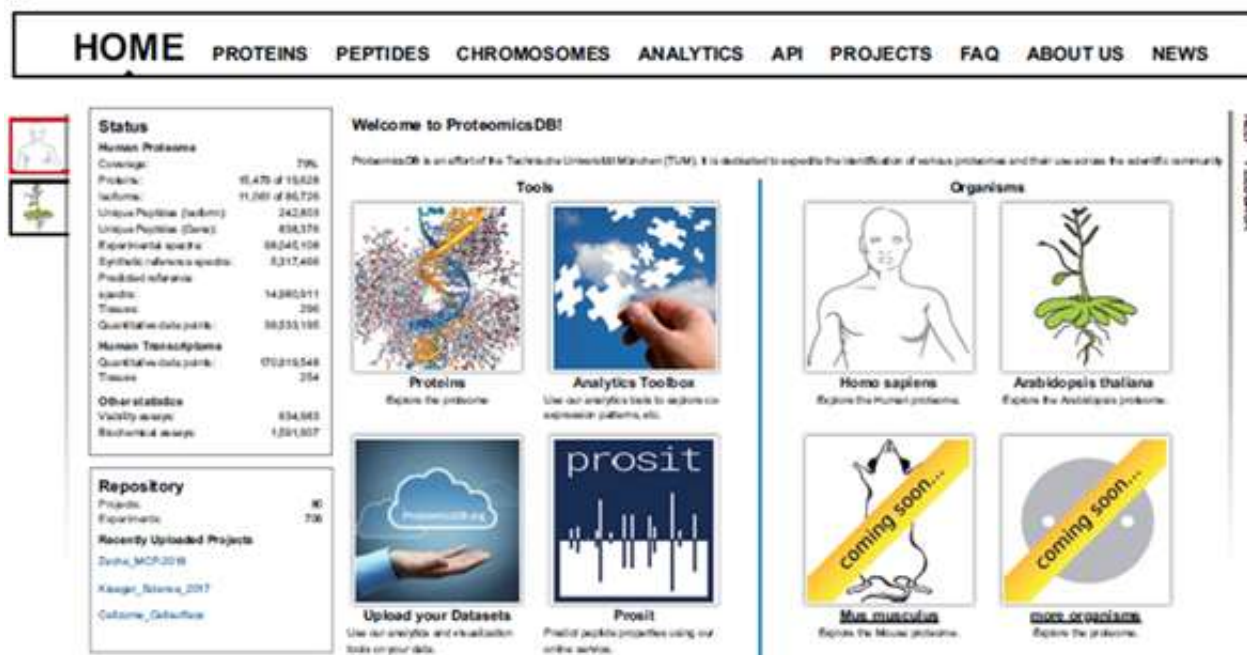
WKŁAD W ROZBUDOWĘ BAZY DANYCH ProteomicsDB | Głównym osiągnięciem cyklu prac dotyczących termicznej denaturacji białek jest utworzenie baz danych białkowych meltomów, opisujących termiczną denaturację białek na przestrzeni proteomów oraz w szerokim zakresie gradientu temperatur (ProteomicsDB oraz Meltome Atlas). Dane te są publicznie dostępne oraz stanowią cenne źródło informacji dla innych naukowców zajmujących się badaniem wpływu temperatury na denaturację termiczną białek. Dodatkowo wnikliwa

analiza właściwości determinujących strukturę oraz funkcję białek pozwoliła na wyciągnięcie globalnych wniosków dotyczących termicznej labilności tych cząsteczek, a przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na potwierdzenie właściwości wynikających z analizy danych liczbowych uzyskanych dla poszczególnych meltomów.

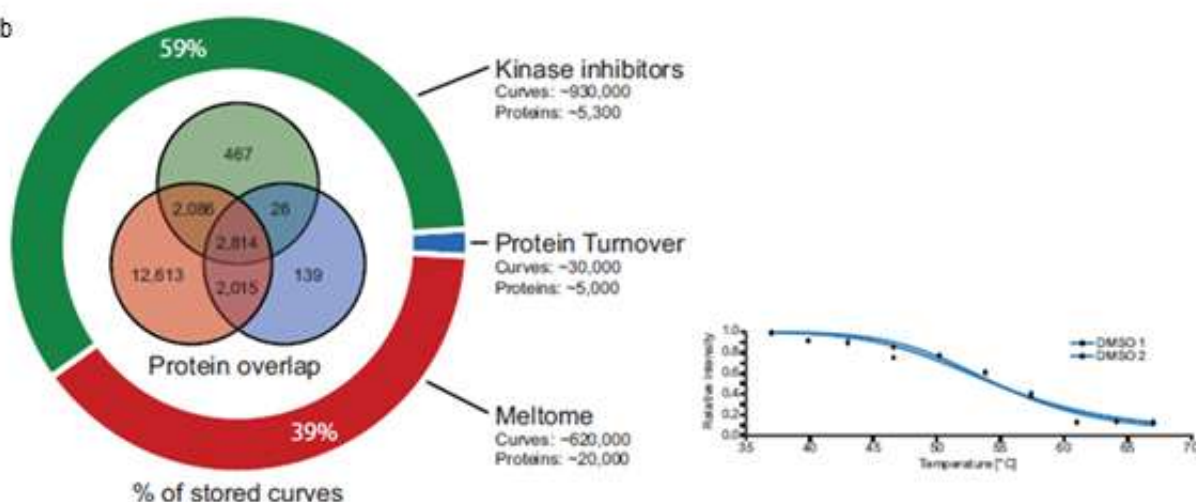
Pomimo tego, że zagadnienia związane z termiczną denaturacją białek są badane od dziesięcioleci to wiele czynników determinujących ich termolabilność nie jest do końca poznanych i dokładnie zrozumianych. Podczas realizacji mojego stażu podoktorskiego przez prawie 4 lata pracowałam nad czynnikami determinującymi stabilność termiczną białek z wykorzystaniem termicznego profilowania proteomów (ang. Thermal Proteome Profiling, TPP) – techniki proteomicznej opartej na spektrometrii mas. Pierwszym sukcesem tych badań było opublikowanie wyników dotyczących denaturacji ludzkich proteomów w bazie danych białkowych **ProteomicsDB** (Ryc. 1), które zostały opisane w publikacji: *Samaras P, Schmidt T, Frejno M, Gessulat S, Reinecke M, Jarzab A, Zecha J, Mergner J, Giansanti P, Ehrlich HC, Aiche S, Rank J, Kienegger H, Krcmar H, Kuster B, Wilhelm M: ProteomicsDB: a multi-omics and multi-organisms resource for life science research. Nucleic Acids Res. 2019 Oct 30 (Publikacja 1: H1)*. Udostępnione przeze mnie dane obejmują krzywe topnienia ~13 000 ludzkich białek, pochodzących z linii komórkowych oraz tkanek człowieka. Dzięki przekazaniu przez nas danych zawierających informacje dotyczące denaturacji białek z kilkudziesięciu ludzkich zestawów meltomów baza ta wzbogaciła się w informacje będące wskazówką dla innych naukowców pracujących z technikami opartymi o TPP. Dane te ułatwią przykładowo podjęcie decyzji na temat tego, który zakres temperatur powinni wybrać do swoich badań, aby właściwie monitorować przesunięcia w temperaturze topnienia (ang. melting point, T_m), które występują na skutek wiązania się białka z inną cząsteczką, np. lekiem. Techniki te wykorzystują zdolność białka do zmiany jego konformacji pod wpływem związania z inną cząsteczką, co następnie skutkuje zmianą jego wrażliwości na temperaturę, a tym samym zmianą T_m. Jest to niezwykle użyteczna informacja dla planowania eksperymentów przesiewowych służących poszukiwaniu nowych celów molekularnych dla potencjalnych leków, z wykorzystaniem technologii takich jak CETSA (ang. Cellular Thermal Shift Assay) czy ITDR (ang. Isothermal Dose Response Assay).

ProteomicsDB (<https://www.ProteomicsDB.org>) to baza danych, pierwotnie opracowana do eksploracji dużych ilości danych ilościowych pochodzących z danych proteomicznych opartych o spektrometrię mas, w tym tzw. „pierwszego szkicu ludzkiego proteomu” [8]. Oprócz wielu funkcji umożliwia ona badanie i analizę ilościową białek w różnych tkankach, liniach komórkowych i płynach ustrojowych w czasie rzeczywistym za pośrednictwem interaktywnych wykresów: map cieplnych (tzw. heatmaps), krzywych odpowiedzi na leki, czy krzywych opisujących denaturację białek pod wpływem temperatury. Obecnie ProteomicsDB oferuje wiele możliwości jej użycia w różnych dyscyplinach i dziedzinach nauki, obejmuje szeroki zakres danych oraz jest sukcesywnie rozwijana o kolejne organizmy, a także eksperymenty oparte na spektrometrii mas [9, 10].

a



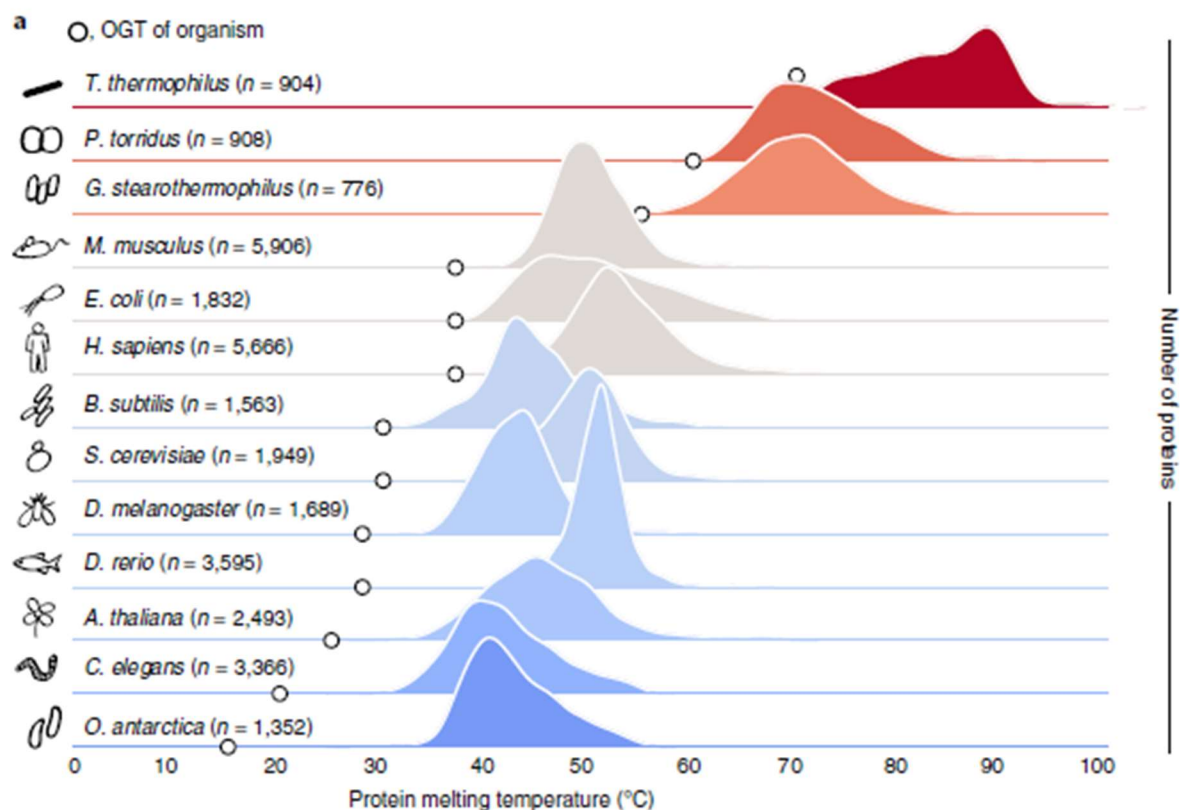
b



Ryc. 1. Baza danych ProteomicsDB. a) Strona główna ProteomicsDB została dostosowana tak, aby pomieścić nowe organizmy, a także dostarczać informacji o ilości różnych typów danych przechowywanych w bazie danych, w tym meltomów ludzkich **b)** Nowe dane zdeponowane z badań biochemicznych. Wykres kołowy po lewej stronie pokazuje rozkład danych z badań biochemicznych dostępnych dla trzech różnych zastosowań (dane pochodzące z inhibitorów kinaz, procesu syntezy i degradacji białek oraz meltomów ludzkich). Diagram Venna wewnątrz wykresu kołowego pokazuje nakładanie się białek, dla których dostępne są dane z badań biochemicznych odpowiedniego typu. Diagramy po prawej stronie pokazują przykładowe krzywe dla danych pochodzących z meltomów ludzkich (Zaadaptowano z Samaras et al, Nucl. Acid Res., 2019).

WKŁAD W POWSTANIE BAZY DANYCH Meltome Atlas | W toku kontynuacji tych badań, poza wieloma meltomami ludzkimi przeanalizowaliśmy proteomy 13 różnych organizmów modelowych znajdujących się na różnych poziomach drzewa filogenetycznego w

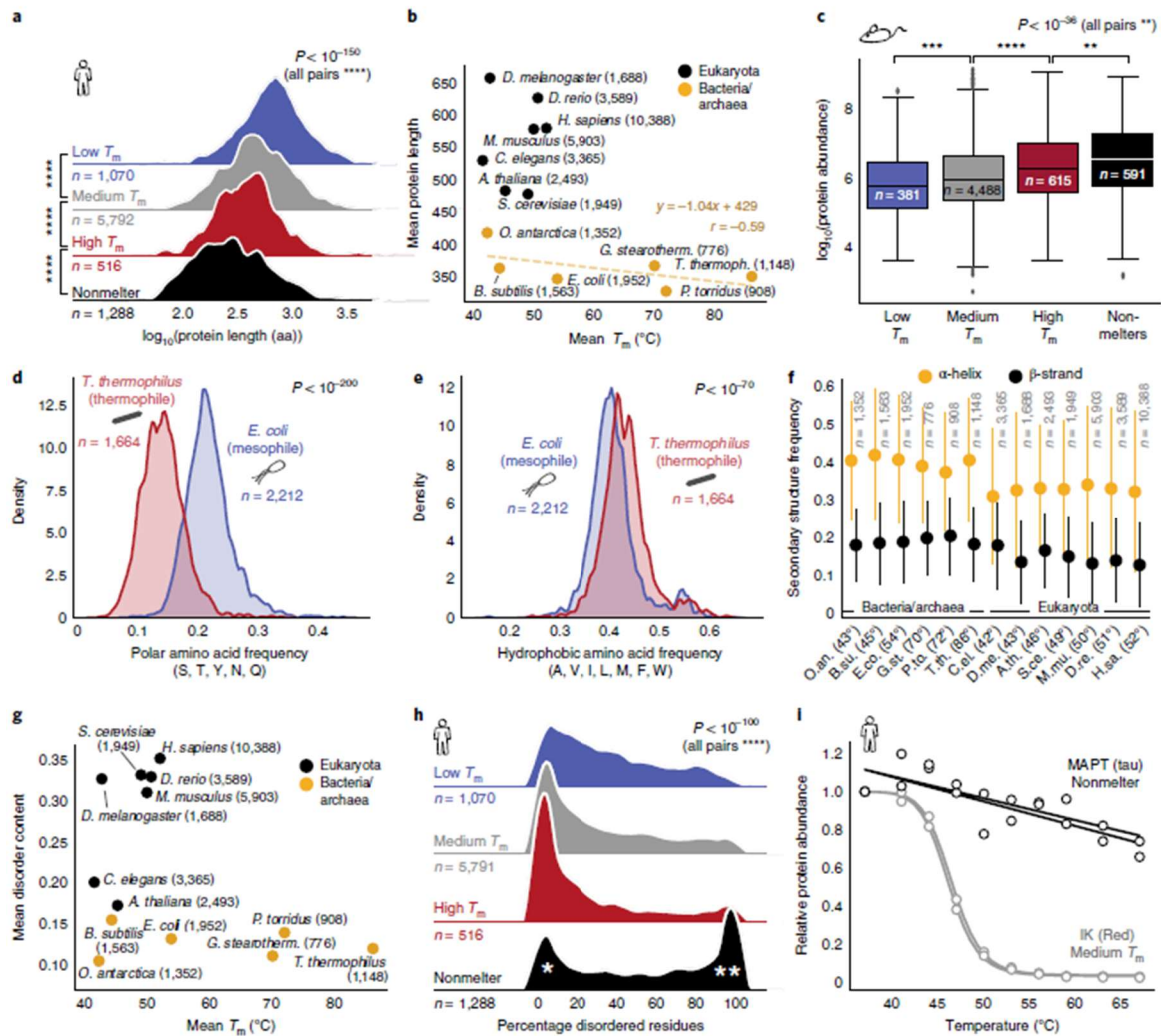
zakresie temperatur 30-90 °C (Ryc. 2). Ostatecznym rezultatem tych badań była baza danych proteomicznych – **Meltome Atlas** obrazujących krzywe topnienia ~48 000 białek.



Ryc. 2. Reprezentacja rozkładu topnienia (dystrybucja T_m) meltomów z 13 organizmów opisanych w Meltome Atlas (Zaadaptowano z Jarzab et al, Nature Meth, 2020).

Badania te przyczyniły się do powstania nowego terminu w obrębie nauk proteomicznych – **meltomiki**. Baza ta była nie tylko źródłem danych dla naszego zespołu – aktualnie wyniki tych prac są publicznie dostępne oraz używane przez naukowców na całym świecie. Wyniki oraz analiza danych zostały opisane w publikacji Jarzab A, Kurzawa N, Hopf T, Moerch M, Zecha J, Leijten N, Musiol E, Maschberger M, Stoeck G, Daly C, Samaras P, Mergner J, Spanier B, Angelov A, Werner T, Bantscheff M, Wilhelm M, Klingenspor M, Lemeer S, Liebl W, Hahne H, Savitski MM, Kuster B: Meltome Atlas – thermal proteome stability across the tree of life. Nature Methods 2020 May 17(5):495-503 (Publikacja 2: H2).

WYKAZANIE WPŁYWU STRUKTURY BIAŁEK NA ICH WŁAŚCIWOŚCI TERMOLABILNE | Systematyczna analiza meltomów różnych organizmów, żyjących w zróżnicowanych warunkach temperaturowych (od 4 °C do 70 °C) pozwoliła na ewaluację czynników mogących wpływać na stabilność termiczną białek, włączając w to: wielkość białka, częstotliwość występowania danego białka w komórce, zawartości struktur II-rzędowych (α -helis, β -katek), struktur nieuporządkowanych, a także wpływ zawartości niektórych grup aminokwasów, np. aminokwasów hydrofobowych, polarnych (Ryc. 3).



Ryc. 3. Molekularne determinanty stabilności termicznej białek. **a)** Analiza związku długości białka i T_m w obrębie gatunku na przykładzie *Homo sapiens*. Termicznie stabilne białka są zazwyczaj mniejsze niż białka nietrwale cieplnie. **b)** Analiza związku długości białka i T_m między gatunkami. Kółka oznaczają średnią T_m wszystkich białek u danego gatunku. Linia przerywana przedstawia analizę regresji liniowej średnich wartości T_m wśród prokariotów, ujawniając dość silne powiązanie, którego nie obserwuje się u eukariotów. **c)** Analiza związku częstości występowania białka i T_m komórek pochodzących ze szpiku kostnego myszy. **d)** Rozkład częstości występowania aminokwasów polarnych u *T. thermophilus* i *E. coli*. **e)** Rozkład częstości występowania aminokwasów hydrofobowych u *T. thermophilus* i *E. coli*. **f)** Częstość występowania elementów struktury drugorzędowej u wszystkich gatunków. **g)** Średnia zawartość nieuporządkowanych elementów struktury białek jako funkcja średniej T_m białek w każdym gatunku. **h)** Dystrybucja zawartości nieuporządkowanej struktury białek ludzkich w czterech kategoriach topnienia użytych w tym badaniu. **i)** Krzywe topnienia ($n = 2$) dla dwóch wysoce nieuporządkowanych białek wykazujących średnią (IK, białko czerwone) lub wysoką (tau) stabilność termiczną w komórkach U937. (Zaadaptowano z Jarzab et al, Nature Meth, 2020).

Jedną z najistotniejszych zależności opisanych w pracy była korelacja między wielkością białka a jego temperaturą topnienia. W badaniach zaobserwowaliśmy negatywną korelację pomiędzy wielkością białek oraz ich stabilnością termiczną w obrębie rozpatrywanego organizmu, np. u człowieka (Ryc. 3a). Prace innych autorów opisujące zależność pomiędzy wielkością oraz T_m białka wykonane na pojedynczych organizmach były kompatybilne z naszymi obserwacjami [11]. Natomiast skorelowanie średniej długości białka ze średnimi wartościami T_m u różnych organizmów oraz na przestrzeni 13 gatunków pozwoliło

na systematyczną analizę oraz wyciągnięcie globalnych wniosków. Dzięki systematycznej analizie stabilności białek prokariotycznych wykazaliśmy wyraźniejszy wpływ redukcji długości białka na zwiększenie jego stabilności termicznej. Jest to interesujące, ponieważ dane dotyczące różnych gatunków prokariotycznych wskazują, że życie w wyższych temperaturach wiąże się z koniecznością ograniczenia rozmiaru białka – dotyczy to w szczególności organizmów ekstermofilnych. Zgodnie z tym, zwiększenie stopnia upakowania białka i obciążenie pętli wystawionych na działanie rozpuszczalnika należą do czynników ewolucyjnych, które mogą sprawić, że białka będą wyjątkowo termostabilne. Dodatkowo, nie znaleźliśmy takiego związku dla gatunków eukariotycznych, które w większości żyją w zmiennych temperaturach otoczenia oraz u których obecne są liczne mechanizmy termoregulacji (Ryc. 3b). Badania te pokazują, jak cenny jest dostęp do szerokiego zakresu informacji (obszernej bazy danych), w naszym przypadku różnych organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Ponadto, wyniki te pokazują, że wnioski wyciągnięte na podstawie analizy pojedynczych organizmów mogą prowadzić do zupełnie innych konkluzji niż wnioski wyciągnięte na podstawie rozległej systematycznej analizy opartej o dużą ilość danych.

W badaniach nad Meltome Atlas, w większości naszych zestawów danych zaobserwowaliśmy ogólny trend pokazujący zależność częstotliwości występowania białka w komórce z jego stabilnością termiczną. Efekt ten był bardziej wyraźny w przypadku białek nieulegających denaturacji (Ryc. 3c). Niemniej jednak, korelacje te były bardzo słabe, a rozmiary efektu bardzo małe, więc częstotliwości występowania białka w komórce nie można było uznać za dobry predyktor stabilności termicznej. Nasze wyniki pokazały dużo słabszy efekt potwierdzający pozytywną korelację częstości występowania białka z jego termostabilnością, niż pokazały to inne grupy badawcze pracujące na pojedynczych organizmach np. *E. coli* [11].

Podczas badań wykazano wiele zależności pomiędzy strukturą pierwszorzędową a stabilnością termiczną białek. Przeanalizowaliśmy skład aminokwasowy i zaobserwowaliśmy, że białka *T. thermophilus* mają znacznie niższą zawartość cysteiny (Cys) niż inne gatunki. W przypadku większości innych aminokwasów rozpatrywanych indywidualnie nie zaobserwowaliśmy wyraźnych powiązań. Jednak po pogrupowaniu według pewnych właściwości, odkryliśmy, że białka gatunków termofilnych, takich jak *T. thermophilus* zawierały znacznie mniej aminokwasów polarnych niż białka mezofilnej *E. coli* (Ryc. 3d). Ponadto, białka *T. thermophilus* miały nieco wyższą częstotliwość występowania aminokwasów hydrofobowych (Ryc. 3e), co ułatwia przetrwanie w wyższych temperaturach, ponieważ zwiększenie oddziaływań hydrofobowych w rdzeniu prowadzi do tworzenia i utrzymania bardziej stabilnych struktur białkowych.

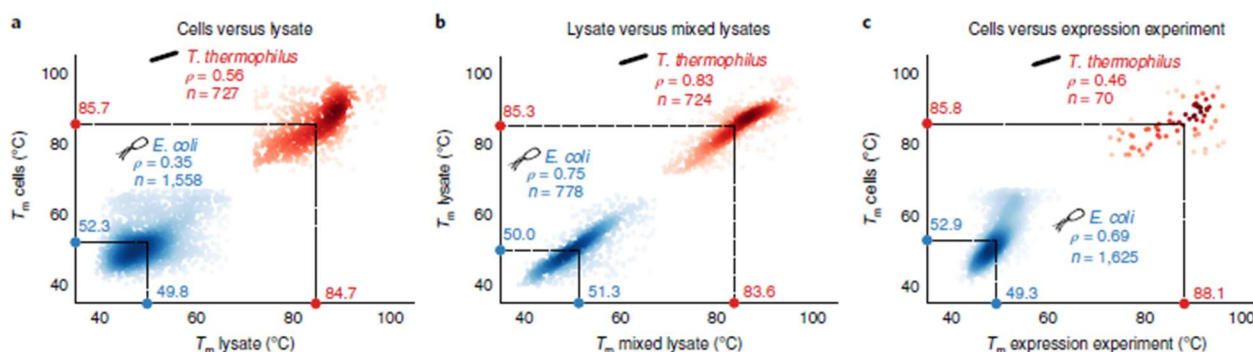
Globalna analiza wykazała znaczące różnice w obecności struktur II-rzędowych (α -helis, pętli lub β -katek) między bakteriami i eukariotami (Ryc. 3f). Z drugiej strony ich względne proporcje były niemal identyczne między różnymi bakteriami, mimo że ich optymalne temperatury wzrostu (ang. optimal growth temperature, OGT) różniły się o ponad 50 °C. Sugeruje to, że oddziaływania w strukturze II-rzędowej nie odgrywają kluczowego znaczenia w stabilności termicznej białek.

Dodatkowo, podczas analizy naszych danych zauważyliśmy, że pętle i nieuporządkowane regiony są znacznie bardziej powszechne w białkach eukariotycznych niż u organizmów prokariotycznych (Ryc. 3g). Z tego względu skupiliśmy się też na ocenie, czy zakres nieuporządkowanych regionów w białkach człowieka może być dobrym predyktorem ich stabilności termicznej. Poprzednie prace z wykorzystaniem lizatów wykazały, że białka z dużym udziałem nieuporządkowanych regionów są często niestabilne termicznie i wykazują podobne zachowanie podczas topnienia jak białka ustrukturyzowane [11]. Analiza termicznej denaturacji białek ludzkich potwierdziła tę obserwację dla całych komórek. Dodatkowo, poza standardowym monitorowaniem T_m wprowadzona przez nas klasyfikacja oparta na AUC (ang. area under the curve) pozwoliła na rozszerzenie analizy na białka nieulegające topnieniu (ang. non-melters). Wbrew wcześniejszym publikacjom, nasze analizy wykazały, że białka nieulegające denaturacji (non-melters) były najsilniej wzbogacone w regionach nieuporządkowanych. Ponadto, nietopliwe białka wykazywały bimodalny rozkład pod względem nieuporządkowanych struktur (Ryc. 3h). Analiza ontologii genów wykazała, że białka nieulegające denaturacji o małej zawartości struktur nieuporządkowanych były silnie wzbogacone w białka zawierające domenę transbłonową, białka z domenami zewnątrzkomórkowymi, białka glikozylowane, białka wydzielane z peptydami sygnałowymi i białka zawierające wiązania disiarczkowe. To wszystko stanowi uzasadnienie, dlaczego białka te nie wytrącają się w wyższych temperaturach. Natomiast białka termostabilne, ale wysoce nieustrukturyzowane, były silnie wzbogacone w białka jądrowe i białka ulegające fosforylacji. Dobrym przykładem potwierdzającym to zachowanie jest białko Tau, które jest znane ze swojej odporności termicznej oraz jednocześnie należy do grupy białek wysoce nieuporządkowanych [12]. Z drugiej strony spliceosomalne białko IK jest również w dużej mierze nieuporządkowane, ale w naszych badaniach wykazuje dość niską temperaturę topnienia $T_m \sim 47^\circ\text{C}$ (Ryc. 3i). Z tego względu możemy wnioskować, że istnieje bardziej złożona relacja między strukturą nieuporządkowaną a stabilnością termiczną białka niż wcześniej sądzono.

Nasze wyniki pochodzące z korelacji danych strukturalnych białek oraz termolabilności białek wykazały, że stabilność białka jest w dużej części, wewnętrzną właściwością białek zakodowanych w ich pierwotnej sekwencji. Naturalną konsekwencją dalszej analizy termolabilności białek było sprawdzenie czy właściwość ta jest zachowana ewolucyjnie między różnymi gatunkami, a także czy jest ona kształtowana w toku ewolucji. Hipotezę tą przetestowaliśmy, porównując względne stabilności białek u wszystkich 13 gatunków, obliczając korelacje między AUC ortologicznych białek. Hierarchiczna klasteryzacja współczynników korelacji przybliżyła znaną relację filogenetyczną między analizowanymi gatunkami, z dwoma szerokimi klastrami dla bakterii/archeonów i eukariotów. Podgromada eukariotyczna w większości podążała za drzewem gatunków eukariotów od drożdży do ssaków, przy czym najwyższą korelację wykazano między myszami i ludźmi, czego można było oczekiwać na podstawie stosunkowo niewielkiej odległości ewolucyjnej między tymi dwoma gatunkami. Odkrycia te sugerują, że stabilność białka jest przynajmniej częściowo zachowaną właściwością, ale stale zmniejsza się w miarę rozchodzenia się sekwencji i nacisków środowiskowych, które je kształtują.

WYKAZANIE, ŻE SEKWENCJA AMINOKWASOWA MA KLUCZOWE ZNACZENIE W TERMICZNEJ STABILNOŚCI BIAŁEK | Znaczącym osiągnięciem

badan przeprowadzonych w eksperymentalnej części Meltome Atlas było wykazanie, że sekwencja i struktura aminokwasów są ważnymi czynnikami determinującymi stabilność termiczną białek. Badania innych grup badawczych sugerowały również, że otoczenie środowiska, w szczególności innych białek i cząsteczek w komórkach mają znaczący wpływ na termolabilność białek [13].



Ryc 4. a) Porównanie temperatur topnienia białek z *E. coli* i *T. thermophilus* uzyskanych przez ogrzewanie nienaruszonych komórek lub ich lizatów w oddzielnych eksperymentach, **b)** Porównanie temperatur topnienia białek z *E. coli* i *T. thermophilus* uzyskanych przez ogrzewanie ich lizatów w oddzielnych eksperymentach oraz po zmieszaniu obu lizatów przed ich ogrzaniem, **c)** Porównanie temperatur topnienia białek z *E. coli* i *T. thermophilus* uzyskanych przez ogrzewanie nienaruszonych komórek oraz białek *T. thermophilus* wyekspresjonowanych w *E. coli* a następnie podgrzanych. Mediana temperatury topnienia dla każdego gatunku i eksperymentu jest oznaczona liniami przerywanymi i kolorowymi kółkami, a korelacja temperatur topnienia w obrębie gatunku jest podana za pomocą współczynników korelacji Spearmana.

Porównanie profili termicznego topnienia białek w całych komórkach w porównaniu z lizatami (Ryc. 4a), używając mezofilnego szczepu *E. coli* (OGT 37 °C) oraz termofilnego szczepu *T. thermophilus* (OGT 70 °C) nie wykazała dużych różnic. Mediana wartości T_m białek z obu gatunków różni się o ponad 30 °C. Niemniej jednak różnica w T_m pokazująca różnice między komórkami a lizatami jest niewielka (~1-2 °C). Przyczynami tych różnic może być jedynie utrata błon podczas lizy, rozerwanie kompleksów białkowych, obecność osmoprotektantów i rozcieńczenie białek, kofaktorów lub innych substancji występujących w całych komórkach w dużo większych stężeniach.

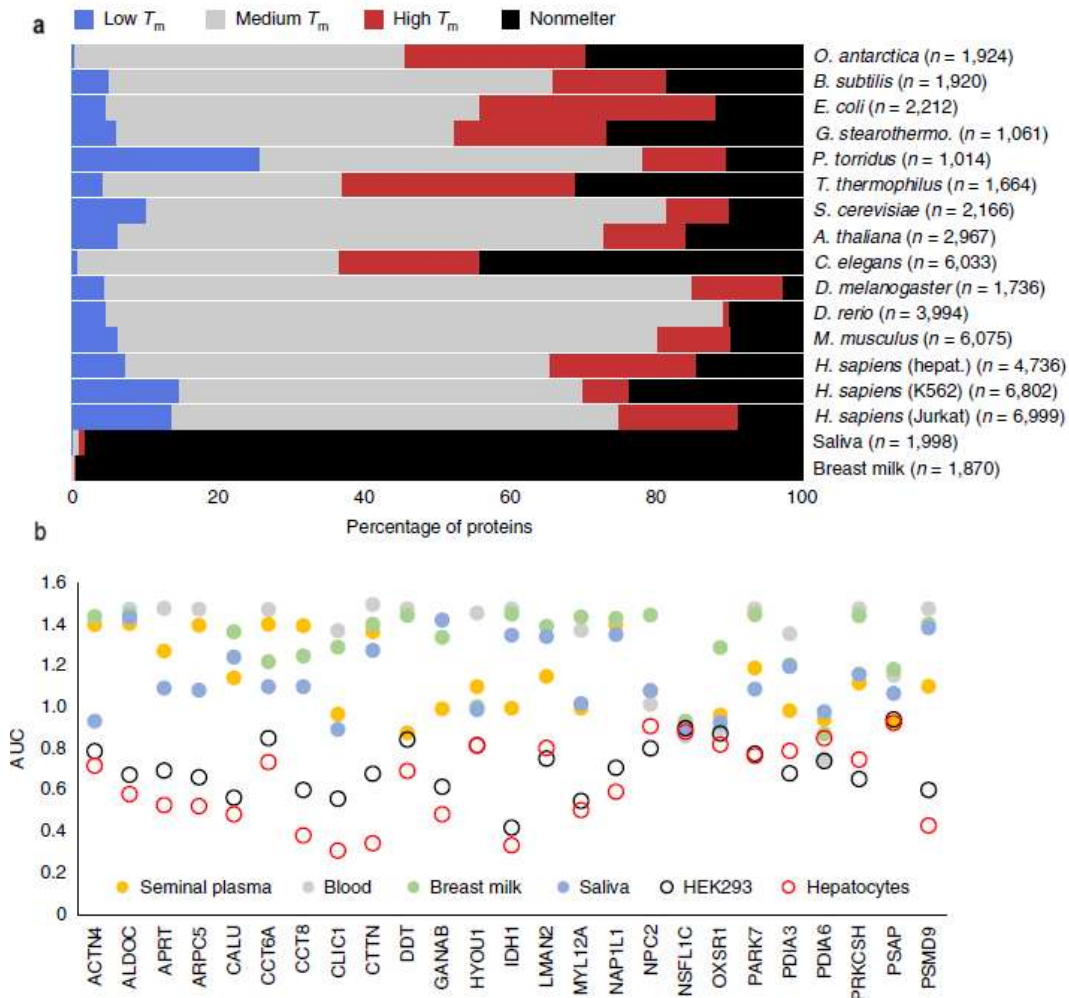
Wykazaliśmy również, że sama obecność białek z jednego gatunku nie ma istotnego wpływu na zachowanie się białek z drugiego gatunku podczas topnienia. Pokazaliśmy, że przygotowane oddzielnie lizaty z obu gatunków i wymieszane w równych ilościach przed podgrzaniem (Ryc. 4b) nie wpływają na zwiększenie/zmniejszenie temperatury indywidualnych białek z obu gatunków. Mediana wartości T_m dla obu gatunków była niemal identyczna jak ta uzyskana w eksperymentach z oddzielnymi lizatami. Dodatkowo wyniki z lizatu były znacznie ściślej skorelowane niż eksperyment komórka vs. lizat, co wskazuje, że kontekst komórkowy ma wpływ na stabilność białka i może zmieniać stabilność białek o 1-2 °C.

Najistotniejszym osiągnięciem wynikającym z przeprowadzenia kolejnego eksperymentu było wykazanie kluczowego znaczenia sekwencji aminokwasowej białka w jego stabilności termicznej. Po ekspresji kilkuset białek *T. thermophilus* w komórkach *E. coli* i podgrzaniu zaobserwowaliśmy, że wartości T_m białek z obu gatunków były w dużej mierze niezmiennione (Ryc. 4c). Co ważne białka *T. thermophilus* zachowały swoją ogromną stabilność termiczną pomimo tego, że zostały wyekspresjonowane w organizmie mezofilnym *E. coli*. Łącznie pokazuje to, że sekwencja jest jednym z dominujących czynników determinujących absolutną stabilność termiczną białka, ale że środowisko komórkowe również ma znaczenie.

WYKAZANIE PODWYŻSZONEJ STABILNOŚCI TERMICZNEJ BIAŁEK WYSTĘPUJĄCYCH W PŁYNACH USTROJOWYCH CZŁOWIEKA | Porównując równolegle eksperymenty TPP na ludzkich komórkach i lizatach, wykazano, że białka mogą wykazywać różnice w zależności od lokalizacji komórkowej [14]. Dysponując rozległym zakresem danych w Meltome Atlas poszerzyliśmy te analizy. Analiza ogólnej termostabilności białek z wykorzystaniem podziału na białka denaturujące w niskich, średnich i wysokich temperaturach oraz dodatkowo białka nie ulegające denaturacji wykazała przeważający odsetek białek nie ulegających denaturacji w płynach ustrojowych człowieka (Ryc. 5a). Wyniki TPP dla białek wewnątrzkomórkowych zidentyfikowanych w płynach ustrojowych człowieka wykazały, że stężenie białka również odgrywa dużą rolę w utrzymaniu ich stabilności termicznej.

Z tego względu porównaliśmy zdolność do denaturacji białek występujących w płynach ustrojowych człowieka oraz tych samych białek występujących w komórkach. W przypadku 25 przykładowych białek widać, że są one ogólnie bardziej rozpuszczalne w płynach ustrojowych niż w komórkach podczas ogrzewania (Ryc. 5b). Wydaje się, że białka obecna w płynach ustrojowych nie są w stanie agregować, ponieważ ich indywidualne stężenia są bardzo niskie. Nie mogą również współagregować z innymi białkami pomimo wysokiego ogólnego stężenia białka w płynach ustrojowych, ponieważ te ostatnie zazwyczaj nie wytrącają się podczas obróbki cieplnej. Kolejną możliwością jest obecność emulgatorów hamujących agregację, takich jak lecytyny, w mleku ludzkim [15].

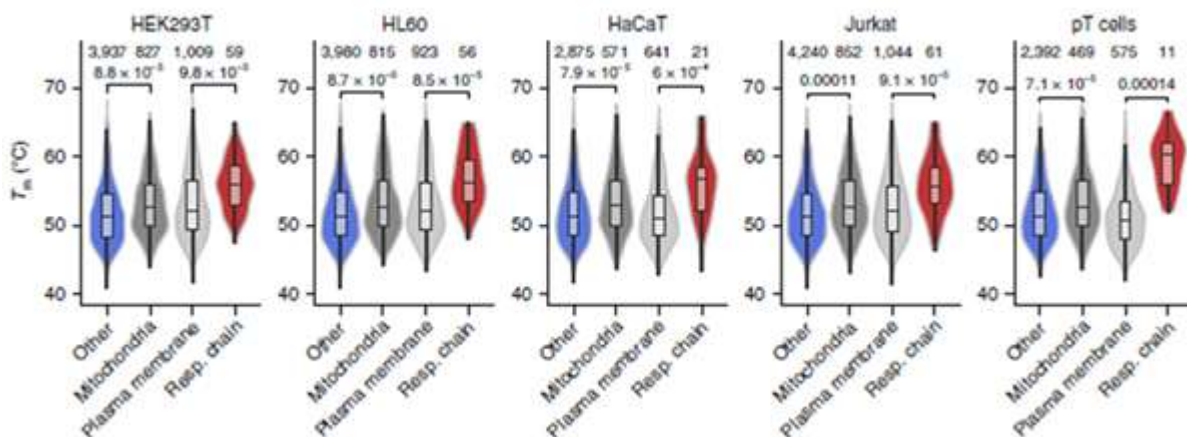
Znaleźliśmy wiele przykładów białek koagregujących, które są częścią kompleksów białkowych [16]. Po porównaniu zachowania TPP kompleksu Arp2/3 u danio pręgowanego i u człowieka, wydaje się, że kompleksy białkowe są konserwatywne pod względem tego, jak ściśle są złożone, nawet jeśli ich bezwzględne wartości T_m są zasadniczo różne. Dodatkowo, dokonaliśmy systematycznej analizy *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *D. rerio*, bazy danych EcoCyc, *E. coli*, drożdży i *D. melanogaster* [17, 18, 19, 20], co potwierdziło, że ko-denaturacja podjednostek kompleksów białkowych jest często konserwatywna nawet u odległych gatunków. Jak zaobserwowali Tan i in. dla komórek ludzkich [16] i Mateus i in. w przypadku *E. coli* [14]. Podejście to pozwoliło na zbadanie większej liczby kompleksów w przypadku eksperymentów przeprowadzonych na nienaruszonych komórkach jakie przeprowadzono w badaniach nad Meltome Atlas niż na lizatach, jakimi dysponowali inni badacze.



Ryc. 5. Odporność termiczna białek występujących w płynach ustrojowych. a) Dystrybucja charakterystyk topnienia białek w różnych próbkach biologicznych pochodzących z Meltome Atlas z ich klasyfikacją na białka o niskiej, średniej, wysokiej temperaturze topnienia oraz białka nie ulegające denaturacji, **b)** Analiza stabilności termicznej 25 wewnątrzkomórkowych białek ludzkich (wyrażonej jako AUC) wykrytych w osoczu nasienia, krwi, mleku kobiecym, ślinie, komórkach HEK293 i pierwotnych hepatocytach, (Zaadaptowano z Jarzab et al, Nature Meth, 2020).

WYKAZANIE, ŻE BIAŁKA WCHODZĄCE W SKŁAD MITOCHONDRIALNEGO ŁAŃCUCHA ODDECHOWEGO SĄ STABILNE TERMICZNIE ORAZ FUNKCJONUJĄ W TEMPERATURACH PRZEKRACZAJĄCYCH 46 °C | Badania literaturowe sugerowały, że mitochondria w komórkach ludzkich są fizjologicznie utrzymywane w temperaturze zbliżonej do 50 °C, a niektóre rezydujące enzymy, zwłaszcza w kompleksach II, III i IV, mają maksymalną aktywność w zakresie 46–50 °C [21]. Przeprowadzona przez nas globalna analiza przez wszystkie dostępne linie komórkowe ludzkie wykazała, że białka łańcucha oddechowego są szczególnie termostabilne w porównaniu do innych białek mitochondrialnych, innych białek błonowych i ogólnie wobec całej puli białek wchodzących w skład proteomów ludzkich (Ryc. 6a). Obserwacje te prowadzą do logicznych konkluzji, ponieważ znaczna ilość energii jest rozpraszana w miejscu oddychania w mitochondriach w wyniku wycieku i przemieszczania się protonów, co wskazuje również na

znaczną generację ciepła w tych obszarach. Aby zapobiegać uszkodzeniom termicznym całego proteomu mitochondrialnego i komórkowego, białka łańcucha oddechowego wystawione na działanie ciepła muszą być wystarczająco stabilne, aby zachować swoją funkcjonalność. Wyniki analiz proteomicznych kontynuowane w warunkach eksperymentalnych, dzięki pomiarowi tempa oddychania komórek nienaruszonych i permeabilizowanych na modelu ludzkiej embrionalnej linii nerki 293 (HEK293) w różnych temperaturach wykazały, że tempo oddychania nienaruszonych komórek, oparte na funkcjonalnych enzymach glikolitycznych, gwałtownie spada w temperaturach powyżej 42 °C. Natomiast permeabilizowane komórki, które były zewnętrznie zaopatrywane w substraty dla łańcucha oddechowego, miały zbliżone do normalnego tempo oddychania w temperaturach ~46 °C, co potwierdza hipotezę, że białka łańcucha oddechowego mogły ewolucyjnie przystosować się do wyższych lokalnych temperatur poprzez zwiększenie swojej stabilności termicznej.



Ryc. 6. Stabilność cieplna białek łańcucha oddechowego mitochondriów. Rozkład temperatur topnienia białek mitochondrialnych, błony plazmatycznej i łańcucha oddechowego w porównaniu z innymi białkami (Zaadaptowano z Jarzab et al, Nature Meth, 2020).

Wyniki analiz, jakie przedstawiliśmy w Meltome Atlas są tylko częścią ogromnej ilości informacji, które ciągle ukryte są w opublikowanej przez nas bazie danych. Ze względu na to, że baza ta jest dostępna publicznie jest ona często eksplorowana przez innych badaczy, którzy wykorzystują nasze wyniki, a tym samym stanowi istotny wkład nie tylko w nasze badania własne, ale jednocześnie służy całej społeczności, która prowadzi badania dotyczące termicznej labilności białek. Moje aktualne badania prowadzone w ramach realizacji **grantu NCN Sonata Bis 13** zmierzają w kierunku rozszerzenia bazy Maltome Atlas o kilkanaście meltomów bakteryjnych.

WKŁAD W BADANIA NAD OPRACOWANIEM SZCZEPIONKI CHRONIĄCEJ PRZED CZERWONKĄ BAKTERYJNĄ ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNYCH OPRACOWANYCH ANTYPGENÓW | Poza obszernymi badaniami nad funkcjonalnością białek związaną z ich termolabilnością oraz

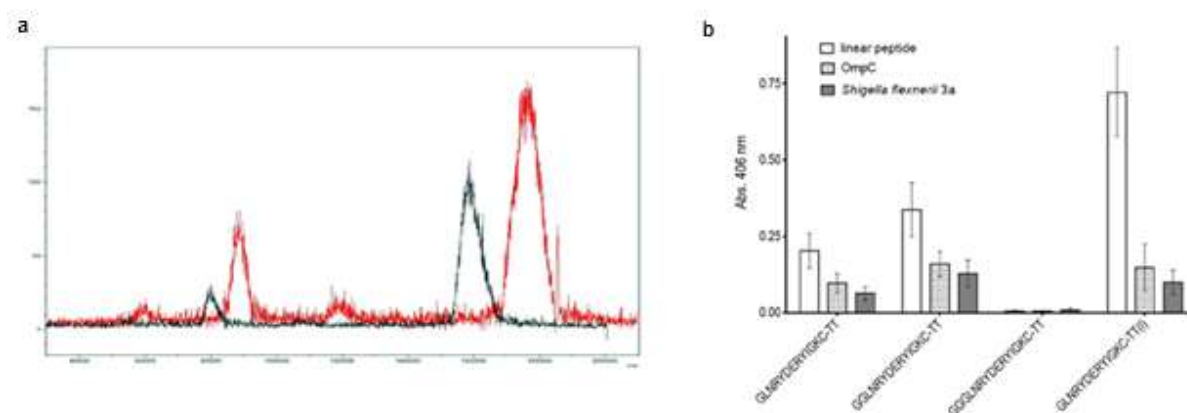
strukturą i funkcją białek kontynuowałam również badania związane z wpływem różnych konformacji strukturalnych białek bakteryjnych. W szczególności zajęłam się wpływem białka OmpC oraz jego epitopu peptydowego w różnych konformacjach (epitopu liniowego/konformacyjnego) na wzbudzanie ochronnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko pałeczkom *Shigella*.

WYKAZANIE WPŁYWU KONFORMACJI EPITOPU CYKLICZNEGO I LINIOWEGO NA ANTYPGENOWOŚĆ ORAZ IMMUNOGENNOŚĆ |

W swoich badaniach po doktoracie skupiałam się nad optymalizacją epitopu białka OmpC, jak również rozwikłaniem zagadnień związanych z ogólną immunogennością białka OmpC. Ze względu na to, że poziom wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej względem liniowego epitopu okazał się niewystarczający do uzyskania ochronnej odpowiedzi immunologicznej zdecydowaliśmy się na syntezę koniugatów, opartych o epitopy cykliczne. W badaniach tych zsyntetyzowano kilka różnych peptydów zawierających epitop peptydowy o różnej długości, który konformacyjnie był zamknięty – miał imitować naturalne tworzenie się pętli występującej na powierzchni białka OmpC wystającej na zewnątrz komórki bakteryjnej. Badania te zostały opisane w publikacji: Jarzab A, Witkowska D, Ziomek E, Setner B, Czajkowska A, Dorot M, Szewczuk Z, Gamian A: Cyclic OmpC peptidic epitope conjugated to tetanus toxoid as a potential vaccine candidate against shigellosis. *Vaccine*. 2018 Jul 25;36(31):4641-4649 (Publikacja 3: H3) oraz dostarczają informacji na temat wpływu różnych konformacji epitopów białkowych na odpowiedź immunologiczną, a tym samym stanowią cenny wkład w projektowanie peptydów mających stanowić antygeny szczepionkowe. Dodatkowo wyniki opublikowane w publikacji 3 zostały opatentowane. W patencie: Jarzab A, Witkowska D, Ziomek E, Gamian A: „Immunogenic conjugate and its use in the prophylaxis and treatment of infections caused by Enterobacteriaceae”. *Patent międzynarodowy: WO2016/012951A1, 28.01.2016 oraz patent polski: PL235826B1, 02.11.2020 (Patent 1: H5)* zastrzeżono sekwencje oraz wykorzystanie koniugatów opartych o stworzone przez nas koniugaty z peptydami cyklicznymi.

W **Publikacji 3** użyto peptydu zawierającego sekwencję epitopu białka OmpC GLNRYDERYIGK, który poddano cyklizacji. Testowano 3 różne koniugaty z peptydami różniącymi się wielkością pętli, dzięki zastosowaniu jej przedłużenia resztami glicyny (Gly). Cyklizacji poddano naturalną sekwencję peptydu (cyclic-GLNRYDERYIGK), oraz odpowiednio pętlę powiększoną o 1 (cyclic-GGLNRYDERYIGK) i 2 reszty Gly (cyclic - GGGLNRYDERYIGK). W badaniach testowano również natywny liniowy peptyd GLNRYDERYIGK. Wszystkie peptydy były koniugowane do białka nośnikowego TT (*Tetanus toxoid*) za pomocą technik opartych o tzw. metodę click chemisty. Wyniki skuteczności koniugacji monitorowano technikami analitycznymi SDS-PAGE oraz z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-TOF-MS (Ryc. 7a). Koniugacja peptydów z większym nośnikiem miała na celu podniesienie immunogenności peptydów (same cząsteczki peptydów są haptenami oraz są zbyt małe, aby mogły wzbudzać odpowiedź związaną z przeciwciałami) oraz polepszenia ich stabilności w surowicy.

Pokazaliśmy, że peptyd pre-inkubowany w surowicy mysiej był bardzo szybko trawiony, co zobrazowały badania z wykorzystaniem HPLC (ang. High Performance Liquid Chromatography). Pokazały one tempo zanikania całego peptydu oraz jego rozkładu do mniejszych fragmentów. Peptydy cykliczne wykazywały okres półtrwania ~ 1 h, natomiast peptyd liniowy był rozkładany w przeciągu kilku minut od jego zawieszenia w surowicy mysiej. Wykazano polepszenie stabilności w surowicy peptydów o strukturze cyklicznej w stosunku do peptydów liniowych. Następnie przetestowano właściwości immunogenne koniugatów: trzy koniugaty oparte o peptydy cykliczne oraz 1 zawierający liniowy epitop użyto w badaniach na myszach. Wykazano, że najbardziej reaktywne serum uzyskano po immunizacji koniugatem zawierającym liniowy peptyd (GLNRYDERYIGC-TT). Trzy inne surowice również wykazały najwyższą aktywność w stosunku do liniowego peptydu GLNRYDERYIGC. Najmniej reaktywne było serum uzyskane po immunizacji koniugatem z cyklicznym peptydem GGGLNRYDERYIGC-TT, co sugeruje, że rozszerzona pętla w cyklicznym peptydzie mogła zniekształcić konformację epitopu oraz doprowadzić do utraty jego właściwości immunogennych. W badaniach pokazaliśmy, że najbardziej reaktywne były surowice uzyskane od myszy immunizowanych koniugatem peptydu cyklicznego-TT z 2 resztami glicyny jako łącznikiem (cyclic-GGLNRYDERYIGC-TT). W tym przypadku surowica uzyskana dla peptydu cyklicznego: cyclic-GGLNRYDERYIGC wykazała wyższą aktywność niż surowica wytworzona dla koniugatu peptydu liniowego-TT. Te wyniki sugerowały, że peptydy cykliczne mogą indukować produkcję przeciwciał lepiej rozpoznających konformację natywnego epitopu zarówno na białku OmpC, jak i na powierzchni komórki bakteryjnej (Ryc. 7b).



Ryc. 7. Koniugat oparty o epitop peptydowy oraz białko nośnikowe TT. a) Analiza koniugatu pozwalająca na określenie stopnia obsadzenia białka nośnikowego (kolor czarny), peptydami stanowiącymi sekwencje epitopu (kolor czerwony). **b)** Reaktywność peptydu liniowego GLNRYDERYIGC-TT(l), OmpC i komórek *Shigella flexneri* 3a z surowicami myszy uzyskanymi po immunizacji GLNRYDERYIGC-TT(c), GGLNRYDERYIGC-TT(c), GGGLNRYDERYIGC-TT(c) i GLNRYDERYIGC-TT(l) (Zaadaptowano z Jarzab et al, Vaccine, 2018).

Z drugiej strony przeciwciała uzyskane po immunizacji cyklicznym koniugatem cyclic-GGLNRYDERYIGC-TT były skuteczniejsze w rozpoznawaniu białka OmpC i komórek *Shigella flexnerii* 3a niż przeciwciała uzyskane po immunizacji liniowym GLNRYDERYIGC-TT. Co więcej, badania z wykorzystaniem SPR (ang. Surface Plasmon Resonance) pokazały, że przeciwciała monoklonalne wytworzone przeciwko liniowemu peptydowi

GLNRYDERYIGC-TT wykazały 20-krotnie niższą stałą dysocjacji (KD) niż naturalnie występujące przeciwciała poliklonalne z surowicy pępowinowej.

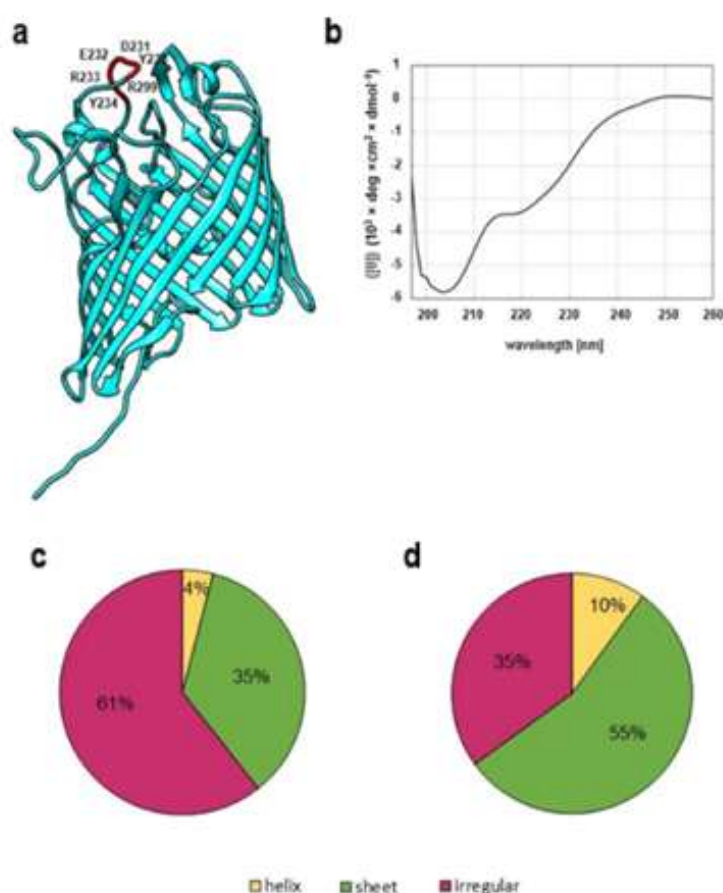
Przyjmuje się, że w rozwoju szczepionek najlepszym sposobem identyfikacji antygeny ochronnego komórek B jest wytworzenie przeciwciała monoklonalnego przeciwko takiemu epitopowi i wykazanie, że przeciwciała monoklonalne mają właściwości neutralizujące i/lub ochronne [22]. Aby ocenić potencjał ochronny przeciwciał monoklonalnych, przeprowadzono eksperymenty dotyczące biernej ochrony i porównano wyniki z efektem surowicy myszy anty-OmpC. Wyniki pokazały niestety, że przeciwciała monoklonalne ma bardzo niski potencjał ochronny, podczas gdy surowica myszy anty-OmpC (powstała po immunizacji myszy całym białkiem) była znacznie lepsza w ochronie zakażonych zwierząt. Ponadto, najlepszą ochronę uzyskano u myszy immunizowanych OmpC [23]. Wyniki te potwierdzają opublikowane dane dotyczące efektu ochronnego OmpC [24, 25] i potwierdzają nasze ustalenia, że przeciwciała monoklonalne o niskim powinowactwie, specyficzne dla liniowego koniugatu w aktualnej formie GLNRYDERYIGC-TT, nie nadają się do ochrony zakażonych myszy.

Ogólnie, w pracy wskazano zasadność zastosowania cyklicznych peptydów jako odpowiednich kandydatów na szczepionkę, ponieważ mogą one wywołać produkcję przeciwciał o wyższym powinowactwie. Niepowodzenie przeciwciała monoklonalnego w ochronie myszy przed żywym szczepem *Shigella flexnerii* 3a wynika prawdopodobnie ze słabej opsonizacji patogenu. Słabe wiązanie i prawdopodobnie niezdolność do tworzenia większych agregatów doprowadziły do nieskuteczności w ochronie przeciwciała monoklonalnego. Syntetyczny cykliczny peptyd zapewnia również lepszą stabilność szczepionki, ponieważ konstrukcja będzie mniej podatna na trawienie proteazami obecnymi w surowicy. Immunogenność cyklicznych peptydów może zostać poprawiona przez zastosowanie lepszego nośnika szczepionki i/lub adiuwantu. Ponieważ cykliczny epitop wydaje się być dobrym antygenem, generującym swoistą odpowiedź immunologiczną przeciwko antygenowi błony zewnętrznej *Shigella*, aktualnie prowadzimy dalsze badania nad poprawą immunogenności peptydu stanowiącego sekwencję epitopu. Badania nad optymalizacją epitopu OmpC jako antygeny szczepionkowego są prowadzone w ramach realizacji grantu NCBR w programie Lider XIII.

WYKAZANIE WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOGENNYCH REKOMBINOWANEGO BIAŁKA OMPC | Ze względu na niską ochronę uzyskaną w wyniku immunizacji myszy koniugatami zawierającymi pętlę epitopu białka OmpC zdecydowaliśmy się na powrót do immunizacji całym białkiem. Wyniki tych badań opisano w publikacji: Jarzab A, Dąbrowska A, Naporowski P, Krasna K, Szmyt A, Swiat M, Pawlik K, Witkowska D, Ziomek E, Gamian A: Outer membrane protein C is a protective and unique vaccine antigen against *Shigella flexneri* 3a. *Sci Rep*, 2024, 14, 25398 (Publikacja 4: H4). Tym razem białko OmpC nie było oczyszczane z natywnych komórek *S. flexneri* 3a, ale uzyskane metodami inżynierii genetycznej oraz nadekspresjonowane w systemie *E. coli*. Celem tych badań było zbadanie czy na immunogenność białka natywnego mogły mieć wpływ minimalne zanieczyszczenie lipopolisacharydami lub kwasami nukleinowymi pochodzącymi z *S. flexneri*. Przede wszystkim jednak chcieliśmy zobaczyć czy techniki inżynierii genetycznej umożliwią nam nadprodukcję

dużej ilości białka OmpC we właściwej formie oraz z zachowaniem struktury umożliwiającej wykorzystanie go jako antygeny do szczepionki.

Przeprowadziliśmy wnikliwą analizę immunoenzymatyczną oraz strukturalną białka rekombinowanego. W badaniach wykazaliśmy, że uzyskaliśmy białko rekombinowane o sekwencji kompatybilnej z masą białka natywnego, co potwierdziła analiza MALDI-TOF-MS. Ponadto białko wykazywało dobre właściwości antygenowe. Reaktywność białka rekombinowanego ekspresjonowanego w *E.coli* była porównywalna z reaktywnością białka natywnego, izolowanego z błony *S. flexneri* 3a. Również eksperymenty na zwierzętach wykazały, że myszy immunizowane białkiem rekombinowanym wykazują wzrost poziomu przeciwciał klasy IgG oraz IgM podobnie jak zwierzęta po immunizacji białkiem natywnym. Co więcej, w obu przypadkach myszy immunizowane białkiem natywnym lub rekombinowanym są chronione przed dawką śmiertelną *S. flexneri* 3a (Ryc. 8).



Ryc. 8. Analiza rekombinowanego białka OmpC a) model białka OmpC b) molarność eliptyczna oraz c) struktura II-rzędowa rekombinowanego białka OmpC określona za pomocą dichroizmu kołowego d) struktura II-rzędowa rekombinowanego białka OmpC określona na podstawie wyliczeń teoretycznych (Zaadaptowano z Jarzab et al, Sci. Rep. 2024).

Co ciekawe analiza strukturalna białka rekombinowanego z wykorzystaniem dichroizmu kołowego (ang. Circular dichroism, CD) wykazała, że nie przyjmuje ono idealnej struktury białka natywnego oraz charakteryzuje ją większa zawartość struktur nieuporządkowanych. Dodatkowo analiza z wykorzystaniem dynamicznego rozpraszania światła (ang. Dynamic Light Scattering, DLS) wykazała, że białko to wykazuje dużą skłonność do agregacji, co może do pewnego stopnia być zaletą antygeny, gdyż duże cząsteczki są lepiej ekspozowane układowi immunologicznemu oraz mniej podatne na proteolizę. Niemniej jednak, agregacja białka uzyskanego metodami inżynierii genetycznej była problematyczna, ze

względnie na to, że duże agregaty zaczynały wypadać z roztworu, co prowadziło do bardzo małej wydajności w uzyskiwaniu rozpuszczalnego białka rekombinowanego, jakie można przeznaczyć do immunizacji.

UZYSKANIE KONIUGATU EPITOPU ORAZ BIAŁKA NOŚNIKOWEGO O BARDZO DOBRYM STOPNIU OBSADZENIA ORAZ WŁAŚCIWOŚCIACH ANTYPGENOWYCH | Aktualnie badania nad opracowaniem szczepionki chroniącej przeciwko czerwonce bakteryjnej są kontynuowane w ramach projektu Lider XIII (NCBR). Część wyników została zastrzeżona **Zgłoszeniem patentowym 1:H6** (*Krasna K, Jarzab A: „Koniugat zawierający antygenowy peptyd i jego zastosowanie do zapobiegania zakażeniom bakteryjnym wywołanym przez bakterie Shigella”, nr WIPO ST 10/C PL451249 z dn. 20.02.2025*).

W zgłoszeniu patentowym opisano wyniki w których wykazano właściwości antygenowe, immunogenne oraz brak właściwości cytotoksycznych koniugatu. Dzięki optymalizacji metody koniugacji opartej o białko nośnikowe oraz peptyd wyposażony w dodatkowy linker glicynowy uzyskano koniugat o bardzo dobrym obsadzeniu białka nośnikowego peptydami stanowiącymi sekwencję epitopu (~29 cząsteczek peptydu/cząsteczkę nośnika, Ryc. 9a, b). Dodatkowo wykazano właściwości antygenowe w oddziaływaniach z przeciwciałami ludzkiej krwi pępowinowej (ryc. 9c) oraz wykazano, że koniugat jest bezpieczny oraz nie wykazuje właściwości cytotoksycznych do bardzo wysokich stężeń 10 μ M (ryc 9d).

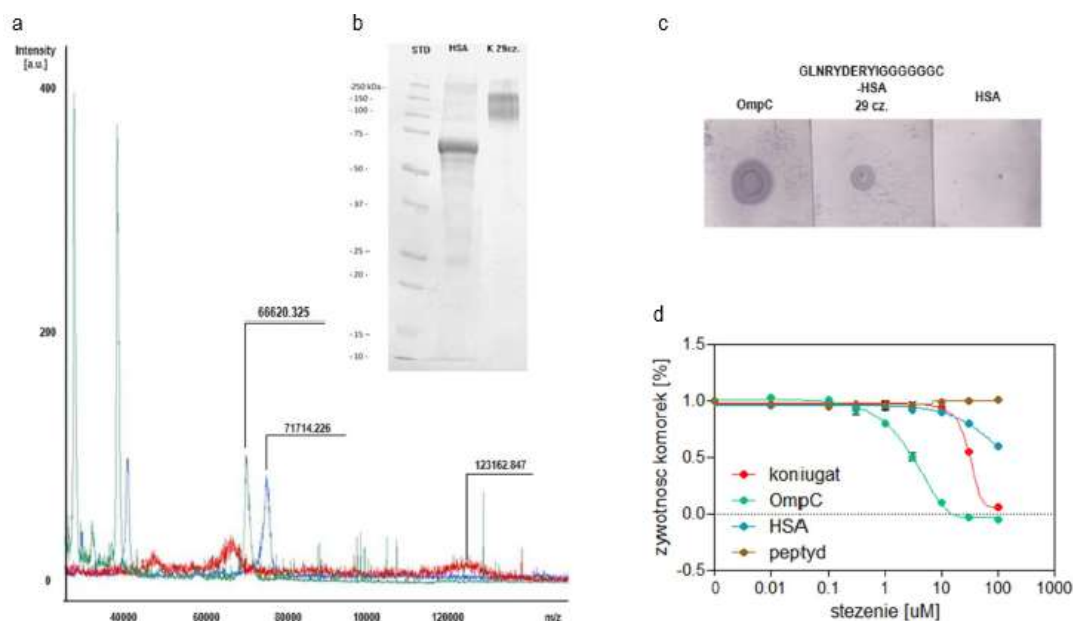


Fig. 9. Koniugat stanowiący prototyp szczepionki oparty o białko nośnikowe-peptyd liniowy. **a)** Widmo MALDI-TOF-MS pozwalające na określenie masy białka nośnikowego, białka po bromoacetylacji oraz koniugatu białko-peptyd. Koniugat peptyd-białko: GLNRYDERYIGGGGGGC-HSA ($MW_{avg} = 123162.847$ Da), białko nośnikowe po bromoacetylacji ($MW_{avg} = 71714.226$ Da) oraz białko nośnikowe przed bromoacetylacją (HSA, $MW_{avg} = 66620.325$ Da) **b)** Potwierdzenie obecności oraz czystości koniugatu białko nośnikowe HSA skoniugowanego z 29cząsteczek peptydów: GLNRYDERYIGGGGGGC-HSA w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE. **c)** Immunoreaktywność białka OmpC – naturalnego antygenu z *S. flexneri* (kontrola pozytywna), oraz z koniugatem GLNRYDERYIGGGGGGC-HSA z 29cząsteczkami peptydów. Kontrola negatywna, białko HSA nie wykazało

reaktywności z przeciwciałami ludzkiej krwi pępowinowej użytej w testach. **d) Wyniki testu cytotoksyczności.** Wpływ koniugatu GLNRYDERYIGGGGGGC-HSA, białka OmpC, białka nośnikowego HSA oraz wolnego peptydu GLNRYDERYIGGGGGGC na żywotność komórek K562 w warunkach *in vitro* (Zaadoptowano z Zgł. Pat 1. Krasna K, Jarzab A.: PL451249 z dn. 20.02.2025)

Aktualnie prowadzimy dalsze badania nad koniugatem szczepionki przeciwko czerwonce bakteryjnej. Wykazaliśmy bardzo dobre właściwości ochronne koniugatu w modelach zwierzęcych na myszach. Ponadto, pracujemy także nad wyznaczenie mechanizmu działania prototypu szczepionki na ludzkie komórki, głównie w kontekście jego właściwości immunomodulatorowych. Wyniki opisane w przykładach do zgłoszenia patentowego oraz wyniki z immunizacji myszy sugerują, że kluczowe znaczenie w podniesieniu immunogenności koniugatu zawierającego liniowy epitop peptydowy miało zastosowanie linkera oddalającego peptyd od struktury białka nośnikowego, co mogło skutkować jego lepszą dostępnością podczas rozpoznania przez przeciwciała.

Konsekwencją osiągnięć wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego są **uzyskane przeze mnie w latach 2022-2024 granty naukowe** (1 zrealizowany oraz 3 będące w toku realizacji). Pozyskane zewnętrzne finansowanie pozwoliło mi na założenie własnego zespołu badawczego: **Grupy Proteomiki i Analizy Immunoenzymatycznej,**

- <https://hirszfeld.pl/struktura/laboratoria/laboratorium-mikrobiologii-lekarskiej/anna-jarzab-phd-assistant-professor-group-leader/>,

który razem ze mną realizuje 4 projekty w ramach środków krajowych oraz międzynarodowych, w których jestem kierownikiem:

Miniatura 7 | grant zrealizowany | 09.2023-09.2024: Grant Narodowego Centrum Nauki (NCN) | 2023/07/X/NZ5/00532; 50 000 PLN, funkcja: kierownik) | „Antitumor effect of hyperthermia and its potential association with infectious fever”

Badania przeprowadzone w ramach realizacji grantu Miniatura 7 (NCN) pozwoliły na określenie wpływu temperatury na żywotności ludzkich linii komórkowych w badaniach na modelu nowotworu nerki: linie HEK293 oraz A498. W wyniku przeprowadzonych wykazano istotną statystycznie różnicę w przeżywalności komórek nowotworowych (A498) w stosunku do ich zdrowych odpowiedników (HEK293). Jest to odpowiednio temperatura ok 48 °C w przypadku krótszego traktowania oraz 46 °C w przypadku przedłużonego traktowania ciepłem. Dane literaturowe pokazują, że jest to temperatura w jakiej niejednokrotnie wykazano zdolność do pracy mitochondriów – w szczególności łańcucha oddechowego, co wykazaliśmy również w toku naszych badań własnych nad Meltome Atlas. Różnice te stanowią przesłanki do podjęcia dalszych badań w kierunku określeniem mechanizmu odpowiedzialnego za szybszą śmierć komórek nowotworowych w podwyższonych temperaturach oraz sugerują, że warto w sposób rozszerzony przyrzeć się funkcjonowaniu mitochondriów. Aktualnie pracuję nad wnioskiem grantowym umożliwiającym podjęcie dalszych badań nad tą tematyką.

Sonata Bis 13 | w trakcie realizacji | 1.10.2024-1.10.2029: Grant Narodowego Centrum Nauki | 2023/50/E/NZ2/00420; 4 740 400 PLN, **funkcja: kierownik** | *“Bacterial Meltome Atlas and its use in the assessment of bacterial sensitivity to temperature in the context of infectious fever”*

Finansowanie w ramach realizacji tego grantu pozwoliło mi na rozbudowę mojego zespołu badawczego, jak również kontynuację badań z wykorzystaniem termicznego profilowania proteomów. W ramach realizacji projektu planujemy stworzyć proteomiczną bazę danych zawierającą meltomy bakteryjne oraz wykorzystać je do analizy wpływu temperatury na denaturację białek bakteryjnych. W szczególności zbadamy wpływ temperatur w przedziale 37-43 °C, czyli zakres gorączki infekcyjnej. Systematyczne badania na większej liczbie szczepów bakteryjnych pozwolą nam określić jaki jest faktyczny wpływ ciepła emitowanego podczas gorączki infekcyjnej na denaturację białek bakteryjnych, a tym samym ich przeżywalność w warunkach szoku cieplnego.

Lider XIII | w końcowej fazie realizacji | 03.2023-03-2026: Grant Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBR) | LIDER13/0093/2022; 1 500 000 PLN, **funkcja: kierownik** | *„Development of an innovative peptide vaccine protecting against bacterial dysentery”*

Projekt ten pozwolił na optymalizację koniugatu: białko-linker-peptyd, który wykazywał bardzo dobry stopień obsadzenia cząsteczki białka peptydami (~30 cząsteczek peptydu/białko nośnikowe), bardzo dobrą reaktogenność z przeciwciałami, nie wykazywał właściwości toksycznych in vitro ani in vivo na modelu mysim. Ponadto wykazano bardzo dobre właściwości ochronne przygotowanego koniugatu (prototypu szczepionki) na modelu mysim. Aktualnie prowadzimy badania nad mechanizmem działania szczepionki z wykorzystaniem proteomiki.

Efektem realizacji tego projektu jest **Publikacja 4** wchodząca w skład cyklu habilitacyjnego oraz **zgłoszenie patentowe** (Karina Krasna, Anna Jarzab: „Koniugat zawierający antygeny peptyd i jego zastosowanie do zapobiegania zakażeniom bakteryjnym wywołanym przez bakterie *Shigella*”: nr. WIPO ST 10/C PL451249 z dn. 20.02.2025).

Alexander von Humboldt Research Group Linkage Program | w trakcie realizacji | 1.07.2024- 30.06.2027: Grant z Fundacji Alexandra von Humboldta | 55 000 EUR, **funkcja: PI** | Grant umożliwiający finansowanie współpracy międzynarodowej pomiędzy: Prof. dr Bernhardem Kuster (Chair of Proteomics and Bioanalytics, Technical University of Munich), dr Christiną Ludwig (Bavarian Center for Mass Spectrometry, BayBio MS) oraz dr Anną Jarzab (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Hirsfelda PAN we Wrocławiu)

Projekt ten umożliwia finansowanie badań opartych na trójstronnej współpracy z partnerami zagranicznymi na TU Munich. Dzięki pozyskanym środkom możliwe będą krótkoterminowe wyjazdy doktorantów oraz post-doków umożliwiające ich rozwój w laboratoriach proteomicznych oraz metabolicznych u naszego partnera zagranicznego na TU Munich.

PODSUMOWANIE GŁÓWNYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH:

1. Wkład w rozbudowę bazy danych białkowych o globalnym zasięgu **ProteomicsDB**, która pozwala na szeroki dostęp do danych obrazujących topnienie proteomów człowieka. Baza danych meltomów dotyczących białek ludzkich zawiera ~13 000 białek pochodzących z 14 różnych linii komórkowych, komórek pierwotnych, tkanek oraz płynów organizmu (krew, mleko, ślina, plazma nasienia, płyn mózgowo-rdzeniowy).
2. Stworzenie bazy danych proteomicznych **Meltome Atlas** opisującej topnienie białek z 13 różnych organizmów modelowych: 6 organizmów prokariotycznych (5 szczepów bakteryjnych: *E. coli*, *B. subtilis*, *O. antarctica*, *T. thermophilus*, *G. stearothermophilus* oraz 1 archeon *P. torridus*), 7 organizmów eukariotycznych (*S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *A. thaliana*, *M. musculus*, *H. sapiens*). Atlas zawiera charakterystykę topnienia ~48 000 różnych białek z organizmów znajdujących się na różnych poziomach drzewa filogenetycznego w zakresie temperatur 30-90 °C. Baza danych jest publicznie dostępna i mogą z niej korzystać użytkownicy z całego świata.

Dodatkowo, wnikliwa analiza danych zdeponowanych w bazie Meltome Atlas dostarczyła bardzo cennych wyników:

- 2.1. Wykazanie wpływu czynników determinujących stabilność termiczną białek m.in. wielkość, zawartość struktur II-rzędowych, uporządkowanie struktury, obecność niektórych aminokwasów na ich denaturację cieplną.
- 2.2. Wykazanie, że największy wpływ na termostabilność białek ma struktura I-rzędowa białek zakodowana w sekwencji aminokwasowej. Dodatkowo wykazano, że znaczenie ma również otoczenie komórkowe.
- 2.3. Wykazanie, że białka obecne w ludzkich płynach ustrojowych wykazują większą stabilność termiczną niż te same białka występujące w komórkach organizmu.
- 2.4. Wykazanie, że stabilność termiczna białek wchodzących w skład kompleksów białkowych jest uzależniona od stabilności partnera, z którym tworzą kompleks.
- 2.5. Wykazanie, że białka obecne w łańcuchu oddechowym wykazują dużo większą stabilność termiczną (~46°C) oraz aktywność w tych temperaturach niż białka znajdujące się w innych częściach komórki.
3. Uzyskanie koniugatów (prototypów szczepionki) opartych o białko nośnikowe (TT) oraz peptyd zawierający sekwencję epitopu białka OmpC w 3 formach cyklicznego peptydu symulującego pętlę epitopu oraz określenie ich właściwości biochemicznych, immunogennych i ochronnych w odniesieniu do ich konformacji.

- 3.1. Wykazanie że peptydy cykliczne mają zwiększoną stabilność w surowicy w porównaniu do peptydów liniowych a także dobre właściwości antygenowe w oddziaływaniach z przeciwciałami.
- 3.2. Wykazanie, że dodanie 1 dodatkowej reszty Gly polepsza właściwości immunogenne peptydu GGLNRYDERYIG, natomiast dodanie 2 reszt Gly, a tym samym zwiększenie objętości pętli prowadzi do spadku jego właściwości immunogennych. Obserwacja ta podkreśla znaczenie sekwencji epitopu, która determinuje jego strukturę przestrzenną, a ta z kolei wpływa na jego właściwości immunomodulatorowe.
4. Uzyskanie rekombinowanego białka OmpC, które zostało szeroko scharakteryzowane pod względem jego struktury I-, II-, III-, IV-rzędowej oraz wykazanie jego właściwości antygenowych (techniki immunoenzymatyczne) i immunogennych (badania *in vivo* na modelu mysim), w szczególności wykazaniem jego właściwości ochronnych przed dawką śmiertelną *Shigella flexneri* 3a.
5. Uzyskanie ochrony na prototypy szczepionki koniugatowej zastrzeżone w zgłoszeniach patentowych/patentach.

Bibliografia do cyklu osiągnięć głównych:

- [1] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Analyzing Protein Structure and Function. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26820>
- [2] Sakuma K, Kobayashi N, Sugiki T, Nagashima T, Fujiwara T, Suzuki K, Kobayashi N, Murata T, Kosugi T, Tatsumi-Koga R, Koga N. Design of complicated all- α protein structures. Nat Struct Mol Biol. 2024 Feb;31(2):275-282
- [3] Fields PA. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2001 Jun;129(2-3):417-31
- [4] Paludan SR, Pradeu T, Masters SL, Mogensen TH. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. Nat Rev Immunol. 2021 Mar;21(3):137-150
- [5] Sebina I, Pepper M. Humoral immune responses to infection: common mechanisms and unique strategies to combat pathogen immune evasion tactics. Curr Opin Immunol. 2018 Apr;51:46-54
- [6] Liu F, Yuan C, Chen H, Yang F. Prediction of linear B-cell epitopes based on protein sequence features and BERT embeddings. Sci Rep. 2024 Jan 30;14(1):2464
- [7] Chaplin DD. Overview of the immune response. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23
- [8] Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, Ziegler E, Butzmann L, Gessulat S, Marx H, Mathieson T, Lemeer S, Schnatbaum K, Reimer U, Wenschuh H, Mollenhauer M, Slotta-Huspenina J, Boese JH, Bantscheff M, Gerstmair A, Faerber F, Kuster B. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. Nature. 2014 May 29;509(7502):582-7
- [9] Schmidt T, Samaras P, Frejno M, Gessulat S, Barnert M, Kienegger H, Krcmar H, Schlegl J, Ehrlich HC, Aiche S, Kuster B, Wilhelm M. ProteomicsDB. Nucleic Acids Res. 2018 Jan 4;46(D1):D1271-D1281

- [10] Lautenbacher L, Samaras P, Muller J, Grafberger A, Shraideh M, Rank J, Fuchs ST, Schmidt TK, The M, Dallago C, Wittges H, Rost B, Krcmar H, Kuster B, Wilhelm M. ProteomicsDB: toward a FAIR open-source resource for life-science research. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D1541-D1552
- [11] Leuenberger P, Gansch S, Kahraman A, Cappelletti V, Boersema PJ, von Mering C, Claassen M, Picotti P. Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science.* 2017 Feb 24;355(6327):eaai7825
- [12] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 May;72(5):1858-62
- [13] Becher I, Andrés-Pons A, Romanov N, Stein F, Schramm M, Baudin F, Helm D, Kurzawa N, Mateus A, Mackmull MT, Typas A, Müller CW, Bork P, Beck M, Savitski MM. Pervasive Protein Thermal Stability Variation during the Cell Cycle. *Cell.* 2018 May 31;173(6):1495-1507.e18
- [14] Mateus A, Bobonis J, Kurzawa N, Stein F, Helm D, Hevler J, Typas A, Savitski MM. Thermal proteome profiling in bacteria: probing protein state *in vivo*. *Mol Syst Biol.* 2018 Jul 6;14(7):e8242
- [15] Le TT, El-Bakry M, Neiryneck N, Bogus M, Hoa HD, Van der Meeren P. Hydrophilic lecithins protect milk proteins against heat-induced aggregation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007 Nov 15;60(2):167-73
- [16] Tan CSH, Go KD, Bisteau X, Dai L, Yong CH, Prabhu N, Ozturk MB, Lim YT, Sreekumar L, Lengqvist J, Tergaonkar V, Kaldis P, Sobota RM, Nordlund P. Thermal proximity coaggregation for system-wide profiling of protein complex dynamics in cells. *Science.* 2018 Mar 9;359(6380):1170-1177
- [17] Guruharsha KG, Rual JF, Zhai B, Mintseris J, Vaidya P, Vaidya N, Beekman C, Wong C, Rhee DY, Cenaj O, McKillip E, Shah S, Stapleton M, Wan KH, Yu C, Parsa B, Carlson JW, Chen X, Kapadia B, VijayRaghavan K, Gygi SP, Celniker SE, Obar RA, Artavanis-Tsakonas S. A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell.* 2011 Oct 28;147(3):690-703
- [18] Keseler IM, Mackie A, Santos-Zavaleta A, Billington R, Bonavides-Martínez C, Caspi R, Fulcher C, Gama-Castro S, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Muñoz-Rascado L, Ong Q, Paley S, Peralta-Gil M, Subhraveti P, Velázquez-Ramírez DA, Weaver D, Collado-Vides J, Paulsen I, Karp PD. The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D543-D550
- [19] Mukhopadhyay A, Ray S, De M. Detecting protein complexes in a PPI network: a gene ontology based multi-objective evolutionary approach. *Mol Biosyst.* 2012 Nov;8(11):3036-48
- [20] Ori A, Iskar M, Buczak K, Kastiris P, Parca L, Andrés-Pons A, Singer S, Bork P, Beck M. Spatiotemporal variation of mammalian protein complex stoichiometries. *Genome Biol.* 2016 Mar 14;17:47
- [21] Chrétien D, Bénit P, Ha HH, Keipert S, El-Khoury R, Chang YT, Jastroch M, Jacobs HT, Rustin P, Rak M. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. *PLoS Biol.* 2018 Jan 25;16(1):e2003992
- [22] Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-Tov DD, Tarnovitski Freund N, Weiss Y. Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. *BioDrugs.* 2007;21(3):145-56
- [23] Jarząb A, Witkowska D, Ziomek E, Dąbrowska A, Szewczuk Z, Gamian A. *Shigella flexneri* 3a outer membrane protein C epitope is recognized by human umbilical cord sera and associated with protective activity. *PLoS One.* 2013 Aug 5;8(8):e70539
- [24] Witkowska D, Masłowska E, Staniszevska M, Szostko B, Jankowski A, Gamian A. Enterobacterial 38-kDa outer membrane protein is an age-dependent molecular marker of innate immunity and immunoglobulin deficiency as results from its reactivity with IgG and IgA antibody. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Nov;48(2):205-14
- [25] Jarząb A, Witkowska D, Ziomek E, Dąbrowska A, Szewczuk Z, Gamian A. *Shigella flexneri* 3a outer membrane protein C epitope is recognized by human umbilical cord sera and associated with protective activity. *PLoS One.* 2013 Aug 5;8(8):e70539

OPIS DODATKOWYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Mój dorobek naukowy wraz z jednotematycznym cyklem publikacji obejmuje współautorstwo w **22** artykułach (18 oryginalnych i 4 przeglądowych): **21** pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (jako pierwszy autor – **7** prac, autor korespondencyjny – **1** praca), współautorstwo w **1** pracy spoza bazy JCR, **28** komunikatach zjazdowych w tym w **13** wystąpieniach wygłoszonych na międzynarodowych i krajowych konferencjach. Ponadto jestem współtwórcą **3** krajowych patentów oraz **2** patentów o zasięgu międzynarodowym. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, ang. impact factor) wszystkich prac wynosi **106,396**, a suma punktów MNiSW: **1406**. Do dnia 21.03.2025 r., według bazy Web Of Science (WOS, all database, Anna Jarzab), prace były cytowane **613** razy (w tym **602** bez autocytowań), indeks Hirscha wynosi **13**.

Dodatkowe osiągnięcia naukowe podzielono tematycznie. Opisano wkład habilitantki w rozwój poszczególnych zagadnień oraz jej rolę w zakresie przygotowania poszczególnych publikacji.

TEMATYKA PRACY DOKTORSKIEJ | BIAŁKA BŁONOWE JAKO ANTYGENY DO KONSTRUKCJI SZCZEPIONEK | Wkład w badania nad opracowaniem szczepionki chroniącej przed rozwojem czerwonki bakteryjnej oraz stworzenie platformy do projektowania szczepionek peptydowych

Poza osiągnięciami dotyczącymi szczepionek antybakteryjnych opisanymi w cyklu habilitacyjnym opublikowanym po obronie pracy doktorskiej, cyklem publikacji poprzedzającym te osiągnięcia były artykuły, które powstały w ramach realizacji mojej pracy doktorskiej. Efektem moich badań nad strukturą i funkcją białek błonowych z *Shigella flexneri* 3a, był mój wkład w opracowanie prototypu szczepionki chroniącej przeciwko czerwonce bakteryjnej (shigellozie). W ramach mojego doktoratu powstały 2 publikacje oryginalne, 2 publikacje przeglądowe oraz 1 patent międzynarodowy opisane poniżej.

Cykl prac powstałych **w ramach realizacji pracy doktorskiej** porusza temat zakażeń pokarmowych powodowanych przez pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*, opisanych w **Publikacji 5** (**Jarzab A, Górską-Frączek S, Rybka J, Witkowska D: Enterobacteriaceae infection – diagnosis, antibiotic resistance and prevention. Post. Hig. Med. Dosw., 2011; 65, 55-72;** a także tematykę związaną ze szczepionkami podjednostkowymi opisaną w **Publikacji 6** (**Jarzab A, Skowicki M, Witkowska D: Subunits vaccines – antigens, carriers, conjugation methods and the role of adjuvants. Post. Hig. Med. Dosw. 2013; 67: 1128-1143.**). Są to dwie prace przeglądowe, które stanowią wkład merytoryczny w tematykę zakażeń pokarmowych, ich diagnostykę i leczenie, a także profilaktykę związaną ze szczepieniami ochronnymi. Dodatkowo, **Publikacja 7: Jarzab A, Witkowska D, Szostko B, Hirnle L, Gamian A: Potential carrier or antigen for conjugate vaccine: OMP-38 from Sh. flexneri 3a – isolation and purification strategies. Sepsis, 2011; 1(4):39-45** przedstawia wyniki, jakie uzyskałam

podczas opracowania wydajnej metody uzyskiwania natywnego białka błonowego OmpC z błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri* 3a. Białko to stanowiło pierwotny antygen szczepionkowy, który użyty do immunizacji myszy wykazywał właściwości ochronne. Ze względu na to, iż proces oczyszczania białek błonowych jest niezwykle pracochłonny, zdecydowałam się na identyfikację krótkich epitopów obecnych na powierzchni białka OmpC oraz użycia ich do konstrukcji peptydowej szczepionki podjednostkowej. Wyniki tych prac zostały opublikowane w **Publikacji 8: Jarzab A, Witkowska D, Ziomek E, Dąbrowska A, Szewczuk Z, Gamian A: *Shigella flexneri* 3a outer membrane protein C epitope recognized by human umbilical cord sera and associated with protective activity. PloS One, 2013; 8(8): e70539.** Badania nad epitopami białka OmpC umożliwiły identyfikację jednej pętli, która szczególnie silnie oddziaływała z przeciwciałami ludzkiej krwi pępowinowej. Sekwencja tego epitopu oraz możliwych sekwencji alternatywnych oddziałujących z przeciwciałami została opatentowana, jako antygen szczepionkowy (**Patent 2: Jarzab A, Witkowska D, Ziomek E, Gamian A: „Epitope and its use”. Patent międzynarodowy: WO2014/073998A1, 15.05.2014; patent polski: PL220297B1, 30.10.2015 oraz patent USA: US9890194B2, 13.02.2018.** Ponadto, znaczącym osiągnięciem wynikającym z tych badań było stworzenie uniwersalnej platformy do projektowania szczepionek peptydowych. Opracowana przeze mnie procedura opiera się na połączeniu wielu technik oraz metod badawczych: poczynając od bioinformatycznego wytypowania pętli epitopowych, poprzez eksperymentalną walidację z zastosowaniem chemicznej syntezy peptydów na pinach polietylenowych oraz wykazania ich reaktywności z przeciwciałami. Procedura ta jest uzupełniona szeregiem metod analitycznych, umożliwiających analizę strukturalną antygenów peptydowych i białkowych. Platforma ta jest aktualnie wykorzystywana przez innych pracowników mojej jednostki. Znalazła ona zastosowanie m.in. w projekcie przy konstrukcji szczepionki chroniącej przed COVID19.

Zastosowanie peptydów w szczepionkach podjednostkowych pozwala na posługiwanie się wysoce swoistymi antygenami o znanej sekwencji. Ponadto cząsteczki te są dużo bardziej bezpiecznymi antygenami w konstrukcji szczepionek niż szczepionki oparte o całe, zabite lub atenuowane szczepy, czy też całe antygeny komórek bakteryjnych, które często są zanieczyszczone innymi cząsteczkami pochodzenia bakteryjnego, np. lipopolisacharydami. Szczepionki peptydowe są również dobrze zdefiniowane oraz łatwe i tanie w produkcji. Badania te były kontynuowane po obronie pracy doktorskiej (wyniki opisane w cyklu habilitacyjnym) oraz są prowadzone w chwili obecnej w ramach projektu Lider XIII (NCBR), którego jestem kierownikiem.

TEMATYKA 1 | PROTEOMIKA W BADANIACH NAD NOWOTWORAMI | Wkład w poznanie mechanizmów oporności komórek nowotworowych na leki onkologiczne

Podczas realizacji stażu zagranicznego na **Technical University of Munich** pracowałam nad identyfikacją mechanizmów nabytej oporności komórek nowotworowych na leki stosowane w klinice. Jednym z najistotniejszych osiągnięć tych badań była praca na liniach pierwotnych oraz opornych na działanie przeciwciała cetuximab. W ramach współpracy z **Lucienem Torlot (LMU, Munich)** z wykorzystaniem modelu raka jelita grubego

przeprowadziłam badania proteomiczne, całkowitą analizę danych oraz wykazałam, że jednym z mechanizmów oporności na terapeutyczne przeciwciało cetuximab rozpoznające oraz blokujące szlak przekazywania sygnałów zależny od EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) jest nadekspresja białka EPHA2 (Ephrin type A receptor 2). Tym samym – zastosowanie inhibitorów dla EPHA2 stwarza realne szanse na wprowadzenie drugiej linii obrony wobec pierwotnych komórek traktowanych przeciwciałami cetuximab, na które nowotwór przestał odpowiadać (**Publikacja 9:** Torlot L, Jarzab A, Albert J, Pók-Udvari Á, Stahler A, Holch JW, Gerlinger M, Heinemann V, Klauschen F, Kirchner T, Kumbrink J, Küster B, Jung A: Proteomics uncover EPHA2 as a potential novel therapeutic target in colorectal cancer cell lines with acquired cetuximab resistance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023 Feb;149(2):669-682). Co istotne, mechanizm zidentyfikowany podczas przeprowadzonych przeze mnie badań proteomicznych został potwierdzony w badaniach przeprowadzonych przez innych współautorów.

Uczestniczyłam również w pracach **dr Martina Frejno (University of Oxford)** nad szeroką charakterystyką proteomów 65 linii komórkowych raka jelita grubego z wykorzystaniem proteomiki opartej na spektrometrii mas, która umożliwiła charakterystykę każdego proteomu do głębokości ~ 10 000 białek. Wartościową częścią tego projektu była korelacja wyników uzyskanych dla ludzkich linii komórkowych z proteomami 90 pacjentów z diagnozą raka jelita grubego. Uzupełnienie wyników proteomicznych o dane transkryptomyczne pozwoliło na identyfikację zintegrowanych podtypów CRC (ang. colorectal cancer), a modelowanie odpowiedzi linii komórkowych na 577 leków przeciwnowotworowych umożliwiło przewidywanie wrażliwości na leki dla ludzkich linii komórkowych oraz pacjentów. Większość molekularnych terapii przeciwnowotworowych działa na cele białkowe, ale dane o statusie proteomu pacjentów i modelach komórkowych dla proteomowych badań przedklinicznych dotyczących wrażliwości na leki nie są w dalszym ciągu dostatecznie zebrane i opisane. Z tego względu badania te stanowią cenny wkład w kontekście planowania terapii celowanych w leczeniu raka jelita grubego. Aby ułatwić projektowanie innowacyjnych perspektywnych badań klinicznych, dane proteomiczne i farmakologiczne uzyskane w ramach realizacji tego projektu zostały udostępnione jako baza danych dostępna publicznie (**Publikacja 10:** Frejno M, Zenezini Chiozzi R, Wilhelm M, Koch H, Zheng R, Klaeger S, Ruprecht B, Meng C, Kramer K, Jarzab A, Heinzlmeir S, Johnstone E, Domingo E, Kerr D, Jesinghaus M, Slotta-Huspenina J, Weichert W, Knapp S, Feller SM, Kuster B. Pharmacoproteomic characterisation of human colon and rectal cancer. *Mol Syst Biol.* 2017 Nov 3;13(11):951). Mój bezpośredni wkład w obszerne badania Dr Frejno polegał na opracowaniu kilku linii nowotworowych w zakresie ich proteomów oraz kinomów (proteomów, w których swoiście przeanalizowano kinazy białkowe z wykorzystaniem technologii Kinobeads).

Innym kierunkiem moich badań związanych z tematyką nowotworową był udział w projekcie, w którym przeprowadziliśmy badania metaproteomiczne w korelacji z badaniami metagenomicznymi na próbkach klinicznych pochodzących od pacjentów z ostrą białaczką (212 próbek kału od 56 hospitalizowanych pacjentów), u których stwierdzono kolonizację jelit szczepami *Enterobacteriaceae* wykazującymi wielolekooporność. Badania wykonaliśmy w ramach projektu **Infect ERA** (projekt opisano w szczegółach poniżej), który realizowało kilka

europejskich jednostek pracujących na pograniczu mikrobiologii, onkologii, genomiki oraz proteomiki. Było to jedno z największych przeprowadzonych dotychczas klinicznych badań metaproteomicznych i pierwsze badanie metaproteomiczne dotyczące mikrobiomu jelit u pacjentów z ostrą białaczką, skolonizowanych przez MRE. Na podstawie tego obszernego zestawu danych omówiliśmy główne ograniczenia w klinicznej analizie danych metaproteomicznych. Co ważne, wyniki pokazały, że publiczne bazy danych metagenomów są niekompletne i rozproszone, a metagenomy specyficzne dla próbek pochodzących od konkretnych pacjentów poprawiają oraz ułatwiają analizę wyników. Ponadto, nasze badania pokazały, że zmienność biologiczna pomiędzy poszczególnymi pacjentami oraz ich stadiami związanymi z leczeniem (w szczególności u pacjentów po antybiotykoterapii) jest ogromna i stanowi wyzwanie dla badań klinicznych. Pomimo wielu problemów związanych z analizą danych metaproteomicznych, mikrobiom ma silny wpływ na zdrowie i choroby człowieka, dlatego też jest on coraz częściej badany w kontekście klinicznym. Również dlatego metaproteomika przyciąga znaczną uwagę, a dane dotyczące indywidualnych pacjentów można dziś wydajnie generować dzięki udoskonaleniom proteomiki opartej na spektrometrii mas (**Publikacja 11:** Rechenberger J, Samaras P, Jarzab A, Behr J, Frejno M, Djukovic A, Sanz J, González-Barberá EM, Salavert M, López-Hontangas JL, Xavier KB, Debrauwer L, Rolain JM, Sanz M, Garcia-Garcera M, Wilhelm M, Ubeda C, Kuster B: Challenges in Clinical Metaproteomics Highlighted by the Analysis of Acute Leukemia Patients with Gut Colonization by Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Proteomes*. 2019 Jan 8;7(1).). W badaniach tych byłam odpowiedzialna za opracowanie workflow proteomicznego, umożliwiającego pomiar mikrobiomu jelitowego pacjentów oraz opiekę nad doktorantką, która wykonała większość analiz. Dodatkowo byłam odpowiedzialna za zarządzanie projektem po stronie partnera niemieckiego oraz jego reprezentacje podczas spotkań projektowych z partnerami zagranicznymi.

TEMATYKA 2 | BADANIA PROTEOMICZNE W BADANIACH NAD GLIKOZYLACJĄ BIAŁEK | Wkład w badania nad poszukiwaniem markerów niepłodności męskiej

Współpraca z dr Beata Olejnik, dr Anną Kałużą oraz Prof. Mirosławą Ferens-Sieczkowską z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu umożliwiła mi udział w bardzo ciekawym projekcie dotyczącym wpływu sposobu glikozylacji białek nasienia na płodność u mężczyzn. Mój wkład w identyfikację glikanów obecnych na powierzchni białek nasienia z wykorzystaniem spektrometrii mas (MALDI-TOF MS, ang. matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry) pozwolił na wyznaczenie markerów mogących być predyktorami niepłodności męskiej. W ramach realizacji tego projektu zoptymalizowałam własną metodę pomiaru, identyfikacji oraz analizy N-glikanów z wykorzystaniem MALDI-TOF-MS. Wyniki tych badań mają bardzo duże znaczenie społeczne, a rosnąca liczba par, które mają problemy z poczęciem. Szczegółowe zrozumienie mechanizmów molekularnych towarzyszących zapłodnieniu pozostaje kolejnym wyzwaniem. Rozpoznawanie glikanów i białek może mieć kluczowe znaczenie w diagnostyce niepłodności. Obecnie sugeruje się, że wzór glikozylacji w obrębie układu rozrodczego ma wpływ na

zapewnienie żeńskiej tolerancji immunologicznej na przyjęcie plemników, a tym samym rozwijający się zarodek.

Wśród niepełnych osób uzyskano próbki normozoospermiczne, oligozoospermiczne, astenozoospermiczne i oligoastenozoospermiczne. We wszystkich analizowanych próbkach zidentyfikowano osiemdziesiąt sześć oligosacharydów. Różnice w zawartości unikalnych glikanów: wysokomannozowych i hybrydowych, pozbawionych końcowego kwasu sialowego i wysoce fukozylowanych stwierdzono, gdy próbki pochodzące od niepełnych osób o różnych wzorcach nasienia porównano z kontrolą zdrowych, płodnych mężczyzn. Zawartość silnie rozgałęzionych glikanów była 3-krotnie podwyższona u niepełnych mężczyzn z normozoospermią, podczas gdy ekspresja wysoce fukozylowanych oligosacharydów była zwiększona w próbkach astenozoospermicznych, oligozoospermicznych i oligoastenozoospermicznych. Sialilacja oligosacharydów była zmniejszona w próbkach oligozoospermicznych, oligoastenozoospermicznych, a zwłaszcza astenozoospermicznych, ale wzrosła u niepełnych osób z normozoospermią. Zmieniona glikozylacja obserwowana w osoczu nasienia może odzwierciedlać podobne zmiany w glikoproteinach powierzchniowych plemników i może zaburzać interakcję plemników z żeńskim układem odpornościowym. W pracy zasugerowaliśmy, że przynajmniej niektóre przypadki niewyjaśnionej męskiej niepełności mogą być związane z upośledzoną glikozylacją (**Publikacja 12: Kaluza A, Jarzab A, Gamian A, Kratz EM, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M: Preliminary MALDI-TOF-MS analysis of seminal plasma N-glycome of infertile men. *Carbohydr Res.* 2016 Nov 29;435:19-25.**

W ramach tych badań przeanalizowaliśmy również unikalny wzór glikozylacji białek osocza nasiennego, identyfikując oligosacharydy o wysokiej zawartości mannozy i hybrydowe, za pomocą ich reaktywności z lektyną *Galanthus nivalis* specyficzną dla mannozy. Niepełne osoby z normozoospermią wykazywały zmniejszone ilości reaktywnych wobec lektyny glikoepitopów w porównaniu z płodnymi dawcami i niepełnymi pacjentami z nieprawidłowymi parametrami nasienia. Glikoproteiny zawierające odsłoniętą mannozę wyizolowano w chromatografii powinowactwa, a 17 glikoprotein zidentyfikowano w chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią masową z jonizacją elektrorozpyłową. N-glikom wyizolowanych glikoprotein zbadano w spektrometrii masowej z desorpcją laserową wspomaganą matrycą (MALDI-TOF-MS). Jedenaście z 27 zidentyfikowanych oligosacharydów wyrażało końcowe reszty mannozy, odpowiedzialne za wiązanie lektyny. W badaniach tych zasugerowaliśmy, że obniżona zawartość glikanów o wysokiej zawartości mannozy i hybrydowych u niepełnych pacjentów z normozoospermią może być związana z upośledzoną ochroną plemników przed przedwczesną kapacytacją i powinna być brana pod uwagę w poszukiwaniu nowych markerów niepełności (**Publikacja 13: Olejniki B, Jarzab A, Kratz EM, Zimmer M, Gamian A, Ferens-Sieczkowska M: Terminal mannose residues in seminal plasma glycoproteins of infertile men. *Int. J Mol. Sci.*; 2015 Jul 2;16(7):14933-50.**

TEMATYKA 3 | BADANIA PROTEOMICZNE W IDENTYFIKACJI BIAŁEK | Wkład w badania nad identyfikacją białek oraz szczepów bakteryjnych w kontekście ich znaczenia biologicznego

Opracowanie oraz optymalizacja kilku technik analitycznych w zakresie przygotowania próbek do pomiarów spektrometrycznych podczas mojej pracy w IITD PAN we Wrocławiu oraz wykorzystania MALDI-TOF-MS przyczyniło się do powstania kilku wartościowych prac, które powstały we współpracy z innymi jednostkami badawczymi.

Publikacja 14: Grzymajło K, Ugorski M, Suchanski J, Kedzierska AE, Kolenda R, Jarzab A, Biernatowska A, Schierack P: The Novel Type 1 Fimbriae FimH Receptor Calreticulin Plays a Role in Salmonella Host Specificity. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Jul 19;7:326 powstała w wyniku mojej współpracy naukowej z **dr Krzysztofem Grzymajło z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu**. W badaniach tych byłam odpowiedzialna za identyfikację receptora obecnego na powierzchni komórek jelitowych świni odpowiedzialnego za wiązanie adhezyny FimH z *Salmonella* Choleraesuis. Podczas tych analiz wykorzystałam techniki MALDI-TOF-MS do identyfikacji białek rozdzielonych podczas elektroforezy 2D, co umożliwiło wytypowanie kalretikuliny świńskiej jako potencjalnego receptora. Badania przeprowadzone przez pozostałych autorów potwierdziły znaczenie kalretikuliny w oddziaływaniach z adhezyną bakteryjną. Ponadto, badania innych współautorów sugerują, że niewielkie różnice w strukturze FimH są najprawdopodobniej związane z różnicami w specyficznościach adhezji i mogą określać tropizm różniących się pomiędzy sobą serowarów *Salmonella* do różnych gatunków i tkanek gospodarza. Nasze badania wykazały zależność wiązania się adhezyny FimH *Salmonella* Choleraesuis do kalretikuliny świńskiej, co może mieć duże znaczenie podczas zakażenia tą bakterią.

W badaniach jakie powstały w ramach mojej współpracy z **dr Aleksandrą Bawiec z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Publikacja 15: Bawiec A, Paweska K, Jarzab A: Changes in the microbial composition of municipal wastewater treated in biological processes. Journal of Ecological Engineering (2016) 17(3):41-46)** wykorzystałam technikę spektrometryczną MALDI Biotyper do identyfikacji mikroorganizmów obecnych na różnych etapach oczyszczania ścieków. Technika ta polega na identyfikacji mikroorganizmów na podstawie profilu białek izolowanych ze szczepów bakteryjnych („molekularny odcisk palca”) z dużą dokładnością oraz szybkością wykonywanych pomiarów, a także identyfikacja z wykorzystaniem baz danych przewyższającą znacząco biochemiczną analizę mikroorganizmów. Zastosowanie tej techniki miało ogromne znaczenie przy analizie jakościowej poszczególnych populacji bakterii w ściekach, które zmieniają się w trakcie procesu ich oczyszczania w oczyszczalniach ścieków. Na zawartość mikroorganizmów w oczyszczonych ściekach znacząco wpływa rodzaj technologii stosowanej do ich oczyszczania. W artykule przedstawiono wyniki składu gatunkowego bakterii obecnych w ściekach na różnych etapach oczyszczania dla dwóch różnych technologii. Analizy składu mikrobiologicznego wykazały, że w obiektach składających się ze zbiornika wstępnego i biofiltra jest dużo mniej wydajna niż technika oparta o oczyszczanie ścieków z zastosowaniem laguny hydroponicznej.

TEMATYKA 4 | BADANIA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH KOMPLEKSÓW OPARTYCH O JONY MIEDZI | Wkład w badania nad poszukiwaniem cząsteczek biologicznie czynnych

Udział w badaniach nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi kompleksów miedzi (II) to cykl prac oraz patentów jaki powstał w ramach mojej współpracy naukowej z **dr hab. Agnieszką Wojciechowską (Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska)**. Mój wkład w powstanie cyklu tych prac polegał na przeprowadzeniu badań mających na celu określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanych związków miedzi wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*, *B. subtilis*, *S. mutans*, *E. hirae*), bakterii Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica* Typhimurium, *S. flexneri*) oraz grzybów (*C. albicans*, *S. cerevisiae*). Wyniki opisano w Publikacjach 16-18.

Wyniki badań opisanych w **Publikacji 16** (*Wojciechowska A, Gągor A, Zierkiewicz W, Jarzab A, Dylong A, Zierkiewicz W: Metal-organic framework in L-argininato copper(II) ions polymer – structure, spectroscopic properties, theoretical studies and microbiological activity. RSC Adv., 2015, 5, 36295-36306*), dotyczą związku $\{[Cu(L-Arg)_2(\mu-4,4'-bpy)]Cl_2 \cdot 3H_2O\}_\infty$, którego struktura została dodatkowo zgłoszona do opatentowania (**Zgłoszenie Patentowe 2: Wojciechowska A, Wojtkiewicz, Gągor A, Jarzab A, Poźniak B; numer zgłoszenia: PL407772, 02.04.2014; Krystaliczna forma kompleksu trihydrat chlorku [di(2-amino-5-guanidynopentano)(4,4'-dipirydylo) miedzi (II)] i sposób jej wytwarzania**).

W **Publikacji 17** (*Wojciechowska A, Bregier Jarzębowska R, Komarnicka UK, Koziół S, Szuster Ciesielska A, Sztandera Tymoczek M, Jarzab A, Staszak Z, Witkowska D, Bojarska Junak A, Julia Jezierska: Isothiocyanate l-argininato copper(II) complexes - Solution structure, DNA interaction, anticancer and antimicrobial activity Chem Biol Interact. 2021 Oct 1;348:109636*) przedstawiono badania dotyczące właściwości kompleksów izotiocyanianu l-argininato miedzi(II), tj. związków $[Cu(L-Arg)_2(NCS)](NCS) \cdot H_2O$ oraz $[Cu(L-Arg)(NCS)_2]$. Związki te zostały również opatentowane. (**Patent 3: Wojciechowska A, Wojtkiewicz, Jarzab A, Janczak J, Witkowska D; patent polski: PL227111, opubl. 31.10.2017, zgłoszenie nr: 408655 z 31.08.2015; Krystaliczna forma kompleksu (2-amino-5-guanidynopentano)di(tiocyaniano) miedzi(II) i sposób jej wytwarzania**).

W **Publikacji 18** (*Wojciechowska A, Szuster-Ciesielska A, Sztandera M, Bregier-Jarzębowska R, Jarzab A, Rojek T, Komarnicka UK, Bojarska-Junak A, Jezierska J: L-argininato copper(II) complexes in solution exert significant selective anticancer and antimicrobial activities. August 2020 Applied Organometallic Chemistry. 2020 Aug 34(8)*) opisano właściwości kompleksów miedzi zawierających L-Argininę, tj. związki $[CuCl(L-Arg)(phen)]Cl \cdot 2H_2O$ oraz $[Cu(L-Arg)_2(H_2O)]C_2O_4 \cdot 6H_2O$. Związki te również zostały zastrzeżone również w zgłoszeniu patentowym (**Zgłoszenie patentowe 3: Wojciechowska A, Gawor A, Gągor A, Poźniak B, Jarzab A: P.408663 z 26.06.2014; Krystaliczna forma kompleksu trihydrat chlorku [(2-amino-5-guanidynopentano)chloro(2,2'-dipirydylo)miedzi(II)] i sposób jej wytwarzania**).

TEMATYKA 5 | INNE ZAGADNIENIA BIOCHEMICZNE I MIKROBIOLOGICZNE | Wkład w badania nad receptorem malarii DARC oraz w badania nad infekcyjnością COVID19

W trakcie swojej pracy naukowej bardzo często zajmowałam się zagadnieniami związanymi z badaniem struktury i funkcji białek, które są głównymi determinantami ich właściwości immunomodulujących. Umiejętności związane z modelowaniem molekularnym struktur białkowych nabyte jeszcze podczas doktoratu przyczyniły się do nawiązania współpracy z **Prof. Marcinem Czerwińskim (IITD PAN we Wrocławiu)** oraz powstania publikacji, w której opisaliśmy wpływ zmian w epitopie domeny DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) na oddziaływanie z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym na ten epitop. DARC jest glikoproteiną o siedmiu domenach transbłonowych obecną na czerwonych krwinkach (RBC) i komórkach śródbłonna naczyń włosowatych lub komórkach Purkiniego oraz odgrywa ważną rolę w zdrowiu człowieka, będąc antygenem grupy krwi. Ponadto, DARC jest jedynym znanym receptorem pasożyta *Plasmodium vivax* wywołującego malarię i receptorem chemokin. W pracy zajęłam się wyjaśnieniem roli Val-25 w epitopie, z zastosowaniem modelowania *in silico* peptydu DFEDVWNSSYG i peptydów, które w miejscu Val-25 podstawione były przez reszty Ile, Leu lub Ala. Wykonane modele zasugerowały, że podstawienie Val-25 przez Leu lub Ala implikuje zmiany w konformacji peptydu i nieznacznie oddala hydrofobowe aminokwasy od siebie, a łańcuch boczny Ile (który jest dłuższy niż Val) może mieć wpływ na tworzenie epitopu. Modelowanie sugerowało, że Val-25 może zbliżać się do innych hydrofobowych aminokwasów i kontrolować strukturę polipeptydu. Tak więc podstawienie Val-25 innymi resztami aminokwasowymi o innej hydrofobowości może zmienić tę strukturę, oddalając Tyr-30 od epitopu. Badania modelowania wykazały, że niezbędne reszty tworzące epitop (Phe-22, Trp-26 i Tyr-30) są odsłonięte po jednej stronie helisy, podczas gdy Val-25 znajdujący się po przeciwnej stronie helisy może nie uczestniczyć w kontaktach z przeciwciałem. Ile, która ma dłuższy łańcuch boczny niż Val, może w jakiś sposób stanowić pewną przeszkodę przestrzenną dla interakcji epitopu przeciwciała, ponieważ modelowanie sugeruje, że nie modyfikuje on w znacznym stopniu struktury epitopu. Podsumowując, struktura peptydowa epitopu wydaje się być zwarta, z resztami aromatycznymi tworzącymi pojedynczy blok po jednej stronie helisy. W sumie nasze wyniki potwierdzają, że minimalny epitop DARC rozpoznawany przez 2C3 MAb jest liniowy i składa się z pięciu aminokwasów: 22FEDVW26, ale istnieje pewna interakcja pomiędzy Tyr-30 a przeciwciałem, co dodatkowo potwierdzili w swoich badaniach inni współautorzy za pomocą STD-NMR (**Publikacja 19: Smolarek D, Hattab C, Buczkowska A, Kaczmarek R, Jarzab A, Cochet S, de Brevern AG, Lukaszewicz J, Jachymek W, Niedziela T, Grodecka M, Wasniowska K, Colin Aronovitch Y, Bertrand O, Czerwinski M: Studies of a murine monoclonal antibody directed against DARC: reappraisal of its specificity. PloS One, 2015;10(2):e0116472**).

Podczas doktoratu (**Publikacja 20**) oraz podczas mojej pracy magisterskiej (**Publikacja 21**) uczestniczyłam w przygotowaniu dwóch prac przeglądowych. Publikacje te były syntetycznym opisem wpływu zjawiska mimikry molekularnej na powstawanie chorób o charakterze autoimmunologicznym. W pracy skupiono się na zestawieniu informacji opisanych w literaturze na temat wpływu podobieństwa antygenów drobnoustrojów do antygenów własnych występujących w organizmie człowieka. Uważa się, że taka homologia odpowiada za produkcję autoprzeciwciał i w konsekwencji atak układu odpornościowego na tkanki i narządy gospodarza. W tym artykule przedstawiono przykłady chorób autoimmunologicznych, takich jak cukrzyca typu 1, stwardnienie rozsiane, reaktywne zapalenie stawów i potencjalny udział mikroorganizmów w mechanizmie mimikry molekularnej (**Publikacja 20: Lis J, Jarzab**

A, Witkowska D: Molecular mimicry in the etiology of autoimmune diseases. Post. Hig. Med. Dosw., 2012, 66, 505-524).

W pracy przeglądowej (**Publikacja 21: Górski S, Jarzab A, Gamian A: Probiotic bacteria in the human gastrointestinal tract as a factor stimulating the immune system. Post. Hig. Med. Dosw., 2009; 63, 653-667**) opisano rolę mikroflory jelitowej człowieka we wspomaganiu ochrony organizmu przed patogenami i antygenami obecnymi w żywności. Szczegółowo opisano w jaki sposób flora jelitowa naturalnie bytująca w naszym przewodzie pokarmowym może modulować odpowiedź immunologiczną. W szczególności opisano modulujący wpływ bakterii komensalnych i probiotycznych na odpowiedź wrodzoną i swoistą, a także dysfunkcje przewodu pokarmowego związane ze zmianami mikroflory i ich profilaktykę.

Publikacja 22 (Selkirk J, Stanifer M, Mateus A, Mitosch K, Barrio-Hernandez I, Rettel M, Kim H, Voogdt CGP, Walch P, Kee C, Kurzawa N, Stein F, Potel C, Jarzab A, Kuster B, Bartenschlager R, Boulant S, Beltrao P, Typas A, Savitski MM: SARS-CoV-2 infection remodels the host protein thermal stability landscape. Mol Syst Biol. 2021 Feb;17(2):e10188) jest pracą jaka powstała w trakcie pandemii COVID19 oraz była odpowiedzią naszego zespołu na potrzeby społeczeństwa, które w tym czasie stało w obliczu niebezpiecznej dla zdrowia i życia pandemii. Do realizacji badań zostaliśmy zaproszeni przez zespół **prof. Mikhaila Savitskiego** z EMBL w Heidelberg oraz jego zespół. W badaniach tych wykorzystałam znajomość termicznego profilowania proteomów (TPP), opracowanego w trakcie swoich wcześniejszych projektów. Podczas prac nad publikacją dostosowano TPP do warunków wysokiego bezpieczeństwa biologicznego nadających się do pracy z SARS-CoV-2.

Efektem przeprowadzonych badań było wykazanie wyraźnych zmian czasowych w termostabilności białka gospodarza podczas infekcji, które zbiegały się z procesami komórkowymi, w tym regulacją cyklu komórkowego, mikrotubul i splicingu RNA. Farmakologiczne hamowanie białek gospodarza wykazujących zmienioną stabilność termiczną lub częstość ich występowania podczas infekcji prowadziło do zahamowania replikacji SARS-CoV-2.

PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH DODATKOWYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH:

1. Efektem cyklu publikacji powstałych w ramach realizacji mojej pracy doktorskiej było opracowanie skutecznej metody uzyskiwania natywnego białka (**Publikacja 7**), a w szczególności identyfikacja sekwencji epitopu białka OmpC (**Publikacja 8, Patent 2**), który aktualnie jest przeze mnie walidowany oraz optymalizowany w ramach badań nad szczepionką chroniącą przed czerwonką bakteryjną. Ponadto badania te przyczyniły się do opracowania uniwersalnej platformy, umożliwiającej identyfikację epitopów peptydowych do konstrukcji szczepionek podjednostkowych wykorzystywanej przez innych badaczy.
2. Wkład w cykl publikacji dotyczących badań nad mechanizmami oporności na leki stosowane w klinice. Badania przeprowadziłam z zastosowaniem technik proteomicznych

opartych na spektrometrii mas, które są idealnymi metodami przesiewowymi umożliwiającymi identyfikację molekularnych markerów oporności oraz markerów umożliwiających predykcję ich powstawania o ogromnym potencjale ich zastosowania w badaniach klinicznych.

- 2.1. Wyznaczenie mechanizmu oporności nabytej na przeciwciała terapeutyczne cetuximab stosowane u pacjentów z rakiem jelita grubego. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych pozwoliły na wyznaczenie EPHA2, jako potencjalnego celu molekularnego dla pacjentów, u których stwierdzono oporność na cetuximab. W badaniach tych przeprowadziłam całkowitą analizę proteomiczną oraz analizę danych pozwalającą na wytypowanie EPHA2, jako białka, którego nadekspresja doprowadziła do powstania oporności (**Publikacja 9**).
- 2.2. Wkład w badania zmierzające do opracowania bazy danych linii komórkowych oraz pacjentów z nowotworami jelita grubego. W badaniach tych dostarczyłam wyników badań dotyczących linii komórkowych raka jelita grubego (SW480, SW620). Jednym z cennych rezultatów obszernej analizy całej bazy była identyfikacja MERTK jako predykcyjnego markera oporności na inhibitory MEK1/2 (**Publikacja 10**).
- 2.3. Wkład w badania nad charakterystyką metaproteomiczną dotyczącą mikrobiomu jelit u pacjentów z ostrą białaczką, skolonizowanych przez MRE (**Publikacja 11**).
3. Wkład w cykl publikacji opisujących powiązanie wzorca glikozylacji białek nasienia u mężczyzn oraz jego wpływem na płodność. W badaniach tych opracowałam nowe metody oraz przeprowadziłam analizy spektrometryczne (MALDI-TOF-MS/MS) umożliwiające identyfikacje glikanów obecnych na powierzchni białek nasienia, stwarzających realne szanse na ich wykorzystanie jako markerów niepłodności u mężczyzn (**Publikacje 12-13**).
4. Wkład w cykl publikacji umożliwiających wykorzystanie technik proteomicznych opartych na spektrometrii mas w identyfikację białek.
 - 4.1. Identyfikacja kalretikuliny świńskiej jako receptora dla bakteryjnej adhezyny FimH obecnej na powierzchni *Salmonella Choleraesuis* (**Publikacja 14**). Wykonałam analizy spektrometryczne zmierzające do identyfikacji kalretikuliny, która następnie została potwierdzona jako receptor w badaniach innych współautorów.
 - 4.2. Identyfikacja szczepów bakteryjnych z wykorzystaniem analizy MALDI-Biotyper, umożliwiła ocenę skuteczności różnych technologii oczyszczania ścieków. Stanowiła mój wkład w prace zespołu pracującego nad efektywnością oczyszczania ścieków na różnych etapach tego procesu (**Publikacja 15**).
5. Wkład w badanie właściwości anty-mikrobiologicznych związków miedzi, z dokładnym wyznaczeniem stężeń poszczególnych kompleksów wykazujących właściwości przeciwdrobnoustrojowe (**Publikacje 16-18**).

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

AKTYWNOŚĆ NAUKOWA W INNYCH JEDNOSTKACH NAUKOWYCH **REALIZOWANA W RAMACH STAŻY ZAGRANICZNYCH**

INSPIRACJA DO WYJAZDU ZAGRANICZNEGO | W kręgu moich zainteresowań badawczych, które zaczęły kształtować się jeszcze w czasie doktoratu leżały techniki związane z proteomiką opartą na spektrometrii mas. Podczas doktoratu oraz okresu pracy w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu opracowałam oraz zoptymalizowałam wiele metod pomiarowych z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF-MS, który w tym czasie był dostępny w Instytucie. Analizy te dotyczyły głównie:

- pomiaru masy cząsteczkowej białek (zoptymalizowałam metodę do pomiaru całych cząsteczek nietrawionych białek) z wykorzystaniem MALDI-TOF-MS – głównie badania własne
- identyfikacji białek po trypsynolizie, analizie MALDI-TOF-MS/MS oraz identyfikacji z wykorzystaniem baz danych białkowych (głównie MASCOT) – współpraca z dr K. Grzymajło (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu)
- pomiar masy cząsteczkowej oraz identyfikacja glikanów (obecnych na powierzchni białek po ich uprzedniej izolacji z wykorzystaniem lektyn) – współpraca z Prof. M. Ferens-Sieczkowską i dr B. Olejnik (Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu)
- wykorzystania standardowych technik identyfikacji szczepów bakteryjnych opartych o „molekularny odcisk palca” z zastosowaniem techniki MALDI-Biotyper – współpraca z dr A. Bawiec (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu).

Inspiracją do rozpoczęcia stażu w dziedzinie proteomiki opartej na spektrometrii mas były moje dotychczasowe zainteresowania technikami spektrometrycznymi, jakie poznałam podczas studiów doktoranckich. Z tego względu zdecydowałam się na poszukiwanie stażu podoktorskiego w jednostce pracującej z technikami proteomicznymi opartymi na spektrometrii mas. Po obronie pracy doktorskiej wyjechałam na Politechnikę w Monachium do Katedry Proteomiki i Bioanalizy (**Chair of Proteomics and Bioanalytics, Technical University of Munich**). Wyjazd umożliwił mi dalszy rozwój oraz prowadzenie badań na najwyższej klasy spektrometrach masowych, opartych o technologię Orbitrap. W okresie tym miałam możliwość zdobycia ekspertyzy w wielu dziedzinach proteomiki, w szczególności:

- technikach monitorowania zmian w ekspresji białek na przestrzeni całego proteomu (zastosowanie technologii Orbitrap oraz dodatkowej frakcjonacji prób proteomicznych przy użyciu off-line HPLC umożliwia badanie zmian w ekspresji białek do głębokości ~ 10 000 białek w przypadku proteomu ludzkiego)

- technikach monitorowania zmian w modyfikacjach post-translacyjnych białek (w szczególności fosforylacji białek, mającej kluczowe znaczenie w monitorowaniu szlaków przekazywania sygnałów)
- technikach termicznego profilowania proteomów (TPP)
- poznania aktualnych technik zmierzających do monitorowania danych metaproteomicznych
- poznania szeregu technik bioinformatycznych oraz analizy dużej ilości danych dostarczanych podczas analiz omicznych

TECHNICAL UNIVERSITY OF MUNICH, NIEMCY | Od września 2015 do stycznia 2021 roku (**6-letni staż podoktorski**) prowadziłam badania naukowe w **Katedrze Proteomiki i Bioanalizy na Politechnice w Monachium**. Badania rozpocząłam dzięki pozyskaniu finansowania w ramach grantu *Alexander von Humboldt Fellowship for Postdoctoral Researchers*. Początkowo prowadziłam badania nad mechanizmami oporności leków przeciwnowotworowych stosowanych w klinice na modelu raka jelita grubego. Efektem tych prac były 2 publikacje (**Publikacja 9, Publikacja 10**).

Podczas stażu na TUM, w ramach współpracy z Prof. Andreasem Jung oraz Lucienem Torlot z **Institute of Pathology, Ludwig-Maximilians-University (LMU), Munich, Germany** powstała **Publikacja 9**. W ramach realizacji tej pracy przeprowadziłam badania proteomiczne na liniach komórkowych przed oraz po pojawieniu się oporności względem przeciwciała terapeutycznego (cetuximab), co przyczyniło się do wyjaśnienia jednego z mechanizmów nabytej oporności na cetuximab.

Ponadto, efektem współpracy z dr Martinem Frejno z **Department of Oncology, University of Oxford, Oxford, UK** była **Publikacja 10**. W ramach realizacji tej współpracy przeprowadziłam eksperymenty na liniach modelowych raka jelita grubego. Publikacja dotyczy systematycznej analizy proteomicznej szerokiego panelu linii CRC oraz wskazuje białka, mające znaczenie w powstawaniu oporności na leki stosowane w leczeniu raka jelita grubego (wyniki zostały obszernie opisane przy nurcie tematycznym 1).

Podczas pracy na TUM prowadziłam badania nad termicznym profilowaniem proteomów TPP (ang. Thermal Proteome Profiling, TPP) z szerokim zakresem partnerów krajowych oraz zagranicznych. W ramach realizacji badań nad **Meltome Atlas** współpracowałam aktywnie z kilkoma jednostkami naukowymi, w szczególności:

- Prof. Mikhail Savitski oraz Nils Kurzawa z Faculty of Biosciences, **EMBL and Heidelberg University** (Heidelberg, Germany) oraz Genome Biology Unit, **EMBL** (Heidelberg, Germany)
- dr Hannes Hahn oraz dr Thomas Hopf z **OmicScouts GmbH**, Freising, Germany
- dr Simone Lemeer oraz Niels Leijten z Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics, Bijvoet Center for Biomolecular Research and Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, **Utrecht University**, the Netherlands

Dodatkowo uczestniczyłam w badaniach, jakie przeprowadziliśmy w trakcie pandemii SARS-Cov2, w których wykorzystałam znajomość protokołu TPP oraz CETSA-ITDR

(technika dwuwymiarowa pozwalająca na identyfikację białek będących celami terapeutycznymi dla leków) do badania wpływu potencjalnych leków przeciwwirusowych, jak również zbadania mechanizmów, jakie zachodzą u człowieka podczas infekcji COVID19 (**Publikacja 22**). W ramach tych badań współpracowałam głównie z Prof. Mikhailem Savitskim oraz dr Andre Mateus z Genome Biology Unit, **EMBL** (Heidelberg, Germany).

W trakcie stażu podoktorskiego uczestniczyłam w realizacji dużego grantu europejskiego w ramach Programu **InfectEra** (7 Program Ramowy, 2013-2016), FloraStopMRE_3th Call (2015) – „*Role of the microbiota in the defense against multidrug-resistant Enterobacteriaceae by proteomic approaches*”, gdzie miałam okazję koordynować realizację projektu po stronie partnera niemieckiego (kierownik zadania Prof. dr Bernhard Kuster, **Technische Universität München**) oraz reprezentować nasz zespół podczas spotkań z partnerami zagranicznymi z Hiszpani (dr Carles Ubeda; **FISABIO**), Portugalii (dr Karina Xavier; **Fundação Calouste Gulbenkian**) i Francji (Prof. Jean Marc Rolain - **Faculté de Médecine et de Pharmacie** oraz dr Laurent Debrauwer (LD) – **INRA**). Efektem realizacji tego projektu była (**Publikacja 11**)

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY, USA | Równie ważnym oraz wartościowym stażem jaki odbyłam w okresie od maja do lipca 2013 roku był wyjazd na **University of California, Berkeley, USA** gdzie uczestniczyłam w 8-tygodniowym kursie dotyczącym komercjalizacji wyników prac badawczych oraz zarządzania zespołem badawczym. Nabyte umiejętności pozwalają mi w lepszy sposób zarządzać własnymi grantami oraz projektami, jak również kierować pracą mojej grupy badawczej. Podczas pobytu na UC Berkeley skorzystałam również z okazji odbycia stażu badawczego w **Laboratorium Bioinżynierii**, gdzie mogłam zapoznać się zarówno z merytoryką prowadzonych tam badań, jak również poznać model pracy laboratorium funkcjonującego na jednym z najlepszych uniwersytetów na świecie.

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

6.1.Osiągnięcia dydaktyczne.

6.1.1. Wykłady dla studentów akademickich

Podstawy Proteomiki | wykład dla studentów II roku studiów magisterskich na kierunku Biologia Uniwersytetu Wrocławskiego w ramach przedmiotu Biomarkery w mikrobiologii i medycynie, 26.01.2023

Intensive Proteomics Course | kurs semestralny dla studentów studiów magisterskich, TU Munich, Department of Biosciences, 2017-2020

6.1.2. Opiekun merytoryczny doktorantów, studentów oraz praktykantów i stażystów:

Opiekun merytoryczny w planowanych przewodach doktorskich:

1. Mgr inż. Karina Krasna: (planowany doktorat w trybie eksternistycznym, przewód doktorski nie został jeszcze otwarty): Tytuł roboczy: „Opracowanie innowacyjnej szczepionki peptydowej chroniącej przed rozwojem czerwonki bakteryjnej” – badania prowadzone od 01.03.2023 w ramach projektu Lider XIII, którego jestem kierownikiem

Ekspert merytoryczny na obronach doktoratów:

1. Paulina Żebrowska-Róžańska: *Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu*; Promotor: dr hab. Łukasz Łaczmański, prof. PAN Promotor pomocniczy: dr n. med. Paweł Karpiński, Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, IITD PAN, 22.11.2023
2. Theresa de Cicco: *The role of the actin-remodeling proteins Cap2 and Ctn in the development of the neuromuscular synapse*, doktorat ukończony w Łukasiewicz - PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii oraz Instytucie Bilologii Eksperymentalnej im. Nenckiego, PAN, Promotor: dr hab. Tomasz J. Prószyński, IITD PAN, 30.10.2023
3. Mateusz Noszka: *Characterisation of CemR regulons of selected pathogenic Campylobacter species*, Promotor: dr hab. Anna Pawlik, Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów, IITD PAN, 13.02.2025

Opiekun merytoryczny prac licencjackich, inżynierskich i magisterskich:

1. Theresa Keil: *Studying an acquired MEK Inhibitor Resistance in Colorectal Cancer Cell Model using (Phospho)Proteomics*; Technical University of Munich, Department of Biosciences, praca magisterska (Promotor: Prof. B. Kuster): 2020/2021
2. Małgorzata Magdalena Dorot: *Otrzymywanie i charakterystyka przeciwciał monoklonalnych rozpoznających antygen peptydowy*. Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, praca magisterska (Promotor: dr hab. D. Witkowska). 2014/2015
3. Barbara Maria Rzeszutek: *Zastosowanie technik chromatograficznych do oczyszczania białka OmpC z Shigella flexneri*. Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, praca inżynierska (Promotor: dr hab. D. Witkowska), 2013/2014
4. Małgorzata Magdalena Dorot: *Charakterystyka szczepu Shigella flexneri 3a i oznaczenie dawki śmiertelnej (LD100) dla myszy*. Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, praca inżynierska (Promotor: dr hab. D. Witkowska), 2011/2012
5. Jolanta Lis: *Izolacja, oczyszczanie oraz reaktywność białka błony zewnętrznej (OMP-45) ściany komórkowej Salmonella Typhimurium z surowicami pacjentów ze*

schorzeniami reumatycznymi. Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, praca magisterska (Promotor: dr hab. D. Witkowska), 2011/2012

6. Iwona Włodarska, *Izolacja i oczyszczanie białek błony zewnętrznej ze ściany komórkowej pałeczek jelitowych z rodziny Enterobacteriaceae*. Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, praca magisterska (Promotor: dr hab. D. Witkowska), 2010/2011

Opiekun merytoryczny stażystów oraz praktykantów:

1. Kinga Kramarczyk, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, kierunek: Biotechnologia (praktyka studencka: 02.09.2024-23.09.2024);
2. Katarzyna Zięba, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, kierunek: Biotechnologia (praktyka studencka: 01.07.2024-31.07.2024);
3. Zuzanna Chmielewska, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, kierunek: Mikrobiologia (praktyka studencka: 06.05.2024-31.05.2024);
4. Katarzyna Chmura, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, kierunek: Mikrobiologia (praktyka studencka: 06.05.2024-31.05.2024);
5. Jakub Grabski, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności (praktyka studencka: 10.10.2023-17.11.2023);
6. Carolina Paessens, International Highschool of Wroclaw, 12-grade student, (praktyka laboratoryjna: 11.09.2023-22.09.2023);
7. Theresa Keil, Technical University of Munich, Chair of Proteomics and Bioanalysis (praktyka studencka: 08.2021)
8. Jolanta Lis, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Biotechnologia, (praca badawcza: 2010/2011)
9. Renata Figura, Uniwersytet Wrocławski (praktyka studencka: 14.05.2012-22.06.2012)
10. Agata Franiczek, Uniwersytet Wrocławski (praktyka studencka: 14.05.2012-22.06.2012)
11. Patrycja Beńko, Uniwersytet Wrocławski (praktyka studencka: 11.06.2012-22.06.2012)
12. Angelika Ptak, Uniwersytet Wrocławski (praktyka studencka: 11.06.2012-22.06.2012)
13. Barbara Lisiak, Uniwersytet Wrocławski (praktyka studencka: 03.09.2012-28.09.2012)
14. Karolina Drogos, Uniwersytet Wrocławski (praktyka studencka: 03.09.2012-28.09.2012)
15. Marta Wawrzyszyn, Uniwersytet Przyrodniczy (praktyka studencka: 07.2011)

- 6.1.3. Lider grupy badawczej **Proteomiki i Analizy Immunoenzymatycznej**: (aktualny skład zespołu badawczego: 1 doktorant, 2 post-doków, 1 pracownik techniczny, 3 magistrantów):

<https://hirszfeld.pl/struktura/laboratoria/laboratorium-mikrobiologii-lekarskiej/anna-jarzab-phd-assistant-professor-group-leader/>

6.1.4. Udział w programach mentoringowych podnoszących kompetencje młodej kadry naukowej:

Mentorka w programie mentoringowym „Dziewczyny do nauki” | organizowanym z inicjatywy fundacji Perspektywy finansowanym ze środków budżetu państwa przyznanych przez Ministra Nauki w ramach programu Społeczna odpowiedzialność nauki II - Popularyzacja nauki. Program dla kobiet rozwijających karierę badawczą w naukach technicznych i ścisłych.

Osoby mentorowane:

mgr Patrycja Tarnawska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (2025)

Mentorka w programie mentoringowym TopMinds | inicjatywa Polsko-Amerykańskiej Fundacji Fulbrighta oraz Stowarzyszenia Top 500 Innovators. Program mentoringowy dla młodych naukowców chcących realizować badania w różnych dyscyplinach naukowych.

Osoby mentorowane:

lek. wet. Joanna Wolińska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu (2024),

mgr Katarzyna Płoszka, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (2025)

6.2. Osiągnięcia organizacyjne.

24-26.01.2025 | Organizacja oraz koordynacja spotkania BootCamp w ramach programu **TopMinds** we Wrocławiu dla 20 par mentorskich

2-6.11.2015 | Organizacja II Ogólnopolskiego Tygodnia **Design Thinking Week** we Wrocławiu (dodatkowo pozyskanie finansowania na organizację konferencji w ramach działania KNOW), warsztaty dla 60 osób w IITD PAN we Wrocławiu

21-24.10.2014 | Organizacja I Ogólnopolskiego Tygodnia **Design Thinking Week** we Wrocławiu, warsztaty dla 60 osób w IITD PAN we Wrocławiu

2010-2024 | Coroczne uczestnictwo oraz organizacja warsztatów, wykładów oraz konkursów w ramach **Dolnośląskiego Festiwalu Nauki** w IITD PAN oraz w ramach wyjazdów do szkół podstawowych oraz ponadpodstawowych województwa dolnośląskiego (zestawienie najważniejszych wykładów, warsztatów oraz pokazów opisano w osiągnięciach popularyzujących naukę)

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę.

6.3.1. Udział oraz organizacja wykładów, warsztatów, pokazów i konkursów w ramach **Dolnośląskiego Festiwalu Nauki (DFN)**:

1. Karina Krasna, Bernadeta Szostko, **Anna Jarzab**: Od patogenu do antygeny, czyli jak powstają i działają szczepionki, XXVII DFN, 22.10.2024

2. **Anna Jarzab**: Odpowiedź odpornościowa, czyli jak nasz układ immunologiczny walczy z patogenami – wykład popularnonaukowy, III LO, Wałbrzych, 17.10.2014
 3. **Anna Jarzab**: Szczepionki nowej generacji – przyszłość czy złudzenie? – – wykład popularnonaukowy, III LO, Wałbrzych, 17.10.2014
 4. **Anna Jarzab**, Agnieszka Mehlich: Dlaczego marchewka jest pomarańczowa? – izolacja i rozdział barwników roślinnych – warsztaty dla uczniów, III LO, Wałbrzych, 17.10.2014
 5. **Anna Jarzab**, Agnieszka Mehlich: Co w trawie siedzi – ekstrakcja i rozdział chlorofilu – warsztaty dla uczniów, III LO, Wałbrzych, 17.10.2014
 6. **Anna Jarzab**, Agnieszka Mehlich: Jeść oczami-postrzeganie smaków po ich wyglądzie i zapachu – warsztaty dla uczniów, III LO, Wałbrzych, 17.10.2014
 7. **Anna Jarzab**, Agnieszka Mehlich: Dlaczego marchewka jest pomarańczowa? – izolacja i rozdział barwników roślinnych – warsztaty dla uczniów, Ząbkowice Śląskie, 22.10.2014
 8. **Anna Jarzab**, Agnieszka Mehlich: Jeść oczami – postrzeganie smaków po ich wyglądzie i zapachu – warsztaty dla uczniów, Ząbkowice Śląskie, 22.10.2014
 9. **Anna Jarzab**, Agnieszka Mehlich: Jak nasz organizm rozpoznaje patogeny? – symulacja w warunkach laboratoryjnych – warsztaty dla uczniów, Ząbkowice Śląskie, 22.10.2014
 10. **Anna Jarzab**, Anna Tobiasz, Bernadeta Szostko, Małgorzata Dorot, Barbara Rzeszutek: Rola bakterii w prewencji chorób zakaźnych. XVI DFN, Wrocław, 23.09.2013 - pokaz
 11. Danuta Witkowska, Sabina Górską, Bogna Jatczak, **Anna Jarzab**: Organizacja Konkursu Biologicznego dla Licealistów: "Świat Mikrobów", XVI DFN, Wrocław, 20.09.2013
 12. **Anna Jarzab**, Bernadeta Szostko, Danuta Witkowska: Jak bakterię uczynić swoim przyjacielem. XV DFN, Wrocław, 21-25.09.2012 - pokaz
 13. Marta Sochocka, Anna Kędziora, Sabina Górską-Frączek, **Anna Jarzab**: Organizacja Konkursu Biologicznego dla Gimnazjalistów: "Człowiek Zagadka" , XV DFN, Wrocław, 21-25.09.2012
 14. **Anna Jarzab**, Bernadeta Szostko, Danuta Witkowska: Szczepionka – czy trzeba się jej bać? Warsztaty tematyczne dla uczestników XIV DFN, Wrocław, 19.09.11
- 6.4. Artykuły popularnonaukowe oraz wywiady

Artykuł 1 | Artykuł *Dr inż. Anna Jarzab laureatką Nagród Naukowych Polityki 2024* opisujący najważniejsze osiągnięcia naukowe (20.10.2024):

<https://www.polityka.pl/tygodnikpolityka/nauka/nagrodynaukowe/2274611,1,dr-inz-anna-jarzab-laureatka-nagrod-naukowych-2024.read>

Podcast 1 | na YouTube dotyczący kierunków moich badań naukowych

https://www.youtube.com/watch?v=xYY4pTrNt4Q&ab_channel=PolitykaPL

Wywiad 1 | Wywiad dla tygodnika Polityka: *Białka? To się grzeje! Po co badać je tak głęboko i dlaczego to tak wielka przygoda* na temat rozwoju mojej ścieżki naukowej oraz najważniejszych wyników pracy naukowej związanej z badaniami nad termolabilnością i immunogennością białek (12.11.2024)

<https://www.polityka.pl/tygodnikpolityka/nauka/2277627,1,bialka-to-sie-grzeje-po-co-badac-je-tak-gleboko-i-dlaczego-to-tak-wielka-przygoda.read>

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

7.1. Nagrody i stypendia

Nagrody naukowe za prowadzone badania i działalność naukową:

Nagroda 1 | **Nagroda Naukowa Polityki**, laureatka w kategorii nauki ścisłe, Warszawa, 20.10.2024

Nagroda 2 | **II-nagroda naukowa im. Prof. E. Mikulaszka dla młodych naukowców** za wyróżniające się osiągnięcia w badaniach nad szczepionkami, Polska Organizacja Mikrobiologów, Warszawa, 2014

Nagroda 3 | **Nagroda Rektora Politechniki Wrocławskiej** za aktywność na rzecz społeczności studenckiej, Wrocław, 2009 i 2008

Stypendia krajowe oraz zagraniczne:

Stypendium 1 | **Stypendium Ministra dla wybitnych młodych naukowców**, Warszawa, 2023-2026

Stypendium 2 | Stypendium fundacji **Alexandra von Humboldta**: AvH fellowship for postdoctoral researchers, Bonn, 2015

Stypendium 3 | Stypendium Fundacji **Carl Friedrich von Siemens** (04.2016-03.2018), Munich, 2015

Stypendium 4 | **Top 500 Innovators – Science, Management, Commercialization**, Nagroda polskiego ministerstwa nauki na realizację stażu w zakresie komercjalizacji wyników badań naukowych oraz zarządzaniem zespołem na UC Berkeley, USA, Warszawa, 21.05.2013

Stypendium 5 | **Grant Plus**, Stypendium Urzędu Marszałkowskiego dla młodych naukowców, Wrocław, 22.10.2012

Stypendium 6 | **Stypendium wyjazdowe**, European Biophysical Societies' Association (EBSA), 13.12.2011

Wyróżnienia pracy naukowej:

Wyróżnienie pracy magisterskiej | „*Badania strukturalne egzopolisacharydów z różnych gatunków *Lactobacillus* wyizolowanych z ludzkiego przewodu pokarmowego*” prezentacja prac w ramach studenckiego koła naukowego w IITD PAN we Wrocławiu, 15.06.2009

Wyróżnienie pracy doktorskiej | „*Charakterystyka immunochemiczne białka OmpC rozpoznawanego przez przeciwciała krwi pępowinowej jako potencjalnego antygeny szczepionek koniugatowych*”, nadane uchwałą Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN z dnia 12.06.2014

7.2. Najważniejsze kursy i szkolenia:

- 2-dniowe szkolenie z **pisania wniosków ERC**: *Jak skutecznie aplikować o granty #ERC?*, Wrocławskie Centrum Transferu Technologii, Horyzontalny Punkt Kontaktowy Polska Południowo Zachodnia, Krajowy Punkt Kontaktowy Programów Badawczych UE (NCBR), Wrocław, 26-27.02.2025
- 2-dniowe szkolenie z zakresu **pisania oraz redagowania publikacji naukowych**, Technical University of Munich, 2020
- 8th **MaxQuant** Summer School 2016, Oxford University, UK, 4.06-8.06.2016
- **Intensive Proteomics** Course, Technical University of Munich, 21-25.09.2015
- High Pressure Liquid Chromatography (**HPLC**): Knauer Corp., Wrocław, 27.05.2014
- Szkolenie z Jasco J-1500 (**CD** - circular dichroism): Jasco Corp., Wrocław, 07.05.2014
- Szkolenie **LC-MALDI-TOF-MS/MS**: Bruker Corp., Wrocław, 29-31.09.12
- **Biacore** Systems – Leading the Way In Label-Free Interaction Analysis, Wrocław, 19.09.2012

7.3. Współpraca naukowa z innymi jednostkami naukowymi w ramach pracy w IITD PAN we Wrocławiu

TECHNICAL UNIVERSITY OF MUNICH, NIEMCY | współpraca po powrocie do Polski | Aktywnie współpracuję z jednostkami naukowymi w kraju i za granicą. Jedną z najważniejszych współprac, jaką aktualnie kontynuuję po powrocie do Polski (od 2022 r.) jest współpraca z **Katedrą Proteomiki i Bioanalizy** (Prof. Bernhard Kuster) oraz **Bawarskim Centrum Biomolekularnej Spektrometrii Mas (BayBioMS, Bavarian Center for Biomolecular Mass Spectrometry; dr Christina Ludwig)** w zakresie badań proteomicznych. Aktualnie jednostki te uczestniczą w pomiarach MS, realizowanych w ramach moich projektów (Lider XIII, NCBR oraz Sonata Bis 13, NCN). Dodatkowo prowadzimy trójstronną współpracę merytoryczną przy wsparciu finansowania z grantu, który uzyskałam z Fundacji Alexandra von Humboldta (Alexander von Humboldt Research Linkage Grant) na 3-letnie finansowanie współpracy pomiędzy naszymi jednostkami, które umożliwiają szkolenie studentów, doktorantów oraz młodej kadry pracującej w naszych jednostkach.

UNIVERSITY OF HELSINKI, FINLAND | Aktualnie prowadzimy aktywną współpracę (2023 – obecnie) z dr Tobiasem Freitag (**Translational Immunology Research Program at the Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland**) w zakresie badań modelowych na zwierzętach. W ramach tej współpracy badamy właściwości immunogenne oraz ochronne białek oraz koniugatów białko-peptyd, jako potencjalnych antygenów szczepionek podjednostkowych (współpraca w ramach realizacji grantu Lider XIII, NCBR).

UNIwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska | Od wielu lat (2015 – obecnie) współpracuję z Prof. Mirosławą Ferens-Sieczkową oraz dr Beatą Olejnik

(**Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu**). W ramach realizacji tej współpracy badamy wpływ glikozylacji białek obecnych na powierzchni plazmy nasienia na płodność mężczyzn z wykorzystaniem technik spektrometrii mas (**Publikacja 12-13**).

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, POLSKA | Efektem współpracy z dr Agnieszką Wojciechowską z **Politechniki Wrocławskiej** (2015-2022) jest cykl publikacji oraz patentów, jakie uzyskaliśmy w ramach przeprowadzonych badań. Mój wkład w powstanie tych publikacji polegał na ocenie właściwości przeciwdrobnoustrojowej związków kompleksowych opartych na jonach miedzi (**Publikacje 16-18; Patent 3, Zgłoszenie patentowe 2-3**).

UNIwersYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU, POLSKA | Dodatkowo współpracowałam z dr Krzysztofem Grzymajło z **Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu**. W badaniach tych wykonałam analizy proteomiczne umożliwiające identyfikację receptorów białkowych odpowiedzialnych za oddziaływanie pomiędzy komórkami jelitowymi świń oraz powierzchnią komórek bakteryjnych *Salmonella* (**Publikacja 14**). Współpraca z dr Aleksandrą Bawiec z **Uniwersytetu Przyrodniczego** zaowocowała publikacją opisującą identyfikację mikroorganizmów bytujących w zbiornikach wodnych na różnych etapach oczyszczania ścieków (**Publikacja 15**).

7.4. Przerwy w karierze naukowej.

11.2015-03.2016 | **intensywny kurs języka niemieckiego** (zakończony certyfikatem B2), Goethe Institute, Munich, Germany

01.11.2018-05.11.2019: | **urlop macierzyński** (12 m-cy), syn Oskar, urodzony 6.11.2018

16.01.2021-25.02.2022: | **urlop macierzyński** (13 m-cy), córka Natalia, urodzona 26.02.2021

.....
(podpis wnioskodawcy)