

dr Bożena Nejman-Faleńczyk

AUTOREFERAT PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 2019

1. Imię i nazwisko:

Bożena Nejman-Faleńczyk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe –z podaniem nazwy miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2012 r. Gdańsk – dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie mikrobiologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, dnia 15 czerwca 2012 r. na podstawie rozprawy doktorskiej pod tytułem „Kontrola replikacji fagów lambdoidalnych niosących geny toksyn Shiga w świetle potencjalnych nowych metod ich wykrywania i terapii zakażeń enterokrwotocznymi szczepami *Escherichia coli*”, przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna.

2010 r. Poznań – dyplom ukończenia studiów podyplomowych na kierunku Dietetyka i Planowanie Żywienia, uzyskany na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, na podstawie pracy dyplomowej pod tytułem „Niebezpieczeństwa związane ze skażeniem żywności bakterią *Escherichia coli* O157:H7”, przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Korczaka.

2006 r. Toruń – dyplom ukończenia uzupełniających studiów magisterskich na kierunku Biotechnologia, uzyskany na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, na podstawie pracy magisterskiej napisanej w języku angielskim pod tytułem: „TGF- β receptor expression determines progressive fibrosis”, przygotowanej pod kierunkiem prof. UMK, dr hab. Anny Goc i wykonanej w laboratorium prof. Olivera Eickelberga na Uniwersytecie Justusa Liebiga w Giessen, w Niemczech.

2005 r. Giessen (Niemcy) – certyfikat ukończenia I roku międzynarodowego programu MBML (z ang. Molecular Biology and Medicine of the Lung) skupiającego m.in. doktorantów Szkoły Medycznej na Uniwersytecie Justusa Liebiga w Giessen, w Niemczech.

2004 r. Toruń – dyplom ukończenia studiów licencjackich na kierunku Biotechnologia, uzyskany na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, na podstawie pracy licencjackiej pod tytułem: „Charakterystyka ludzkiego genu *BRC1*”, przygotowanej pod kierunkiem prof. UMK, dr hab. Anny Goc.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Od 2012 r. do chwili obecnej (z półroczną przerwą związaną z pobytem na urlopie macierzyńskim) jestem adiunktem w Katedrze Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Analiza funkcji wybranych, zakonserwowanych rejonów genomów fagów Stx w kontekście opracowywania nowych metod wykrywania i zwalczania infekcji Shiga-toksycznymi szczepami *Escherichia coli*

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

1. BLOCH SK, FELCZYKOWSKA A, NEJMAN-FALEŃCZYK B#. (2012) *Escherichia coli* O104:H4 outbreak- have we learnt a lesson from it? *Acta Biochimica Polonica*; 59(4): 483-488 – praca przeglądowa (#) - autor korespondujący
(IF₂₀₁₂ 1,185; pkt MNiSW: 15)
2. BLOCH S, NEJMAN-FALEŃCZYK B, ŁOŚ JM, BARAŃSKA S, ŁEPEK K, FELCZYKOWSKA A, ŁOŚ M, WĘGRZYN G, WĘGRZYN A. (2013) Genes from the *exo-xis* region of λ and Shiga toxin-converting bacteriophages influence lysogenization and prophage induction. *Archives of Microbiology* 195(10-11): 693-703. DOI: 10.1007/s00203-013-0920-8 – praca oryginalna
(IF₂₀₁₃ 1,861; pkt MNiSW: 20)
3. BLOCH S, NEJMAN-FALEŃCZYK B, DYDECKA A, ŁOŚ JM, FELCZYKOWSKA A, WĘGRZYN A, WĘGRZYN G. (2014) Different expression patterns of genes from the *exo-xis* region of bacteriophage lambda and Shiga toxin-converting bacteriophage Φ 24B following infection or prophage induction in *Escherichia coli*. *PLoS One* 9(10): e108233. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0108233 – praca oryginalna
(IF₂₀₁₄ 3,234; pkt MNiSW: 40)
4. NEJMAN-FALEŃCZYK B#, BLOCH S, JANUSZKIEWICZ A, WĘGRZYN A, WĘGRZYN G. (2015) A simple and rapid procedure for the detection of genes encoding Shiga toxins and other specific DNA sequences. *Toxins (Basel)*. 7(11): 4745-4757. DOI:10.3390/TOXINS7114745 – praca oryginalna (#) – autor korespondujący
(IF₂₀₁₅ 3,571; pkt MNiSW: 30)

Zaprezentowana w niniejszej pracy i opracowana metoda uzyskała krajową ochronę patentową (patenty numer: B1 218839 oraz B1 220906).

5. BLOCH S*, NEJMAN-FALEŃCZYK B*, TOPKA G, DYDECKA A, LICZNERSKA K, NARAJCZYK M, NECEL A, WĘGRZYN A, WĘGRZYN G. (2015) UV-sensitivity of Shiga toxin-converting bacteriophage virions Φ 24B, 933W, P22, P27 and P32. *Toxins (Basel)*. 7(9): 3727-3739. DOI: 10.3390/TOXINS7093727 - praca oryginalna, (*) – równorzędne pierwsze autorstwo
(IF₂₀₁₅ 3,571; pkt MNiSW: 30)
6. NEJMAN-FALEŃCZYK B, BLOCH S, LICZNERSKA K, FELCZYKOWSKA A, DYDECKA A, WĘGRZYN A, WĘGRZYN G. (2015) Small regulatory RNAs in lambdoid bacteriophages and phage-derived plasmids: not only antisense. *Plasmid* 78: 71-78. DOI:10.1016/J.PLASMID.2014.07.006 - praca przeglądowa
(IF₂₀₁₅ 1,732; pkt MNiSW: 15)
7. NEJMAN-FALEŃCZYK B*, BLOCH S*, LICZNERSKA K, DYDECKA A, FELCZYKOWSKA A, TOPKA G, WĘGRZYN A, WĘGRZYN G. (2015) A small, microRNA-size, ribonucleic acid regulating gene expression and development of Shiga toxin-converting bacteriophage Φ 24B. *Scientific Reports* 5: 10080. DOI: 10.1038/SREP10080 - praca oryginalna
(*) – równorzędne pierwsze autorstwo
(IF₂₀₁₅ 5,228; pkt MNiSW: 40)
8. LICZNERSKA K, NEJMAN-FALEŃCZYK B, BLOCH S, DYDECKA A, TOPKA G, GAŚSIOR T, WĘGRZYN A, WĘGRZYN G. (2016) Oxidative stress in Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Oxid Med Cell Longev*. 2016: 3578368. DOI:10.1155/2016/3578368 – praca przeglądowa
(IF₂₀₁₆ 4,593; pkt MNiSW: 30)
9. BLOCH S, WĘGRZYN A, WĘGRZYN G, NEJMAN-FALEŃCZYK B#. (2017) Small and smaller-sRNAs and microRNAs in the regulation of toxin gene expression in prokaryotic cells: A mini-review. *Toxins (Basel)*. 9(6): 181. DOI:10.3390/TOXINS9060181 – praca przeglądowa
(#) - autor korespondujący
(IF₂₀₁₇ 3,273; pkt MNiSW: 35)
10. BLOCH S*, NEJMAN-FALEŃCZYK B*, PIERZYNOWSKA K, PIOTROWSKA E, WĘGRZYN A, MARMINON CH, BOUAZIZ, Z, NEBOIS, P, JOSE, J, LE BORGNE, M, SASO, L, WĘGRZYN G. (2018) Inhibition of Shiga toxin-converting bacteriophage development by novel antioxidant compounds. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 33(1): 639-650. DOI:10.1080/14756366.2018.1444610 – praca oryginalna,
(*) – równorzędne pierwsze autorstwo
(IF₂₀₁₇ 3,638; pkt MNiSW: 25)
11. DYDECKA A, NEJMAN-FALEŃCZYK B, BLOCH S, TOPKA G, NECEL A, DONALDSON LW, WĘGRZYN G, WĘGRZYN A. (2018) Roles of *orf60a* and *orf61* in development of bacteriophages λ and Φ 24_B. *Viruses*. 10(10): 553. DOI: 10.3390/V10100553 – praca oryginalna
(IF₂₀₁₇ 3,761; pkt MNiSW: 30)

Osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl powiązanych tematycznie, jedenastu artykułów naukowych opublikowanych w latach 2012-2018, w czasopiśmie posiadających współczynnik wpływu Impact Factor (IF) i znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Wszystkie publikacje powstały po obronie mojej pracy doktorskiej, która odbyła się w czerwcu 2012 roku. IF podałam według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania pracy lub ostatni dostępny. Sumaryczny IF dla publikacji wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia naukowego wynosi **35,6 (IF SUM)**. Punkty MNiSW podałam według wykazu czasopism naukowych z listy A, zgodnie z rokiem opublikowania pracy lub uwzględniając ostatni rok, w którym przeprowadzono ocenę czasopism. Suma punktów MNiSW uzyskanych dla wyżej wymienionych artykułów wynosi **310 (pkt MNiSW SUM)**.

Wśród jedenastu zgłoszonych przeze mnie prac, cztery są pracami przeglądowymi, natomiast w pozostałych siedmiu opisane zostały oryginalne badania naukowe. W trzech z zaprezentowanych prac jestem autorem korespondującym (#), natomiast w sumie w pięciu pierwszym lub równorzędnie pierwszym (*). W pozostałych wymienionych publikacjach jestem drugim w kolejności autorem, jednak występowałam wówczas w roli promotora pomocniczego autora (doktorantki) z pierwszej pozycji. Opis mojego indywidualnego wkładu w powstanie każdej z publikacji znajduje się w Załączniku nr 4. Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład znajdują się w Załączniku nr 5.

W dalszej części autoreferatu prace wchodzące w skład niniejszego osiągnięcia naukowego są cytowane zgodnie z powyższą numeracją [**praca nr 1-11**]. Spis zacytowanej w pkt 4c literatury uzupełniającej znajduje się pod opisem. Podczas omawiania osiągnięcia zacytowane zostały tylko te najbardziej kluczowe doniesienia. Pozostałe prace zostały zacytowane w omówionych poniżej publikacjach.

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

Problematyka poruszona w prezentowanym osiągnięciu naukowym dotyczy bakteriofagów Stx przenoszących geny groźnych dla człowieka toksyn Shiga. Fagi te, infekują bakterie *Escherichia coli* i tym samym przekształcają je w niebezpieczne, zdolne do produkcji toksyn patogeny, z których najliczniejszą grupę stanowią enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (EHEC). Badania przeprowadzone w ramach ww. prac zwracają uwagę na wybrane, zakonserwowane w genomach fagów Stx rejonu sekwencji, mogące mieć znaczenie w wykrywaniu lub zwalczaniu infekcji Shiga-toksycznymi bakteriami. Co istotne, funkcje niektórych z analizowanych rejonów sekwencji nie były wcześniej znane.

Najbardziej rozpowszechnionym przedstawicielem bakterii EHEC jest *E. coli* o serotypie O157:H7, rozpoznawana na świecie od 1982 roku. Bakteria ta, została wówczas po raz pierwszy zidentyfikowana jako przyczyna masowych przypadków zatrucia pokarmowych, przebiegających z ostrą, długotrwałą biegunką krwotoczną oraz będących efektem spożycia hamburgerów, w jednej z restauracji typu fast food, w Stanach Zjednoczonych (Riley i wsp. 1983). Wówczas nie było jeszcze wiadomo, że przyczyną tych objawów są toksyny Shiga, których geny (*stx*) zlokalizowane są w genomie występującego w bakterii profaga, a nie w genomie samej bakterii. Nie wiadomo również, że produkcja tych niebezpiecznych toksyn uzależniona jest od decyzji faga o przejściu z rozwoju lizogenicznego w cykl lityczny.

Od tego czasu, zidentyfikowanych zostało ponad 470 różnych serotypów bakterii *E. coli* lizogennych fagami Stx i zdolnych do produkcji toksyn Shiga. Każdego roku, te patogenne bakterie są przyczyną kilkuset tysięcy przypadków zachorowań na świecie i odnotowuje się znaczący wzrost liczby infekcji wywołanych przez inne, niż O157:H7, serotypy bakterii *E. coli*. (Lee i wsp. 2016). Dane epidemiologiczne wskazują, iż najczęstszą przyczyną masowych zachorowań wywołanych tymi bakteriami jest spożycie zainfekowanej wołowiny i kielków, ale źródłami infekcji są również inne surowe warzywa, niepasteryzowane soki, a także woda. Do zanieczyszczenia żywności dochodzi najczęściej podczas uboju zwierząt lub nawożenia upraw ich odchodami, gdyż to właśnie zwierzęta domowe (przede wszystkim bydło) są rezerwuarem bakterii EHEC (Krüger i Lucchesi, 2015). Powszechność występowania tych bakterii oraz łatwy dostęp do potencjalnych źródeł zakażeń sprawiają, że oprócz zagrożeń zdrowotnych, każdej epidemii towarzyszą również poważne straty ekonomiczne. W dużej mierze są one wynikiem wywołanej paniki i strachu społeczeństwa przed spożywaniem mięsa i warzyw. Dla przykładu, straty finansowe producentów żywności będące efektem wywołanej przez Shiga-toksyczny szczep *E. coli* O104:H4, epidemii w Niemczech i innych krajach europejskich, w 2011 roku, oszacowano na ponad 3 mld EUR (wg WHO). Główną przyczyną tych obaw jest z kolei świadomość, że nie istnieją skuteczne sposoby leczenia infekcji bakteriami produkującymi toksyny Shiga, a nieleczone infekcje mogą prowadzić do rozwoju ciężkich powikłań, takich jak np. przebiegający z ostrą niewydolnością nerek, zespół hemolityczno-mocznicowy (HUS). Dowiedziono, iż wiele antybiotyków i znanych czynników antybakteryjnych nie może być wykorzystywanych w leczeniu tego typu infekcji, gdyż indukują one rozwój lityczny fagów Stx, wzmagają produkcję toksyn i tym samym zamiast leczyć, nasilają objawy chorobowe (Kimmit i wsp. 2000). Ponadto, wybuch epidemii w 2011 roku uwidocznił poważne ograniczenia związane z wykrywaniem Shiga-toksycznych bakterii. Problemy te przeanalizowaliśmy w **pracy nr 1**. Jak wskazaliśmy, największa trudność diagnostyczna podczas tej epidemii wynikała z faktu, że przyczyną licznych i szybko postępujących zachorowań była bakteria o nietypowych cechach (*E. coli* O104:H4), wykazująca podobieństwo zarówno do enterokrwotocznym, jak i enteroagregacyjnym (EAEC) szczepów *E. coli*. Okazało się bowiem, że bakteria ta posiadała unikatowy zestaw czynników zjadliwości. Podobnie jak inne szczepy EHEC produkowała odpowiedzialną za objawy chorobowe toksynę Shiga, natomiast nie wytwarzała charakterystycznych dla bakterii EHEC białek intyminy oraz enterohemolizyny. Co ciekawe, w zamian posiadała geny kodujące czynniki adhezyjne typowe dla bakterii z grupy EAEC. Ostatecznie ustalono, że bakteria ta powstała w wyniku wystąpienia horyzontalnego transferu genów i w efekcie nabyła cechy charakterystyczne dla różnych patotypów bakterii *E. coli*. Zdolność do produkcji toksyn Shiga, bakteria *E. coli* O104:H4 nabyła w wyniku pozyskania profaga niosącego geny tych toksyn. Badania sekwencji genomu faga wyizolowanego z tej bakterii, wykazały jej duże podobieństwo do genomów znanych fagów Stx infekujących bakterie z grupy EHEC. Co istotne jednak, był to pierwszy opisany przypadek infekcji fagiem Stx bakterii *E. coli* o tym serotypie. W efekcie tego, stosowane podczas epidemii diagnostyczne metody serologiczne okazały się nieskuteczne. Ponadto, zawiodły również metody molekularne rutynowo stosowane w wykrywaniu bakterii z grupy EHEC i oparte

na identyfikacji genu intyminy (*eae*). Odnosząc się do opisanych w **pracy nr 1** trudności w identyfikacji bakterii produkujących toksyny Shiga, w podsumowaniu wskazaliśmy potrzebę opracowania nowych molekularnych metod diagnostycznych, ukierunkowanych na wykrywanie sekwencji zlokalizowanych na ruchomych elementach genetycznych, w szczególności występujących w genomach profagów Stx sekwencji genów toksyn Shiga (*stx*).

Sami również podjęliśmy się tego zadania [**praca nr 4**]. Przeprowadziliśmy analizę sekwencji genów *stx* kodujących toksyny Shiga typu 1 oraz 2 i zidentyfikowaliśmy w ich obrębie rejony o wysokim stopniu zakonserwowania w genomach fagów Stx. Do znalezionych fragmentów sekwencji genów *stx1* i *stx2*, zaprojektowaliśmy dwa zestawy rozpoznających je starterów i sond. W efekcie przeprowadzonych prac, uzyskaliśmy nową, opartą na technice PCR metodę umożliwiającą wykrywanie ww. sekwencji DNA, której skuteczność i specyficzność przetestowaliśmy na próbach DNA pochodzących z 19 różnych izolatów Shiga-toksycznych bakterii *E. coli*. Materiał do badań pozyskaliśmy dzięki współpracy z dr Aleksandrą Januszkiewicz z Państwowego Zakładu Higieny. Zaproponowana przez nas metoda przypomina klasyczne testy PCR, jednakże w tym przypadku, amplifikacja fragmentów DNA genów toksyn przez polimerazę DNA, zachodzi w obecności pary starterów oraz podwójnie wyznakowanej, specyficznej dla danej sekwencji sondy DNA. Sondę stanowi krótki odcinek DNA komplementarny do docelowej sekwencji i posiadający na jednym końcu wzbudzany światłem UV reporter fluorescencji, a na drugim końcu kompatybilną z tym znacznikiem, cząsteczkę wygaszającą emitowaną fluorescencję. Z kolei startery są zaprojektowane do fragmentu DNA obejmującego miejsce wiązania dla tej sondy. W reakcji amplifikacji wykorzystywana jest aktywność 5'→3' egzonukleazy polimerazy DNA *Taq*, dzięki której sonda, po związaniu się z docelowym fragmentem DNA, jest degradowana na etapie wydłużania starterów. W wyniku degradacji sondy, reporter uwalnia się spod działania wygaszacza i po wzbudzeniu światłem o określonej długości fali, emituje sygnał fluorescencji. Opisany powyżej mechanizm był już wcześniej znany (Bustin, 2000) i standardowo wykorzystywany w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR), jednak zgodnie z przedstawioną w **pracy nr 4** koncepcją, postanowiliśmy zastosować ten schemat w reakcji PCR przeprowadzanej w klasycznych termocyklerach. W odróżnieniu od wcześniejszych przykładów zastosowań, wykorzystaliśmy mało istotną z punktu widzenia reakcji real-time PCR, możliwość wzbudzenia fluorescencji niektórych reporterów (np. FAM) światłem UV i dzięki temu mogliśmy zaproponować alternatywny w stosunku do elektroforezy DNA w żelu agarozowym, nowy sposób detekcji powstałego podczas tej reakcji produktu. Sposób ten jest bardzo prosty, zajmuje zaledwie kilka minut. Polega on na obserwacji w świetle UV sygnału fluorescencyjnego emitowanego przez uwolniony w wyniku degradacji sondy reporter fluorescencji. Co istotne, sygnał ten jest widoczny „gołym okiem” w postaci zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej, bezpośrednio w próbówce i pojawia się tylko wówczas gdy dojdzie do amplifikacji (komplementarnego do sondy) docelowego fragmentu DNA [**rycina nr 1 – praca nr 4**]. Dodatkowo, wykazaliśmy, że w porównaniu z klasycznymi testami PCR proponowanymi w połączeniu ze standardowym sposobem detekcji

produktów PCR za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, opracowana przez nas metoda jest nie tylko szybsza, ale i bardziej specyficzna. Ponadto, ze względu na brak konieczności przenoszenia mieszaniny poreakcyjnej z próbki, jest również mniej podatna na zanieczyszczenia. Z kolei, w odniesieniu do testów PCR w czasie rzeczywistym, metoda ta nie wymaga przeprowadzenia skomplikowanej analizy wyników, ani też zakupu drogich aparatów do real-time PCR, gdyż detekcja sygnału jest tu możliwa przy użyciu klasycznego termocyklera i transiluminatora UV. Zaproponowana metoda spotkała się z uznaniem i w ramach programu LIDER Narodowego Centrum Badań i Rozwoju została kierownikiem projektu i otrzymałam fundusze na realizację badań w tym temacie (Nr Lider/21/92/L-3/11/NCBR/2012). Poza tym, od 2015 roku jest objęta krajową ochroną patentową [patenty opisane w pkt II.B.1-2 zał. 4]. Obecnie kontynuuję badania nad ukierunkowaniem opracowanej metody na wykrywanie również innych patogenów i prowadzę prace przedwdrożeniowe w ramach realizacji na Uniwersytecie Gdańskim projektu „Inkubator Innowacyjności+” finansowanego przez MNiSW (Nr MNISW/2017/DIR/68/II +).

Przy okazji prowadzenia badań nad metodą wykrywania sekwencji genów toksyn Shiga, zaobserwowaliśmy, że bakteriofagi Stx są znacznie bardziej wrażliwe na światło UV niż blisko z nimi spokrewniony fag λ . W **pracy nr 5** wykazaliśmy, że promieniowanie UV (w dawce 50 J/m²) ma negatywny wpływ na stabilność wirionów fagów Stx oraz ich zdolność do infekcji bakterii *E. coli*. Analiza z wykorzystaniem technik mikroskopii elektronowej wykazała, że przyczyną obniżonej stabilności fagów są najprawdopodobniej wywołane światłem UV, uszkodzenia kapsydów prowadzące, przynajmniej w części analizowanych przypadków, do wycieku fagowego DNA. Na tej podstawie, wydawać by się mogło, że światło UV może być dobrym narzędziem do walki z bakteriofagami przenoszącymi geny toksyn Shiga. Okazało się jednak, że zastosowane w podanej powyżej dawce promieniowanie UV, stymuluje również indukcję profaga Stx (Φ 24B) i tym samym jego lityczny rozwój w bakteriach *E. coli* [**praca nr 2**]. Co więcej, uzyskane przez nas wyniki były zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Aersten i wsp. 2005). Mając z kolei na uwadze fakt, że mało prawdopodobne jest, iż to właśnie światło UV warunkuje indukcję profagów Stx w dolnym odcinku przewodu pokarmowego człowieka, postanowiliśmy kontynuować rozpoczęte uprzednio rozważania (Łoś i wsp. 2013) na temat roli nadtlenu wodoru w tym procesie. W **pracy nr 8**, odwołaliśmy się do doniesień wskazujących, że produkowany przez neutrofile nadtlenek wodoru może być naturalnym induktorem rozwoju litycznego fagów Stx, w bytujących w jelitach, patogennych bakteriach *E. coli*. Przypomnieliśmy również, że mechanizm tej indukcji opiera się na zależnej od odpowiedzi SOS degradacji głównego represora cyklu litycznego – białka CI, natomiast sama odpowiedź SOS jest uruchamiana w efekcie pojawienia się w komórce jednoniciowych fragmentów DNA. Te z kolei, są efektem uszkodzeń DNA powstających w obecności nadtlenu wodoru, ale także innych czynników indukujących np. wspomnianego światła UV. Na podstawie zaobserwowanych w **pracy nr 3** istotnych, uzależnionych od zastosowanego induktora, różnic w poziomie ekspresji fagowych genów oraz w oparciu o dostępne dane literaturowe, w **pracy nr 8** zwróciliśmy uwagę na fakt, że wydajność indukcji profagów lambdoidalnych (w

tym Stx) wywołanej nadtlaniem wodoru jest niższa, niż w wydajność indukcji spowodowanej antybiotykami, czy światłem UV. Przywołane przez nas dane wskazują, że do indukcji profagów zachodzi w zaledwie 1 % komórek populacji bakterii w przypadku zastosowania H₂O₂ i aż w 30 % przy użyciu antybiotyku mitomycyny C. Zastanawiając się nad mechanizmem determinującym tak niską wydajność indukcji profagów w warunkach stresu oksydacyjnego, natrafiliśmy na ciekawą pracę (Glinkowska i wsp. 2010) wskazującą na istotną rolę, aktywowanego w tych warunkach, białka OxyR. Dowiedziono, że białko to wiąże się w rejonie promotorowym *p_M-p_R* faga λ i przyczynia się do bardziej efektywnej transkrypcji z promotora *p_M* i tym samym wzmożonej ekspresji genu *ci*. Co istotne, analizy *in silico* przeprowadzone zarówno przez nas, jak i autorów wspomnianej pracy, wykazały występowanie potencjalnych miejsc wiązania dla białka OxyR w obrębie sekwencji promotorowych *p_M-p_R* fagów Stx. Na tej podstawie, w **pracy nr 8** zaproponowaliśmy wspólny dla fagów λ i Stx, regulowany przez białko OxyR mechanizm indukcji profagów nadtlaniem wodoru. Mechanizm ten zakłada, że w warunkach wywołanego obecnością H₂O₂ stresu oksydacyjnego, aktywne białko OxyR przyczynia się do wzmożonej produkcji białka CI, którego duża ilość nie jest w całości degradowana podczas uruchomionej odpowiedzi SOS. W efekcie, w większości komórek analizowanej populacji bakterii, białko to nadal funkcjonuje utrzymując faga w stanie lizogenii, a tylko w niewielkiej ich części dochodzi do uruchomienia cyklu litycznego i produkcji fagowych białek (w tym toksyn w przypadku fagów Stx). Komórki, w których doszło do indukcji profaga giną i postuluje się, że liza zachodząca w niewielkiej frakcji komórek bakteryjnych w populacji, jest mechanizmem obronnym całej populacji, w efekcie którego część bakterii „poświęca się” aby inne mogły przetrwać spotkanie z atakującym je drapieżnikiem (Łoś i wsp. 2013). Co istotne, to właśnie uwolnione w reakcji obronnej toksyny Shiga są narzędziem w walce z zagrażającym bakteriom organizmem (np. pierwotniakiem *Tetrahymena thermophila*) i mogą doprowadzić do jego śmierci. Zaskakujące jest również to, że nadtlanie wodoru, który uruchamia mechanizm obronny bakterii, wydzielany jest najczęściej przez samego drapieżnika (Lainhart i wsp. 2009). Co ciekawe, podobna sytuacja występuje w ludzkich jelitach, gdzie do produkcji nadtlenu wodoru zdolne są neutrofile napływające w odpowiedzi na infekcję bakteryjną. W tym świetle, panujące w jelitach warunki stresu oksydacyjnego, wydały się nam najbardziej prawdopodobnym sygnałem do produkcji toksyn Shiga przez patogenne bakterie *E. coli* bytujące w przewodzie pokarmowym człowieka. Z tego względu właśnie, istotne było dla nas poznanie kolejnych rejonów w genomach fagów Stx, mających znaczenie w tego typu reakcji stresowej.

Takim rejonem okazał się fragment fagowej sekwencji zlokalizowany pomiędzy genami *exo* i *xis*. Jak wykazaliśmy w **pracy nr 2**, znamienne dla rejonu *exo-xis* fagów λ i Stx są cztery otwarte ramki odczytu (opisane u faga λ jako: *orf60a*, *orf63*, *orf61* i *orf73*) o nieznanym jeszcze do niedawna funkcji oraz jeden rozpoznany, jednak niescharakteryzowany gen (*ea22*). Co ciekawe, okazało się, że w przeciwieństwie do faga λ, rejony *exo-xis* analizowanych przez nas fagów Stx, zawierają dodatkowe otwarte ramki odczytu i nie posiadają odpowiednika genu *ea8.5*. Mając świadomość, że zachowane ewolucyjnie sekwencje mogą

wskazywać na ich istotne znaczenie biologiczne oraz na podstawie wcześniejszych doniesień dotyczących rejonu *exo-xis* faga λ (Łoś i wsp. 2008), postanowiliśmy zbadać wpływ tego rejonu na rozwój faga Stx (Φ 24B) w bakteriach *E. coli*. Początkowo, prowadziliśmy badania w warunkach nadekspresji całego rejonu *exo-xis*, wprowadzając do komórek bakteryjnych plazmid zawierający dodatkową kopię fragmentu sekwencji faga Φ 24B, znajdującego się pomiędzy genami *exo* i *xis*. W efekcie przeprowadzonych prac, zaobserwowaliśmy wzrost liczby cząstek fagowych w wariancie z nadekspresją rejonu, po indukcji wymuszonej zarówno mitomycyną C, jak i nadtlenkiem wodoru, przy czym efekt ten był bardziej widoczny w doświadczeniu prowadzonym w temperaturze 30°C [**praca nr 3**] niż 37°C [**praca nr 2**]. Ponadto, wykazaliśmy, że wskutek wymuszonej indukcji profaga w bakteriach niosących dodatkową kopię sekwencji rejonu *exo-xis* na plazmidzie, nastąpił wzrost poziomu fagowego DNA i jednoczesny spadek przeżywalności bakterii *E. coli*, w porównaniu z próbą kontrolną [**praca nr 3**]. Zgodnie z oczekiwaniami, wydajność procesu lizogenizacji bakterii *E. coli* fagiem Φ 24B oraz przeżywalność bakterii po infekcji tym fagiem były niższe w wariancie z nadekspresją tego rejonu [**praca nr 2**]. W świetle uzyskanych wyników wysunęliśmy wstępny wniosek, że istnieje zależność pomiędzy rejonem *exo-xis*, a litycznym rozwojem fagów lambdoidalnych. Spostrzeżenia te były zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi faga λ , które dowiodły, że w warunkach nadekspresji rejonu *exo-xis* faga λ dochodzi do obniżenia poziomu transkrypcji z promotorów zależnych od białka CII, a mianowicie p_E , p_I oraz p_{aQ} , których aktywność z kolei jest istotna z punktu widzenia cyklu lizogenicznego (Łoś i wsp. 2008). Na tej podstawie, podjęliśmy decyzję o rozwinięciu badań w tym temacie. Wspólnie przygotowaliśmy projekt badawczy, który uzyskał finansowanie w konkursie Opus 5 Narodowego Centrum Nauki (Nr UMO-2013/09/B/NZ2/02366). Jako współtwórca projektu objęłam w nim funkcję głównego wykonawcy i wspólnie z innymi uczestnikami grantu, kontynuowaliśmy badania nad rejonem *exo-xis* fagów lambdoidalnych. Badania przeprowadziliśmy z wykorzystaniem fagowych mutantów delecyjnych, pozbawionych sekwencji całego lub określonego fragmentu rejonu *exo-xis*. Mutanty zostały uzyskane przez nas za pomocą rekombinacji homologicznej. W efekcie wykonanych przez nas prac badawczych powstał artykuł [praca nr II.A.12 zał. 4], który nie został włączony do niniejszego osiągnięcia, jednak jest z nim powiązany tematycznie. W pracy tej wykazaliśmy, że wymuszona nadtlenkiem wodoru indukcja profaga Φ 24B Δ *exo-xis*, pozbawionego rejonu *exo-xis*, była drastycznie upośledzona. Co ciekawe, wykrywana liczba cząstek fagowych w tym wariancie była na poziomie wartości uzyskanych podczas indukcji spontanicznej, czyli w próbie kontrolnej bez dodatku induktora. Dodatkowo, w porównaniu z fagiem typu dzikiego, odnotowaliśmy obniżenie poziomu ekspresji kluczowych fagowych genów, po indukcji nadtlenkiem wodoru fagowego mutantu delecyjnego Φ 24B Δ *exo-xis*, natomiast nie λ Δ *exo-xis*. Ku naszemu zaskoczeniu, w tych warunkach zauważyliśmy również obniżony, w porównaniu z wariantem kontrolnym, poziom ekspresji kluczowych dla odpowiedzi SOS genów bakteryjnych. Co istotne, efekt ten był widoczny u obydwu analizowanych fagów, aczkolwiek bardziej spektakularne różnice uzyskaliśmy w przypadku mutantu delecyjnego faga Φ 24B. Na tej podstawie wywnioskowaliśmy, że zakodowane w rejonie *exo-xis* fagów lambdoidalnych produkty odgrywają istotną rolę w indukowanej H₂O₂ odpowiedzi SOS i w

związku z tym postanowiliśmy przyjrzeć się bliżej zlokalizowanym w tym rejonie otwartym ramkom odczytu. Naszą uwagę zwróciły, zlokalizowane w rejonie *exo-xis* faga $\Phi 24B$, sekwencje *vb_24B_9c* oraz *vb_24B_7c*, stanowiące odpowiedniki dwóch otwartych ramek odczytu (*orf60a* oraz *orf61*), zidentyfikowanych w rejonie *exo-xis* faga λ . Dla uproszczenia, w naszej dalszej pracy przyjęliśmy dla nich nazwy zgodnie z nomenklaturą stosowaną u faga λ . W **pracy nr 11** wykazaliśmy, że sekwencje *orf60a* oraz *orf61* są wysoko zakonserwowane w genomach fagów Stx, zarówno na poziomie zapisu nukleotydowego, jak i aminokwasowego (po przetłumaczeniu). Z kolei analizując rozwój w bakteriach *E. coli* fagowych mutantów delecyjnych pozbawionych tych sekwencji ($\Phi 24B\Delta orf60a$ oraz $\Phi 24B\Delta orf61$) dowiedliśmy, że obie analizowane ramki odczytu mają znaczenie podczas indukcji profaga $\Phi 24B$ nadtlaniem wodoru, gdyż ich usunięcie z genomu faga miało negatywny wpływ na ten proces. Co istotne jednak, obserwowany efekt nie był tak spektakularny, jak w przypadku delecji całego rejonu *exo-xis* z genomu faga $\Phi 24B$ [praca nr II.A.12 zał. 4]. Poza tym, pomimo wysokiego podobieństwa tych sekwencji do analogicznych otwartych ramek odczytu w rejonie *exo-xis* faga λ , nie zaobserwowaliśmy tak istotnego wpływu mutantów delecyjnych $\lambda\Delta orf60a$ oraz $\lambda\Delta orf61$. Również odnotowany przez nas wzrost wydajności lizogenizacji bakterii *E. coli* fagowymi mutantami delecyjnymi był bardziej znaczący w przypadku mutantów faga $\Phi 24B$ niż λ . W świetle wyników uzyskanych zarówno w warunkach nadekspresji, jak i delecji rejonu *exo-xis*, wysunęliśmy wniosek, że rejon ten odgrywa ważną rolę w procesie indukcji profagów Stx oraz ich dalszego rozwoju litycznego w warunkach stresu oksydacyjnego. Znaczenie otwartych ramek odczytu *orf60a* oraz *orf61* jest istotne w tym procesie, aczkolwiek wpływ całego rejonu *exo-xis* jest zdumiewający i niewątpliwie jest on wynikiem współdziałania również innych czynników z tego rejonu. m.in. badanej przez nas otwartej ramki odczytu *orf63* [praca nr II.A.14 zał. 4]. Co prawda, praca opisująca *orf63* nie weszła w skład niniejszego osiągnięcia i jest omówiona w punkcie 5 autoreferatu, jednak od niej zaczęła się nasza aktywna współpraca z prof. Loganem Donaldsonem z Uniwersytetu York w Kanadzie. Współpracę tę kontynuowaliśmy przy okazji badań nad *orf60a* oraz *orf61* i podtrzymujemy ją do dnia dzisiejszego. Wspólnie prowadzimy badania nad kolejnymi czynnikami z rejonu *exo-xis*, a obecnie analizujemy gen *ea22*. Uzyskana dotąd wiedza, uzmysłowiła nam, że wyjaśnienie mechanizmu, za pomocą którego czynniki zakodowane w rejonie *exo-xis* regulują rozwój fagów Stx w warunkach stresu oksydacyjnego może mieć znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalne znaczenie praktyczne. Mając świadomość, że patogenność Shiga-toksycznych bakterii w jelitach człowieka zależy przede wszystkim od wyboru jakiego dokonuje bakteriofag na etapie podjęcia decyzji „liza czy lizogenia” oraz od wydajności indukcji profaga i jego dalszego rozwoju litycznego w warunkach stresu oksydacyjnego, zasugerowaliśmy, że uzyskana przez nas wiedza, może mieć znaczenie w opracowywaniu alternatywnych, w stosunku do antybiotyków, terapii leczenia.

W kontekście prowadzenia badań istotnych z punktu widzenia opracowywania takich nowych terapii, podjęliśmy dodatkowe kroki. Mając na uwadze, iż stan stresu oksydacyjnego jest efektem działania wolnych rodników (w tym powstającego z nadtlenu wodoru wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego), które to

powodują w komórce liczne uszkodzenia, m.in. uruchamiające odpowiedź SOS uszkodzenia DNA, w kolejnym etapie badań [**praca nr 10**] postanowiliśmy sprawdzić, czy związki o właściwościach antyoksydacyjnych mogą przeciwdziałać indukcji profagów Stx w takich warunkach. Dzięki współpracy z grupą badawczą prof. Luciano Saso z Uniwersytetu Sapienza w Rzymie pozyskaliśmy 46 nowo zsyntetyzowanych związków i przeanalizowaliśmy ich wpływ na wzrost bakterii *E. coli* lizogennych fagiem Stx (Φ 24B) po indukcji profaga. W przypadku 15 badanych związków, pomimo zastosowania induktora, zaobserwowaliśmy istotny wzrost bakterii w hodowli prowadzonej w obecności związku, w porównaniu z wariantem kontrolnym (DMSO). Zasugerowaliśmy, że może to świadczyć o zahamowaniu procesu indukcji profaga lub jego dalszego rozwoju litycznego. Chcąc potwierdzić nasze przypuszczenia, postanowiliśmy zbadać wpływ ww. związków na liczbę cząstek fagowych powstających podczas rozwoju faga w warunkach indukcji wymuszonej różnymi induktorami, w tym nadtlakiem wodoru. W efekcie przeprowadzonej analizy, zaobserwowaliśmy, że pomimo użycia nadtlakiem wodoru, nastąpił drastyczny spadek liczby cząstek fagowych w hodowlach prowadzonych w obecności badanych związków, w porównaniu z wariantem kontrolnym (DMSO). Co więcej, przeprowadzona dla trzech wybranych związków, analiza ekspresji genów w tych warunkach, wykazała znaczny spadek poziomu ekspresji genów bakteryjnych, istotnych z punktu widzenia odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz kluczowych genów cyklu litycznego faga, natomiast wzrost poziomu ekspresji genu fagowego represora CI. Świadczy to najprawdopodobniej o ukierunkowanym działaniu testowanych związków, które obniżając poziom stresu oksydacyjnego w komórce zapobiegają wymuszonej nadtlakiem wodoru indukcji profagów Stx. W konsekwencji, umożliwiają one zatrzymanie rozwoju faga w stanie lizogenii i zapobiegają produkcji toksyn Shiga. W praktyce, stwarza to potencjalne możliwości wykorzystania tych związków do zwalczania infekcji Shiga-toksycznymi bakteriami.

Pozostając w temacie poszukiwania kolejnych rejonów sekwencji fagów Stx, mogących mieć znaczenie w opracowywaniu alternatywnych terapii leczenia infekcji tymi bakteriami, postanowiliśmy przyjrzeć się bliżej zakodowanym w genomach tych fagów małym regulatorowym cząsteczkom RNA. Nasz wybór nie był przypadkowy. W literaturze opisanych zostało wiele przykładów terapeutycznego znaczenia tego typu cząsteczek (DeJong i wsp. 2002). W **pracy nr 6** gruntownie przeanalizowaliśmy dwie niekodujące cząsteczki RNA zidentyfikowane u faga λ (aQ RNA i oop RNA). Następnie, na podstawie wyników wykonanych przez nas analiz *in silico*, wykazaliśmy obecność w genomach fagów Stx dość dobrze zakonserwowanej sekwencji kodującej cząsteczkę oop RNA i opracowaliśmy dla niej prawdopodobne modele struktury drugorzędowej. Ponadto, zebraliśmy informacje o innych, nowo odkrytych w genomach fagów Stx, małych, niekodujących cząsteczkach RNA, których okazało się być całkiem sporo. Zachęceni tymi doniesieniami, sami również postanowiliśmy poszukać nowych, fagowych cząsteczek tego typu. W efekcie przeprowadzonych badań [**praca nr 7**], odkryliśmy pierwszą cząsteczkę typu mikroRNA, którą nazwaliśmy 24B_1, od nazwy bakteriofaga Φ 24B, u którego została znaleziona. Zidentyfikowana cząsteczka

ma zaledwie 20 nukleotydów i powstaje prawdopodobnie z dłuższego 80-nukleotydowego transkryptu prekursorowego. W oparciu o przeprowadzone przez nas analizy *in silico* ustaliliśmy, że sekwencja kodująca cząsteczkę 24B_1 znajduje się w genomie faga Φ 24B pomiędzy genem *lom* oraz otwartą ramką odczytu *vb_24B_43*, jest wysoko zakonserwowana w genomach fagów Stx i nie występuje w genomie faga λ . Dodatkowo, zidentyfikowaliśmy dwa potencjalne miejsca wiązania dla tej cząsteczki, z których pierwsze jest zlokalizowane powyżej fagowego genu *S*, a drugie znajduje się w obrębie genu *d_ant*, kodującego prawdopodobnie białko o właściwościach antyrepresora. Następnie, wykonaliśmy szereg doświadczeń z wykorzystaniem fagowego mutanta delecyjnego pozbawionego sekwencji kodującej tę cząsteczkę i wykazaliśmy jej istotność biologiczną. Zaobserwowaliśmy, że usunięcie sekwencji dłuższej formy cząsteczki 24B_1 z genomu faga, skutkowało m.in. obniżeniem wydajności lizogenizacji bakterii *E. coli* i ich przeżywalności po infekcji fagiem, poza tym przyspieszeniem momentu indukcji profaga i jednocześnie zwiększeniem liczby potomnych cząstek fagowych podczas cyklu litycznego. Ponadto, odnotowaliśmy znacznie podwyższony poziom ekspresji kluczowych genów fagowych podczas infekcji komórek bakteryjnych mutantem Φ 24B Δ 24B_1 i na podstawie uzyskanych wyników zaproponowaliśmy mechanizm działania tej cząsteczki. Mechanizm ten wskazuje na rolę cząsteczki 24B_1 jako negatywnego regulatora ekspresji genu *d_ant*, którego produkt z kolei hamuje najprawdopodobniej aktywność głównego represora cyklu litycznego faga, czyli białka CI. W konsekwencji działania cząsteczki 24B_1, nie powstaje białko antyrepresora, a CI efektywnie hamuje transkrypcję z głównych promotorów fagowych p_L i p_R i tym samym również ekspresję istotnych dla rozwoju litycznego fagowych genów. Podsumowując nasze obserwacje stwierdziliśmy, że cząsteczka 24B_1, która pod wieloma względami przypomina eukariotyczne mikroRNA, odgrywa istotną rolę na etapie wyboru przez faga jednej z dwóch alternatywnych dróg rozwojowych: „lizy bądź lizogenii” i pośrednio stymuluje lizogeniczny rozwój faga Φ 24B w bakteriach *E. coli*. Na podstawie tego istotnego odkrycia, w **pracy nr 9** zainicjowaliśmy rozważania na temat występowania i roli cząsteczek typu mikroRNA u organizmów prokariotycznych, jako że niewiele na ten temat było dotąd wiadomo, a niektórzy naukowcy wręcz kwestionowali funkcjonowanie tego typu prokariotycznych cząsteczek. Analizując ówczesny stan wiedzy dotarliśmy do wcześniejszych doniesień wskazujących na istnienie kilku równie krótkich, co 24B_1, cząsteczek typu mikroRNA pochodzenia bakteryjnego, których funkcje nie zostały jednak poznane. Co istotne, w kilku opisanych przypadkach potwierdzono występowanie dłuższych prekursorowych transkryptów. Na tej podstawie zasugerowaliśmy, że prokariotyczne cząsteczki typu mikroRNA przechodzą analogiczny do eukariotycznych mikroRNA proces obróbki. Mechanizm postawiania krótkich cząsteczek RNA z dłuższych form nie został poznany, aczkolwiek na podstawie analizy wyników NGS wskazaliśmy, że do przecięcia prekursora dochodzi najprawdopodobniej w specyficznym miejscu. Jednocześnie, zwróciliśmy uwagę na odniesienia potwierdzające występowanie bakteryjnych cząsteczek typu mikroRNA w pęcherzykach błony zewnętrznej oraz na hamujący wpływ takich cząsteczek na produkcję niektórych cytokin i układ odpornościowy gospodarza. Odnosząc się do tych doniesień, dostrzegliśmy kolejną analogię do eukariotycznych mikroRNA, których transport może również odbywać się przy udziale

uwalaniach przez komórki małych pęcherzyków tzw. eksosomów. W oparciu o te spostrzeżenia, zasugerowaliśmy wyodrębnienie cząsteczek typu mikroRNA jako kolejnej (obok *cis*- i *trans*-kodowanych małych RNA) grupy regulatorowych cząsteczek RNA, funkcjonujących w komórkach prokariotycznych. Hipoteza ta wydaje się być wysoce prawdopodobna w kontekście wirusów łagodnych (czyli m.in. fagów Stx), zdolnych do rozwoju zarówno lizogenicznego, jak i litycznego. Jest to podyktowane tym, że cząsteczki mikroRNA zostały zidentyfikowane i dobrze poznane u wirusów atakujących komórki eukariotyczne, głównie herpeswirusów (Pfeffer i wsp. 2004), które podobnie jak fagi Stx, przechodzą dwie fazy cyklu, utajoną (latentną) oraz lityczną i co ciekawe są spokrewnione z fagami ogonkowymi, do których fagi Stx również należą (Baker i wsp. 2005). U herpeswirusów cząsteczki mikroRNA odgrywają niezwykle istotną rolę na etapie przejścia wirusa z jednej fazy cyklu do drugiej i wiele z nich (podobnie jak zidentyfikowana przez nas cząsteczka 24B_1) jest zaangażowanych w utrzymanie wirusa w stanie utajonym. Poza tym, cząsteczki te odpowiadają m.in. za regulację czasu życia i śmierci zainfekowanej komórki, kontrolują intensywność jej proliferacji, a także przeciwdziałają reakcji ze strony układu immunologicznego gospodarza (Grey, 2015; Piedade i wsp. 2016). Na tej podstawie spekulujemy, że analogiczna do herpeswirusów, mikroRNA-zależna kontrola przejścia wirusa z rozwoju utajonego w lityczny, może mieć miejsce w przypadku fagów Stx, a poznanie mechanizmu tej regulacji będzie stanowiło cel naszych dalszych badań. Na ich kontynuację uzyskaliśmy finansowanie w ramach trzech projektów badawczych. Pierwszy z projektów, którego jestem współautorem i głównym wykonawcą, jest finansowany w ramach konkursu Opus 15, ogłoszonego przez Narodowe Centrum Nauki (Nr UMO-2018/29/B/NZ1/00549) i jego nadrzędnym celem jest kontynuacja badań nad cząsteczką 24B_1, w szczególności poznanie mechanizmu jej biogenezy oraz określenie docelowych dla tej cząsteczki miejsc działania. W dwóch pozostałych projektach pełnię funkcję kierownika i na ich realizację pozyskałam fundusze w konkursach Sonata Bis 8 (Nr dec. 2018/30/E/NZ1/00400) oraz Miniatura-2 (Nr dec. 2018/02/X/NZ1/02680), ogłoszonych przez tę samą instytucję. W kierowanych przeze mnie projektach zamierzam przeprowadzić odpowiednio 1) poszukiwania i analizę nowych, małych cząsteczek RNA zaangażowanych w regulację ekspresji genów antyrepresorowych, istotnych z punktu widzenia przejścia fagów Stx ze stanu lizogenii w cykl lityczny oraz 2) analizę wpływu zidentyfikowanych cząsteczek na zmiany w metabolizmie bakterii. Niewątpliwie, dalsze badania dotyczące regulatorowych cząsteczek RNA funkcjonujących w komórkach prokariotycznych, będą miały istotne znaczenie poznawcze, ale niewykluczone jest również, że dostarczą one nowych rozwiązań terapeutycznych i diagnostycznych wykorzystujących te cząsteczki.

Podsumowując omówiony powyżej cykl publikacji, za najważniejsze osiągnięcia uważam:

1. Podniesienie świadomości społeczeństwa na temat trudności w wykrywaniu bakterii produkujących toksyny Shiga, których główne czynniki wirulencji (geny *stx*) zlokalizowane są w obrębie ruchomych elementów genetycznych.

2. Opracowanie nowej, opartej na technice PCR, metody umożliwiającej wykrywanie dobrze zachowanych fragmentów sekwencji genów kodujących toksyny Shiga, charakteryzującej się szybkim i prostym w wykonaniu, a przy tym niedrogim i przede wszystkim skutecznym sposobem detekcji powstających produktów.
3. Zidentyfikowanie rejonów o zakonserwowanej w genomach fagów Stx sekwencji i mających znaczenie w odpowiedzi na warunki stresu oksydacyjnego i uruchomieniu cyklu litycznego faga.
4. Wykazanie skuteczności działania związków o właściwościach antyoksydacyjnych w hamowaniu litycznego rozwoju faga Stx w bakteriach *E. coli*, w warunkach stresu oksydacyjnego.
5. Odkrycie pierwszej fagowej cząsteczki typu mikroRNA o wysoko zakonserwowanej wśród fagów Stx sekwencji i wykazanie jej istotnej, pro-lizogenicznej roli w rozwoju tych fagów w bakteriach *E. coli*.
6. Uwidocznienie różnic w rozwoju fagów Stx oraz blisko spokrewnionego faga λ i wykazanie, że pomimo ogólnego podobieństwa sekwencji tych fagów i ich podobnej organizacji, w określonych rejonach genomu, sekwencje te istotnie się różnią.

Przeprowadzona analiza wyżej wymienionych, dobrze zachowanych w genomach fagów Stx rejonów sekwencji, ma trojaki wymiar. Z jednej strony wytypowaliśmy istotne, z punktu widzenia diagnostyki i leczenia, rejony sekwencji i określiliśmy ich rolę w rozwoju fagów Stx (jeśli nie była dotąd znana). Z drugiej strony, wskazaliśmy możliwości wykorzystania uzyskanej o tych rejonach i o zakodowanych w nich produktach, wiedzy, w opracowywaniu nowych metod wykrywania lub zwalczania infekcji wywołanych Shiga-toksycznymi bakteriami *E. coli*. Po trzecie dowiedliśmy, że wiedza o mechanizmie rozwoju modelowego faga λ nie może być w większości przypadków bezpośrednio przenoszona na fagi Stx i istotna jest jej weryfikacja w indywidualnym podejściu.

Literatura uzupełniająca

1. Aertsen A, FASTER D, Michiels CW. Induction of Shiga toxin-converting prophage in *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol.* 2005, 71(3):1155-62.
2. Baker ML, Jiang W, Rixon FJ, Chiu W. Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J Virol.* 2005, 79(23):14967-70.
3. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000, 25(2):169-93.

4. DeJong ES, Luy B, Marino JP. RNA and RNA-protein complexes as targets for therapeutic intervention. *Curr Top Med Chem*. 2002, 2(3):289-302.
5. Dydecka A, Bloch S, Rizvi A, Perez S, Nejman-Falenczyk B, Topka G, Gasior T, Necel A, Węgrzyn G, Donaldson LW, Węgrzyn A. Bad phages in good bacteria: role of the mysterious *orf63* of λ and Shiga toxin-converting Φ 24(B) bacteriophages. *Front Microbiol*. 2017, 8:1618. [praca nr II.A.14 zał. 4]
6. Glinkowska M, Łoś JM, Szambowska A, Czyz A, Całkiewicz J, Herman-Antosiewicz A, Wróbel B, Węgrzyn G, Węgrzyn A, Łoś M. Influence of the *Escherichia coli oxyR* gene function on lambda prophage maintenance. *Arch Microbiol*. 2010,192(8):673-83.
7. Grey F. Role of microRNAs in herpesvirus latency and persistence. *J Gen Virol*. 2015,96(4):739-51.
8. Kimmitt PT., Harwood, CR., Barer, MR. Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis*. 2000, 6: 458–465.
9. Krüger A, Lucchesi PM. Shiga toxins and Stx phages: highly diverse entities. *Microbiology*. 2015, 161(3):451-62.
10. Lainhart W, Stolfa G, Koudelka GB. Shiga toxin as a bacterial defense against a eukaryotic predator, *Tetrahymena thermophila*. *J Bacteriol*. 2009, 91(16):5116-22.
11. Lee MS, Koo S, Jeong DG, Tesh VL. Shiga toxins as multi-functional proteins: induction of host cellular stress responses, role in pathogenesis and therapeutic applications. *Toxins (Basel)*. 2016, 8(3) pii: E77.
12. Licznarska K, Dydecka A, Bloch S, Topka G, Nejman-Faleńczyk B, Węgrzyn A, Węgrzyn G. The role of the *exo-xis* region in oxidative stress-mediated induction of Shiga toxin-converting prophages. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8453135. [praca nr II.A.12 zał. 4]
13. Łoś JM, Łoś M, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Role of the bacteriophage lambda *exo-xis* region in the virus development. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008, 53(5):443-50.
14. Łoś JM, Łoś M, Węgrzyn A, Węgrzyn G. Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013, 2:166.
15. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004, 304(5671):734-6.
16. Piedade D, Azevedo-Pereira JM. The role of microRNAs in the pathogenesis of herpesvirus infection. *Viruses*. 2016, 8(6). pii: E156.
17. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*. 1983 308(12):681-5.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Poza wskazanym powyżej osiągnięciem naukowym stanowiącym cykl 11 powiązanych tematycznie publikacji, prowadziłam również badania w innych obszarach biologii molekularnej. Oprócz tych 11 prac, w swoim dotychczasowym dorobku naukowym posiadam jeszcze 15 artykułów, z których 3 powstały na podstawie wyników prowadzonych przeze mnie badań w trakcie studiów magisterskich, kolejne 3 weszły w skład mojej pracy doktorskiej, a następne 9 powstało po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora.

Pierwsze prace w moim dorobku naukowym wiążą się z tematem badań mojej pracy magisterskiej, którą przygotowałam w Zakładzie Genetyki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem Pani prof. UMK, dr hab. Anny Goc, na podstawie wyników doświadczeń wykonanych w laboratorium Pana prof. Olivera Eickelberga na Uniwersytecie Justusa Liebiga w Giessen, w Niemczech. Do grupy prof. Eickelberga dołączyłam w październiku 2004 roku (w trakcie I roku uzupełniających studiów magisterskich) i przebywałam tam do końca września 2005 r. Podczas rocznego pobytu w Giessen uczestniczyłam w międzynarodowym programie pod tytułem „Molecular Biology and Medicine of the Lung” (w skrócie zwanym MBML). Program ten przeznaczony jest głównie dla studentów studiów doktoranckich zajmujących się szeroko rozumianą problematyką biologii molekularnej i medycyny płuc. Obejmuje on odbywające się w języku angielskim ćwiczenia, seminaria, wykłady oraz egzaminy, w których brałam udział i które zaliczyłam z bardzo dobrym wynikiem będąc zaledwie absolwentką studiów licencjackich. Oprócz uczestnictwa w zajęciach, poświęcałam się również pracy badawczej, którą wykonywałam w laboratorium Pana prof. Olivera Eickelberga. Tematyka moich badań dotyczyła poznania molekularnych mechanizmów powstawania dwóch przewlekłych schorzeń, a mianowicie idiopatycznego włóknienia płuc oraz płucnego nadciśnienia tętniczego (PAH). Prowadzone przeze mnie badania zaowocowały pracą magisterską w języku angielskim pt. „TGF- β receptor expression determines progressive fibrosis” oraz trzema artykułami opublikowanymi w wysoko notowanych czasopismach z listy JCR: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; *European Respiratory Journal* oraz *Circulation*. W opublikowanych badaniach wykorzystaliśmy dość nowy jak na ówczesne czasy, indukowany monokrotaliną (MCT) szczurzy model nadciśnienia płucnego oraz linię szczurzych komórek mięśni gładkich tętnicy płucnej (PASMC). Analizując poszczególne czynniki należące do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) wykazaliśmy, że w homogenacie tkanki płucnej pochodzącej od szczurów w czwartym tygodniu choroby, nastąpiło drastyczne obniżenie poziomu ekspresji zarówno genu, jak i ilości produkowanego białka receptora typu II TGFBR-2 oraz receptora Acvr11. Ponadto, zaobserwowaliśmy istotny spadek ilości białek typu Smad (3 i 4). Z kolei, już w drugim tygodniu eksperymentu odnotowaliśmy znaczące obniżenie poziomu ufosforylowanej formy białka Smad2 (pSmad2) i potwierdziliśmy te wyniki na wyprowadzonej od badanych szczurów linii komórkowej PASMC. Na tej podstawie, zasugerowaliśmy upośledzenie ścieżki przekazywania sygnału

zależnej od Smad2/3 w analizowanym szczurzym modelu PAH i zwróciliśmy uwagę na istotne znaczenie szlaku zależnego od ligandów TGF- β w tym schorzeniu [praca nr II.A.1 zał. 4]. Jednocześnie analizowaliśmy szlak sygnałowy zależny od czynników należących do rodziny morfogenetycznych białek kości (BMPs). W tym przypadku również zaobserwowaliśmy istotny spadek poziomu ekspresji genów oraz ilości białek receptorowych (BMPRIb, BMPRII), a także białek typu Smad (4, 5, 8 oraz pSmad1), świadczący o dysfunkcji tego szlaku w badanym modelu PAH [praca nr II.A.2 zał. 4]. W ostatniej pracy z tego okresu dowiedliśmy występowania oddziaływania pomiędzy receptorem BMPRII i białkiem receptorowym RACK-1 oraz ich ko-lokalizacji w tkankach pozyskanych od pacjentów z PAH. Poza tym, z wykorzystaniem techniki RT-qPCR oraz Western Blot, wykazaliśmy istotne obniżenie poziomu ekspresji genu oraz ilości powstającego białka RACK-1 w homogenatach tkanki płucnej, pochodzącej od szczurów w 4 tygodniu tej choroby. Odnotowaliśmy również występowanie zależności pomiędzy RACK1 oraz ufosforylowaną formą białka Smad1, a także udział RACK-1 w procesie proliferacji komórek PASMC. Na podstawie naszych spostrzeżeń, zasugerowaliśmy, że białko to może odgrywać istotną rolę w patogenezie PAH [praca nr II.A.3 zał. 4]. Co istotne, część z omówionych powyżej wyników została uzyskana podczas realizacji projektu pod tytułem „Pulmotension” finansowanego w ramach 6 Programu Ramowego Unii Europejskiej (Nr LSHM-CT-2006-018725).

W 2006 roku, po obronie pracy magisterskiej na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, przyjechałam do Gdańska i rozpoczęłam studia doktoranckie na obecnym Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Rozpoczęłam badania do pracy doktorskiej, którą wykonywałam w Katedrze Biologii Molekularnej pod opieką Pana prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Tematyka mojego doktoratu również dotyczyła Shiga-toksycznych szczepów *E. coli* i infekujących je bakteriofagów Stx, jednak wówczas skupiałam się głównie na poznaniu mechanizmu replikacji tych fagów. W efekcie wykonanych przeze mnie prac badawczych, powstała praca doktorska złożna z trzech artykułów naukowych, w których jestem pierwszym autorem i które zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* oraz *Microbiology* i *Foodborne Pathogens and Disease*. Badania zostały przeprowadzone zarówno w oparciu o modele fagowe, jak też skonstruowane na ich bazie plazmidy replikacyjne zawierające rejon *origin* faga jako jedyne miejsce inicjacji replikacji oraz wszystkie geny i sekwencje regulatorowe niezbędne do powielania plazmidowego DNA. W pierwszej pracy z tego okresu [praca nr II.A.4 zał. 4] zaobserwowaliśmy, że ogólny schemat replikacji analizowanych fagów Stx jest podobny do tego obserwowanego u modelowego faga λ , jednakże procesy regulacyjne na poziomie aktywacji transkrypcyjnej *origin* mogą różnić się istotnymi szczegółami. Wykazaliśmy również, że u podstaw tych różnic mogą leżeć rozbieżności w sekwencjach genów kodujących fagowe białka replikacyjne O i P, które z kolei mogą wpływać na zmiany w sposobie oddziaływania tych białek ze sobą, a tym samym na reorganizację kompleksu replikacyjnego. Poza tym, zwróciliśmy uwagę na rolę białka DksA w tym procesie, które obok ppGpp jest głównym czynnikiem bakteryjnej odpowiedzi na warunki głodu.

Przenalizowaliśmy wydajność procesu replikacji w odpowiedzi na warunki głodzenia aminokwasowego i zaobserwowaliśmy zahamowanie replikacji analizowanych plazmidów Stx. Zasugerowaliśmy, że może to być efekt zależnej od białka DksA, mniej wydajnej transkrypcji z promotora p_R , a tym samym mniej efektywnej aktywacji rejonu *origin* [praca nr II.A.5 zał. 4]. W kolejnej pracy [nr II.A.6 zał. 4] potwierdziliśmy uzyskane wyniki, odnotowując zahamowanie rozwoju bakteriofaga Stx w tych warunkach, a w dalszych badaniach wykazaliśmy również hamujący wpływ cytrynianu sodu, będącego składnikiem stosowanych w przypadku biegunek płynów nawadniających (np. Orsalitu) oraz znoszący ten efekt wpływ glukozy (także będącej składnikiem takich płynów). Niewątpliwie, otrzymane wyniki mają znaczenie poznawcze, aczkolwiek wydają się być także istotne z praktycznego punktu widzenia. Być może odpowiednia modyfikacja składu podawanych płynów nawadniających, bądź też uwzględnienie w procesie leczenia etapu głodówki, mogłyby wpłynąć na łagodniejszy przebieg infekcji Shiga-toksycznymi bakteriami, a tym samym zmniejszenie ryzyka wystąpienia powikłań. Oprócz trzech opisanych powyżej publikacji, niezwykle istotnym dla mnie osiągnięciem naukowym z tego okresu, było uzyskanie w 2009 roku pierwszego, własnego grantu badawczego, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu Ventures, Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (Nr Ventures/2009-3/6). Uzyskane wsparcie umożliwiło mi realizację części badań do mojej pracy doktorskiej. Dodatkowo, w tym czasie pracowałam jako wykonawca w dwóch grantach badawczych finansowanych przez MNiSW (Nr N301 122 31/3747 oraz Nr N N301 192439).

Po obronie doktoratu, w czerwcu 2012 roku, kontynuowałam pracę badawczą w kierowanej przez Pana prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego. Oprócz prac prowadzonych w ramach głównego nurtu moich zainteresowań badawczych, którym w dalszym ciągu były bakteriofagi Stx, brałam również udział w badaniach o odmiennej tematyce. Między innymi uczestniczyłam w pracach badawczych wykorzystujących zarówno tradycyjne podejście [praca nr II.A.9 zał. 4], jak i metody z zakresu metagenomiki [praca nr II.A.8 zał. 4] do analizy prowadzonych w warunkach laboratoryjnych hodowli cyjanobakterii oraz ich zakwitów pochodzących z Morza Bałtyckiego, pod kątem poszukiwania nowych, aktywnych biologicznie związków, mających potencjalne znaczenie aplikacyjne w różnych gałęziach przemysłu. W efekcie wykonanych prac, okazało się, że ekstrakty sporządzone z kultur cyjanobakterii stanowią bogate źródło enzymów oraz związków o właściwościach zarówno antybakteryjnych, jak i stymulujących wzrost bakterii, a nawet związków wykazujących aktywność przeciwnowotworową. Co ciekawe, obserwowane profile aktywności enzymatycznych i antybakteryjnych były specyficzne dla poszczególnych, analizowanych szczepów cyjanobakterii [praca nr II.A.9 zał. 4]. Jako uzupełnienie tych badań zastosowaliśmy nowe podejście polegające na skonstruowaniu i analizie bibliotek metagenomowych niosących DNA wyizolowane z hodowli oraz zakwitów cyjanobakterii. Podczas przeszukiwania bibliotek udało się zidentyfikować klony bakteryjne charakteryzujące się produkcją związków wykazujących działanie antybakteryjne, stymulujące wzrost bakterii i działanie

przeciwnowotworowe [**praca nr II.A.8 zał. 4**]. Badania te były realizowane w ramach międzynarodowego grantu badawczego MAREX (Nr FP7-KBBE-2009-3-2-01-245137) pozyskanego w 7 Programie Ramowym Unii Europejskiej i zrzeszającego 19 partnerów (w tym zarówno firm, jak i ośrodków naukowych) z 13 krajów. W wyniku prowadzonych prac badawczych, powstały dwie prace oryginalne opublikowane w czasopiśmie z listy JCR: *European Journal of Phycology*, *Microbial Cell Factories*. Ponadto, w czasopiśmie *Acta Biochimica Polonica* opublikowaliśmy dwie prace przeglądowe, w których dokonaliśmy gruntownej analizy stosowanych w metagenomice strategii wraz z podaniem przykładów ich wykorzystania w badaniu środowisk morskich, pod kątem poszukiwania nowych bioaktywnych związków [**praca nr II.A.7 zał. 4**], a także szczegółowego podsumowania związanych z metagenomiką ograniczeń [**praca nr II.A.10 zał. 4**].

Równolegle realizowałam własne pomysły badawcze. Zostałam kierownikiem projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu LIDER (Nr Lider/21/92/L-3/11/NCBR/2012). Dzięki finansowemu wsparciu, które pozyskałam, mogłam zostać zatrudniona na Uniwersytecie Gdańskim na stanowisku adiunkta, jako pracownik naukowy. W konsekwencji, nie miałam obowiązku prowadzenia zajęć dydaktycznych i całkowicie mogłam poświęcić się realizacji prac badawczych. W projekcie tym, kierowałam 3-osobowym zespołem doktorantów. Prowadziliśmy badania mające na celu optymalizację metody wykrywania sekwencji genów kodujących toksyny Shiga (opisana w pkt. 4 autoreferatu) ale również jej modyfikację w kierunku zwiększenia czułości i rozszerzenia zakresu identyfikowanych patogenów. Zastosowane rozwiązania umożliwiły obniżenie progu wykrywalności do 0,02 pg DNA, oraz użycie dłuższych sond (powyżej 25 nukleotydów), co dodatkowo wpłynęło na poprawę specyficzności metody. Ponadto, udało się nam ukierunkować opracowaną metodę na wykrywanie DNA różnych patogenów przenoszonych przez kleszcze, odpowiedzialnych za rozwój wielu niebezpiecznych chorób, takich jak np. anaplazmoza, borelioza, babeszjoza, bartonelloza, czy riketsjoza. Ze względu na częsty problem występowania koinfekcji różnymi tego typu patogenami i związanych z tym trudności diagnostycznych, zaproponowana przez nas metoda (charakteryzująca się zwiększoną w stosunku do klasycznych testów PCR specyficznością, a przy tym dobrą czułością) może okazać się bardzo użyteczna. Prace w tym temacie zaowocowały dwoma patentami o zasięgu krajowym nr B1 218839 [**patent II.B.1 zał. 4**] i nr B1 220906 [**patent II.B.2 zał. 4**] oraz kolejnym zgłoszeniem patentowym nr P.419159 [**pozycja II.B.3 zał. 4**], złożonym do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej w 2016 roku, w celu rozszerzenia ochrony i uzyskania dodatkowego zabezpieczenia na wprowadzone modyfikacje. Na tej podstawie złożiliśmy również zgłoszenie patentowe o uzyskanie ochrony o zasięgu międzynarodowym (PCT) o nr EP17001719 [**pozycja II.B.4 zał. 4**]. Dodatkowo, osiągnięcie to zakwalifikowano do finałowej grupy wynalazków w konkursie pod tytułem „EUREKA DGP – Odkrywamy polskie wynalazki”, w konsekwencji czego powstał na ten temat artykuł popularno-naukowy, opublikowany na łamach Dziennika Gazety Prawnej w lutym 2015 roku [Nr 30 (3923) ROK 21]. Wynalazek został również nominowany do Nagrody

EuroSymbol Innowacji 2015 i wzbudził zainteresowanie amerykańskiej firmy 3G Therapeutics, specjalizującej się w doradztwie w zakresie komercjalizacji produktów medycznych. W efekcie przeprowadzonych rozmów, władze Uniwersytetu Gdańskiego podjęły decyzję o komercjalizacji wyników tych badań. Obecnie prowadzę prace przedwdrożeniowe w ramach realizacji na Uniwersytecie Gdańskim projektu „Inkubator Innowacyjności +” finansowanego przez MNiSW (Nr MNISW/2017/DIR/68/II+). Celem tych badań jest walidacja skuteczności i specyficzności opracowanej metody na próbkach krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego, pozyskanych od pacjentów z podejrzeniem lub zdiagnozowaną chorobą odkleszczową, którą najczęściej jest neuroborelioza. Ich realizacja jest możliwa dzięki współpracy pomiędzy Uniwersytetem Gdańskim a spółką Szpitale Pomorskie.

W 2016 roku przystąpiłam do realizacji projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Opus 9 (Nr UMO-2015/17/B/NZ9/01724). Jako wykonawca projektu, brałam udział w badaniach mających na celu poszukiwanie nowych bakteriofagów w próbkach środowiskowych oraz ich funkcjonalną charakterystykę. W efekcie wykonanych prac badawczych powstały dotąd dwa artykuły naukowe, opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie JCR: *Scientific Reports* oraz *Frontiers in Microbiology*. W pierwszej pracy z tego cyklu [**praca nr II.A.13 zał. 4**] dokonaliśmy szczegółowej analizy 83 nowych szczepów bakteriofagowych wyizolowanych ze ścieków miejskich. Fagi te zostały przez nas scharakteryzowane pod względem ich podstawowych cech, takich jak zakres gospodarza, morfologia wirionu, morfologia łysek, zdolność do namnażania się w różnych temperaturach oraz wrażliwość na czynniki fizyczne i chemiczne. Dodatkowo, zsekwencjonowaliśmy genomy 7 wybranych fagów, a uzyskane sekwencje poddaliśmy szczegółowej analizie bioinformatycznej. W kolejnym etapie prac, postanowiliśmy szczegółowo scharakteryzować jednego z tych bakteriofagów. Wybraliśmy litycznego faga vB-EcoS-95. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazaliśmy, że pomimo 74 % podobieństwa sekwencji do genomu faga pSf-1, vB-EcoS-95 prezentuje inny zakres gospodarza i nie infekuje bakterii z rodzaju *Shigella*. Ponadto, udowodniliśmy, że bakteriofaga vB-EcoS-95 charakteryzuje bardzo szybki rozwój wewnątrzkomórkowy i zdolność do niszczenia bakteryjnych biofilmów. [**praca nr II.A.15 zał. 4**]. Prace w tym temacie są nadal kontynuowane, w ramach współpracy z Panią prof. PAN dr hab. Alicją Węgrzyn z Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Gdańsku. Doświadczenie w pracy z biofilmami pozwoliło nam również nawiązać współpracę z Panią dr Paivi Tammela oraz Panią dr Cristiną Durante Cruz z Uniwersytetu w Helsinkach w Finlandii, w ramach której badaliśmy wpływ nowych związków o właściwościach antybakteryjnych na biofilmy tworzone przez wybrane szczepy bakterii Gram-dodatnich.

Bardzo cenię sobie fakt, że pracując w Katedrze Biologii Molekularnej UG, mam możliwość współpracować z naukowcami z innych instytucji, w tym zagranicznych. Niewątpliwie jest to zasługa kierownika Katedry, Pana prof. Grzegorza Węgrzyna, który jest znanym i rozpoznawalnym na świecie naukowcem. Moja dotychczasowa współpraca zaowocowała kilkoma istotnymi osiągnięciami. Wspólnie z

Panem prof. G. Węgrzynem zostaliśmy zaproszeni przez Pana prof. Luciano Saso z Uniwersytetu Sapienza w Rzymie (Włochy) do napisania rozdziału pod tytułem „*In vitro* methods for the evaluation of oxidative stress”. Rozdział ten został opublikowany w drugim tomie książek z serii „Recent advances in analytical techniques” wydanym przez Bentham eBooks, w 2018 roku. Przygotowaliśmy podrozdział dotyczący różnych strategii wykorzystywanych do oceny poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach bakteryjnych [pozycja nr II.C.1 zał. 4]. Aktywna współpraca z Panem prof. L. Saso zaczęła się od opublikowanej przez nasz zespół pracy w czasopiśmie z listy JCR *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. W pracy tej wykazaliśmy, że rejon *exo-xis* odgrywa ważną rolę w procesie indukcji profagów Stx oraz w uruchomieniu bakteryjnej odpowiedzi SOS, w warunkach stresu oksydacyjnego [praca nr II.A.12 zał. 4 – opisana w pkt 4c]. Pana Profesora bardzo zaciekały nasze rozważania na temat wpływu warunków steru oksydacyjnego na patogenność Shiga-toksycznych bakterii *E. coli* i tak narodził się pomysł przeanalizowania badanych przez Pana prof. L. Saso związków o właściwościach antyoksydacyjnych (praca nr 10 opisana w pkt 4 autoreferatu).

W efekcie prac prowadzonych w temacie rejonu *exo-xis*, nawiązaliśmy również współpracę z prof. Loganem Donaldsonem z Uniwersytetu York w Toronto (Kanada), który zajmuje się m.in. analizą struktury białek i wykorzystuje w swych badaniach spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Pierwsze rozmowy naukowe przeprowadziliśmy w 2013 roku, po tym jak Pan prof. Donaldson opublikował pracę dotyczącą struktury, zakodowanego w rejonie *exo-xis* faga λ , białka Ea8.5. W ramach współpracy postanowiliśmy kontynuować badania dotyczące funkcjonalnej analizy innych, zlokalizowanych w rejonie *exo-xis* otwartych ramek odczytu. W efekcie przeprowadzonych prac powstały dwa artykuły opublikowane w czasopismach z listy JCR *Frontiers in Microbiology* oraz *Viruses*. W pierwszej z prac wykazaliśmy, że otwarta ramka odczytu *orf63* jest funkcjonalnym genem, kodującym białko odgrywające istotną rolę w rozwoju fagów λ i Stx w bakteriiach *E. coli*. Zaobserwowaliśmy, że usunięcie sekwencji kodującej *orf63* z genomu faga powoduje wzrost wydajności procesu lizogenizacji bakterii, a jednocześnie opóźnienie momentu indukcji profaga i obniżenie liczby potomnych cząstek fagowych uwalnianych podczas cyklu litycznego w warunkach stresu oksydacyjnego [praca nr II.A.14 zał. 4]. W drugiej pracy dowiedliśmy, że również *orf60a* oraz *orf61* mają znaczenie podczas indukcji profaga Stx nadtlaniem wodoru, a usunięcie tych sekwencji z genomu faga wywołało efekty podobne do tych obserwowanych podczas analizy *orf63* (praca nr 11 opisana w pkt 4 autoreferatu). W rezultacie naszej współpracy prof. Donaldson zaprosił mnie do swojego laboratorium w Kanadzie, w celu odbycia szkolenia i wykonania serii doświadczeń wykorzystujących technikę NMR do analizy profilu metabolicznego bakterii *E. coli*. Fundusze na ten wyjazd badawczy pozyskałam w konkursie Miniatura-2 zorganizowanym przez Narodowe Centrum Nauki (Nr dec. 2018/02/X/NZ1/02680). W efekcie badań nad *orf60a* i *orf61*, w 2018 roku nawiązaliśmy również współpracę z Panem prof. Andriejem Letarovem z Winogradskiego Instytutu Mikrobiologii przy Rosyjskiej Akademii Nauk w Moskwie. Po licznych konsultacjach naukowych oraz wizycie Pan Profesora w

laboratorium KBM UG, opracowaliśmy plany badawcze dotyczące analizy wpływu *orf60a* i *orf61* z rejonu *exo-xis* na proces adsorpcji fagów lambdoidalnych do komórek bakteryjnych.

Owocnej współpracy doświadczyłam również w naszym lokalnym środowisku naukowym. W 2015 roku, wspólnie z zespołem Pani prof. dr hab. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz zbadaliśmy wpływ procesu poliadenylacji RNA na rozwój fagów λ oraz Stx. Wykazaliśmy, że w warunkach deficytu enzymu poli(A) polimerazy I (PAP I) w komórce, rozwój lityczny tych fagów zachodzi istotnie mniej wydajnie niż w komórce typu dzikiego. Zaobserwowaliśmy zarówno spadek wydajności procesu indukcji fagów, jak i niższy plon fagowy po infekcji. Mając na uwadze, że poliadenylacja RNA skutkuje destabilizacją takiego transkryptu, zasugerowaliśmy, że u podstaw obserwowanych różnic leżą zaburzenia w ilości występujących w komórce cząsteczek RNA, które w przypadku braku enzymu PAPI nie są poddawane poliadenylacji i tym samym nie mogą być efektywnie degradowane. Zwróciliśmy również uwagę na zjawisko poliadenylacji regulatorowych cząsteczek RNA [praca nr II.A.11 zał. 4].

Bardzo zaciekał mnie ten ostatni aspekt i wspólnie z dr Sylwią Bloch (ówczesną doktorantką, której byłam promotorem pomocniczym) podjęliśmy próbę wyizolowania i zidentyfikowania, istotnych dla rozwoju fagów Stx w bakteriach *E. coli*, poliadenylowanych cząsteczek RNA. Próba ta nie powiodła się, ale to niepowodzenie skłoniło nas podjęcia, bardzo istotnej dla naszych dalszych prac badawczych, decyzji o poszukiwaniu małych cząsteczek typu mikroRNA u organizmów prokariotycznych. Te poszukiwania zakończyły się sukcesem i w ten sposób odkryliśmy pierwszą tego typu cząsteczkę fagowego pochodzenia, 24B_1, którą szczegółowo opisałam w pkt. 4 niniejszego autoreferatu (praca nr 7). Tak jak wspomniałam wcześniej, w efekcie zrealizowanych w kontekście cząsteczki 24B_1 badań, narodziło się wiele nowych pytań i pomysłów badawczych, które zamierzamy zrealizować w ramach dwóch dużych projektów finansowanych z konkursów Opus 15 (Nr UMO-2018/29/B/NZ1/00549) oraz Sonata Bis 8 (Nr dec. 2018/30/E/NZ1/00400). W tym ostatnim, pełnię funkcję kierownika projektu i zamierzam przeprowadzić poszukiwania wraz z funkcjonalną analizą innych, analogicznych cząsteczek RNA, ze szczególnym uwzględnieniem cząsteczek regulujących ekspresję genów kodujących białka antyrepresorów. Ze względu na fakt, iż obok represorów (takich jak białko CI u fagów Stx), antyrepresory stanowią najważniejsze białka regulujące rozwój fagów w bakteriach, zidentyfikowanie i scharakteryzowanie tego typu cząsteczek miałyby duże znaczenie poznawcze, ale i potencjalne aplikacyjne.

Podsumowując, w swoim dorobku posiadam 26 artykułów opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, z których 20 powstało po uzyskaniu przeze mnie stopnia naukowego doktora, a 11 (z tych 20) stanowi przedstawione do oceny osiągnięcie. Sumaryczny Impact Factor wszystkich moich publikacji wynosi **97,8** natomiast liczba cytowań **364**, podczas gdy Indeks Hirscha **10**. Jestem również współtwórcą 2 patentów o zasięgu krajowym i 2 dodatkowych zgłoszeń patentowych, w tym 1 o zasięgu międzynarodowym. Kolejnym moim osiągnięciem jest współautorstwo rozdziału w anglojęzycznym opracowaniu pt. „Recent advances in

analytical techniques”. Objęłam kierownictwo w 3 projektach (w tym dwóch na kwotę ponad 1 mln PLN) oraz 2 działaniach naukowych (Miniatura-2 oraz Inkubator Innowacyjności +). Poza tym, uczestniczyłam w realizacji 8 innych projektów. Przez cały ten czas rozwijałam swój warsztat badawczy biorąc udział w licznych szkoleniach i kursach m.in. z zakresu technik umożliwiających analizę ekspresji genów takich jak: RT-qPCR, profilowanie ekspresji mikroRNA czy RNA-Seq. Za moje dotychczasowe osiągnięcia naukowe zdobyłam liczne nagrody i stypendia, w sumie 16, w tym m.in. Stypendium FNP Start (2013), Stypendium dla wybitnych młodych naukowców MNiSW (2015) oraz wyróżnienie w konkursie Nagród Naukowych Polityki (2017).

W ramach działań popularyzatorskich i dydaktycznych, zaprezentowałam wyniki prac badawczych na 16 konferencjach i spotkaniach naukowych, w tym wygłosiłam 6 referatów. Uczestniczyłam również w organizacji naukowej konferencji pt. „4th Congress of Baltic Microbiologists”, która odbyła się w dniach 10-12 września 2018 r., w Gdańsku. Poza tym, brałam udział w organizacji pokazów i warsztatów w ramach Bałtyckiego Festiwalu Nauki organizowanego przez Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. W 2019 roku dołączyłam do grupy redakcyjnej czasopisma *Postępy Mikrobiologii*. Poza tym, wykonałam recenzje zarówno oryginalnych, jak i przeglądowych prac naukowych dla czasopism międzynarodowych z bazy JCR: *Acta Biochimica Polonica* (4) *Viruses* (3), *Scientific Reports* (1) oraz spoza tej listy: *Current Bionanotechnology* (1) oraz *African Journal of Biotechnology* (1). Oprócz tego zrecenzowałam jeszcze 4 prace dyplomowe. W czasie mojej dotychczasowej kariery naukowej objęłam funkcję promotora pomocniczego w 4 przewodach doktorskich oraz promotora 3 prac magisterskich i 5 prac licencjackich. Na Wydziale Biologii UG prowadzę zajęcia dydaktyczne z przedmiotów: Biologia Molekularna z Biotechnologią oraz Diagnostyka Molekularna.

Szczegółowy spis wszystkich moich aktywności naukowych, popularyzatorskich i dydaktycznych znajduje się w załączniku nr 4.

.....*Bożena Nejman-Faleńczyk*.....

(podpis)