

## AUTOREFERAT

### 1. Imię i Nazwisko.

**Urszula Zielenkiewicz**

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

**2001** stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii  
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie,  
Tytuł rozprawy: "Role of genes epsilon and zeta of pSM19035 plasmid In its stable maintenance in bacterial cells", promotor: dr hab. Piotr Cegłowski

**1980** magister biologii, specjalizacja mikrobiologia  
Uniwersytet Warszawski  
promotor: prof. dr hab. W. Kunicki-Goldfinger

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

od **2011** adiunkt, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
od **1995** asystent, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
od **1993** biolog, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
od **1984-1997**, studia doktoranckie w IBB PAN

### 4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

**Kaseta genowa  $\epsilon$ - $\zeta$  plazmidu pSM19035 jako model systemów toksyna-antytoksyna bakterii Gram-dodatnich.**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)  
IF podano dla roku wydania publikacji.

Nowakowska B., Kern-Zdanowicz I., Zielenkiewicz U. and Cegłowski P. **2005** Characterization of *Bacillus subtilis* clones surviving overproduction of Zeta, a pSM19035 plasmid-encoded toxin. *Acta Biochim Pol.*, 52: 99-107. IF 1,862

Zielenkiewicz U., Kowalewska M., Kaczor C. and Cegłowski P. **2009** In Vivo Interactions between Toxin-Antitoxin Proteins Epsilon and Zeta of Streptococcal Plasmid pSM19035 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.*, 191: 3677-3684. IF 3,940

Brzozowska I., Brzozowska K., Zielenkiewicz U. **2012** Functioning of the TA cassette of streptococcal plasmid pSM19035 in various Gram-positive bacteria. *Plasmid* 68: 51-60. IF 1,516

Brzozowska I. and Zielenkiewicz U. **2013** Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70: 33-41. IF 1,760

Brzozowska I. and Zielenkiewicz U. **2014** The ClpXP protease is responsible for the degradation of the Epsilon antidote to the Zeta toxin of the streptococcal pSM19035 plasmid. *J.Biol.Chem.*, 289: 7514-7523. IF 4,651

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

### **Kaseta genowa $\epsilon$ - $\zeta$ plazmidu pSM19035 jako model systemów toksyna-antytoksyna bakterii Gram-dodatnich.**

Odkryte w plazmidach systemy znane jako toksyna-antytoksyna (TA) widziane były początkowo jako tzw. „pasożytnicze DNA” - replikujące się lecz niepełniące żadnej funkcji. Niemożność uzyskania żywotnych komórek gospodarza pozbawionych plazmidu niosącego taki system nadawała im cechę uzależnienia komórki od, wydawałoby się zbędnego, elementu pozachromosomalnego. Idea „addykcji” gospodarza do plazmidu pochodzi z pracy Koyamy (Koyama, 1975), który zauważył, że jeżeli komórka tracąca plazmid ginie, to w populacji nigdy nie pojawiają się żywotne komórki bezplazmidowe. Wynikiem tego procesu będzie efektywne dziedziczenie i trwała obecność plazmidu w populacji bakterii, niezależnie od braku jakiegokolwiek presji selekcyjnej i ilości kopii. Ponieważ skutkiem działania takich par genów jest śmierć komórki, która po podziale nie odziedziczyła plazmidu, proces/system ten uzyskał też nazwy „zabójczego”, „po-segregacyjnego zabijania”, a nawet zaprogramowanej śmierci komórek. Po odkryciu, że jeden z tych genów koduje truciznę, a drugi specyficzną dla niej odtrutkę przyjęto nazywanie tych systemów systemami trucizny-odtrutki lub toksyny-antytoksyny (TA).

Późniejsze badania oraz analizy sekwencjonowanych genomów *Bacteria* i *Archea* wykazały, że systemy TA obecne są nie tylko w niskokopijnych plazmidach, lecz także licznie, często w wielu kopiach, w chromosomach tych organizmów (Hayes i van Melderen, 2011). Chociaż obecność systemów TA nie jest niezbędna dla normalnego wzrostu komórek bakterii, dlatego nie wszystkie gatunki bakterii posiadają te systemy, znane są gatunki, które zawierają nawet kilkadziesiąt operonów TA w genomowym DNA. Jak do tej pory w genomie *Escherichia coli* K-12 odnaleziono 36 systemów TA, natomiast genomy niektórych sinic kodują ponad 70 toksyn i antytoksyn, a *Mycobacterium tuberculosis* posiada aż 88 tych systemów. W przypadku niektórych *Proteobacteria* oraz bakterii siarkowych aż do 2,5% otwartych ramek odczytu przypisanych jest do systemów TA typu II. Warto zwrócić również uwagę na fakt, iż obecność tych systemów nie jest zależna od wielkości chromosomu.

W przeciwieństwie do bardzo dobrze określonej roli w stabilnym utrzymywaniu plazmidów w populacji bakterii funkcja systemów TA kodowanych w chromosomach jest przedmiotem intensywnych badań i szerokiej dyskusji. Najczęściej postulowane i coraz lepiej udokumentowane role to współdziałanie w reakcjach na stres (Gerdes et al., 2005), tworzeniu biofilmów (Yamaguchi, 2009), powstawaniu komórek „persisters” (w przejściowym stanie

uśpienia, niedzielących się i nieaktywnych metabolicznie; Maisonneuve, 2013), ochronie przed inwazją obcego DNA (Mruk and Kobayashi, 2013) i patogenezie (De la Cruz et al., 2013). Ogólnie, poprzez spowolnienie lub zahamowanie wzrostu a nawet powodowanie śmierci części populacji systemu TA stanowią ważny element adaptacji mikroorganizmów do zmieniającego się środowiska.

Molekularną podstawą funkcjonowania systemów TA jest istnienie genetycznego modułu kodującego dwa elementy: trwały czynnik toksyczny oraz nietrwały czynnik przeciwdziałający powstaniu lub działaniu toksyny. Toksyny są zawsze białkami, natomiast antytoksyny mogą być białkami lub cząsteczkami RNA. W zależności od natury i sposobu działania antytoksyny obecnie wyróżnia się pięć typów systemów TA. W typie I i III antytoksyny to RNA, odpowiednio antysensowny RNA wiążący mRNA toksyny blokując jej translację lub sRNA bezpośrednio blokujący aktywność toksyny poprzez tworzenie z nią kompleksu. W pozostałych typach antytoksyny to białka. Najpowszechniejszym jest typ II, którego białka tworzą silne kompleksy, w których toksyny pozostają nieaktywne. Istota działania systemu tego typu polega na różnicy w trwałości obu białek. Podczas gdy toksyna jest białkiem trwałym, antytoksyna, wrażliwa na działanie proteaz komórkowych, charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania. Jeżeli ilość antytoksyny w komórce ulegnie obniżeniu, stabilna toksyna przestaje być neutralizowana i oddziałując ze swoistym celem w komórce powoduje zahamowanie jej wzrostu lub śmierć. W pozostałych dwóch, niedawno odkrytych, typach systemów TA antytoksyna nie neutralizuje toksyny poprzez tworzenie z nią kompleksu, lecz działa jako antagonistka aktywności toksyny (typ IV), lub blokuje translację toksyny (typ V).

Na podstawie podobieństwa sekwencji oraz modelu działania antytoksyn wyróżnia się 14 rodzin systemów typu II (w wyniku lawinowo zwiększającej się liczby danych lista przedstawicieli jest stale uzupełniana, vide np. Heaton et al., 2012). Jednakże, z powodu coraz liczniejszych przykładów oddziaływania toksyn z antytoksynami różnych klas, uzasadnione wydaje się kategoryzowanie toksyn i antytoksyn typu II niezależnie w oparciu o analizy bioinformatyczne. Obecnie wyróżnianych jest 13 rodzin toksyn i 20 rodzin antytoksyn (Goeders i van Melderen 2014).

Większość systemów TA zaliczonych do typu II posiada kilka wspólnych cech. Geny kodujące toksynę i antytoksynę tworzą operon, w którym najczęściej gen antytoksyny występuje jako pierwszy, a sekwencje obu genów często na siebie zachodzą lub oddzielone są jedynie kilkoma parami zasad. Antytoksyna, pojedynczo lub w kompleksie z toksyną, pełni funkcję autorepresora transkrypcji wiążąc się do sekwencji palindromowej w obrębie regionu promotora. Dzięki temu zapewnione jest utrzymywanie poziomu białek systemu TA na stałym poziomie.

Obecnie wiadomo, że większość toksyn systemów TA typu II to miejscowo specyficzne endorybonukleazy, degradujące mRNA zależnie (np. RelE) bądź niezależnie (np. MazE) od rybosomów lub specyficzne transkrypty, regulujące procesy translacji. Zahamowanie translacji to także efekt działania kinazy Doc systemu TA faga P1 i kinazy HipA. Również toksyny systemów typu III to endorybonukleazy degradujące mRNA.

Toksyny typu I to najczęściej małe, hydrofobowe białka (<60 aminokwasów) posiadające domenę transmembranową, których działanie zbliżone jest do holin fagowych. Uszkadzają one błony wewnętrzne co prowadzi do zahamowania oddychania oraz wypływu związków niskocząsteczkowych, a w efekcie do powstawania charakterystycznych tzw. „duchów” komórek (Gerdes et al., 1997). Podobnie działa toksyna GhoT, jedyny przedstawiciel V typu systemów TA (Wang et al., 2012).

Badany przeze mnie system  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  był jednym z pierwszych odkrytych u bakterii Gram-dodatnich. Zlokalizowany na plazmidzie pSM19035 wyizolowanym z klinicznego szczepu *Streptococcus pyogenes*, operon  $\epsilon$ - $\zeta$  został po raz pierwszy opisany przez promotora mojej dysertacji dr hab. Piotra Cegłowskiego (Cegłowski et al., 1993) jako fragment większej jednostki zapewniającej niezwykle skuteczne dziedziczenie tego niskokopijnego plazmidu. W odróżnieniu od wszystkich ówczesnie znanych systemów TA system z plazmidu pSM19035 nie jest autoregulowany przez odtrutkę, wolną ani w kompleksie z toksyną, lecz przez trzeci komponent systemu- białko Omega (de la Hozet al., 2000). Niezwykłą cechą jest także wielkość białka toksyny Zeta: 287 aminokwasów, gdy inne toksyny mają przeciętnie ok.100. Na podstawie krystalografii rentgenowskiej określono strukturę kompleksu  $\epsilon_2\zeta_2$ , w którym dwie cząsteczki białka Epsilon (10,7 kDa) otoczone są dwoma monomerami białka Zeta (32,4 kDa)(Meinhart et al., 2003). Struktura tego heterotetrameru jest również unikalna co pozwoliło wydzielić dla białek Epsilon i Zeta osobną rodzinę. W żadnej z powyższych prac nie przedstawiono dowodu na funkcjonowanie operonu  $\epsilon$ - $\zeta$  jako systemu addykcji. Przeprowadzone przeze mnie badania jednoznacznie wykazały, że operon  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  stanowi nowego typu system trucizna–odtrutka, działający na zasadzie po-segregacyjnego zabijania bezplazmidowych komórek potomnych. Pokazałam w klasycznych testach stabilności, że system ten zapewnia dziedziczenie pochodnych plazmidu pSM19035 podczas podziałów komórek hodowanych bez presji selekcyjnej przez co najmniej 100 generacji, jak również dziedziczenie niestabilnych replikonów heterologicznych. Wykazałam też, że para genów  $\epsilon$ - $\zeta$  stanowi funkcjonalną kasetę TA niezależnie od faktu tworzenia jednej jednostki transkrypcyjnej z genem  $\omega$ . Poprzez manipulacje molekularne utworzyłam szereg konstruktów, które pozwoliły ocenić efekty działania systemu zarówno w komórkach bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus subtilis*, gospodarz laboratoryjny) jak i Gram-ujemnych (*Escherichia coli*). Geny operonu zostały rozdzielone i sklonowane niezależnie w różnych zgodnych wektorach umożliwiając przeprowadzenie precyzyjnych badań wzajemnych relacji między obu genami i ich produktami białkowymi. Potwierdziłam, w analizie western blot, obecność białka Zeta po indukcji ekspresji w obu typach komórek bakteryjnych oraz sprawdziłam jego aktywność w biologicznym teście tzw. „ko-transformacji”, w którym transformacja plazmidem niosącym gen  $\zeta$  jest możliwa tylko przy jednoczesnej obecności plazmidu zawierającego gen  $\epsilon$ . Nadprodukcja białka toksyny pokazała, że toksyna Zeta jest silnie bakteriobójcza dla *B. subtilis* powodując szybką lizę komórek, podczas gdy dla *E. coli* jest bakteriostatyczna zatrzymując podziały komórek, które przekształcają się w długie filamenty. Sprawdziłam, że efekt ten nie jest związany z indukcją systemu SOS. W dwóch rodzajach doświadczeń udowodniłam, że białko odtrutki Epsilon skutecznie przeciwdziała aktywności toksyny Zeta: (i) zwiększenie ekspresji białka Epsilon w komórkach poddanych działaniu toksyny przywracało ich wzrost i prawidłową morfologię, (ii) stały nadmiar antytoksyny

w komórkach znosił efekt obecności systemu TA  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  w plazmidach, które były szybko traczone z populacji w kolejnych generacjach.

Opisane powyżej eksperymenty stanowiły zawartość mojej rozprawy doktorskiej obronionej w 2001 roku pod kierunkiem dr hab. P. Cegłowskiego, dlatego też, mimo że stanowią punkt wyjścia do wszystkich pozostałych badań systemu  $\epsilon$ - $\zeta$ , publikacja prezentująca te wyniki (**Zielenkiewicz i Cegłowski, 2005**) nie została włączona do zbioru prac składających się na wskazane we wniosku osiągnięcie naukowe.

Po przedwczesnej śmierci mojego mentora, w 2004 roku, kontynuowałam badania w tej dziedzinie skupiając się na szczegółowej charakterystyce funkcjonowania systemu  $\epsilon$ - $\zeta$ , początkowo samodzielnie, a później przy udziale Iwony Brzozowskiej, dla której byłam opiekunem merytorycznym przy realizacji pracy magisterskiej, a następnie promotorem pomocniczym przy doktorskiej.

Na podstawie analiz struktury krystalicznej kompleksu  $\epsilon_2\zeta_2$  postulowano aktywność trucizny Zeta jako fosfotransferazy, która mogłaby działać podobnie jak enzym esteraza chloramfenikolu. Nie przedstawiono jednak żadnych dowodów eksperymentalnych. W poszukiwaniach mechanizmu działania oraz czynnika specyficznego hamowanego przez toksynę Zeta najbardziej pożądane było znalezienie mutanta niewrażliwego na działanie toksyny. Postanowiliśmy wykorzystać w tym celu przygotowany wcześniej przez mnie szczep *B. subtilis*, w chromosomie którego wbudowałam gen  $\zeta$  o regulowanej ekspresji (fuzja z promotorem ksylozowym). Komórki tego szczepu poddałam działaniu toksyny Zeta i uzyskałam w wielokrotnych eksperymentach kilkaset kolonii komórek przeżywających nadprodukcję trucizny (**Nowakowska et al., 2005**). Analiza sekwencji genu  $\zeta$  ponad stu spośród badanych klonów pokazała, że w większości były to sekwencje o zmienionej ramce odczytu lub zawierające kodon stop. W takich komórkach nie powstawało białko Zeta. Wysoka częstość z jaką powstają takie mutacje świadczy zarówno o sile toksyny Zeta jak i skuteczności mechanizmów obronnych komórki. Jednocześnie unaoczniała trudności w uzyskaniu mutanta niewrażliwego na toksynę Zeta oraz wskazywała na istotność procesu(-ów) zaburzanego przez tę toksynę. (Późniejsze badania oraz odkrycie mechanizmu działania toksyny Zeta potwierdziły, że istotność zaburzanego procesu nie pozwala na uzyskanie żywotnego mutanta opornego). Realizując ten projekt otrzymałam również nieliczne mutanty o zmienionej sekwencji, u których wykrywano metodami immunologicznymi białko Zeta. Jeden z nich (mutacja A248G) wykazywał znacząco obniżoną toksyczność, dzięki czemu mógł posłużyć w innych badaniach jako model aktywnej toksyny (vide Lioy et al., 2006, 2010). Wszystkie mutacje były zlokalizowane w N-terminalnej części genu  $\zeta$ , co pozwoliło nam sformułować tezę, wielokrotnie później potwierdzoną, że to ten fragment białka jest odpowiedzialny za toksyczność.

Wzajemne oddziaływanie białek toksyn z antytoksynami jest warunkiem prawidłowego działania systemów TA typu II. Dowodem takich oddziaływań były analizy *in vitro* struktury krystalograficznej kilku kompleksów białek TA uzyskiwanych poprzez ich nadprodukcję w komórkach *E. coli*, w tym heterotetrameru  $\epsilon_2\zeta_2$ . Dla zbadania interakcji pomiędzy białkami systemu  $\epsilon$ - $\zeta$  *in vivo* wykorzystałam, skonstruowany jeszcze podczas pracy nad doktoratem,

nowatorski wówczas drożdżowy system dwuhybrydowy. W jednoznacznym teście aktywności genu reporterowego pokazałam silne oddziaływanie pomiędzy białkami Epsilon i Zeta. Utworzyliśmy również w tym systemie szereg fuzji badanych białek, skróconych w różnym stopniu zarówno od amino- jak i karboksy- końców i wyznaczyliśmy obszary obu białek istotne we wzajemnych oddziaływaniach. W pełnej zgodności z danymi krystalograficznymi wykazaliśmy, że istotne dla oddziaływań *in vivo* są N-końcowe fragmenty białek. Posiłkując się opracowanym wcześniej biologicznym testem ko-transformacji pokazaliśmy jednocześnie, które regiony białka Zeta są odpowiedzialne za jego toksyczność. Potwierdziliśmy własną tezę istotności N-końcowego fragmentu, jak również niezbędność motywu A Walkera wiążącego ATP, dla toksyczności tego białka. Ponadto, dzięki użyciu konstruktów plazmidowych drożdżowego systemu dwuhybrydowego, mieliśmy wyjątkową możliwość jednoczesnego badania funkcjonowania białek bakteryjnych zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych. W testach żywotności transformantów oraz obserwacjach mikroskopowych stwierdziłam, że toksyna Zeta hamuje podziały komórkowe drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w stopniu zależnym od dawki genu  $\zeta$ . Obserwacje efektów działania toksyny Zeta w drożdżach opublikowane zostały w spójnej pracy (**Zielenkiewicz et al., 2009**) przedstawiającej dodatkowo również wyniki badań z użyciem systemu dwuhybrydowego zawarte w mojej pracy doktorskiej.

Wyniki tych badań, ukazujące istotność i powszechność u mikroorganizmów procesu, na który wpływa toksyna Zeta, przyczyniły się do rozwiązania zagadki mechanizmu jej działania. Mimo wielu podejść eksperymentalnych mechanizm działania toksyny systemu  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  został wyjaśniony dopiero w 2011 roku na podstawie homologicznego systemu PezAT *Streptococcus pneumoniae* (Mutschler et al., 2011). Toksyna Zeta to kinaza bezpośrednio wpływająca na syntezę ściany komórkowej. Fosforylowany przez białko Zeta prekursor peptydoglikanu UNAG (urydyno-dwufosfo-N-acetyloglukozamina) hamuje enzym MurA odpowiedzialny za pierwszy etap syntezy tych związków u bakterii.

System  $\epsilon$ - $\zeta$  plazmidu pSM19035 widziany był początkowo jako specyficzny dla elementów mobilnych z rodziny *inc18* niosących geny odpowiadające za wysoką oporność na powszechnie stosowane antybiotyki z grupy makrolidów. Lawinowe nagromadzenie danych sekwencji genomów mikroorganizmów unaocznilo powszechność występowania tego systemu i jego homologów w licznych szczepach bakteryjnych, a szczególnie bliskich filogenetycznie rodzajów bakterii patogennych należących do Firmicutes. Plazmidy rodziny *inc18*, często koniugacyjne lub mobilizowalne, uznawane są za jednostki o szerokim spektrum gospodarza zdolne do replikowania w wielu gatunkach bakterii Gram-dodatnich o niskiej zawartości par G/C w DNA. Mimo licznych badań biologii plazmidów rodziny *inc18*, szczególnie plazmidu pSM19035, niewiele wiadomo było na temat jego stabilnego dziedziczenia w pokrewnych do *S. pyogenes* gatunkach bakterii. Nie badano też funkcjonowania systemu  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  w innych gatunkach bakterii. Wprowadziłyśmy pochodne plazmidu pSM19035 do komórek kilku gatunków bakterii Firmicutes (*Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*) i zbadaliśmy efektywność funkcjonowania systemu  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  w tych szczepach (**Brzozowska et al., 2012**). Określiłyśmy metodą Real-Time PCR



liczbę kopii badanego plazmidu w każdym badanym szczepie. Zaobserwowaliśmy znaczne różnice w funkcjonowaniu systemu pomiędzy badanymi szczepami, bez korelacji z liczbą kopii niosącego ten system plazmidu. Jedynie w przypadku *S. aureus* kasetę  $\epsilon$ - $\zeta$  stabilizuje plazmid tak samo efektywnie, jak w przypadku *S. pyogenes* (gospodarz naturalny pSM19035) czy *B. subtilis* (gospodarz laboratoryjny pSM19035). W szczepach, które nie utrzymywały plazmidu z kasetą stabilizacyjną TA potwierdziliśmy ekspresję genów  $\epsilon$ - $\zeta$  w komórkach.

W genomach bakteryjnych może współwystępować wiele homologicznych lub niehomologicznych systemów TA kodowanych zarówno w chromosomach jak i mobilnych elementach genetycznych. Interesujące zatem wydaje się pytanie, czy możliwe są interakcje pomiędzy różnymi systemami TA oraz jaki może to mieć wpływ na ich ewolucję oraz aktywność. W literaturze opisane zostały bezpośrednie oddziaływania pomiędzy toksyną a antytoksyną niehomologicznych systemów (*mazE-vapC* i *mazEF*, Zhu et al., 2010), ale w wielu przypadkach nie obserwowano interakcji krzyżowych nawet pomiędzy systemami wysoce homologicznymi (Fiebig et al., 2010). W naszych badaniach, homolog chromosomalny białka Epsilon (80% identyczności sekwencji aminokwasowej) wykryto w przypadku szczepu *E. faecalis*. Jego obecność nie wpływa na stabilność plazmidu zawierającego badaną kasetę TA w tym szczepie. Wyniki opublikowane w ***Plasmid*** (2012, 68: 51-60) wskazują na znaczący wpływ specyficznych czynników komórkowych na działanie kasety  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$ , potwierdziły także postulowany szeroki zakres gospodarzy wśród bakterii o niskiej zawartości par G/C w DNA dla plazmidu pSM19035.

Kluczową rolę w funkcjonowaniu systemów TA typu II pełni nietrwałość antytoksyny. W wielu przypadkach C-końcowy fragment lub całe białko antytoksyny nie posiada struktury, co sprawia, że białka te są podatne na działanie ATP-zależnych proteaz komórkowych. Po utworzeniu kompleksu z toksyną, białko antytoksyny przyjmuje uporządkowaną strukturę lub fragmenty białka nieposiadające struktury osłaniane są przez białko toksyny. Dodatkowo, białka antytoksyn są silnie kwasowe, co wraz z ich nieustrukturalizowaniem ułatwia zmiany konformacyjne potrzebne do wiązania z dodatnio naładowanymi toksynami. Przyjmuje się, że niska stabilność termodynamiczna oraz brak konformacji jest wspólną cechą antytoksyn typu II (Yamaguchi et al., 2011).

Większość badań dotyczących degradowania antytoksyn prowadzono *in vivo* dla różnych systemów TA *E. coli*, najczęściej poprzez porównywanie ilości białka antytoksyny w szczepie pozbawionym danej proteazy do jego ilości w szczepie dzikiego typu lub/i poprzez określenie stopnia dziedziczenia plazmidu niosącego dany system w takim szczepie. W degradację antytoksyn bakterii Gram-ujemnych zaangażowana jest zazwyczaj proteaza Lon (np. CcdA, RelB, HipB, Pemi, Kis), rzadziej ClpP w kooperacji z podjednostką ATPazową ClpX (np. Phd) lub ClpA (np. MazE). Znane też są przypadki degradowania białek antytoksyn przez dwie proteazy (np. RelN, DinJ, MazE) w zależności od stanu fizjologicznego komórki i warunków środowiskowych. Jak dotąd, u bakterii Gram(+), jedynie dla systemów Axe1 i 2 oraz MazE<sub>SA</sub> *Staphylococcus aureus* pokazano *in vivo* degradację antytoksyn przez ClpPC. Powyższe informacje wraz ze szczegółowym opisem źródeł a także doświadczeń, które doprowadziły do określenia roli konkretnych proteaz w degradacji białek antytoksyn zostały przedstawione w pracy przeglądowej opublikowanej w

*Plasmid* (Brzowska i Zielenkiewicz, 2013). W pracy tej, specjalny nacisk położono na konsekwencje proteolizy białek antytoksyn systemów TA dla komórki oraz na wpływ czynników środowiskowych na regulację degradacji antytoksyn.

Antytoksyna Epsilon, zgodnie z oczekiwaniem, posiada znacząco krótszy niż neutralizowana przez nią toksyna, okres półtrwania *in vivo* (~18 vs 60 min). Z kolei badania *in vitro* wykazały wyższą stabilność tego białka w obecności mocznika oraz w warunkach niespecyficzej proteolizy w porównaniu do białka toksyny Zeta (Camacho et al., 2002). Jednakże, nie wynika to z braku struktury - odtrutka sfałdowana jest w trójzwojowy pęk z częściowo tylko nieuporządkowanym fragmentem C-końcowym i, w przeciwieństwie do większości antytoksyn, jest termodynamicznie stabilna. Wskazuje to na istnienie procesu degradacji białka Epsilon w komórce przez specyficzną proteazę(y). Antytoksyna Epsilon tworzy z toksyną Zeta nieaktywny trwały kompleks, heterotetramer  $\epsilon_2\zeta_2$ , w którym oba białka nie zmieniają znacząco swoich struktur. Toksyczność białka Zeta zostaje zablokowana poprzez zasłonięcie miejsca wiązania ATP/GTP w obrębie motywu Walkera przez N-końcowy fragment cząsteczki Epsilon. Z kolei znacznie większe monomery  $\zeta$  otaczając dimer  $\epsilon_2$  skutecznie chronią przed dostępem do białka Epsilon.

Przeprowadzone przeze mnie *in vivo* badania dziedziczenia plazmidów w mutantach *B. subtilis*:  $\Delta lonA$ ,  $\Delta clpP$ ,  $\Delta clpX$ ,  $\Delta clpE$ ,  $\Delta clpC$  i  $\Delta codX$  wskazywały, że w degradacji antytoksyny Epsilon bierze udział proteaza ClpP w kooperacji z podjednostką ClpX wiążącą ATP. Z drugiej strony wyniki opublikowane (Lioy et al., 2006) z doświadczeń przeżywalności komórek tych mutantów po zablokowaniu syntezy białek *de novo*, okazały się zarówno niejednoznaczne jak i rozbieżne z uzyskiwanymi w naszej pracowni. Dla wyjaśnienia tych rozbieżności podjęłam prace nad odtworzeniem reakcji degradacji antytoksyny Epsilon w warunkach *in vitro*.

W badaniach zastosowałyśmy oczyszczone białka proteaz Lon i ClpP oraz podjednostki ClpX (*B. subtilis*) a także Epsilon i Zeta. Do tego celu przygotowaliśmy odpowiednie konstrukty umożliwiające nadprodukcję wyżej wymienionych białek jak również białka Spx, substratu dla proteazy ClpX<sub>Bs</sub>P<sub>Bs</sub>.

Na łamach *J Biol Chem* (Brzowska and Zielenkiewicz, 2014) opisałyśmy proces degradacji *in vitro* białka odtrutki Epsilon przez proteazę ClpXP. Pokazałyśmy szybką degradację ( $T_{1/2} \sim 8$ ) białka Epsilon w obecności proteazy ClpX<sub>Bs</sub>P<sub>Bs</sub> i całkowity brak degradacji przez aktywne białko Lon<sub>Bs</sub>. Zgodnie z oczekiwaniem, dodanie białka Zeta bardzo wyraźnie redukowało proces degradacji odtrutki, prawdopodobnie w wyniku utworzenia kompleksu  $\epsilon_2\zeta_2$ , w którym cząsteczki Epsilon są chronione przed dostępem proteazy. Sprawdziłyśmy za pomocą analizy LC/MS (chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas), że proteaza ClpX<sub>Bs</sub>P<sub>Bs</sub> nie wykazuje specyficzności co do aminokwasu czy rozpoznawanej sekwencji w białku Epsilon, a efektem degradacji są krótkie, zachodzące na siebie peptydy. W publikacji tej przedstawiliśmy również wyniki obserwacji *in vivo* stopnia dziedziczenia plazmidów niosących kasetę  $\omega\text{-}\epsilon\text{-}\zeta$  w mutantach pozbawionych poszczególnych proteaz.

Zgromadzona wiedza o funkcjonowaniu systemów TA pozwoliła na praktyczne wykorzystanie właściwości tych systemów. Naturalna funkcja systemów TA związana ze stabilnym



utrzymywaniem mobilnych elementów genetycznych z powodzeniem znalazła zastosowanie w wektorach ekspresyjnych, w których kasety oporności na antybiotyki zastąpione zostały operonem TA do pozytywnej selekcji właściwych transformantów (Tieber et al., 2008), stworzenia systemu do produkcji pojedynczego białka w *E. coli* (Suzuki et al., 2007) czy zapobiegania rozprzestrzenianiu się organizmów genetycznie modyfikowanych używanych w bioremediacji (Pieper and Reineke, 2000). Inne potencjalne wykorzystanie systemów TA związane jest z terapią genową skierowaną przeciwko infekcjom wirusowym (Chono et al., 2011) i komórkom nowotworowym (Cueva-Méndez et al., 2003).

Ze względu na wszechobecność w genomach bakterii patogennych, systemy TA w ostatnim czasie często przywoływane są jako potencjalni kandydaci do opracowania celowanych leków antybakteryjnych, innych niż powszechnie stosowane i coraz mniej skuteczne antybiotyki (Williams i Hergenrother, 2012).

W podsumowaniu, najważniejsze moje osiągnięcia wynikające z badań, w których brałam udział, to:

- (i) wykazanie w badaniach *in vivo* i *in vitro*, że proteazą degradującą antytoksynę Epsilon jest ClpXP,
- (ii) wskazanie na uniwersalność procesu komórkowego, który jest zaburzany działaniem toksyny Zeta poprzez pokazanie hamującego działania toksyny na podziały komórkowe drożdży *Saccharomyces cerevisiae*,
- (iii) uzyskanie mutantu o znacząco obniżonej toksyczności białka Zeta, który posłużył w innych badaniach jako model aktywnej toksyny,
- (iv) potwierdzenie postulowanego dla plazmidu pSM19035 szerokiego zakresu gospodarzy wśród bakterii Gram-dodatnich o niskiej zawartości par G/C w DNA oraz pokazanie różnic w efektywności funkcjonowania systemu  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  w tych szczepach.

Pełna charakterystyka kasety  $\epsilon$ - $\zeta$  oraz powszechność występowania systemów TA tej rodziny pozwalają na wykorzystanie tej kasety jako modelu w poszukiwaniach nowych strategii antybakteryjnych oraz szerzej, w nowatorskich badaniach ukierunkowanych na opracowanie cząsteczek, które zaburzałyby interakcje między białkami lub uniemożliwiałyby tworzenie kompleksów. Badania w tym obszarze stanowią obecnie jeden z wątków moich dociekań naukowych.

#### Literatura:

**Brzozowska I**, Brzozowska K, Zielenkiewicz U (2012) Functioning of the TA cassette of streptococcal plasmid pSM19035 in various Gram-positive bacteria. *Plasmid* 68, 51-60.

**Brzozowska I**, Zielenkiewicz U (2013) Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70, 33-41.

**Brzozowska I**, Zielenkiewicz U (2014) The ClpXP protease is responsible for the degradation of the Epsilon antidote to the Zeta toxin of the streptococcal pSM19035 plasmid. *J.Biol.Chem.* 289, 7514-7523

**Camacho AG**, Misselwitz R, Behlke J, Ayora S, Welfle K, Meinhart A, Lara B, Saenger W, Welfle H, Alonso JC (2002) *In vitro* and *in vivo* stability of the  $\epsilon_2\zeta_2$  protein complex of the broad host-range *Streptococcus pyogenes* pSM19035 addiction system. *Biol. Chem.* 383, 1701-1713.

**Ceglowski P**, Boitsov A, Chai S & Alonso JC (1993) Analysis of the stabilization system of pSM19035-derived plasmid pBT233 in *Bacillus subtilis*. *Gene* 136, 1-12.

- Chono H**, Matsumoto K, Tsuda H, Saito N, Lee K, Kim S, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Yasutomi Y et al. (2011) Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific *E. coli* mRNA interferase. *Hum Gene Ther.* 22, 35-43.
- de la Cruz MA**, Zhao W, Farenc C, Gimenez G, Raoult D, et al. (2013) A Toxin-Antitoxin Module of Salmonella Promotes Virulence in Mice. *PLoS Pathog* 9: e1003827.
- de la Cueva-Méndez G**, Mills AD, Clay-Farrace L, Díaz-Orejas R, Laskey RA (2003) Regulatable killing of eukaryotic cells by the prokaryotic proteins Kid and Kis. *EMBO J.* 22, 246-51.
- de la Hoz AB**, Ayora S, Sitkiewicz I, Fernandez S, Pankiewicz R, Alonso JC, Ceglowski P (2000) Plasmid copy-number control and better than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 728–733.
- Fiebig A**, Castro Rojas CM, Siegal-Gaskins D, Crosson S (2010) Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. *Mol. Microbiol.* 77, 236–251.
- Gerdes K**, Christensen SK, Lobner-Olesen A (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* 3, 371–382.
- Gerdes K**, Gulyaev AP, Franch T, Pedersen K, Mikkelsen ND (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet.* 31, 1–31.
- Goeders N** and Van Melderen L (2014) Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems *Toxins* 6, 304-324.
- Hayes F**, van Melderen L (2011) Toxins-antitoxins: Diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46, 386–408.
- Koyama AH**, Wada C, Nagata T, Yura T (1975) Indirect selection for plasmid mutants: Isolation of ColVBtrp mutants defective in self-maintenance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 122, 73–79.
- Lioy VS**, Martin TM, Camacho AG, Lurz R, Antelmann H, Hecker M, Hitchin E, Ridge Y, Wells JM, Alonso JC (2006) pSM19035-encoded  $\zeta$ -toxin induces stasis followed by death in a subpopulation of cells. *Microbiol.* 152, 2365–2379.
- Lioy VS**, Rey O, Balsa D, Pellicer T, Alonso JC (2010) A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development. *Plasmid* 63, 31-9.
- Maisonneuve E**, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K (2011) Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13206–13211.
- Meinhart A**, Alonso JC, Strater N, Saenger W (2003) Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by  $\epsilon\zeta$  complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1661–1666.
- Mruk I**, Kobayashi I (2013) To be or not to be: Regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic. Acids Res.* 13, 70–86.
- Mutschler H**, Gebhardt M, Shoeman RL, Meinhart A (2011) A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol.* 9, e1001033. doi:10.1371/journal.pbio.1001033.
- Nowakowska B**, Kern-Zdanowicz I, Zielenkiewicz U and Ceglowski P (2005) Characterization of *Bacillus subtilis* clones surviving overproduction of Zeta, a pSM19035 plasmid-encoded toxin. *Acta Biochim Pol* 52, 99-107.
- Pieper DH**, Reineke W (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 11, 262–270.
- Suzuki M**, Mao L, Inouye M (2007) Single protein production (SPP) system in *Escherichia coli*. *Nat Protoc* 2,1802-10; PMID:17641648.
- Tieber D**, Gabant P and Szpirer C (2008) The art of selective killing: plasmid toxin/antitoxin systems and their technological applications. *BioTechniques.* 45, 344-6.
- Wang X**, Lord DM, Cheng H-Y, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V et al. (2012) A new type V Toxin antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat. Chem. Biol.* 8, 858–861.
- Williams JJ**, Hergenrother PJ (2012) Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy. *Trends Microbiol* 20: 291–298.
- Yamaguchi Y**, Inouye M (2011) Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin- antitoxin systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 779–790.
- Yamaguchi Y**, Park JH, Inouye M (2009) MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284, 28746–28753.
- Zhu L**, Sharp JD, Kobayashi H, Woychik NA, Inouye M (2010) Noncognate *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxins can physically and functionally interact. *J. Biol. Chem.* 285, 39732–39738.
- Zielenkiewicz U**, Ceglowski P (2005) The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *J. Bacteriol.* 187, 6094–6105.
- Zielenkiewicz U**, Kowalewska M, Kaczor C, Ceglowski P (2009) *In vivo* interactions between toxin- antitoxin proteins epsilon and zeta of streptococcal plasmid pSM19035 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 191, 3677–3684.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Swoją pracę naukową rozpoczynałam w IBB PAN w Warszawie bezpośrednio po ukończeniu studiów, jako wolontariuszka. Opracowałam wówczas system ekspresji w ekstraktach komórkowych *Bacillus subtilis*. Po roku wyjechałam na 3-letni staż badawczy w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Farmacji Uniwersytetu Autonomicznego w Barcelonie, gdzie zajmowałam się badaniami produkcji polimyksyny u *Serratia marcescens* [Lauferska et al. 1983] oraz fagami *Neisseria meningitidis*.

Po powrocie do kraju rozpoczęłam pracę w IBB PAN w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów pod kierunkiem prof. T. Kłopotowskiego, w zespole badającym wpływ tzw. kontroli ścisłej na regulację ekspresji operonu *dad*. W tym okresie rozpoczęłam studia doktoranckie, które przerwałam w związku z urodzeniem dziecka.

Po kilkuletnim urlopie wychowawczym, powróciłam do pracy w IBB, w Pracowni Sekwencjonowania DNA, gdzie opanowałam ówczesną technikę sekwencjonowania (Sanger) oraz metody izolacji RNA [Gromadka et al. 1996]. W roku 1996 dołączyłam do grupy dr Piotra Cegłowskiego i zainteresowałam się elementami genetycznymi warunkującymi trwałe dziedziczenie cząsteczek plazmidowych w komórkach bakterii skupiając się na szczegółowej charakterystyce funkcjonowania systemu  $\epsilon$ - $\zeta$  plazmidu pSM19035 z *Streptococcus pyogenes*.

Po przedwczesnej śmierci mojego mentora w 2004 roku, samodzielnie kontynuowałam badania w tej dziedzinie podejmując się jednocześnie obowiązków organizacyjno-administracyjnych dotyczących funkcjonowania zespołu badawczego i realizacji zadań podjętych przez dr hab. P. Cegłowskiego. W krótkim czasie wyodrębniłam też własną nową tematykę badawczą z zakresu metagenomiki i bioróżnorodności mikrobiologicznej różnych środowisk z wykorzystaniem szybko rozwijających się technik sekwencjonowania nowej generacji, zdobywając na ten cel finansowanie w stosownych konkursach. W opublikowanych pracach scharakteryzowałam społeczność mikroorganizmów różnych biofilmów: naskalnego z kopalni w Żłotym Stoku [5], granularnego z bioreaktora produkującego wodór [9], osadu metanogenego [2]. W trakcie tych badań opracowałam również metodę selekcji unikalnych fragmentów z puli klonów z użyciem techniki MSSCP [8].

Zainteresowałam się również szczepami izolowanymi z badanych przeze mnie środowisk; stworzyłam kolekcję (przechowywaną w COLIBB) kilkuset izolatów z różnych środowisk, w tym skażonych metalami ciężkimi i/lub niebezpiecznymi. Wybrane szczepy są badane pod kątem cech fizjologicznych, a ich sekwencje DNA analizowane i deponowane w publicznych bazach danych [10, 4].

Obecnie jestem kierowniczką wyodrębnionego tematu statutowego w IBB PAN, w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów. Byłam opiekunem kilkunastu obronionych prac magisterskich i dwóch doktorskich. Obie prace doktorskie wykonane pod moją opieką merytoryczną zostały wyróżnione przez recenzentów i Radę Naukową IBB.

Prowadzę również badania metagenomiczne we współpracy z innymi jednostkami naukowymi (UW, SGGW, KUL, Muzeum Pałacu w Wilanowie).

**5.1. Sumaryczny impact factor: IF 41,708**

**5.2. Liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science: 181 bez autocytowań:164**

**5.3. Indeks Hirscha wg bazy Web of Science: 7**

**5.4. Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora (podano wszystkie), łączny IF 37,556**  
**IF podano dla roku wydania publikacji, a w przypadku najnowszych prac dla roku poprzedniego.**

Zgodnie z Oświadczeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie naruszania zasad dobrej praktyki naukowej przy stosowaniu bibliometrycznego wskaźnika impactfactor do oceny dorobku jednostek naukowych z 11.07.2008, przy wydawnictwach konferencyjnych pominięto IF czasopisma.

1. Chojnacka A., Szczęsny P., Błaszczuk M.K., **Zielenkiewicz U.**, Detman A., Salamon A. and Sikora A. (2015) Noteworthy Facts about a Methane-Producing Microbial Community Processing Acidic Effluent from Sugar Beet Molasses Fermentation. *PLOS ONE* 10.1371/journal.pone.0128008. **IF 3,534**
2. Tomczyk-Żak K., **Zielenkiewicz U.** (2015) Microbial diversity in caves. *Geomicrobiol. J.* DOI 10.1080/01490451.2014.1003341. **IF 1,860**
3. Brzozowska I. and **Zielenkiewicz U.** (2014) The ClpXP protease is responsible for the degradation of the Epsilon antidote to the Zeta toxin of the streptococcal pSM19035 plasmid. *J.Biol.Chem.*, 289:7514-7523. **IF 4,651**
4. Chlebicki A., **Zielenkiewicz U.**, Wilczek A. M. (2014) Fungi are not involved in biofilm formation on rock wall in subterranean arsenic mine in Poland. *Nova Hedwigia*, 99: 255-269. **IF 0,989**
5. Tomczyk-Żak K., Kaczanowski S., Drewniak Ł., Dmoch Ł., Skłodowska A., **Zielenkiewicz U.** (2013) Bacteria diversity and arsenic mobilization in rock biofilm from an ancient gold and arsenic mine. *SciTotEnv*, 461-462:330-340. **IF 3,258**
6. Brzozowska I. and **Zielenkiewicz U.** (2013) Regulation of toxin-antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70: 33-41. **IF 1,760**
7. Brzozowska I., Brzozowska K., **Zielenkiewicz U.** (2012) Functioning of the TA cassette of streptococcal plasmid pSM19035 in various Gram-positive bacteria. *Plasmid* 68: 51-60. **IF 1,516**
8. Tomczyk-Żak K., Kaczanowski S., Górecka M. and **Zielenkiewicz U.** (2012) Novel application of the MSSCP method in biodiversity studies. *J.Bas.Microb.*, 52: 104-109. **IF 1,266**
9. Chojnacka A., Błaszczuk M.K., Szczęsny P., Nowak K., Sumińska M., Tomczyk-Żak K., **Zielenkiewicz U.**, Sikora A. (2011) Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Bioresource Technology* 102 (21):10057-10064. **IF 4,980**
10. Sikora A., Wójtowicz-Sieńko J., Pielą P., **Zielenkiewicz U.**, Tomczyk-Żak K., Chojnacka A., Sikora R., Kowalczyk P., Grzesiuk E. and Błaszczuk M. (2011) Selection of bacteria capable of dissimilatory reduction of Fe(III) from a long-term continuous culture on molasses and their use in a microbial fuel cell. *J. Microbiol. and Biotech.*, 21(3):305-316. **IF 1,381**

11. **Zielenkiewicz U.**, Kowalewska M., Kaczor C. and **Cegłowski P.** (2009) In Vivo Interactions between Toxin-Antitoxin Proteins Epsilon and Zeta of Streptococcal Plasmid pSM19035 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 191: 3677-3684. **IF 3,940**
12. Cwalina B., Pacholewska M., Sozanska M., **Zielenkiewicz U.** (2007) Microenvironments determining some acidophilic bacterial growth in near neutral zinc/lead flotation tailings. *J Biotechnol*, 131 (S), 263-265. **IF 2,565**
13. **Zielenkiewicz U.** and **Cegłowski P.** (2005) The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *J. Bacteriol.*, 187: 6094–6105. **IF 3,993**
14. Nowakowska B., Kern-Zdanowicz I., **Zielenkiewicz U.** and **Cegłowski P.** (2005) Characterization of *Bacillus subtilis* clones surviving overproduction of Zeta, a pSM19035 plasmid-encoded toxin. *Acta Biochim Pol*, 52: 99-107. **IF 1,863**

#### 5.5. Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora (podano wszystkie), łączny **IF 4,152**

**Zielenkiewicz U.** and **Cegłowski P.** (2001) Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochim Pol*, 48: 1003-1023. **IF 0,832**

**Zielenkiewicz U.**, Sitkiewicz S., Kern-Zdanowicz I., **Cegłowski P.** (2000) Activity of a post-segregational killing system of the plasmid pSM9035 in *B. subtilis* cells. *Plasmid*, 45: 156.

Sitkiewicz S., **Zielenkiewicz U.**, Pankiewicz R., Kern I., Alonso J.C. & **Cegłowski P.** (1999) Characterization of the region involved in a better-than-random segregation of streptococcal plasmid pSM19035. *Plasmid*, 41: 161–162.

Gromadka R., Góra M., **Zielenkiewicz U.**, Słonimski P. and Rytka J. (1996) Subtelomeric duplications in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes III and XI: topology, arrangements, corrections of sequence and strain-specific polymorphism. *Yeast*, 12 (6):583-591. **IF 2,809**

**Lauferska U.**, Viñas M., Lorén JG., Guinea J. (1983) Enhancement by polymyxin B of proline-induced prodigiosin biosynthesis in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Microbiologica*, 6 (2):155-62. **IF 0,511**

#### 5.6. Rozdziały w książkach

1. Gerdes K., Aroya S., Canosa I., Ceglowski P., Diaz-Orejas R., Franch T., Gulyaev A.P., Bugge Jensen R., Kobayashi I., Macpherson C., Summers D., Thomas C.M. & **Zielenkiewicz U.** (2000) A novel proteic plasmid stabilization system from Gram-positive bacteria. in *The Horizontal Gene Pool. Bacterial Plasmids and Gene Spread*. (Thomas, C.M., ed) pp. 66–67 Harwood Academic Publishers
2. A. Sikora, M. Błaszczuk, M. Jurkowski and **U. Zielenkiewicz** (2012) Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence? in *LACTIC ACID BACTERIA R & D for Food, Health & Livestock Purposes*: Editor Dr. J. Marcelino Kongo (ISBN) 980-953-307-278-9

#### 5.7. Otrzymane nagrody i wyróżnienia

Nie dotyczy



**5.8. Krótkie staże badawcze i kursy**

staż naukowy, 1982-1984 Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia,  
Universidad Autónoma de Barcelona, Hiszpania

**5.9. Projekty badawcze**

**2011- 2014 NCBiR -SP/J/3/143045/11** – „*Podstawy zabezpieczenia potrzeb paliwowych polskiej energetyki jądrowej*”, konsorcjum naukowe, koordynator: UW  
Strategiczny projekt badawczy: "Technologie wspomagające rozwój bezpiecznej energetyki jądrowej" IBB PAN, kierowniczka wydziałowego zadania

**2009-2011 MNiSW-NN302293836** – „*Analiza metagenomiczna zespołu bakterii prowadzących fermentacje wodorowe w hodowli ciągłej na substratach odpadowych oraz ilościowe i jakościowe oznaczenia końcowych niegazowych produktów fermentacji*”,  
Projekt badawczy własny, kierowniczka projektu

**2007-2010 PBZ-MNiSW-04/I/2007** – „*Ruchome elementy genetyczne bakterii- analiza molekularna i wykorzystanie do konstrukcji narzędzi dla przemysłu biotechnologicznego*”,  
Projekt badawczy zamawiany, IBB PAN, kierowniczka wydziałowego zadania

**2006-2008 KBN-PBZ-111/T09/2004** – „*Utylizacja odpadów przemysłu mineralnego z zastosowaniem metod biotechnologicznych oraz stworzenie banku mikroorganizmów potencjalnie użytecznych w biometalurgii*”, sieć naukowa  
Projekt badawczy zamawiany, IBB PAN, kierowniczka wydziałowego zadania

**2013-2015 NCBiR-PBS1/B9/9/2012** – „*Alternatywna mikrobiologiczna metoda produkcji wodoru i metanu na drodze fermentacji (skala ułamkowa)*”,  
badawczo-rozwojowy, IBB PAN, główny wykonawca

**2015-2018 UMO-2014/13/B/NZ8/04719** – „*Ewolucyjne podejście do badania genomów*”  
badawczy, IBB PAN, główny wykonawca

**2014-2015 NCN/D/NZ9/02482/2013** – „*Metagenomy glebowe wskaźnikiem degradacji bioróżnorodności mikroorganizmów w glebach użytkowanych rolniczo na Lubelszczyźnie*”, badawczy, główny wykonawca

**2002-2004 KBN-6P04B00820** – „*System trucizna-odtrutka plazmidu pSM19035: analiza molekularna i potencjalne zastosowania.*” badawczy, IBB PAN, wykonawca

**2000-2005** Program Ramowy Unii Europejskiej, IBB PAN, wykonawca

**5.10. Zaproszone wykłady, wygłoszone seminaria, ustne prezentacje na konferencjach.**

*Biofilms- the state of the art*, Politechnika Warszawska, Wydział Chemii, Biotechnologia, 2011

*Molekularne metody określania różnorodności mikrobiologicznej*, Akademia Sztuk Pięknych w Warszawie, Wydział Konserwacji i Restauracji Dzieł Sztuki, 2010

**5.11. Inna działalność naukowa**

Recenzje artykułów dla: Water Research, FEMS Microbiology Letters, Science of the Total Environment, Journal of Molecular Medicine, International Research Journal of Microbiology, Turkish Journal of Microbiology, PlosOne, Acta Biochimica Polonica.



Recenzje projektów dla: KBN, Naukowej Fundacji Polpharmy, U.S. ARO Federal Assistance, NCN (Juventus Plus).

#### 5.12. Artykuły popularnonaukowe

1. **Zielenkiewicz U.** (2012) Społeczne życie bakterii. Biofilm – systemowe życie zbiorowe mikroorganizmów.  
Magazyn Polskiej Akademii Nauk ACADEMIA No.1 (29)
2. **Zielenkiewicz U.**, Dmowski M. (2009) Epsilon kontra Zeta.  
Magazyn Polskiej Akademii Nauk ACADEMIA No.1 (17)
3. **Zielenkiewicz U.**, Cegłowski P. (2002) Mechanizmy stabilnego dziedziczenia plazmidów.  
Kosmos 256:297-304
4. Chlebicki A., **Zielenkiewicz U.** (2012) Grzyby mikroskopijne występujące w bakteryjnym biofilmie ze Sztolni Gertrudy (Złoty Stok). Przyroda Sudetów t.11 43-56
5. **Lauferska U.** (1984) Las bacterias: El pequeño mundo a tu alcance. SUDETES  
w serii TL edebé - 53; Edebé Barcelona

#### 5.13. Działalność dydaktyczna

- **Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej** mgr Iwony Brzozowskiej pt. „Charakterystyka funkcjonalna działania systemu toksyna-antytoksyna plazmidu pSM19035”.  
Promotor: prof. dr hab. J. Bardowski; obrona wrzesień 2014
- **Opiekun naukowy rozprawy doktorskiej** mgr Karoliny Tomczyk-Żak pt. „Analiza metagenomiczna konsorcjum bakterii oraz właściwości fizyko-chemiczne biofilmu naskalnego z kopalni złota Złoty Stok”.  
Promotor: prof. dr hab. J. Bardowski; obrona marzec 2012
- **Opiekun naukowy 8 prac magisterskich studentów SGGW:** K. Brzozowska, 2004; M. Górecka, 2008; I. Brzozowska, 2008; K. Kryśkiewicz, 2010; M. Lorenz, 2012; M. Jurkowski, 2013; M. Cymer, 2014; A. Szczepaniak, 2014.

Wykłady i ćwiczenia z genetyki molekularnej dla studentów Zakładu Biofizyki UW (1998-2007)

#### 5.14. Zgłoszenie patentowe

Nie dotyczy