

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Anna Maria Grudniak

Nazwisko panieńskie: **Jóźwik**

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.

- **14.04.2003:** Nadanie stopnia **doktora nauk biologicznych w zakresie biologii** uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rola białek opiekuńczych DnaK i DnaJ w powstawaniu aktywnych kompleksów białkowych w *Escherichia coli*”. Promotorem w przewodzie doktorskim była prof. dr hab. Krystyna I. Wolska (Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski), a recenzentami: prof. dr hab. Anna J. Podhajska (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna w Gdańsku) oraz prof. dr hab. Andrzej Piekarowicz (Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski).
- **06.1998:** tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł pracy magisterskiej: „Próba identyfikacji genów wirulencji kodowanych na plazmidzie pYV *Yersinia enterocolitica* serotyp O:9 i O:5 i ich ekspresja w szczepach *Escherichia coli*”. Opiekunem pracy była dr Katarzyna Brzostek.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 01.10.2003-30.09.2004: **adiunkt** w Zakładzie Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 01.10.2004-30.09.2016: **adiunkt** w Zakładzie Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 01.10.20016 do chwili obecnej: **asystent** w Zakładzie Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

w tym:

- 06.2005-11.2005 (4 miesiące): urlop macierzyński
- 10.1998-04.2003: studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 10.1993-06.1998: studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Rola białka opiekuńczego HtpG w fizjologii wybranych szczepów bakterii z klasy *Gammaproteobacteria*

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczególnym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy.

- i. **Grudniak A.M.**, K. Pawlak*, K. Bartosik*, K.I. Wolska. **2013**. Physiological consequences of mutations in the *htpG* heat shock gene of *Escherichia coli*. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis* 745-746:1-5; DOI information: 10.1016/j.mrfmmm.2013.04.003 I

IF₂₀₁₃ –**4,440**; IF_{5-letni} –**3,092**; punktacja MNiSW –**35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) –7

Wkład habilitanta: **85%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie wszystkich doświadczeń – konstrukcja mutantu $\Delta htpG$ metodą gene replacement; oznaczanie aktywności alkalicznej fosfatazy oraz β -laktamazy, badanie zjawiska proteolizy, badanie zdolności do tworzenia biofilmów. Przygotowanie manuskryptu, analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie tabel i rycin do publikacji; opieka nad studentkami: (K. Pawlak) – podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji czyli przeniesienia mutacji $\Delta htpG$ do odpowiedniego szczepu *E. coli* oraz (K. Bartosik) – podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji czyli badanie zdolności do tworzenia biofilmów przez badane szczepy.

- ii. Markowska K.***, **A.M. Grudniak**, K. Krawczyk*, I. Wróbel *, K.I. Wolska. **2014**. Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles. *Journal of Medical Microbiology* 63:849-854; DOI information: 10.1099/j.mm.068833-0

IF₂₀₁₄ – **2,248**; IF_{5-letni} –**2,362**; punktacja MNiSW –**25**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) –11

Wkład habilitanta: **50%** Współautorstwo koncepcji badań, zaplanowanie i przeprowadzenie wybranych doświadczeń badających wpływ nanocząstek srebra na indukcję odpowiedzi *heat shock* w komórkach *P. aeruginosa*, indukcja białek DnaK oraz HtpG; oczyszczenie białek i pozyskanie specyficznych przeciwciał. Opieka nad studentami wykonującymi pracę dyplomową w Zakładzie Genetyki Bakterii (K. Krawczyk, I. Wróbel) oraz doktorantką K. Markowską podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji – czyli badanie synergistycznego działania AgNPs z wybranymi antybiotykami, weszły one w skład rozprawy doktorskiej K. Markowskiej (której byłam promotorem pomocniczym). Dodatkowo przygotowywałam manuskrypt oraz analizowałam i interpretowałam wyniki badań.

- iii. **Grudniak A.M.**, K. Markowska*, K.I. Wolska. **2015**. Interactions of *Escherichia coli* molecular chaperone HtpG with DnaA replication initiator DNA. *Cell Stress Chaperones* 20: 951-957; DOI information: 10.1007/s12192-015-0623-y

IF₂₀₁₅ – **2,583**; IF_{5-letni} –**2,571**, punktacja MNiSW –**25**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) –1

Wkład habilitanta: **85%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie wszystkich doświadczeń – przygotowanie konstruktów do oczyszczania białek, oczyszczanie białka HtpG, analiza oddziaływań pomiędzy badanymi białkami w systemie dwuhybrydowym oraz zmodyfikowaną metodą pull-down; cross-linking. Przygotowanie manuskryptu, analiza i interpretacja wyników badań; przygotowanie tabel i rycin do publikacji; opieka nad studentką (K. Markowską) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji czyli oczyszczanie białka DnaA, badanie oddziaływań białek metodą cross-linking.

- iv. **Grudniak A.M.**, B. Klecha*, K.I. Wolska. **2018** Effects of null mutation of the heat-shock gene *htpG* on the production of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiology* 13:69-80; DOI information: 10.2217/fmb-2017-0111

IF₂₀₁₆ – **3,374**; IF_{5-letni} –**4,152**; punktacja MNiSW –**35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) –0

Wkład habilitanta: **85%** Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczeń czyli konstrukcja mutantu Δ *htpG* *P. aeruginosa*, oznaczanie aktywności stafilolitycznej białka LasA, badanie zdolności do wytwarzania piowerdyny, picyjaniny oraz ramnolipidów. Badanie zdolności do tworzenia biofilmów oraz zdolności do ruchu. Analiza statystyczna otrzymanych wyników. Przygotowanie manuskryptu, tabel i rycin do publikacji analiza i interpretacja wyników badań; opieka nad studentką (B. Klechą) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji.

- v. Wolska K.I, **A.M. Grudniak**, Z. Rudnicka*, K. Markowska**. **2016** Genetic control of bacterial biofilms. *Journal of Applied Genetics* 57(2):225-38; **praca przeglądowa** DOI information: 10,0007/s13353-015-0309-2

Wkład habilitanta: **40%** Współautor publikacji. Zebranie literatury dotyczącej biofilmów bakteryjnych, przygotowanie części manuskryptu poświęconej biofilmom *P. aeruginosa*.

IF₂₀₁₆ – **1,655**; IF_{5-letni} –**1,996**; punktacja MNiSW –**20**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) –8

* studenci wykonujący prace dyplomowe w Zakładzie Genetyki Bakterii (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

** doktoranci Zakładu Genetyki Bakterii (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące

w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania – **14,31**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – **140**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **27**

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

WSTĘP

Białka opiekuńcze – czaperony (ang. *molecular chaperones*), są szeroko rozpowszechnioną grupą białek występującą u wszystkich gatunków organizmów żywych. Definiowane są, jako białka pośredniczące w utrzymywaniu i powstawaniu prawidłowej struktury innych białek i kompleksów białkowych, ale niebędące składnikiem ich końcowych struktur (Hartl, 1996; Van der Vies, 1991). Rozpoznają one w białkach reszty hydrofobowe, świadczące o ich złym zwinięciu (Buchner, 1999). Zadaniem białek opiekuńczych jest między innymi zapobieganie agregacji, ochrona polipeptydów przed nieodwracalną denaturacją ułatwianie dysocjacji nieaktywnych białek i przywracanie ich natywnej konformacji (Hendrick i Hartl, 1993, Morimoto i wsp., 1994). Czaperony zaangażowane są również w tworzenie oligomerycznych struktur białkowych oraz w transport białek przez błony (Hanein i wsp., 1997; Ueguchi i Ito 1992). Zlokalizowane są one głównie na terenie cytoplazmy. Do grupy tej należą również białka, które wiążą się z rybosomami, wiele z nich do swej aktywności wymaga energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Duża grupa białek opiekuńczych zaliczana jest do białek szoku cieplnego, nazywanych białkami Hsp (ang. *heat shock proteins*). Zapotrzebowanie na nie w komórce drastycznie wzrasta nawet po chwilowym podniesieniu temperatury, czyli w warunkach szoku cieplnego. Białka Hsp występują u wszystkich organizmów żywych począwszy od bakterii i archeonów po eukariota. Są one silnie konserwowane w toku ewolucji. Do zwiększonej produkcji białek szoku cieplnego dochodzi nie tylko w warunkach podwyższonej temperatury, ale również pod wpływem innych czynników stresowych jak np.: pH, etanol, metale ciężkie, zmiany osmolarności, głód węglowy czy azotowy, promieniowanie UV, antybiotyki, stres tlenowy czy infekcje wirusowe (Neidhardt i von Bogelen, 1987). Czynniki stresowe indukują w komórkach nagłą agregację białek, która doprowadziłaby do śmierci komórki, jeżeli nie działałyby czynniki naprawcze w postaci białek opiekuńczych. To one właśnie reaktywują nieprawidłowo zwinięte lub uszkodzone białka a te, które nie mogą być naprawione stają się substratami dla proteaz szoku cieplnego (Bardweel i Craig, 1987; Gross, 1996).

W komórkach *Escherichia coli* wykryto 20 białek zaliczanych do Hsp, ich wielkość waha się od 10 kDa do 110 kDa. Do najlepiej poznanych czaperonów należą białka wchodzące w skład kompleksów DnaK/DnaJ/GrpE oraz GroEL/GroES a także grupa małych białek IbpA/IbpB. Białka Hsp należą do najsilniej konserwowanych w toku ewolucji. Geny 20 białek szoku cieplnego tworzą wspólny regulon, który pozostaje pod pozytywną kontrolą genu *rpoH* kodującego σ^{32} , podjednostkę polimerazy RNA. Podjednostka ta łączy się z rdzeniem polimerazy RNA i odpowiedzialna jest za rozpoznawanie promotorów genów szoku cieplnego (Hamer i wsp., 1992). Białko σ^{32} kontroluje transkrypcję genów *hsp* zarówno w warunkach stresowych jak i fizjologicznych, jego delecja jest letalna dla komórki. Niektóre

geny *hsp* np. *groEL* i *groES* posiadają promotory zależne zarówno od σ^{70} jak i σ^{32} co zapewnia im wyższy poziom ekspresji białek w warunkach szoku cieplnego. Regulacja syntezy białek Hsp jest procesem wieloetapowym, na który składają się również regulacja translacji mRNA *rpoH* i jego stabilności oraz złożony system autoregulacji.

Białko DnaK (70 kDa) oraz jego białko pomocnicze DnaJ (40 kDa), były przedmiotem wieloletnich badań prowadzonych w Zakładzie Genetyki Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, na Wydziale Biologii, UW pod kierunkiem prof. dr hab. K.I. Wolskiej. Stały się one również tematem mojej pracy doktorskiej, którą obroniłam w 2003 r. na Wydziale Biologii, UW promotorem rozprawy była prof. dr hab. K.I. Wolska. Tytuł rozprawy: „Rola białek opiekuńczych DnaK i DnaJ w powstawaniu aktywnych kompleksów białkowych w *Escherichia coli*”. Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej należało wykazanie udziału białek DnaK i DnaJ w: (i) ekspresji tryptofanazy poprzez ich wpływ na stabilność pozytywnych regulatorów transkrypcji operonu *tna*, białek GreA i GreB (Grudniak i wsp., 2004); (ii) ekspresji wybranych operonów należących do regulonu cysteinowego; efekt ten miał związek z zahamowaniem tworzenia aktywnych tetramerów białka CysB przy braku badanych białek opiekuńczych (Karpiński i wsp., 2002); (iii) funkcjonowaniu systemów naprawy mutacji spontanicznych i indukowanych UV i MMS zwłaszcza w systemie naprawy błędnej; w mutantach $\Delta dnaJ$ i $\Delta dnaKdnaJ$ obserwowano obniżenie stabilności białka UmuC biorącego udział w naprawie uszkodzeń DNA przez polimerazę V (Grudniak i wsp., 2005); (iv) oporności *E. coli* na antybiotyki β -laktamowe, chloramfenikol i tetracyklinę (Wolska i wsp., 2000). Badania dotyczące roli białek DnaK/DnaJ w komórkach bakterii są liczne a funkcje tych białek zostały dobrze scharakteryzowane. Badania prowadzone przeze mnie w Zakładzie Genetyki Bakterii, UW zainspirowały mnie do zajęcia się słabo scharakteryzowanym i jak dotąd niezbadanym białkiem HtpG.

Białko HtpG (ang. *high temperature protein G*) *Escherichia coli* jest bakteryjnym odpowiednikiem eukariotycznych białek Hsp90. Jak dotąd wiadomo było jedynie, że białko to, podobnie jak inne białka opiekuńcze, odpowiada za prawidłową strukturę konformacyjną oraz odpowiednią lokalizację komórkową nowosyntetyzowanych polipeptydów. Jest ono silnie konserwowane w toku ewolucji (Buchner, 1999; Georgopoulos i Spence, 1989, Georgopoulos, 1992). Białko HtpG w komórkach *E. coli* funkcjonuje, jako dimer. Każdy budujący go monomer składa się z trzech domen: (A) N-terminalnej (39 kDa), (B) domeny środkowej (32 kDa) oraz (C) C-terminalnej (8 kDa). Do oddziaływań dochodzi głównie między domenami A i B w tym samym polipeptydzie. Domenę środkową można podzielić strukturalnie i funkcjonalnie na dwie subdomeny. N-terminalną – BI, kontaktującą się z domeną A oraz C-terminalną – BII kontaktującą się z domena C (Agard i wsp., 2004). Domena N-terminalna wiąże ATP i odpowiada za aktywność ATP-azową białka, może również brać udział w wiązaniu substratu. Białko substratowe może wiązać się z HtpG dopiero po jego aktywacji, do której konieczna jest przynajmniej jedna runda hydrolizy ATP (Nemoto i wsp., 2001). Kluczową rolę w procesie dimeryzacji białka HtpG odgrywa domena C-terminalna, która oddziałuje z sąsiednim monomerem HtpG i jednocześnie z subdomeną BI

tego samego monomeru. W stanie „zamkniętym”, gdy białko jest związane z ADP proces dimeryzacji jest utrudniony (Huai i wsp., 2005).

Jak już wspomniano białko HtpG jest silnie ewolucyjnie konserwowane i wykazuje około 40% homologie do swoich eukariotycznych odpowiedników np.: Hsp90 α i β około 37%, Grp94 – 34% homologii. Obecnie jest ono odnajdywane u większości bakterii. W niektórych gatunkach np. *Streptomyces coelicolor* i *Bacteroides fragilis* odnaleziono dwie kopie genu *htpG*, u pozostałych gatunków bakterii odnajdywana jest jedna kopia genu *htpG*. Podejrzewa się, że białka te w toku ewolucji uległy dwóm oddzielnym duplikacjom jednak ich przyczyna i początek ewolucji nie jest do końca poznany. Gen *htpG* pozostaje pod pozytywną kontrolą czynnika σ^{32} i jest indukowany przede wszystkim w wyniku wzrostu temperatury, jednak są pewne wyjątki. Zaobserwowano na przykład, że u *Helicobacter pylori* HtpG wysoka temperatura powoduje zanik transkryptu (Chen i wsp., 2006). Jak dotąd, niewiele wiadomo na temat potencjalnych funkcji białka HtpG w komórkach bakterii.

Eukariotyczne białka Hsp90 związane są z wieloma procesami komórkowymi, m. in. z regulującą transkrypcję transdukcją sygnału, działają bowiem jako składniki wielobiałkowego kompleksu w skład którego wchodzi Hsp70 i Hsp40. W komórkach ssaków odnajdywane są cztery izoformy tego białka: Hsp90 α , Hsp90 β , mitochondrialne TRAP1/Hsp75 i retikularne Grp94/Grp96 (Chen i wsp., 2006). Białka Hsp90 uczestniczą w dysocjacji trójskładnikowego kompleksu p53/Hsp40/Hsc70 co prowadzi do powstania p53/Hsp90. Białko Hsp90 jest syntetyzowane na 10-krotnie wyższym poziomie w komórkach nowotworowych, ochraniając inne komórki potrzebne komórkom nowotworowym do wzrostu. W komórkach eukariotycznych zapobiega ono również agregacji białek, zakłóca wiele procesów komórkowych oraz wpływa na regulację transkrypcji. Hsp90 może również tworzyć kompleks z „koczaparonem” Cdc37 przez oddziaływanie domeny N-terminalnej z domeną środkową Aha1. Jest ono celem leku antynowotworowego zarejestrowanego pod nazwą Geldanamycyna 17AAG (17-allylaminogeldanamycin). Lek ten hamuje aktywność białka Hsp90 co skutkuje ubikwitynacją podjednostki eukariotycznej telomerazy nTERT, kończącej się jej degradacją w proteosomie, czego oczywistym efektem jest zahamowanie jej aktywności. Lek ma wybiórcze działanie, nie uszkadza komórek zdrowych, nie ma skutków ubocznych. Obecnie bada się jego skuteczność w stosunku do nowotworów niemających pochodzenia nabłonkowego np.: czerniak, mięsak, rak piersi, jelita grubego, trzustki, jajnika czy płuc (Hoeners i wsp., 2001). Białka Hsp90 są aktualnie badane jako potencjalne autoszczepionki ze względu na zdolność do aktywacji limfocytów T cytotoksycznych (Kowalczyk, 2006). Bardzo ważnym aspektem ostatnich badań jest rola HtpG podczas infekcji bakteryjnej czy wywoływanej przez pierwotniaki. Stwierdzono, że głównymi czynnikami pobudzającymi ludzki układ odpornościowy oprócz białek Hsp70 i Hsp60 są właśnie białka Hsp90. Działają one jak antygeny; w przypadku malarii, kandydozy, trypanosomatozy organizm reaguje właśnie na Hsp90 patogena (Pockley, 2001). W świetle powyższych doniesień wydaje się, że poznanie roli białka HtpG i pełnionych przez nie funkcji w komórkach bakterii jest zadaniem istotnym poznawczo.

Celem przeprowadzonych przez mnie badań była charakterystyka funkcji pełnionych przez białko HtpG oraz poznanie procesów, w które może być ono zaangażowane w komórkach bakterii. Do badań wybrano modelowy organizm jakim jest *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, ze względu na potencjalne zaangażowanie w patogenezę bakterii chorobotwórczych. *P. aeruginosa* to bakteria zdolna do syntezy licznych czynników wirulencji oraz modelowy organizm do badania biofilmów. Celem przeprowadzonych badań była weryfikacja hipotezy badawczej, zakładającej udział białka HtpG w podstawowych procesach życiowych *Gammaproteobacteria* oraz w transporcie i syntezie wybranych białek determinujących wirulencję *P. aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa należący do *Gammaproteobacteria* jest tlenowcem, który może również rosnąć w warunkach beztlenowych. Odnajdywany jest on w glebie oraz na roślinach jak również jest patogenem oportunistycznym organizmów wyższych. Często doprowadza do zakażeń dróg moczowych, rogówki, ucha środkowego czy zapaleń otrzewnej. Jest bakterią bardzo często izolowaną z ran pooparzeniowych. Ponadto *P. aeruginosa* może kolonizować płuca osób chorych na mukowiscydozę, prowadząc do nawracających i przewlekłych zapaleń tego narządu. Jest groźnym czynnikiem etiologicznym powodującym częste zakażenia szpitalne. Obecnie izoluje się szczepy wielolekooporne niewrażliwe na stosowane dotąd antybiotyki. *P. aeruginosa* posiada liczne czynniki wirulencji, które można podzielić na dwie grupy: związane z komórką takie jak wić, pilusy typu IV, adhezyny, lipopolisacharyd oraz wydzielane poza komórkę jak elastazy LasB i LasA, egzotoksyna A, fosfolipaza C, proteaza IV, lipaza, egzoenzymy S, T oraz Y, piocyjanina, piowerdyna, siderofory czy ramnolipidy. Jednym z ważniejszych czynników wirulencji jest zdolność do tworzenia biofilmów (Meyer, 2000). Wiadomo, że ponad 80% bakteryjnych infekcji przebiega w organizmie ludzkim z wytworzeniem struktury biofilmu a *P. aeruginosa* to modelowy organizm, jeśli chodzi o badanie tej struktury. Dane te stały się impulsem do wybrania przeze mnie tego gatunku bakterii do dalszych badań obok *E. coli*.

NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE:

Publikacje:

- Grudniak A.M., K. Pawlak, K. Bartosik, K.I. Wolska. 2013. Physiological consequences of mutations in the *htpG* heat shock gene of *Escherichia coli*. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis* 745-746:1-5; DOI information: 10.1016/j.mrfmmm.2013.04.003
- Grudniak A.M., K. Markowska, K.I. Wolska. 2015. Interactions of *Escherichia coli* molecular chaperone HtpG with DnaA replication initiator DNA. *Cell Stress Chaperones* 20: 951-957; DOI information: 10.1007/s12192-015-0623-y

Badania, które rozpoczęłam po doktoracie miały na celu wyjaśnienie funkcji i roli białka HtpG w komórkach modelowego organizmu, którym jest *Escherichia coli* MC1061 (ATCC 5338). Badania prowadzono *in vivo* i *in vitro*. Białko HtpG należy do białek silnie konserwowanych w toku ewolucji. Gen *htpG* (początkowo nazywany C62.5) zlokalizowano pomiędzy genami *dnaZ* a *adk* w 11,1 minucie chromosomu *E. coli*. Mutacje delecyjne genu *htpG* nie są letalne dla komórki, wykazano natomiast, że mutant Δ *htpG* słabiej rośnie w temperaturze 46°C, co umożliwiło zakwalifikowanie HtpG do białek szoku cieplnego (HSPs). Defekt ten nie jest jednak tak silnie zaznaczony jak ma to miejsce w przypadku innych białek HSP jak np. Δ *dnaK* czy Δ *dnaJ* (Buchner i wsp., 2008; Colangelo i wsp., 1999). Wiadomo, że HtpG funkcjonuje w komórkach jako białko opiekuńcze, umożliwiając optymalne zwinięcie nowo syntetyzowanych białek komórkowych w warunkach stersowych (Thomas i Beneyx, 2000). Jednak mechanizm tego zwijania bez udziału innych białek pomocniczych, podobnie jak większość białkowych substratów HtpG, wciąż pozostaje nieznany (Buchner i wsp., 2007). W ostatnich latach, wykazano udział HtpG w zapobieganiu tworzeniu się agregatów białkowych, transporcie polipeptydów oraz stabilizacji białek odpowiedzialnych za wiązanie dużych kompleksów białkowych, fikobilisomów u *Cyjanobacteria* (Buchner, 2010). U *Synechococcus elongatus* białko to jest wymagane do przeżycia w warunkach fizjologicznych, substratem dla białka HtpG jest tu polipeptydowy łącznik L_R³⁰, zaangażowany w budowę i stabilizację struktury fikobilisomów, HtpG ochrania go przed agregacją (Sato i wsp., 2010). Badania ostatnich lat pozwoliły na wyodrębnienie kilku prawdopodobnych substratów dla białka HtpG jednym z nich jest rybosomowe białko L2, które wymagane jest do biogenezy rybosomów; połączone z HtpG nie agreguje nawet w 95°C (Motojima i wsp., 2010). W mutancie Δ *htpG* twierdzono zwiększoną agregację, a co za tym idzie spadek aktywności modelowego enzymu preS2- β -galaktozydazy, którego prawidłowe zwinięcie uzależnione jest od kompleksu DnaK/DnaJ/GrpE oraz GroEL/GroES (Thomas i Beneyx, 2000). Genest i współpracownicy wykazali natomiast, że HtpG odpowiada za reaktywację termicznie inaktywowanej lucyferazy w reakcji zależnej od Hsp70 (DnaK). Zasugerowano, że system DnaK/DnaJ/GrpE jako pierwszy rozpoznaje białko, następnie dochodzi do oddziaływania pomiędzy HtpG a DnaK czego skutkiem jest rearanżacja związanego wcześniej polipeptydu. Przeprowadzone badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, że pomiędzy białkami Hsp70 a HtpG dochodzi do bezpośredniego oddziaływania w komórkach *E. coli*. (Genest i

wsp., 2011). Jak dotąd poznano niewiele funkcji komórkowych zależnych od aktywności HtpG. Wiadomo także, że HtpG zapobiega agregacji syntazy cytrynianowej przez krótkotrwałe połączenie z wcześniej niezwiniętymi intermediatami (Jakob i wsp., 1995). HtpG wymagane jest również do optymalnego zwijania niektórych białek cytoplazmatycznych *E. coli* w warunkach stresowych (Buchner i Richter, 2006). Rola HtpG w ochronie białek *E. coli* przed agregacją poznana jest jak dotąd jedynie marginalnie.

Analiza mutacji punktowych i delecyjnych to standardowa metoda badań, która może dostarczyć podstawowych informacji na temat komórkowej funkcji białka. W świetle przedstawionych doniesień postanowiłam zbadać funkcje białka HtpG w oparciu o analizę mutantu delecyjnego $\Delta htpG$. Uzyskane wyniki przedstawiono w publikacji „Physiological consequences of mutations in the *htpG* heat shock gene of *Escherichia coli*” (Grudniak i wsp., 2013). Pierwszym etapem badań była konstrukcja mutantu *E. coli* MC1061 $\Delta htpG$. W tym celu zastosowano klasyczną metodę wymiany alleli (ang. *gene replacement*) (Dastenکو i Wanner, 2000). Poprawność konstrukcji została potwierdzona w reakcji PCR oraz przez sekwencjonowanie. Sprawdzono również temperaturo-wrażliwy fenotyp otrzymanego mutantu. Uzyskany mutant *E. coli* $\Delta htpG$ wykorzystany został w dalszych badaniach.

Literatura dotycząca wpływu białek szoku cieplnego na syntezę i eksport określonych białek, najczęściej enzymatycznych jest dość liczna. Dotychczas wykazano m.in. udział białka DnaJ w syntezie β -galaktozydazy i dwóch enzymów związanych z błonami: dehydrogenazy bursztynianowej i dehydrogenazy mleczanowej. Wykazano również udział białka DnaK w aktywności i transporcie modelowych enzymów β -laktamazy i alkalicznej fosfatazy w komórkach *E. coli*. Powyższe doniesienia zainspirowały mnie do zbadania wpływu mutacji w genie *htpG* na aktywność i transport wybranych enzymów. Do badań wytypowano dwa modelowe enzymy, których lokalizacja w komórkach *E. coli* jest peryplazmatyczna. Pierwszym z nich była wspomniana wcześniej alkaliczna fosfataza, niespecyficzny enzym z klasy hydrolaz. Transport tego enzymu do peryplazmy nie zależy od kompleksu białek Sec, jednego z głównych systemów transportujących białka przez błonę cytoplazmatyczną (Ullers i wsp., 2007), lecz związany jest z odcięciem sekwencji sygnałnej, co sprawia, że dojrzałe białko jest mniejsze od swojego cytoplazmatycznego prekursora (Wickner i wsp., 1991). Kolejnym badanym przez mnie enzymem była β -laktamaza również o lokalizacji peryplazmatycznej, która hydrolizuje wiązanie amidowe w pierścieniu β -laktamowym antybiotyku, co prowadzi do jego neutralizacji. Większość bakterii wykazująca naturalną antybiotykooporność na β -laktamy cechuje się wytwarzaniem β -laktamaz z lokus chromosomowego. Niektóre gramujemne pałeczki, jak np. *E. coli*, produkują enzym konstytutywnie. W transport β -laktamaz zaangażowane są białka GroEL/GroES (Kusukawa i wsp., 1989) oraz DnaK/DnaJ (Wolska i wsp., 2000). Aktywność enzymów oznaczałam we frakcji peryplazmatycznej oraz w lizatach całych komórkach otrzymanych na drodze sonikacji w temperaturach fizjologicznej 30°C oraz restrykcyjnej 42°C. Otrzymane wyniki wykazały znaczne zmniejszenie ilości enzymu w szczepie mutantu *E. coli* $\Delta htpG$ w obu badanych frakcjach: komórkowej (o 39%) oraz peryplazmatycznej (o 36%) po ekspozycji komórek na temperaturę 42°C. Potwierdza to udział białka HtpG w syntezie bądź stabilności β -laktamazy

a nie w jej transporcie do peryplazmy. Defekt ten podlegał komplementacji po wprowadzeniu na plazmidzie pACYC184 dzikiej kopii genu *htpG*⁺. W przypadku alkalicznej fosfatazy zaobserwowano natomiast zmniejszenie ilości enzymu w mutancie *E. coli* Δ *htpG*, w obu badanych temperaturach, jedynie we frakcji komórkowej. Ilość enzymu we frakcji białek peryplazmatycznych, uległa zwiększeniu około 1,56 raza. Defekt ten podlegał komplementacji. W przeciwieństwie do β -laktamazy świadczy to o wpływie HtpG na translokację alkalicznej fosfatazy do peryplazmy przy słabym wpływie na syntezę enzymu. Otrzymane wyniki sugerują, że białko HtpG może działać odmiennie niż białka DnaK i DnaJ w transporcie alkalicznej fosfatazy (Grudniak i wsp., 2013).

Kolejnym etapem pracy była ocena wpływu białka HtpG na przebieg procesu proteolizy nieprawidłowych białek. Proteolityczna degradacja białek w cytoplazmie bakterii gramujemnych jest zapewniana przez pięć głównych proteaz: Lon, ClpAP, ClpXP, HslUV oraz FtsH, wszystkie wykazują aktywność ATP-azową. Substrat musi być na wstępie związany przez domenę regulatorową. Domena wiążąca substrat ma budowę oligomeryczną uniemożliwiającą przypadkowe wiązanie większości białek prawidłowo zwiniętych. Przypadkowa degradacja białek przez proteazy wiązałaby się z ubocznymi efektami i negatywnym wpływem na komórki bakteryjne, dlatego proces ten jest ściśle kontrolowany na etapie rozpoznawania i wiązania substratu. Proteazy charakteryzują się wysoką specyficnością substratową i selektywnością. Jednym z podstawowych zadań proteolizy, jest usuwanie z komórek bakterii zagregowanych i niezwinionych białek, których znacząca ilość pojawia się w komórkach w warunkach stresowych. To właśnie proteazy razem z białkami opiekuńczymi tworzą swoisty system kontroli jakości powstających białek, którego zadaniem jest minimalizacja niekorzystnych efektów powodowanych przez czynniki stresowe. Proteoliza w komórkach bakterii odgrywa również funkcję regulującą wiele procesów komórkowych, jednym z nich może być na przykład biosynteza lipopolisacharydu (LPS). Udział wybranych białek opiekuńczych w proteolizie został już wcześniej udokumentowany, wykazano między innymi, iż zależna od proteazy Lon degradacja niezwinionych białek jest znacznie wolniejsza w mutancie pozbawionym *dnaJ* (Jubette i wsp., 1996). Mutanty w genach *dnaK*, *dnaJ* oraz *grpE* wykazywały defekt procesu proteolizy nienormalnych białek (Laskowska i Taylor, 1998; Wolska i wsp., 2002). Kilka grup badawczych potwierdziło także zahamowanie degradacji fragmentów puromycynowych oraz białek z fragmentami kanawaniny w mutancie pozbawionym *dnaK* (Keller i Simon 1988, Straus, 1988). Analizując wcześniejsze doniesienia literaturowe postanowiłam zbadać potencjalny udział białka HtpG w procesie proteolizy nieprawidłowych białek z wbudowaną w ich strukturę kanawaniną. Zastosowałam metodę znakowania białek ³⁵S-metioniną. Znaczne różnice w ilości zdegradowanych białek zauważono po ekspozycji komórek na wysoką temperaturę, kiedy to zapotrzebowanie na białka opiekuńcze w komórkach znacznie wzrasta. W mutancie Δ *htpG* poziom zdegradowanych białek był ponad dwukrotnie niższy w stosunku do szczepu dzikiego. Defekt ten podlegał komplementacji (Grudniak i wsp., 2013).

Biofilmy to struktury mogące kolonizować różne powierzchnie abiotyczne jak również biotyczne, regulacja ich powstawania jest tak różna jak powierzchnie, na których mogą one

powstawać. W wielu środowiskach biofilm stanowi podstawowy i dominujący styl życia bakterii, skutecznie chroniąc komórki przed szkodliwymi czynnikami otoczenia. W ostatnich latach szczególne znaczenie przypisuje się mu w patogenezie bakterii chorobotwórczych, uważając strukturę biofilmu jako jeden z ważniejszych czynników wirulencji. W tworzenie biofilmów zaangażowane są różne struktury jak np.: fimbrie, powierzchniowe białka czy polisacharydy. Bakterie tworzące biofilm otoczone są macierzą zbudowaną ze związków wydzielanych na zewnątrz przez komórki. Wcześniej zaprezentowane przeze mnie badania wykazały udział białka HtpG w transporcie białek do peryplazmy. Ueguchi i Ito wykazali natomiast, że białko HtpG może działać, jako supresor mutacji w genie *secY* (Ueguchi i Ito, 1992). Postanowiłam więc zbadać zdolność do tworzenia biofilmu przez szczep *E. coli* Δ *htpG*. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały znaczące zahamowanie intensywności tworzenia biofilmu w mutancie *E. coli* Δ *htpG* zwłaszcza w temperaturze restrykcyjnej, defekt ten podlegał komplementacji po wprowadzeniu na plazmidzie dzikiej kopii genu *htpG*⁺. Dodatkowa analiza przeżywalności komórek w biofilmie, przeprowadzona przy zastosowaniu komercyjnego testu BacTiter-Glo™ (Promega), wykazała znacznie zmniejszoną żywotność komórek w biofilmie tworzonego przez szczep mutanta w 42°C (na podstawie pomiaru ilości uwalnianego ATP), (Grudniak i wsp., 2013). Proces tworzenia biofilmów jest złożony z kilku kluczowych etapów. Na podstawie przeprowadzonych badań nie jesteśmy w stanie określić, który z etapów jest hamowany. Badania biofilmu u *E. coli* stały się inspiracją do badań na komórkach *Pseudomonas aeruginosa* przedstawionych w dalszej części opracowania.

Kolejny cel badawczy, który postawiłam przed sobą polegał na zbadaniu interakcji pomiędzy białkami HtpG a DnaA w układzie *in vitro* i *in vivo*. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w publikacji pt. „Interactions of *Escherichia coli* molecular chaperone HtpG with DnaA replication initiator DNA” (Grudniak i wsp., 2015). Procesem bez, którego żadna komórka żywa nie może prawidłowo funkcjonować jest replikacja chromosomu. Białko DnaA produkt genu *dnaA*, jest podstawowym białkiem inicjatorowym replikacji chromosomu i obecne jest we wszystkich bakteriach. Białko to ma wielkość 52 kDa i zlokalizowane jest na terenie cytoplazmy komórki. Zaliczane jest ono do ATP-az z rodziny AAA⁺. DnaA ma duże powinowactwo do ATP. W komórkach oprócz DnaA-ATP powstają również połączenia DnaA-ADP, jednak tylko pierwsza forma białka jest zdolna do rozplecenia podwójnej helisy. DnaA wiąże się z DNA w ściśle określonych miejscach. Dzięki swej budowie, ma zdolność do wiązania się również z podjednostką β polimerazy RNA oraz z produktami genów takich jak.: *dnaB*, *dnaZ* oraz *groE*. DnaA zaangażowane jest także w inicjację replikacji wielu plazmidów. Poza podstawową funkcją, jaką jest inicjacja replikacji chromosomu bakteryjnego białko funkcjonuje, jako czynnik transkrypcyjny. Badania interakcji pomiędzy białkami przeprowadziłam *in vivo* w komórkach *E. coli* z wykorzystaniem bakteryjnego systemu dwuhybrydowego opisanego przez Di Lallo (Di Lallo i wsp., 2001). Zasada jego działania opiera się na zastosowaniu himerycznego operatora obecnego w chromosomie szczepu *E. coli* R721. Wykorzystanie systemu, wymagało utworzenia odpowiednich konstrukcji składających się z genów *dnaA/htpG* oraz zrekombinowanych plazmidów niosących N-terminalne fragmenty represorów 434 lub P22. Otrzymane konstrukty w odpowiednich

układach wprowadzano do szczepu *E. coli* R721. O sile oddziaływań wnioskowano na podstawie aktywności β -galaktozydazy. W przypadku analizowanych przeze mnie białek dochodzi do silnych oddziaływań pomiędzy białkami DnaA a HtpG; należy podkreślić, że do interakcji takich dochodzi jedynie, gdy gen *htpG* zlokalizowany był na plazmidzie wysokokopionym a *dnaA* na niskokopionym. Prawdopodobnie do zaistnienia tego typu interakcji konieczna jest nadprodukcja HtpG. W warunkach fizjologicznych poziom białka DnaA jest w komórkach wyższy niż HtpG. Ekspresja *htpG* ulega zwiększeniu w warunkach szoku termicznego i to właśnie wówczas może dochodzić do interakcji między białkami, gdy komórkowy poziom białka HtpG jest zwiększony (Grudniak i wsp., 2015).

Kolejnym etapem eksperymentów było oczyszczenie białek HtpG i DnaA do homogenności przy zastosowaniu klasycznego systemu ekspresyjnego, wykorzystującego wektor pET, który pozwala na wydajną ekspresję genów kodujących zrekombinowane białka z domeną polihistydynową. Oczyszczanie obu białek wymagało optymalizacji procedury zwłaszcza w przypadku białka DnaA ze względu na jego agregację i poprzedzone było wieloetapowymi procesami klonowania. Oczyszczone białka zostały następnie wykorzystane do reakcji immunizacji królików, w wyniku której pozyskano przeciwciała specyficzne względem białek DnaA/HtpG (proces ten został przeprowadzony przez firmę Eurogentec, Belgia). Badania *in vitro* interakcji pomiędzy białkami DnaA i HtpG przeprowadzono zmodyfikowaną metodą „pull-down” oraz w reakcji sieciowania z aldehydem glutarowym, wykorzystując oczyszczone białka oraz pozyskane przeciwciała (Kędzierska i wsp., 2005). Wysoce czuła i specyficzna metoda co-immunoprecypitacji, potwierdziła istnienie bezpośrednich oddziaływań pomiędzy badanymi białkami niezależnie od obecności ATP/ADP. Białko HtpG po związaniu z ATP ulega strukturalnym rearanżacjom, powstaje struktura zamknięta niezdolna do związania substratu. Substrat wiązany jest do dimeru HtpG, po jego wcześniejszym związaniu z ADP mechanizm tego procesu jest jednak nieznan. DnaA wiąże zarówno ATP jak i ADP jednak hydroliza ATP jest niezbędna, gdy białko to wiąże się do DNA i działa, jako inicjator replikacji umożliwiając rozplecenie podwójnej nici DNA w regionie *oriC* bakteryjnego chromosomu. Przeprowadzone badania wykazały, że wiązanie ATP/ADP nie jest niezbędne do utworzenia kompleksu z HtpG przez DnaA. Oddziaływania, do jakich dochodzi pomiędzy DnaA a HtpG nie należą do typowych charakterystycznych dla białek opiekuńczych, do jakich dochodzi pomiędzy substratami. ATP nie jest niezbędny do pełnienia przez HtpG funkcji opiekuńczej w warunkach fizjologicznych. Mechanizm oddziaływania białka HtpG z białkowymi substratami pozostaje nadal niewyjaśniony. W pracy (Grudniak i wsp., 2015) wykazano istnienie oddziaływań pomiędzy białkami HtpG a DnaA w mechanizmie niezależnym od ATP.

Analiza oddziaływań białek z zastosowaniem czynników sieciujących, umożliwia utrwalenie kompleksów naturalnie tworzonych przez cząsteczki białkowe zdolne do interakcji. Aldehyd glutarowy to homobifunkcyjny czynnik sieciujący, posiadający dwie grupy funkcyjne (aldehydowe), które uczestniczą w tworzeniu trwałych wiązań kowalencyjnych między grupami aminowymi (aminokwasów zasadowych, najczęściej lizyny). Aby oddziaływania były efektywne minimalna ilość lizyn w białku powinna wynosić około 7%.

HtpG zawiera 7,4 % a DnaA 4,92 % lizyn. Zaobserwowana zwiększona zdolność do oligomeryzacji białka DnaA w obecności czynnika sieciującego, znacząco utrudniła odczyt wyników. Otrzymane rezultaty potwierdziły zdolność tworzenia kompleksów pomiędzy białkami DnaA i HtpG (Grudniak i wsp., 2015).

Otrzymane wyniki potwierdzają istnienie oddziaływań pomiędzy białkami HtpG a DnaA, które sugerują prawdopodobny udział białka HtpG w stabilizacji białka DnaA. W warunkach stresowych białko to może partycypować również w podstawowej funkcji DnaA jaką jest inicjacja replikacji chromosomowego DNA u bakterii.

Główne osiągnięcia poznawcze

- Otrzymanie mutantu delecyjnego $\Delta htpG$ w komórkach *E. coli* MC1061.
- Wykazanie udziału białka HtpG w syntezie (stabilności) β -laktamazy.
- Stwierdzenie zahamowania transportu alkalicznej fosfatazy do peryplazmy w mutancie $\Delta htpG$.
- Udowodnienie wpływu białka HtpG na degradację (proteolizę) białek z wbudowaną w ich strukturę kanawaniną.
- Wykazanie obniżonej zdolności *E. coli* do tworzenia biofilmów przez szczep pozbawiony białka HtpG.
- Stwierdzenie bezpośredniego oddziaływania pomiędzy białkiem HtpG a DnaA, do którego może dochodzić w warunkach stresowych, gdy ilość białka HtpG w komórkach znacząco wzrasta.
- Białko HtpG stabilizuje DnaA, prawdopodobnie chroniąc go przed agregacją.

Publikacje:

- **Grudniak A.M.**, B. Klecha, K.I. Wolska. **2018** Effects of null mutation of the heat-shock gene *htpG* on the production of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiology* 13:69-80; DOI information: 10.2217/fmb-2017-0111
- Markowska K., **A.M. Grudniak**, K. Krawczyk, I. Wróbel, K.I. Wolska. **2014**. Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles. *Journal of Medical Microbiology* 63:84-854; DOI information: 10.1099/j.mm. 068833-0
- Wolska K.I., **A.M. Grudniak**, Z. Rudnicka*, K. Markowska**. **2016** Genetic control of bacterial biofilms. *Journal of Applied Genetics* 57(2):225-38; **praca przeglądowa** DOI information: 10,0007/s13353-015-0309-2

Badania zaprezentowane w dołączonej pracy "Effects of null mutation of the heat-shock gene *htpG* on the production of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa*" (Grudniak i wsp., 2018) przeprowadzono w oparciu o analizę skonstruowanego przeze mnie mutantu *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta htpG$. W wyniku przeprowadzonych analiz fenotypowych wykazałam, że białko HtpG odgrywa istotną rolę w tworzeniu przez *P. aeruginosa* biofilmu zwłaszcza na wstępnym etapie adhezji. Wykazano, że adhezja zahamowana jest o 68% w mutancie *P. aeruginosa* $\Delta htpG$ w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Ponieważ na wstępnych etapach adhezji, kluczowym aspektem jest ruchliwość komórek postanowiono zbadać wpływ białka HtpG na zdolność do ruchu komórek *P. aeruginosa*. Ruchliwość *Pseudomonas* związana jest z trzema rodzajami ruchu: pływającym (*swimming*), rozpełzliwym (*swarming*) oraz drgającym (*twitching*). Ruch typu „swimming” to

chemotaktyczna translokacja pojedynczych komórek bakterii w środowisku płynnym. Ruch ten napędzany przez wici odpowiada za adhezję do powierzchni nieożywionych oraz bierze udział we wczesnych fazach kolonizacji tkanek gospodarza. Ruch typu „swarming”, również odbywa się za pomocą wici i uzależniony jest dodatkowo od wytwarzania ramnolipidów. Ramnolipidy zapewniają odpowiednie napięcie powierzchniowe, umożliwiając ruch wici po powierzchniach półstałych, gdy brakuje azotu lub gdy w podłożu obecne są niektóre aminokwasy jak np.: kwas asparaginowy, glutaminowy, histydyna czy prolina. Ruch ten podobnie jak proces tworzenia biofilmu regulowany jest przez *c-di-GMP*. Ruch drgający „twitching” wynika natomiast z kurczenia się pilusa. Pilusy odgrywają ważną rolę w przyłączaniu bakterii do komórek nabłonkowych i tym samym biorą udział w wirulencji *P. aeruginosa*. U *P. aeruginosa* w ruch ten zaangażowane są pilusy typu IV, które uczestniczą w adhezji komórek głównie do powierzchni abiotycznych. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że *P. aeruginosa* pozbawiony białka HtpG wykazuje znacznie zmniejszoną zdolność do ruchu drgającego i pływającego aż o 31% zwłaszcza po ekspozycji komórek na temperaturę 42°C. Zdolność do ruchu, rozpełzliwego również była zaburzona. Obserwowano znacznie mniejszą ilość wypustek tworzoną przez szczep mutanta w temperaturze restrykcyjnej (Grudniak i wsp., 2018).

P. aeruginosa posiada wiele czynników wirulencji, część z nich związana jest z komórką a część wydzielana jest pozakomórkowo jak np. elastazy LasB i LasA, egzotoksyna A, fosfolipaza C, proteaza IV, lipaza, piocyjanina, piowerdyna czy ramnolipidy. LasA jest proteazą serynową o wielkości 20 kDa należącą do rodziny β -litycznych endopeptydaz. W swojej budowie zawiera atom cynku. Proteaza ta odgrywa ważną rolę w patogenezie, na etapie kolonizacji tkanek gospodarza zwłaszcza u pacjentów z mukowiscydozą podczas kolonizacji dróg oddechowych. LasA *P. aeruginosa* posiada również aktywność stafylolityczną czyli zdolność do lizy komórek *S. aureus*, która została zbadana w pracy. Udział białek szoku cieplnego w proteolizie był już opisywany na przykładzie *groEL*, *dnaK* i *dnaJ* mutantów. Moje wcześniejsze badania wykazały, że białko HtpG jest niezbędne do degradacji uszkodzonych białek i zaangażowane jest w proteolizę u *E. coli*. Mutant Δ *htpG* *P. aeruginosa* wykazywał znaczące obniżenie aktywności proteazy LasA, co bezpośrednio wskazuje na wpływ białka HtpG na ten proces u *P. aeruginosa* i ma szczególne znaczenie zwłaszcza u pacjentów z mukowiscydozą. Wpływ HtpG na produkcję innych czynników wirulencji badałam również u *P. aeruginosa* do analiz wybrałam piocyjaninę, piowerdynę oraz ramnolipidy. Piocyjanina to 1-hydroksy-5-metylofenazyna, która wykazuje właściwości antybiotyczne. Nadaje ona koloniom *Pseudomonas* charakterystyczne zabarwienie. Piocyjanina posiada zdolność do katalizowania reakcji z udziałem tlenu, generuje powstawanie wolnych rodników ponadtlenkowych i nadtlenku wodoru, co powoduje jej wysoką cytotoksyczność. Uszkadza również rzęski nabłonka dróg oddechowych, zwiększa wydzielanie IL-8 przez komórki nabłonka a także powoduje proliferację neutrofilów. Poziom piocyjaniny w szczepie mutanta Δ *htpG* był znacząco obniżony w obu badanych temperaturach w stosunku do szczepu dzikiego *P. aeruginosa*. Kolejnym badanym metabolitem wtórnym była piowerdyna. Piowerdyna została odkryta około 120 lat temu. Jest ona chromopeptydem, który

w nadfiolecie wykazuje silną zielono-niebieską fluorescencję. Wydzielana jest ona do podłoża w warunkach niedoboru żelaza i konkuruje o jony żelaza z ludzką transferyną. Synteza piowerdyny odbywa się w cytoplazmie, a następnie jest ona transportowana przez błonę wewnętrzną. Piowerdyna reguluje ponadto sekrecję jak również wydzielanie innych czynników wirulencji jak: egzotoksyna A czy endoproteaza. Jest ona istotnym czynnikiem wirulencji *P. aeruginosa*, niezbędnym podczas infekcji. W dołączonej pracy wykazałam, że poziom piowerdyny w badanym mutancie $\Delta htpG$ był znacząco obniżony w obu badanych temperaturach w stosunku do szczepu dzikiego *P. aeruginosa*. Z kolei biosurfaktanty są powierzchniowo czynnymi związkami wytwarzanymi przez bakterie, zalicza się do nich glikolipidy, lipopolisacharydy, oligosacharydy oraz lipopeptydy. Ramnolipidy stanowią jedną z klas glikolipidów produkowanych przez *P. aeruginosa*. Są one bardzo istotne podczas kolonizacji przez *P. aeruginosa* płuc u pacjentów wentylowanych oraz u chorych na mukowiscydozę. Związki te odgrywają ważną rolę przy tworzeniu struktury biofilmu, odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie kanałów, które przebiegają w biofilmach i przez które dostarczane są substancje odżywcze. Eliminują konkurencję z bezpośredniego otoczenia. Zaangażowane są również w ruch typu rozpełzliwego. Ramnolipidy oddziałują ponadto z wieloma elementami układu immunologicznego pacjenta. W mutancie *P. aeruginosa* $\Delta htpG$ zaobserwowałam znaczne zahamowanie produkcji ramnolipidów w stosunku do szczepu dzikiego w obu badanych temperaturach, jednak defekt ten był silniej zaznaczony w 42°C. Zmniejszona zdolność do wytwarzania ramnolipidów przez mutant $\Delta htpG$ może mieć bezpośredni wpływ na tworzenie przez niego biofilmu biorąc udział w eksporcie substancji tworzących matriks (Grudniak i wsp., 2018). Zaangażowanie białka HtpG w transport zostało już przeze mnie udowodnione w komórkach *E.coli* na przykładzie alkalicznej fosfatazy.

Reasumując wykazałam, że bakteryjny homolog eukariotycznego białka Hsp90 – HtpG jest zaangażowany w wiele procesów fizjologicznych kluczowych dla *P. aeruginosa* zwłaszcza tych związanych z jego wirulencją, takimi jak ruchliwość, zdolność do tworzenia biofilmów, aktywność proteolityczna, zdolność do wytwarzania barwników czy biosurfaktantów. Wiele z czynników wirulencji u *P. aeruginosa* jest wydzielana pozakomórkowo jest więc wysoce prawdopodobne, że białko HtpG uczestniczy w ich sekrecji.

Moje zainteresowania badawcze związane są również z antybakteryjną aktywnością nanocząstek srebra co zostało udokumentowane w omówieniu pozostałych osiągnięć badawczych. Do osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wystąpienia o stopień doktora habilitowanego, zdecydowałam się dołączyć publikację „Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles” (Markowska i wsp., 2014), która w znacznej części poświęcona jest zdolności nanocząstek srebra do indukcji odpowiedzi stresowej mierzonej poziomem białek opiekuńczych w komórce. Mechanizm działania AgNPs na komórki bakteryjne nie jest do końca poznany. Uważa się, że nanosrebro powoduje pojawianie się w ścianie komórkowej bakterii otworów (*pits*) co doprowadza do kumulacji nanocząstek w obrębie błony zewnętrznej a następnie powoduje zwiększenie jej przepuszczalności i w konsekwencji

śmierć komórki bakteryjnej. Ostatnio wykazano, że AgNPs zwiększają produkcję ROS (reactive oxygen species), powodując indukcję stresu oksydacyjnego dodatkowo zaobserwowano, że wewnątrz komórki może dochodzić do uwalniania jonów srebra, które hamują działanie enzymów łańcucha oddechowego, jak również indukują uwalnianie ROS. Liczne doniesienia literaturowe wykazują, że AgNPs mają wiele celów komórkowego działania. Analizy proteomiczne wykazały zmiany w ekspresji niektórych genów w komórkach *E. coli* poddanych działaniu AgNPs, zaobserwowano między innymi wzrost ilości małych białek szoku cieplnego IbpA i IbpB (*inclusion body binding proteins*) oraz białka S6 składowa małej podjednostki 30S rybosomu. Dodatkowo analiza profilu białkowego przeprowadzona przez Lok i współpracowników wykazała, że w obecności nanocząstek srebra dochodzi u *E. coli* do indukcji małych białek szoku cieplnego (Lok i wsp., 2006). Nanocząstki metali, np. srebra i tlenku cynku wpływają na tworzenie biofilmów przez *E. coli* i *S. aureus*. W ostatnim czasie pojawiają się prace potwierdzające skuteczność nanocząstek w zwalczaniu biofilmów gatunków patogennych takich jak wspomniany wcześniej *S. aureus* czy *P. aeruginosa*. Największą skuteczność w tym procesie posiada nanosrebro.

Odpowiedź stresowa u bakterii indukowana jest przez wiele czynników między innymi przez wysoką temperaturę, etanol, związki pochodzenia roślinnego i antybiotyki. Postanowiłam więc zbadać, czy nanocząstki srebra mogą również indukować tę odpowiedź. W tym celu oznaczyłam poziom białka HtpG w komórkach *P. aeruginosa* poddanych działaniu subletalnych stężeń nanocząstek srebra, tj. 0,15; 0,3; 0,45 MIC w porównaniu z komórkami hodowli kontrolnej prowadzonej bez dodatku AgNPs. Jako kontrolę zbadano poziom indukcji białka DnaK, będącego głównym białkiem opiekuńczym w komórkach bakterii o którym wiadomo, że jego ilość znacząco wzrasta w komórkach poddanych działaniu klasycznych antybakteryjnych terapeutyków. Białka identyfikowano przy pomocy technik SDS-PAGE oraz Western-blot z zastosowaniem specyficznych przeciwciał, uzyskane obrazy poddano analizie densytometrycznej (w programie ImageJ) oraz statystycznej (w programie Statistica 13). Otrzymane wyniki wykazały znaczny wzrost ilości białka DnaK (2,5 – 3 krotny) w komórkach *P. aeruginosa* poddanych działaniu nanocząstek w stężeniach subprogowych, nie zaobserwowano natomiast indukcji białka HtpG w obecności AgNPs, ilości białek były nieznacznie zwiększone bez istotności statystycznej. Spekulując na temat braku indukcji czaperonu HtpG przez nanocząstki srebra, potencjalnej przyczyny można dopatrywać w unikatowym sposobie indukcji tego chaperonu co zostało opisane w pracy Mason i wsp., (1999).

Przedmiotem badań przedstawionych w powyższych pracach oryginalnych jest patogenna bakteria *P. aeruginosa*, praca przeglądowa również w znacznej części zawiera dane uzyskane w trakcie badań nad tym gatunkiem dużo uwagi poświęcono jego biofilmowi. *P. aeruginosa* odpowiedzialny jest za wiele śmiertelnych infekcji zwłaszcza u osób po przeszczepach, chemioterapii oraz u chorych na mukowiscydozę szczególnie groźne są jego infekcje u osób ze zmniejszoną odpornością. Bakteria ta produkuje trzy wydzielane pozakomórkowo polisacharydy: Pel, Psl oraz alginian. Alginian obok eDNA uważany jest za jeden z najważniejszych czynników wirulencji (Silby i wsp., 2011). W omówionej pracy pt.

“Effect of null *htpG* mutation on the virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1” (Grudniak i wsp., 2018), wykazałam wpływ czaperonu HtpG na rozwój biofilmów *P. aeruginosa*. Skłoniło to naszą grupę badawczą, przy znacznym moim udziale, do zebrania literatury dotyczącej szerokiego problemu, genetycznych podstaw rozwoju biofilmów bakteryjnych, praca „Genetic control of bacterial biofilms” (Wolska i wsp., 2016). Prawie wszystkie bakterie, wliczając w to patogeny posiadają zdolność do tworzenia biofilmów. Proces tworzenia biofilmu jest serią silnie regulowanych etapów. Molekularne mechanizmy regulacji mogą różnić się w szczegółach w zależności od gatunku organizmu, ale kluczowe etapy są w swoich fundamentalnych założeniach i przebiegu podobne u większości mikroorganizmów. Biofilm jest strukturą, w której bakterie na wstępie adherują do powierzchni a następnie otaczają się zewnątrzkomórkową substancją nazywaną matriks, w której skład wchodzi polisacharydy, eDNA oraz białka. Bakteryjne biofiliny stanowią olbrzymi problem medyczny, zwłaszcza ze względu na ich zwiększoną oporność w stosunku do obecnie stosowanych konwencjonalnych antybiotyków oraz trudności z ich trwałym usunięciem. Wiele czynników środowiskowych jak również genetycznych jest uwikłanych w tworzenie właściwej struktury biofilmu oraz w jego rozpad. Za najważniejsze uważa się zjawisko wyczuwania liczebności – QS (*Quorum sensing*), *c*-di-GMP (cykliczny kwas diguanylanowy) oraz małe RNA. W dołączonej pracy przeglądowej dokonaliśmy analizy potencjalnej roli tych regulatorów w procesie tworzenia biofilmów przez wybrane gatunki bakterii: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oraz *Vibrio cholerae*, treści dotyczące biofilmów *P. aeruginosa* przedstawiam w dużym skrócie.

Wydaje się, że QS jest integralnym elementem globalnej sieci regulacji ekspresji genów bakteryjnego biofilmu, jego rozwoju i adaptacji do zróżnicowanych środowisk. Komórki bakterii potrafią komunikować się ze sobą, dzięki czemu mogą synchronizować ważne dla nich procesy. Wykorzystują do tego celu systemy uniwersalnych autoinduktorów, jak również wysoce specyficznych do komunikacji wewnątrzgatunkowej jak np. QS. System ten służy, jako prosty wskaźnik gęstości populacji. Bakterie wytwarzają cząstki sygnalizacyjne (induktory), które po połączeniu z odpowiednim receptorem, aktywują transkrypcję określonych genów w tym również odpowiedzialnych za syntezę samego induktora. Tworzenie przez bakterie biofilmu jest procesem grupowego zachowania związanym bezpośrednio z oddziaływaniem między sobą komórek bakterii. Indukcja QS ma miejsce podczas tworzenia struktury biofilmu i odpowiada za aktywację procesu jego dojrzewania lub demontażu. *P. aeruginosa* posiada dwa kompletne systemy AHL (*N-acetylated homoserine lactone*) należące do systemu LASI/R (LasI/LasR oraz RhII/RhIR). Systemy te odpowiadają za syntezę Ahl oraz receptora typu LuxR. AHL stabilizują wiązanie białek typu LuxR umożliwiając wiązanie DNA oraz regulując transkrypcję genów docelowych (Mashburn-Warren i wsp., 2008). U *P. aeruginosa* QS wpływa przede wszystkim na pierwszy etap tworzenia biofilmu, kontroluje ruchliwość komórek wpływając na ich efektywną adhezję oraz produkcję egzopolisacharydów wchodzących w skład matriks biofilmu a także wytwarzanie ramnolipidów. Uczestniczą one również w tworzeniu kanałów umożliwiających kontakt

między komórkami w złożonych strukturach o budowie grzyba. Kanały te umożliwiają właściwą dystrybucję składników odżywczych, tlenu oraz umożliwiają usuwanie produktów przemiany materii. Ekspresja operonu *rhlAB* odpowiedzialnego za syntezę ramnolipidów, ma miejsce przede wszystkim w łodydze grzybowej struktury (Lequette i Greenberg, 2005). Nadprodukcja ramnolipidów doprowadza do zwiększonej dyspersji biofilmu. System QS reguluje ponadto również produkcję składników istotnych do formowania struktury biofilmu jak białka LecA i LecB oraz siderofory. Dodatkowo zbyt wysoka lub zbyt niska koncentracja jonów w środowisku również znacząco wpływała na hamowanie tworzenia biofilmu przez *P. aeruginosa* (Davey i O'Toole, 2000).

c-di-GMP jest specyficznym przekaźnikiem bakteryjnym, regulującym ekspresję wielu genów odpowiedzialnym między innymi za wytwarzanie rzęsek, biosyntezę adhezyn, polisacharydów wchodzących w skład matryks oraz pośrednio kontrolującym ruch bakterii oraz proces tworzenia biofilmu. U patogennych bakterii kontroluje on również geny wirulencji. Poziom *c*-di-GMP w komórkach *P. aeruginosa* zależy od wielu czynników: (i) sensorów odbierających sygnały środowiskowe, (ii) enzymów odpowiedzialnych za syntezę i degradację *c*-di-GMP, (iii) specyficznych białek efektorowych, często będących ryboprzełącznikami, które regulują ekspresje genów w odpowiedzi na zmiany stężenia *c*-di-GMP, (iv) syntezy enzymów komórkowych, wici, egzopolisacharydów lub systemów sekrecji, (v) wydajności produkcji specyficznych białek efektorowych po ich wcześniejszej aktywacji przez *c*-di-GMP. W komórkach *P. aeruginosa* Alg44 aktywowane przez *c*-di-GMP kontroluje syntezę alginianu i egzopolisacharydów ważnych na późniejszych etapach infekcji podczas kolonizacji dróg oddechowych. FleQ działa jako represor/aktywator operonu *pel* odpowiedzialnego za syntezę egzopolisacharydu Pel, ponadto reguluje transport i syntezę adhezyny CdrA oraz umożliwia represję ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę wici. Dwa inne białka regulatorowe regulują natomiast syntezę Pel na poziomie post-transkrypcyjnym i kontrolują ruch *P. aeruginosa* (Römling i wsp., 2013; Hengge, 2009)

Małe niekodujące cząsteczki RNA (sRNA) to post-transkrypcyjna grupa regulatorów bakteryjnych. Zaangażowane są one w regulację wielu procesów takich jak QS, odpowiedź komórek na stres czy zjadliwość (Petrova i Sauer, 2010). Regulacja przez sRNA najlepiej poznana została na przykładzie *rsmY* oraz *rsmZ*. W mechanizmie tym kluczową rolę odgrywają kinazy RetS, LadS oraz GacS. (Irie i wsp., 2010). Kolejne sRNA *phrS* u *P. aeruginosa* odpowiada za stymulację ścieżki PQS. Ekspresja *phrS* wymaga wrażliwego na tlen regulatora ANR, który zapewnia komunikację pomiędzy dostępnym tlenem a PQS. sRNA to swoiste elementy regulacyjne, są one również zaangażowane w powstawanie sieci pętli zwrotnych i pośredniczą w wymianie w globalnych sieciach regulacyjnych sygnałów odpowiedzialnych za adhezję biofilmu lub jego dyspersję. Lista czynników kontrolujących tworzenie struktury biofilmu przez *P. aeruginosa* powinna być wydłużona o czynnik sigma, RpoS. RpoS jest pozytywnym regulatorem tworzenia polisacharydu niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania biofilmu oraz pomaga w adhezji do podłoża odpowiada również za przejście z wolnożyjącego trybu życia do osiadłego. Reasumując, dotychczasowe badania wykazały, że niekodujące cząsteczki RNA odgrywają ważną rolę w tworzeniu biofilmu (Sonnleitner i wsp.,

2011). Praca kończy się wymienieniem i opisem działania związków mogących wpływać na powstawanie i rozwój biofilmów, zwłaszcza tych hamujących działanie 3 głównych, uprzednio opisanych czynników genetycznych. Wspomniano również o podjętych przez naszą grupę badaniach nad wpływem AgNPs na system QS u *P. aeruginosa*. Starano się to wykazać poprzez pomiar zahamowania syntezy głównych regulatorów tej odpowiedzi LasI oraz RhII. Nie wykazano jednak hamującej aktywności nanocząstek srebra.

Główne osiągnięcia poznawcze

- Wykazano indukcję odpowiedzi szoku cieplnego w obecności AgNPs w komórkach *P. aeruginosa*.
- Udowodniono, że szczep *P. aeruginosa* PAO1 Δ htpG wykazuje obniżoną zdolność do tworzenia biofilmów zwłaszcza na pierwszym etapie ich tworzenia (adhezji).
- Stwierdzono, że szczep *P. aeruginosa* PAO1 Δ htpG ma znacznie słabszą zdolność do ruchu zwłaszcza w temperaturze 42°C, co ma kluczowe znaczenie na wstępnych etapach tworzenia biofilmu.
- Wykazano wpływ białka HtpG na zdolność do produkcji piocyjaniny, piowerdyny oraz ramnolipidów mających kluczowe znaczenie dla wirulencji *P. aeruginosa*.
- Zaobserwowano, że *P. aeruginosa* PAO1 Δ htpG wykazywał znacznie słabszą aktywność proteolityczną, która jest niezbędna bakterii podczas kolonizacji tkanek gospodarza.

PODSUMOWANIE

Wyniki badań wchodzące w skład mojej rozprawy habilitacyjnej pozwoliły scharakteryzować funkcje pełnione przez białko HtpG (Hsp90) w komórkach bakteryjnych. Opisałam liczne procesy w które to białko jest zaangażowane. Wydaje się, że kluczowe znaczenie ma tu jego udział w proteolizie zarówno u *E. coli* jak również u *P. aeruginosa*. Kolejną ważną obserwacją jest stwierdzenie udziału białka HtpG w wytwarzaniu licznych czynników wirulencji przez *P. aeruginosa* oraz w syntezie/stabilności lub transporcie kluczowych dla komórek polipeptydów, jak β -laktamazy czy alkaiczna fosfataza w komórkach *E. coli*. Jednak najważniejszym procesem, w który zaangażowane jest białko HtpG, zarówno w komórkach *E. coli* jak również *P. aeruginosa* jest zdolność do wytwarzania biofilmu, która jest ściśle związana z patogennością obu badanych bakterii. Największy wpływ białka HtpG obserwowano na wstępne etapy tworzenia tej struktury. Wykazano również, że białko HtpG w warunkach szoku cieplnego może odgrywać kluczową rolę dla komórki poprzez oddziaływanie z białkiem DnaA, stabilizując jego strukturę i chroniąc przed agregacją. Nanocząstki srebra stosowane, jako alternatywna terapia antybakteryjna, indukują w komórkach bakterii klasyczną odpowiedź adaptacyjną, w wyniku, której dochodzi do zwiększenia syntezy głównego białka opiekuńczego, DnaK. W wyniku działania AgNPs na komórki *P. aeruginosa* nie dochodzi do zwiększonej indukcji białka HtpG.

Realizacja niniejszego osiągnięcia była możliwa dzięki wykorzystaniu zarówno klasycznych, jak również nowoczesnych metod badawczych z zakresu fizjologii bakterii,

biologii molekularnej i genetyki. Wymagało to ode mnie między innymi wiedzy i doświadczenia w konstrukcji mutantów delecyjnych, wektorów ekspresyjnych, oczyszczania białek, jak również analiz *in silico* na poziomie sekwencji DNA. Prowadzone badania były możliwe dzięki pozyskanemu i kierowanemu przeze mnie finansowaniu z MNiSW (projekt zakończony w NCN).

PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach planuję realizację projektów naukowych związanych z następującymi zagadnieniami:

- wyjaśnieniem wpływu białka HtpG na wirulencję bakterii patogennych w tym bakterii gramdodatnich;
- scharakteryzowaniem alternatywnych do antybiotyków związków antybakteryjnych ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu działania nanocząstek oraz zbadaniem ich skuteczności wobec bakterii kolonizujących błony śluzowe; obecnie uzyskał finansowanie projekt pt. "Opracowanie optymalnego składu roztworu koloidalnego nanocząstek produkowanych przez Nano-Tech Polska w oparciu technologię aXonnite o dużej skuteczności antybakteryjnej i przeciwgrzybiczej" w ramach *Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020, Poddziałanie POIR.02.03.02 Bony na innowacje dla MŚP* uzyskany wraz firmą Nano-Tech Polska aktualnie (21.05.2018) uzyskał on finansowanie. Jestem kierownikiem i głównym wykonawcą projektu na UW;
- zidentyfikowaniem zmian mikrobiomu roślin i gleby po nawożeniu obornikiem oraz określenie w jakim stopniu obróbka obornika może ograniczyć rozprzestrzenienie opornych na antybiotyki bakterii patogennych oraz zidentyfikowanie strategii interwencyjnych, które pomogą w ograniczeniu lub wyeliminowaniu rozpowszechniania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR, ang. antimicrobial resistance) wśród patogenów wymienionych jako priorytetowe już na początku łańcucha pokarmowego (obornik, gleba nawożona obornikiem. Projekt INART pt. „*Ograniczenie transferu oporności na antybiotyki do łańcucha pokarmowego*”, oryginalny tytuł "Intervention of antimicrobial resistance transfer into the food chain" uzyskał finansowanie w konkursie (2018) Joint Programming Initiative on Microbial Resistance (<https://www.jpiamr.eu/>) pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Popowskiej, prof. UW (Polska), koordynowany jest przez dr. Fionę Walsh z Maynooth University w Irlandii. W skład konsorcjum wchodzi naukowcy z 5 państw: Irlandia, Polska, Izrael, Kanada, Szwajcaria. Jestem jednym z wykonawców projektu.

LITERATURA

- Agard A.D.**, Harris F.S., Shiao K.A. 2004. The crystal structure of the carboxy – terminal dimerization domain of *htpG*, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure* 12: 1087-1097.
- Bardwell C.J.**, Craig A.E. 1987. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:5177-5181.
- Buchner J.** 1999. Hsp90 & Co. – a holding for folding. *Trends Biochem Sci*. 24(4):136-141.
- Buchner J.** 2010. Bacterial Hsp90-desperately seeking clients. *Mol. Microbiol.* 76:540-4.
- Buchner J.**, Richter K. 2006. Hsp90: twist and fold. *Cell* 127:251-253.
- Buchner J.**, Richter K. Reinstein J. 2007. A Grp on the Hsp90 mechanism. *Mol. Cell* 28:177-179.
- Buchner J.**, Richter K. Wandinger K.S. 2008. The HSP90 chaperone mechanism. *J. Biol. Chem.* 283: 18473-18477.
- Chen B.**, Zhong D., Monyteiro A. 2006. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7:156–175.
- Pockley A.G.** 2001. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert. Rev. Mol. Med.* 3: 1-21.
- Colangelo T.**, Dünner J., Indra P., Mason A. C. 1999. Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3433-3440
- Dastenko K.A.**, Wanner B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-6645.
- Davey M.E.**, O’Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847-867
- Di Lallo G.**, Castagnoli L., Ghelardini P., Paolozzi L. 2001. A two-hybrid system based on chimeric operator recognition for studying protein homo/heterodimerization in *Escherichia coli*. *Microbiology* 147: 1651-1656.
- Ellis R.J.**, Van der Vies M.S. 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321–347.
- Genest O.**, Hoskins J.R., Camberg J.L., Shannon M.D., Wickner S. 2011. Heat shock protein from *Escherichia coli* collaborates with the DnaK chaperone system in client protein remodeling. *PNAS* 108-8206-8211.
- Georgopoulos C.** 1992. The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem. Sci.* 17:295-9.
- Georgopoulos C.**, Spence J. 1989. Purification and properties of the *Escherichia coli* heat shock protein, HtpG. *J. Bacteriol.* 264(8):4398-4403
- Gross C.A.** 1996. Function and regulation of the heat shock proteins. Str. 1382 – 1399. W: N. C. Neidhard, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Resnikoff, M. Riley, M. Schaechter i H. E. Umbarger (wyd.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., vol. 1. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Grudniak A.M.**, Kuć M. and Wolska K.I. 2005. Role of *Escherichia coli* DnaK and DnaJ chaperones in spontaneous and induced mutagenesis and their effect on UmuC stability. *FEMS Microbiol. Letters.* 242: 361-366.

- Grudniak A.M.**, Nowicka-Sans B., Maciąg M. and Wolska K.I. 2004. Influence of *Escherichia coli* DnaK and DnaJ chaperones on tryptophanase (TnaA) amount and GreA, GreB stability. *Folia Microbiologica* 49: 507-512.
- Hamer A.**, Heitzer A., Mason A.C. 1992. Heat shock gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 22:153-169.
- Hanein D.**, Matsudaira P., DeRosier D.J. 1997. Evidence for a conformational change in actin induced by fimbrin (N375) binding. *J Cell Biol.* 139:387-396.
- Hartl F.U.** 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-579.
- Hendrick J.P.**, Hartl U.F., 1993. Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 349–384.
- Hengge R.** 2009. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7:263-273.
- Hoeners C.M.**, Reintje A., Tatzelt J., Voellmy R., Winklhofer F.K. 2001. Geldanamycin restores a defective heat shock response *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 278:45160-45167.
- Huai Q.**, Ke H., Kim H-Y., Liu Y., Toft D., Wang H. 2005. Structures of the N-terminal and middle domains of *E. coli* Hsp90 and conformation changes upon ADP binding. *Structure* 13: 579–590.
- Irie Y.**, Starkey M., Edwards A.N., Wozniak D.J., Romeo T., Parsek M.R. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and postranscriptionally by RsmA. *Mol. Microbiol* 78:158-172.
- Jakob U.**, Lilie H., Meyer I., **Buchner J.** 1995. Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock *in vivo*. *J Biol Chem.* 270:7288-94.
- Jubete, Y.**, Maurizi M.R., Gottesman S. 1996. Role of the heat shock protein DnaJ in the Lon-dependent degradation of naturally unstable proteins. *J. Biol. Chem.* 271:30798-803.
- Karpiński P.**, Grudniak A.M. and Wolska K.I. 2002. Effect of mutations in *dnaK* and *dnaJ* genes on cysteine operon expression in *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica* 47: 371-375.
- Kędzierska S.**, Chesnokova L.S., Witt S.N, Zolkiewski M. 2005. Interaction within the ClpB/DnaK bi-chaperone system from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 444:61-65.
- Keller. J.A.** and Simon L.D. 1988. Divergent effects of a *dnaK* mutation on abnormal protein degradation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2:31-41.
- Kowalczyk W.D.** 2006. Immunoterapia raka jelita grubego. *Współczesna onkologia.* 10:111-115.
- Kusukawa N.**, Yura T., Ueguchi C., Akiyama Y., Ito K. 1989 Effects of mutations in heat shock-genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 8:3517-3521
- Laskowska E.**, Taylor A. 1998. A role of heat-shock proteases in removal of denatured proteins from *Escherichia coli* cells. *Postępy Biochemii* 44: 334–344
- LequetteY.**, Greenberg E.P. 2005. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 187:37-44.
- Lok C.N.**, Ho C.M., Chen r., He Q.y., yu w.y., Sun H., Tamp P.K., Chiu J.F., Che C.M. 2006. Proteomic analysis of mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res* 5:916-924.
- Mason C.A.**, Dünner J., IndraP., Colangelo T. 1999. Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress proteins HtpG are affected by the growth environment. *Appl Environ Microbiol* 65:3433-3440.
- Mashburn-Warren L.**, Howe J., Garidel P., Richter W., Steiniger F., Roessle M., Brandenburg K., Whiteley M. 2008. Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol Microbiol* 69:497-1-502.
- Meyer J.M.** 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbio* 174:135-42.

- Morimoto R.I.**, Tissiers A., Georgopoulos C. 1994. The biology of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA* 209-250.
- Motojima F.**, Y. Motojima-Miyazaki and M. Yoshida. 2010. Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400:241-5.
- Neidhardt F.**, von Bogelen A.R. 1987. Str. 1334 – 1345. W: R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Resnikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger (wyd.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., vol. 1. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Nemoto K.T.**, Ono T., Tanaka K. 2001. Substrate-binding characteristics of proteins in the 90 kDa heat shock protein family. *Biochem. J.* 354:663-670.
- Petrova O.E.**, Sauer K. 2010. The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA *rsmZ* through CasFA. *J Bacteriol* 192:5275-5288.
- Römling U.**, Galperin M.Y., Gomelsky M. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:1-52
- Sato, T.**, Minagawa S., Kojima E., Okamoto N. and Nakamoto H. 2010. HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the *Cyanobacterium Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 76:576-89.
- Silby M.W.**, Winstanley C., Godfrey S.A., Levy S.B., Jackson R.W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35:652-680.
- Sonnleitner E.**, Gonzalez N., Sorger-Domenigg T., Heeb S., Richter A.S., Backofen R., Williams P., Hüttenhofer A., Haas D., Bläsi U. 2011. The small RNA PhrS stimulates synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal. *Mol Microbiol* 80:868-885.
- Straus D.B.**, Walter W.A. and Gross C.A. 1988. *Escherichia coli* heat shock gene mutants are defective in proteolysis. *Genes Dev.* 2:1851-8.
- Thomas J.G.**, Baneyx F. 2000. ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol. Microbiol.* 36:1360-1370.
- Ueguchi C.**, Ito K. 1992. Multicopy suppression: an approach to understanding intracellular functioning of the protein export system. *J Bacteriol.* 174:1454-61.
- Ullers R.S.**, AngD., Schwager f. Georgopoulos C., Genevaux P. 2007. Trigger factor can antagonize both SecB and DnaK/DnaJ chaperone functions in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(9):3101-6.
- Van der Vies E.R.J.** 1991. Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 60:321-47
- Wickner B.**, Bassford P., Beckwith J., Ito K., Kumamoto C., Mizushima S., Oliver D., Randall L., Silhavy T. and Tai P.C. 1991. The primary pathway of protein export in *E. coli*. *Cell.* 65:367-8.
- Wolska K.I.**, Łobacz B., Jurkiewicz D., Bugajska E., Kuć M. and Józwick A. 2000. Biosynthesis and secretion of several enzymes in *Escherichia coli* *dnaK* and *dnaJ* mutants. *Microbios.* 101:157-68.
- Wolska K.I.**, Modrzewska M., Karpiński P., Grudniak A. 2002. Effect of null mutations in *dnaK* and *dnaJ* genes on conjugational DNA transfer, proteolysis and novobiocin susceptibility of *Escherichia coli*. *Acta Microbiol. Pol.* 51:217-24.
- Wolska K.I.**, Paciorek J., Kardys K. 1999. Physiological consequences of mutations in *Escherichia coli* heat shock *dnaK* and *dnaJ* genes. *Microbios* 97:55-67.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Publikacje:

- Józwiak A. K.I. Wolska. 1999. Molecular chaperones. *Acta Microbiologica Polonica* 48: 221-231 (praca przeglądowa).
- Wolska K.I., B. Łobacz, D. Jurkiewicz, E. Bugajska, M. Kuć and A. Józwiak. 2000a. Biosynthesis and secretion of several enzymes in *Escherichia coli dnaK* and *dnaJ* mutants. *Microbios* 101: 157-168.
- Wolska K.I., E. Bugajska, D. Jurkiewicz, M. Kuć, A. Józwiak. 2000b. Antibiotic susceptibility of *Escherichia coli dnaK* and *dnaJ* mutants. *Microbial Drug Resistance* 6: 119-126.
- Grudniak A. and K.I. Wolska. 2001. Bakteryjna tryptofanaza, funkcja i regulacja biosyntezy. *Postępy Mikrobiologii* 40 (1): 79-88 (praca przeglądowa).
- Karpiński P., A.M. Grudniak and K.I. Wolska. 2002. Effect of mutations in *dnaK* and *dnaJ* genes on cysteine operon expression in *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica* 47: 371-375.
- Grudniak A.M., B. Nowicka-Sans, M. Maciąg and K.I. Wolska. 2004. Influence of *Escherichia coli* DnaK and DnaJ chaperones on tryptophanase (TnaA) amount and GreA, GreB stability. *Folia Microbiologica* 49: 507-512.

Pracę naukową w Zakładzie Genetyki Bakterii, UW rozpoczęłam od badań mających na celu określenie udziału białek opiekuńczych - DnaK oraz DnaJ w wybranych cechach fenotypowych *Escherichia coli*. Grupa badawcza pod kierunkiem prof. dr hab. K.I. Wolskiej już od kilku lat zajmowała się badaniem czaperonów DnaK i DnaJ, które pełnią istotną rolę w wielu procesach komórkowych. Na poziomie molekularnym funkcja ich polega między innymi na umożliwieniu powstawania kompleksów białkowych biorących udział w ważnych dla komórki procesach. Białka te partycypują również w transporcie innych białek przez osłonę komórkową, czy ochraniają przed nadmierną agregacją. W związku z powyższym mutanty *dnaK* i *dnaJ* charakteryzują się efektem plejotropowym. Białka szoku cieplnego zaangażowane są przede wszystkim w naprawę białek pojawiających się w komórce po zadziałaniu na nią czynników stresowych. Defekty te są zazwyczaj wyraźniej zaznaczone w podwyższonej temperaturze. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach starałam się również określić molekularną przyczynę obserwowanego fenotypu. W badaniach zastosowano dwa mutanty delecyjne $\Delta dnaJ$ oraz $\Delta dnaK dnaJ$. Przeprowadzone badania finansowane były z grantu KBN (6 P04C 01420), którego byłam kierownikiem. Najważniejszymi osiągnięciami badań było wykazanie udziału białek DnaK i DnaJ w ekspresji tryptofanazy poprzez wpływ na stabilność pozytywnych regulatorów transkrypcji operonu *tna*, białek GreA i GreB (Grudniak i wsp., 2004). Kolejne badania prowadzone w naszej grupie badawczej, w których uczestniczyłam zmierzały do wyjaśnienia roli białek DnaK i DnaJ w kontroli regulonu cysteinowego. Badane mutanty $\Delta dnaJ$ oraz $\Delta dnaK dnaJ$ charakteryzowały się obniżoną ekspresją β -galaktozydazy wyrażoną z fuzji *cysPTWA::lacZ* i *cysJIH::lacZ* w porównaniu z isogenicznym dzikim szczepem. Defekt mutantów w hodowlach w logarytmicznej fazie wzrostu był silniej zaznaczony po ekspozycji komórek na podwyższoną temperaturę. Wykazano udział białek DnaK i DnaJ w ekspresji wybranych operonów należących do regulonu cysteinowego, a efekt ten miał związek z zahamowaniem

tworzenia aktywnych tetramerów białka CysB przy braku badanych białek opiekuńczych (Karpiński i wsp., 2002). Udowodniono również udział badanych białek w niektórych mechanizmach warunkujących oporność *E. coli* na antybiotyki β -laktamowe, chloramfenikol i tetracyklinę. Mutanty $\Delta dnaJ$ oraz $\Delta dnaKdnaJ$ posiadają zaburzoną translokację β -laktamazy do peryplazmy, mutant $\Delta dnaKdnaJ$ charakteryzuje się zwiększoną akumulacją tetracykliny wewnątrz komórek oraz obniżoną aktywnością transacetylazy chloroamfenikolowej – CAT (Wolska i wsp., 2000b). Wykazano także udział białek DnaK oraz DnaJ w sekrecji i biosyntezie wybranych enzymów w komórkach *E. coli*. Udowodniono zmniejszoną syntezę β -galaktozydazy oraz obniżoną aktywność alkalicznej fosfatazy w peryplazmie obu analizowanych mutantów $\Delta dnaKdnaJ$ oraz $\Delta dnaJ$ a także zahamowanie syntezy *b*-cytochromu (Wolska i wsp., 2000a). Otrzymane wyniki zaowocowały czterema publikacjami oryginalnymi oraz dwiema pracami przeglądowymi.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Publikacje:

- Modrzewska M., P. Karpiński, **A. Grudniak** and K.I. Wolska. **2002**. Effect of null mutations in *dnaK* and *dnaJ* genes on conjugational DNA transfer, proteolysis and novobiocin susceptibility of *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Polonica* 51: 217-224.
- Sieńczyk J., A. Skłodowska, **A. Grudniak** and K.I. Wolska. **2004**. Influence of DnaK and DnaJ Chaperones on *Escherichia coli* membrane lipid composition. *Polish Journal of Microbiology* 53: 121-123.
- **Grudniak A.M.**, M. Kuć and K.I. Wolska. **2005**. Role of *Escherichia coli* DnaK and DnaJ chaperones in spontaneous and induced mutagenesis and their effect on UmuC stability. *FEMS Microbiology Letters* 242: 361-366.
- **Grudniak A.M.**, J. Włodkowska and K.I. Wolska. **2015**. Chaperon DnaJ influences the formation of biofilm in *Escherichia coli*. *Polish Journal of Microbiology* 64:279-283

Tematyka białek opiekuńczych DnaK oraz DnaJ była częścią badań prowadzonych przeze mnie również po doktoracie. Badania prowadzono na modelowym organizmie, jakim jest *Escherichia coli*. Jak już wykazano we wcześniejszych badaniach chaperony uczestniczą w transporcie polipeptydów przez osłony komórkowe, utrzymując ich rozciągniętą konformację oraz uczestniczą w tworzeniu kompleksów białkowych, a zatem mogą mieć wpływ na procesy wymagające ich udziału. Charakterystykę badanych białek poszerzono o dalsze cechy. W proces koniugacyjnego transferu zaangażowanych jest kilka polipeptydów, spośród których główną rolę odgrywa białko TraI. Wykazuje ono aktywność endonukleolityczną, ATP-azową jest również ligazą oraz helikazą. Postulowano, że główne białka opiekuńcze DnaK, DnaJ umożliwiają przyjęcie odpowiedniej konformacji przestrzennej przez białko TraI, wpływając na liczne aktywności enzymatyczne tego wielofunkcyjnego białka. Kolejna koncepcja sugerowała, że białka te mogą brać udział w powstawaniu kompleksu TraI z TraY i TraZ, które występują *in vivo* w funkcjonalnym kompleksie TraI. Zbadaliśmy więc udział białek DnaK i DnaJ w koniugacyjnym transferze *E. coli*. Wykazano, że mutacje $\Delta dnaJ$ oraz $\Delta dnaKdnaJ$ hamują koniugacyjny transfer *E. coli*, a efekt był addytywny (Modrzewska i wsp., 2002). Aktywność opiekuńcza podjednostek ATP-azowych proteaz

szoku termicznego umożliwia prezentację substratów podjednostkom proteolitycznym. Przypuszcza się, że białka DnaK, DnaJ utrzymują nieprawidłowe białka w konformacji, która jest podatna na degradację prowadzoną przez proteazę Lon oraz inne proteazy cytoplazmatyczne. Uzyskane przez nas wyniki wykazały, że produkty genów *dnaK* oraz *dnaJ* biorą udział w proteolizie nieprawidłowych białek zachodzącej w 42°C a mutacja $\Delta dnaJ$ dodatkowo wpływa na wzrost przeżywalności szczepu *E. coli* w obecności streptomycyny (Modrzewska i wsp., 2002). Jak już wspomniano mutacje w genach *dnaK* oraz *dnaJ* mają efekt plejotropowy, przez co kontrolują wiele istotnych dla komórek procesów. Przeprowadzone przez nas analizy wykazały, że mutanty *E. coli* $\Delta dnaJ$ oraz $\Delta dnaKdnaJ$ mają istotnie zmieniony kształt komórek. W związku z tym postanowiliśmy zbadać wpływ białek DnaK oraz DnaJ na skład kwasów tłuszczowych we frakcji lipidów oraz we frakcji fosfolipidów w osłonach komórkowych, dodatkowo przeanalizowaliśmy strukturę lipopolisacharydu w badanych mutantach. Przeprowadzone badania wykazały brak kwasu dodekanowego w lipidach nie zawierających fosforu (NFL) w komórkach mutantów $\Delta dnaJ$ oraz $\Delta dnaKdnaJ$ inkubowanych w 42°C. Natomiast białka DnaK i DnaJ nie wpływały na obecność kwasu heksadekanowego (palmitynowego) w lipidach NPL osłon *E. coli* chociaż nie stwierdzono obecności estrowej pochodnej kwasu hydroksypalmitynowego. W mutantach $\Delta dnaJ$ oraz $\Delta dnaKdnaJ$ inkubowanych w 42°C jak również w 30°C występowanie kwasu oktadekanowego skorelowane jest z nieobecnością oktadekanolu. Dodatkowo wykazano, że ilość lipopolisacharydu badanych mutantów złożonych z cząsteczek LPS bez krótkich łańcuchów O-swoistych jest mniejsza w mutancie $\Delta dnaKdnaJ$ w obu badanych temperaturach (Sieńczyk i wsp., 2004). Wykazano także udział białek DnaK i DnaJ w funkcjonowaniu systemów naprawy mutacji spontanicznych i indukowanych UV i MMS zwłaszcza w systemie „naprawy błędnej”. Do mutagenizacji zastosowano szczep *E. coli* AB1157 będący wielokrotnym auktotrofem z doskonale poznanym tłem genetycznym. Wykazano, że mutanty $\Delta dnaJ$ oraz $\Delta dnaKdnaJ$ odznaczają się większą częstością rewersji spontanicznych oraz mniejszą częstością rewersji indukowanych UV i MMS w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Obserwowana różnica była najsilniejsza w przypadku mutantu podwójnego po przejściowej inkubacji w 42°C. Brak obu białek opiekuńczych znacząco wpływał na obniżenie stabilności białka UmuC biorącego udział w naprawie uszkodzeń DNA przez polimerazę V (Grudniak i wsp., 2005). Najnowsze badania wykazały zaangażowanie białka DnaJ w tworzenie przez *E. coli* biofilmu, zwłaszcza, gdy hodowle prowadzono w warunkach restrykcyjnych. Zaobserwowano również zahamowanie zdolności do ruchu w szczepie $\Delta dnaJ$, co pośrednio mogło być również przyczyną zmniejszonej zdolności do tworzenia biofilmów przez badany szczep. Zdolność do ruchu odgrywa kluczową rolę we wstępnym etapie tworzenia struktury biofilmu bezpośrednio wpływa na efektywność adhezji a przez to kolonizacji powierzchni (Grudniak i wsp., 2015). Przedstawione osiągnięcia zostały opublikowane w czterech pracach oryginalnych.

Publikacje:

- Wolska K.I., A. Kraczkiewicz-Dowjat, **A.M. Grudniak**, A. Sajkowska and T. Wiktorowicz. **2004**. New methods of pathogenic bacteria elimination. *Polish Journal of Microbiology* 53 Suppl.: 39-43 (praca przeglądowa).
- **Grudniak A.M.**, A. Kraczkiewicz-Dowjat, K.I. Wolska and J. Wild. **2007**. Conjugal transfer of plazmid R6K γ ori minireplicon derivatives from *Escherichia coli* to various genera of pathogenic bacteria. *Current Microbiology* 55: 549-553.

Przez krótki okres czasu zajmowałam się zagadnieniem opracowania alternatywnej metody eliminacji patogenów bakteryjnych przez nowo wprowadzone plazmidy charakteryzujące się określonymi cechami. W ostatnim czasie nadużywanie antybiotyków do celów leczniczych a także do produkcji żywności zarówno pochodzenia zwierzęcego jak również roślinnego przyczyniło się do lawinowego wzrostu liczby szczepów opornych na antybiotyki. Obecnie mamy liczne wielolekooporne gatunki bakterii, których nie możemy wyeliminować, posługując się klasycznymi terapeutykami. Nadmierne i niekontrolowane stosowanie antybiotyków przyczynia się do nieodwracalnych zmian w środowisku co dodatkowo może wpływać na rozprzestrzenianie się genów oporności pomiędzy różnymi gatunkami bakteriami a nawet rodzajami organizmów. Jest to zjawisko bardzo niebezpieczne. Wobec słabnącej skuteczności antybiotyków poszukuje się alternatywnych do antybiotyków związków bądź terapii antibakteryjnych, które mogłyby nas wspomóc w walce z groźnymi bakteryjnymi patogenami. Tak powstała koncepcja eliminacji bakterii patogennych po koniugacyjnym wprowadzeniu plazmidów. Strategia ta wymaga zastosowania nieszkodliwych dla komórek dawców plazmidów, które jednocześnie skutecznie doprowadzają do eliminacji komórek biorcy. Dokładny opis stosowanych strategii „Konia trojańskiego”, w których to planuje się wykorzystanie koniugacyjno – mobilizowalnych plazmidów do eliminacji komórek patogenów, został umieszczony w zacytowanej powyżej pracy przeglądowej, której jestem współautorem (Wolska i wsp., 2004).

Badania prowadzone w Zakładzie Genetyki Bakterii, UW wykazały możliwość koniugacyjnego przekazywania plazmidu R6K do różnych gatunków bakterii (*Shigella*, *Listeria*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Yersinia*), co udowodniło szerszy zakres gospodarza plazmidu R6K. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano także większą częstość przekazywania oraz większą stabilność w komórkach transkoniugantów nisko kopiowego plazmidu pFL129 niż wysokokopiowego plazmidu pFL130, oba plazmidy są pochodną R6K. Plazmid pFL129 koduje dzikie inicjatorowe białko π natomiast pFL130 koduje zmutowane białko π *F107S o fenotypie „copy-up”. Liczba kopii plazmidu pFL129 w transkoniugantach nie różniła się znacznie od liczby kopii w szczepie dawcy, podczas gdy liczba kopii plazmidu pFL130 zawsze była niższa w uzyskanych transkoniugantach niż w szczepie dawcy. Plazmid pFL129 przekazywany był z wyższą częstością i wykazywał większą stabilność w komórkach uzyskanych transkoniugantów w stosunku do plazmidu pFL130. Dodatkowo skonstruowany przez nas plazmid pAG101 zawierający obok mutacji F107S mutację L84P, wykazywał szeroki zakres gospodarza, jego stabilność w komórkach transkoniugantów była większa niż pFL130 a liczba kopii najwyższa spośród badanych plazmidów (Grudniak i wsp., 2007). Przedstawione badania były finansowane z funduszy przyznawanych przez Uniwersytet

Warszawski, (dwa granty UW), których byłam kierownikiem, oraz zostały opublikowane w zacytowanej powyżej pracy (Grudniak i wsp., 2007).

Publikacje:

- Szakiel A., D. Ruszkowski, A. **Grudniak**, A. Kurek, K.I. Wolska, M. Doligalska, W. Janiszewska. **2008**. Antimicrobial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from *Calendula officinalis* L. *Planta Medica* 74:1709-1715.
- Kurek A. **A.M. Grudniak**, M. Szwed, A. Klicka, Ł. Samluk, K.I. Wolska, W. Janiszewska, M. Popowska. **2010**. Oleanolic acid and urosolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Antonie van Leeuwenhoek* 97:61-68.
- Wolska K.I., **A.M. Grudniak**, B. Fiecek, A. Kraczkiewicz-Dowjat, A. Kurek. **2010**. Antibacterial activity of oleanolic and urosolic acid and their derivatives. *Central European Journal of Biology* 5: 543-553.
- Kurek A., **A.M. Grudniak**, A. Kraczkiewicz-Dowjat, K.I. Wolska. **2011**. New antibacterial therapeutics and strategies. *Polish Journal of Microbiology* 60:3-12 (praca przeglądowa).
- **Grudniak A.M.**, A. Kurek, J. Szarlak, K.I. Wolska. **2011**. Oleanolic and ursolic acids influence affect the expression of the cysteine regulon and the stress response in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 62: 1331-1336.
- Kurek A., K. Markowska, **A.M. Grudniak**, W. Janiszewska, K.I. Wolska. **2014**. The effect of oleanolic and ursolic acids on the hemolytic properties and biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. *Polish Journal of Microbiology* 63:21-25.

Nawiązując do wspomnianych wcześniej problemów związanych z szybko rozprzestrzeniającą się antybiotykoopornością wśród bakterii, nasza grupa badawcza zajęła się poszukiwaniem i badaniem mechanizmu działania alternatywnych do antybiotyków terapeutyków. Nasze zainteresowanie przykuły związki pochodzenia roślinnego kwas oleanolowy (OA) i kwas ursolowy (UA), będące związkami biologicznie czynnymi, które izolowane są z wielu roślin leczniczych, między innymi z nagietka lekarskiego (*Calendula officinalis* L.). Badania były prowadzone we współpracy z Zakładem Biochemii Roślin, UW i były finansowane w ramach dwóch grantów: KBN, którego kierownikiem była prof. dr hab. W. Janiszewska oraz NCN, którego kierownikiem była prof. dr hab. K.I. Wolska, w obu grantach byłam głównym wykonawcą i uczestniczyłam w planowaniu badań. Dodatkowo na badania pozyskałam fundusze w ramach grantu UW, którego byłam kierownikiem. Badania zaowocowały czterema publikacjami oryginalnymi oraz jedną publikacją przeglądową.

Kwas oleanolowy należy do grupy związków triterpenowych o budowie pentacyklicznej w komórkach roślin najczęściej występuje w postaci pochodnych cukrowych. Glukozydy i glukuronozidy również zaliczane są do substancji biologicznie czynnych posiadających aktywność przeciwzapalną, przeciwnowotworową, antygrzybiczą i antybakteryjną. Badania prowadzone przez naszą grupę wykazały szerokie spektrum antybakteryjnego działania OA i UA zarówno wobec bakterii gramujemnych jak również gramododatnich, przy czym nieznacznie lepszy efekt obserwowano w przypadku bakterii gramododatnich (Szakiel i wsp., 2008). Wykazaliśmy, że OA nie wiąże się z białkami wiążącymi penicylinę a więc PBP, białka te nie są celem wewnątrzkomórkowego działania OA. Kwasy oleanolowy i ursolowy wpływały natomiast na autolizę *B. megaterium*, *L. monocytogenes* i *E. coli* indukowaną lizozymem oraz Tritonem X-100. Uzyskane wyniki zainspirowały nas do kontynuacji badań w celu wyjaśnienia wpływu badanych triterpenów pentacyklicznych na skład i biosyntezę

mureiny *E. coli* i *L. monocytogenes*. Wykorzystując radioaktywnie wyznakowaną N-acetylo-D-[1-³H]-glukoaminę, wykazano że OA i UA powodują zahamowanie tempa obrotu metabolicznego mureiny *L. monocytogenes* nie wpływają natomiast na tempo obrotu metabolicznego mureiny u *E. coli*. Przeprowadzona analiza profilu muropeptydowego mureiny *L. monocytogenes*, trawionej mutanolizyną w obecności OA i UA, wykazała znaczne różnice ilościowe w otrzymanym wzorze muropeptydowym, w stosunku do szczepu kontrolnego (Kurek i wsp., 2010). Analiza odpowiedzi szoku cieplnego w komórkach *E. coli* przez OA i UA wykazała natomiast, że oba związki są zdolne do indukcji odpowiedzi stresowej oraz dodatkowo wpływają na ekspresję genów regulonu cysteinowego w komórkach *E. coli* (Grudniak i wsp., 2011). Wykazaliśmy ponadto, że OA oraz UA wpływają hamująco na aktywność listeriolizyny O, która jest najważniejszą hemolizyną w procesie patogenezы *L. monocytogenes*. Nie zaobserwowano natomiast zwiększenia sekrecji białka p60 *L. monocytogenes* w obecności OA/UA. Odnotowano dodatkowo wpływ badanych związków na zmniejszenie przeżywalności *E. coli* pod presją wysokiego stężenia NaCl, co świadczy o wpływie OA/UA na osmoadaptację komórek. Bardzo ważnym aspektem naszych badań była skuteczność anty-biofilmowa badanych triterpenoidów. Wykazaliśmy, że zarówno OA jak również UA już w bardzo niskich stężeniach działają hamująco na zdolność do wytwarzania biofilmów przez badane szczepy (Kurek i wsp., 2014). Badania przeprowadzone przez naszą grupę przybliżyły nas do terapeutycznego zastosowania kwasu oleanolowego i ursolowego, które z powodzeniem mogą zastąpić antybiotyki w walce z bakteriami.

Publikacje:

- Markowska K., **A.M. Grudniak**, K.I. Wolska. **2013**. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica* 60: 523-530 (praca przeglądowa).
- Cierech M., J. Wojnarowicz, D. Szmigiel, B. Bączkowski, **A.M. Grudniak**, K.I. Wolska, W. Łojewski, E. Mierzwińska-Nastalska. **2015**. Preparation and characterization of ZnO-PMMA resin nanocomposites for denture bases *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 18(2):31-41.
- Wolska K.I., **A.M. Grudniak**, K. Kamiński and K. Markowska. **2015**. **Chapter 8** "The potential of metal nanoparticles for inhibition of bacterial biofilms". Rai M. i Kon K. (Redaktorzy). Rozdział w książce pt. **Nanotechnology in diagnosis, treatment and prophylaxis of infectious diseases**. Academic Press is in an imprint of Elsevier, London 2015 (ISBN: 978-0-12-801317-5).
- Cierech M., A. Kolenda, **A.M. Grudniak**, J. Wojnarowicz, B. Woźniak, M. Gołaś, E. Swoboda-Kopeć, W. Łojkowski, E. Mierzwińska-Nastalska. **2016**. Significance of polymethylmethacrylate (PMMA) modification by zinc oxide nanoparticles for fungal biofilm formation. *International Journal of Pharmaceutics* 510: 323-335.
- Wolska K.I., **A.M. Grudniak** and K. Markowska **2017**. **Chapter 7** "Inhibition of Bacterial Quorum Sensing Systems". Rai M. and Shego R. (Redaktorzy). Rozdział w książce pt. **Metal Nanoparticles in Pharma** Springer International publishing AG 2017, ISBN: 978-3-319-63789-1; ISBN: 978-3-319-63790-7 (eBook).
- Jagielski T., Z. Bakuła, M. Pleń, M. Kamiński, J. Nowakowska, J. Bielecki, K.I. Wolska, **A.M. Grudniak**. **2018**. The activity of silver nanoparticles against microalgae of *Prototeca* genus. *Nanomedicine* ID NNM-2017-0370.R1 (praca opublikowana on line).
- Markowska K., **A.M. Grudniak**, B. Milczarek, K.I. Wolska. **2018**. The effect of silver nanoparticles on *Listeria monocytogenes* PCM2191 peptidoglycan metabolism and cell permeability. *Polish Journal of Microbiology* (praca zaakceptowana do druku)

W ostatnich latach nasza grupa badawcza zajęła się badaniem celów i mechanizmów antybakteryjnego działania nanocząstek srebra (AgNPs). Nanotechnologia w ostatnich latach stała się szybko rozwijającą gałęzią nauki łączącą w sobie zagadnienia chemii, fizyki i biologii.

Szczególnym zainteresowaniem cieszą się przede wszystkim nanocząstki metali szlachetnych. Nanocząstki srebra, nie są obdarzone ładunkiem, dlatego też nie są kumulowane w komórkach organizmów wyższych i mogą być stosowane w celach terapeutycznych, jednak mechanizm ich działania nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony. Przypuszcza się, że początkowo NPs opłaszczają komórkę i oddziałują z błoną komórkową bakterii, powodując zaburzenie jej przepuszczalności. Po wnikięciu do komórki AgNPs zakłócają proces syntezy ściany komórkowej i kwasów nukleinowych oraz hamują działanie enzymów, generując powstawanie w komórce reaktywnych form tlenu, głównie nadtlenku wodoru. Nanocząstki reagują głównie ze związkami zawierającymi siarkę i fosfor w wyniku czego dochodzi do śmierci komórki bakteryjnej. Mechanizmy oddziaływania nanocząstek z komórką bakteryjną zostały dokładniej scharakteryzowane w zacytowanych powyżej pracach przeglądowych oraz dwóch rozdziałach w monografiach.

Badania prowadzone w Zakładzie Genetyki Bakterii, UW dotyczyły wpływu nanocząstek srebra na komórki wybranych gatunków bakterii patogennych. Stosowany przez nas preparat nanocząstek srebra aXonnite (firmy NanoTech), otrzymany był metodą fizyczną. Wykazywał on działanie antybakteryjne wobec bakterii gramujemnych jak również gramodatnich, przy czym jego aktywność była nieznacznie silniejsza wobec bakterii gramujemnych. Udało nam się wykazać wpływ AgNPs na strukturę i funkcje patogenów bakteryjnych a oddziaływanie z osłonami komórkowymi ma kluczowe znaczenie dla obserwowanego efektu antybakteryjnego. Uzyskane wyniki weszły w skład rozprawy doktorskiej K. Markowskiej, której byłam promotorem pomocniczym, została ona obroniona w 2016, promotorem rozprawy była prof. K.I. Wolska. Wyniki zostały opublikowane w pracy (Markowska i wsp., 2014). Ostatnia praca dotycząca wpływu AgNPs na metabolizm peptydoglikanu u *Listeria monocytogenes* została przyjęta do druku (Markowska i wsp., 2018).

Aktywność nanocząstek srebra potwierdzono również wobec glonów z rodzaju *Prototeca*, badania te przeprowadzono przy współpracy z dr T. Jagielskim z Zakładu Mikrobiologii Stosowanej, UW (Jagielski i wsp., 2018). Glony z rodzaju *Prototeca* to prymitywne, jednokomórkowe drobnoustroje, które w wyniku ewolucji utraciły chlorofil i przystosowały się do heterotroficznego sposobu odżywiania. Glony te należą do gatunków chorobotwórczych o stosunkowo niskiej zjadliwości, do zakażenia nimi dochodzi głównie u osobników z osłabionym układem immunologicznym. Prototekozy to choroby ludzi i zwierząt domowych (głównie bydła) a także zwierząt dzikich wywołane przez różne gatunki *Prototheca spp.* U bydła najczęściej są to infekcje gruczołów sutkowych, wynikające głównie z braku higieny, przyczyniają się one do obniżenia, jakości i ilości mleka. Przeprowadzone przez nas badania wykazały wysoką skuteczność algobójczą nanocząstek srebra wobec *P. zofii* I, II, *P. blashkeae*, *P. ulmea*, *P. curtis*, *P. miyajii*, *P. wickerhamii* oraz *P. stanosa*, również wobec biofilmów tworzonych przez te gatunki (Jagielski i wsp., 2018).

Kolejny rodzaj nanocząstek, który stał się przedmiotem moich badań to tlenek cynku (ZnO). Tlenek cynku stosuje się przy wytwarzaniu biosensorów oraz ze względu na jego manometryczne rozmiary i antybakteryjne właściwości w stomatologii do wypełniania

kanałów zębowych. Stosowany jest on również w kosmetyce dzięki zdolności do absorbowania fal UV oraz ze względu na jego właściwości przyspieszające gojenie się ran. Mechanizm antybakteryjnego działania ZnO nie jest do końca poznany. Jak dotąd wiadomo, że indukuje on w komórkach stres oksydacyjny powoduje również wzrost stężenia innych reaktywnych form tlenu (ROS) oraz nadprodukcję białka p53. Bardzo istotnym problemem w ostatnich latach są nawracające i przewlekłe infekcje grzybicze w obrębie jamy ustnej u pacjentów stosujących ruchome i stałe uzupełnienia protetyczne. Materiałem kompozytowym stosowanym do wytwarzania protez jest polimetakrylan metylu (PMMA), który niestety bardzo łatwo jest kolonizowany przez różne gatunki *Candida*. Stosowana do leczenia stomatopatii nystatyna usuwa grzyba z powierzchni błon śluzowych, jest jednak nie skuteczna w przypadku porowatych powierzchni tworzywa. Jest to powodem często nawracających zakażeń, dlatego integralną częścią leczenia jest wymiana uzupełnienia protetycznego. Celem badań była analiza wpływu ZnO znajdującego się w materiale kompozytowym (PMMA) na przeżywalność oraz rozwój biofilmów *C. albicans*. Badania prowadzono przy współpracy z Katedrą Protetyki Stomatologicznej, WUM. Nanocząstki tlenku cynku były nanoszone na powierzchnię badanego kompozytu lub inkorporowane w jego wnętrzu. Wykazano, że nanocząstki ZnO wykazują silne działanie grzybobójcze oraz wpływają na zahamowanie tworzenia biofilmu przez *C. albicans*. Przeżywalność komórek w obecności ZnO była znacząco obniżona, również biofilm był silnie hamowany niezależnie od sposobu nanoszenia nanocząstek na powierzchnie PMMA. Udowodniono, że nanocząstki ZnO mogą być z powodzeniem stosowane, jako dodatek do materiałów kompozytowych, powodując ich oporność na kolonizację przez *C. albicans*. Również PMMA, w którym nanocząstki ZnO znajdowały się w jego wnętrzu dawał skuteczną ochronę i zabezpieczał pacjenta przed tego typu infekcjami. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych (Ciarech i wsp., 2015; Ciarech i wsp., 2016). Jestem również współautorką 1 pracy przeglądowej (Markowska i wsp., 2013) oraz dwóch rozdziałów w książkach dotyczących odpowiednio wpływu nanocząstek na hamowanie struktury biofilmu oraz inhibicję systemu QS przez nanocząstki (Wolska i wsp., 20015; Wolska i wsp., 2017).

Publikacje:

- Wolska K.I., **A.M. Grudniak** and A. Kraczkiewicz-Dowjat. **2007**. Genetic and physiological regulation of bacterial endospore development. *Polish Journal of Microbiology* 56: 11-7.
- Wolska K.I., **A.M. Grudniak**, A. Kraczkiewicz-Dowjat, A. Kurek. **2010**. Różnorodne funkcje wybranych pigmentów bakteryjnych. *Postępy Mikrobiologii* 40: 105-114.
- Markowska K., **A.M. Grudniak**, K.I. Wolska. **2013**. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe: podstawy technologii, jej ograniczenia i potencjalne zastosowania. *Postępy Mikrobiologii* 52: 29-40.
- Wolska K.I., **A.M. Grudniak**, K. Markowska. **2016**. Związki interkalujące z bakteryjnymi systemami wyczuwania liczebności i ich potencjalna funkcja terapeutyczna. *Postępy Mikrobiologii* 55 (3): 300-308.

Pozostałe publikacje przeglądowe, których byłam współautorką dotyczą ważnych problemów mikrobiologicznych, opisują procesy istotne dla funkcjonowania komórek

bakteryjnych oraz poruszają aspekty związane z aplikacyjnym zastosowaniem mikroorganizmów.

Endospory bakteryjne to struktury tworzone głównie przez bakterie gramdodatnie. Do ich wytwarzania dochodzi, gdy komórki poddane są warunkom stresowym. Proces sporulacji jest złożony i kontrolowany na wielu etapach, w zacytowanej pracy przeglądowej omówiono główne aspekty związane z tym procesem ze szczególnym uwzględnieniem kontrolujących go mechanizmów genetycznych (Wolska i wsp., 2007).

Praca poświęcona pigmentom bakteryjnym analizuje je jako potencjalne czynniki wirulencji wybranych bakterii. Opisuje również funkcje pigmentów niezwiązane z chorobotwórczością, takie jak fotosynteza, pozyskiwanie żelaza czy ochrona przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych i związków antybakteryjnych oraz porusza aspekt ich potencjalnego zastosowania w medycynie (Wolska i wsp., 2010).

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC) są przykładem aplikacyjnego zastosowania mikroorganizmów. W pracy przedstawiono zasadę działania i rodzaje obecnie stosowanych ogniw MFC, opisano mikroorganizmy zdolne do wytwarzania elektryczności oraz wydajność procesów przeprowadzanych przy ich udziale. Szczególną uwagę poświęcono komercjalizacji ogniw oraz powszechnemu ich wykorzystaniu (Markowska i wsp., 2013)

Związki interkalujące z bakteryjnymi systemami wyczuwania liczebności stanowią dużą grupę do której zaliczane są organiczne inhibitory QS, inhibitory roślinne, inhibitory pochodzenia zwierzęcego czy inhibitory produkowane przez bakterie. Hamowanie QS możliwe jest również przez nanocząstki. W pracy przeanalizowano najważniejsze aspekty związane z mechanizmami ich działania (Wolska i wsp., 2016).

5. Dane bibliometryczne.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w którym ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania – **43,978**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitanta – **615**

Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitanta (wg bazy Web of Science) – **319**

Indeks Hirscha habilitanta (wg bazy Web of Science) – **Grudniak H – 8**

Jóźwik (nazwisko panieńskie) H-2,

Grudniak (łączny) H – 8

Anna M. Grudniak