

# **AUTOREFERAT**

**Dr n. biol. Anna Henriques dos Santos de Sepulveda**



**Zakład Biofizyki, Fizjologii i Patofizjologii**

**Wydział Nauk o Zdrowiu**

**Warszawski Uniwersytet Medyczny**

### **1. Imię i nazwisko**

Anna Henriques dos Santos de Sepulveda (nazwisko panięskie: Grabowska)

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

**2010** stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii molekularnej  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Tytuł rozprawy doktorskiej:

“Sieć oddziaływań białek szlaku utleniania Dsb w komórkach *Campylobacter jejuni*”

Promotor przewodu doktorskiego:

Prof. dr hab. n. biol. E. Katarzyna Jagusztyn-Krynicka

Recenzenci rozprawy doktorskiej:

Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

(Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański),

Prof. dr hab. Jacek Bielecki

(Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

**2006** dyplom magistra psychologii (specjalizacja: Psychofizjologia)  
Wydział Psychologii, Uniwersytet Warszawski

**2005** dyplom magistra biologii (specjalizacja: Biologia Molekularna)  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

**2003** dyplom licencjata biologii (specjalizacja: Biotechnologia)  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

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

**2019-obecnie** adiunkt badawczo-dydaktyczny, Zakład Biofizyki, Fizjologii i Patofizjologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

**2015-2019** podoktorski pracownik naukowy (ang. *post-doctoral research fellow*)  
London School of Hygiene and Tropical Medicine (Londyńska Szkoła Higieny i Medycyny Tropikalnej, LSHTM), Londyn, Wielka Brytania

**2011-2015** podoktorski pracownik naukowy (fr. *chercheuse post-doctorale*), Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (Instytut Farmakologii i Biologii Strukturalnej, IPBS), Tuluza, Francja

**2013** wizytujący pracownik naukowy (ang. *visiting research fellow*), Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska

**2010-2011** specjalista w programie MOSAR, Narodowy Instytut Leków (NIL),  
Warszawa, Polska

- 2005-2010** doktorant indywidualnego programu Studium Medycyny Molekularnej (SMM), działającego przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym; projekt naukowy realizowany w Zakładzie Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska
- 2000-2006** student indywidualnego programu studiów w ramach Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych (MISMaP) Uniwersytetu Warszawskiego; równoległe studia na dwóch kierunkach, ukończone uzyskaniem dyplomów magistra biologii i magistra psychologii, Wydział Biologii i Wydział Psychologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.**

Wykształcenie i doświadczenie naukowo-dydaktyczne zdobyte w kraju na najlepszych polskich uczelniach (studia magisterskie w Uniwersytecie Warszawskim i studia doktoranckie w Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego) umożliwiły mój dalszy rozwój w renomowanych placówkach zagranicznych (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale w Tuluzie, we Francji i London School of Hygiene and Tropical Medicine w Londynie, w Wielkiej Brytanii).

**Na mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych w 2010r. składa się 14 publikacji o skumulowanym współczynniku oddziaływania IF 69,500 i łącznej liczbie 970 punktów MEiN**, w tym 11 prac oryginalnych, z których 10 opublikowanych zostało w czasopismach posiadających współczynnik IF (sumaryczny IF 54,935, razem 860 punktów MEiN), 2 prace poglądowe (sumaryczny IF 14,565, 110 punktów MEiN), 1 list do redakcji (IF 9,754), a także 14 wystąpień ustnych i plakatowych na zjazdach międzynarodowych i krajowych: 7 wystąpień ustnych (w 4 z nich byłam osobą prezentującą), w tym 1 streszczenie w pełnej wersji zawarte w formie drukowanej i 7 plakatowych (w 5 z nich byłam pierwszym autorem).

**Liczba cytowań moich prac wynosi 212 według bazy Scopus i 196 według bazy Web of Science, a z wyłączeniem autocytowań: 205 według bazy Scopus i 192 według bazy Web of Science.**

**Indeks Hirscha dla moich publikacji wynosi 9 według bazy Scopus i 8 według bazy Web of Science.**

**Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 221 ust.14 ustawy z dnia 20 lipca 2018r.**

Moje osiągnięcie naukowe, stanowiące cykl habilitacyjny powiązanych tematycznie prac, dotyczy czynników wirulencji bakterii patogenicznej, prątka gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*, stanowiącego do dnia dzisiejszego jeden z najbardziej zjadliwych czynników chorobotwórczych ludzkości. Gruźlica należy do najgroźniejszych ludzkich chorób infekcyjnych, którym towarzyszy największa śmiertelność na świecie. Każdego roku wskutek gruźlicy umiera 1.5 miliona ludzi (WHO 2020). W 2019 roku liczba przypadków gruźlicy u ludzi przekroczyła 10 milionów (WHO 2020), a szacuje się, że około 25% populacji (1.7 miliarda ludzi) jest bezobjawowo zainfekowanych prątkami i stanowi rezerwuuar dalszego rozprzestrzeniania się zakażenia *M. tuberculosis* (Houben et al. 2016).

Zwalczanie zakażenia prątkiem gruźlicy napotyka na znaczne trudności w związku z nabywaną przez tę bakterię opornością na stosowane powszechnie w terapii antybiotyki, jak również na ich ograniczone działanie, wynikające z wyjątkowych cech *M. tuberculosis*. Jedną z nich jest unikalna struktura osłon komórkowych, bogatych w specyficzne dla bakterii tego rodzaju lipidy, utrudniające penetrację antybiotyków do wnętrza komórek (Daffe 2015). Specyficzna budowa osłon komórkowych utrudnia ekspozycję antygenów bakteryjnych i ich rozpoznawanie przez skierowane przeciwko nim przeciwciała. Wyzwanie dla terapii stanowi również skomplikowany cykl życiowy *M. tuberculosis*, na który składać się może tzw. stan uśpienia (spowolnienia metabolizmu), odpowiedzialny za mogący trwać wiele lat okres bezobjawowej infekcji, poprzedzający zazwyczaj stan aktywacji procesów życiowych patogenu, związany z rozwojem choroby.

Podstawowy obszar badawczy prezentowanego przeze mnie osiągnięcia cyklu habilitacyjnego stanowi charakterystyka mechanizmów warunkujących skuteczną wirulencję prątków

gruźlicy ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnego zastosowania tych mechanizmów w profilaktyce i terapii zakażeń gruźliczych.

**Prezentowany cykl habilitacyjny składa się z 4 publikacji o skumulowanym współczynniku oddziaływania IF 26,433 i łącznej punktacji 340 MEiN**, w tym 3 prac oryginalnych, opublikowanych w czasopismach posiadających współczynnik IF (sumaryczny IF 15,286, razem 300 punktów MEiN) oraz 1 pracy poglądowej (IF 11,147, 40 punktów MEiN).

**a. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Wiodący temat moich badań od momentu uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych w 2010r. stanowiły procesy metaboliczne prątków gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis*, warunkujące skuteczną wirulencję tej bakterii wobec człowieka. Prowadzone przez mnie eksperymenty dążyły do charakterystyki wybranych mechanizmów, które mają potencjał aplikacyjny i mogą zostać wykorzystane w terapii.

Moim osiągnięciem naukowym jest spójny cykl publikacji zatytułowany: **Regulacja procesów metabolicznych mykobakterii warunkujących ich wirulencję i stanowiących potencjalny cel ukierunkowanej terapii.**

**b. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe oraz omówienie celu naukowego**

Poniżej wyszczególnione prace, zgłaszane do postępowania habilitacyjnego, składają się na tematyczny cykl 4 publikacji, które powstały po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk biologicznych w 2010r.

**Skumulowany współczynnik oddziaływania dla tych prac wynosi IF 26,433.**

**Łączna liczba punktów MEiN dla tych prac wynosi 340.**

**b1. Grabowska AD, Andreu N, Cortes T. Translation of a Leaderless Reporter Is Robust During Exponential Growth and Well Sustained During Stress Conditions in *Mycobacterium tuberculosis*. Frontiers in Microbiology. 2021;12(746320):1-14. (IF 5,640; 100 punktów MEiN)**

Artykuł ten dotyczy mechanizmów translacji, podstawowego procesu wyrażania genów pro- i eukariotycznych, oraz porównania efektywności wariantów tego procesu w komórkach prątka gruźlicy, *Mycobacterium tuberculosis*, w optymalnych warunkach wzrostu i w warunkach stresu, panujących w organizmie ludzkim podczas infekcji.

Cykl życiowy *M. tuberculosis* jest bardzo skomplikowany i opiera się na autoregulacji metabolizmu komórkowego. Spowolnienie podstawowych procesów życiowych pozwala tej bakterii przetrwać w stanie uśpienia (ang. *persistence*), nie wywołując objawów u zakażonej osoby nawet przez wiele lat (Bentrup et al. 2001). Rozwój choroby poprzedza aktywacja procesów życiowych patogenu. Podczas pełnego cyklu życiowego mykobakterie muszą się przystosować do zmiennych warunków zewnętrznych i do różnych potencjalnych czynników stresowych, takich jak ograniczony dostęp składników odżywczych lub/i tlenu, czy też ekspozycja na reaktywne związki tlenu i azotu w komórkach gospodarza, głównie makrofagach pęcherzykowych (Forrellad et al. 2013). Niezwykła odporność prątków gruźlicy na warunki stresowe jest powiązana ze spowolnieniem kluczowych procesów komórkowych, takich jak transkrypcja i translacja (Ehrt et al. 2018). U bakterii, jak i u organizmów eukariotycznych, biologiczna adaptacja na drodze regulacji translacji wiąże się z modyfikacją składu cząsteczkowego rybosomów (Xue et al. 2012; Byrgazov et al. 2013). Te zmiany mogą odpowiadać za selektywną translację różnych typów transkryptów mRNA. U bakterii struktura kanonicznego transkryptu oprócz sekwencji kodującej obejmuje również region 5' UTR (ang. *untranslated region*), nie podlegający translacji, a zawierający ważne sekwencje regulatorowe, tak jak sekwencja Shine-Dalgarno. Kanoniczna translacja transkryptów inicjowana jest przez wiązanie sekwencji Shine-Dalgarno do komplementarnego regionu 16S rybosomowego RNA w małej podjednostce rybosomu, 30S (Shine et al. 1974). Poza kanonicznymi transkryptami istnieją również takie, które nie posiadają regionu 5' UTR, a w konsekwencji pozbawione są sekwencji Shine-Dalgarno niezbędnej do inicjacji translacji. Nazwano je transkryptami bezliderowymi (ang. *leaderless*) (Zheng et al. 2011; Nakagawa et al. 2017). Brak sekwencji Shine-Dalgarno ma ważne implikacje dla inicjacji translacji bezliderowych mRNA, która jest możliwa, gdy rybosom 70S wiąże się bezpośrednio do kodonu inicjatorowego AUG w mRNA (Udagawa et al. 2004). W komórkach modelowej bakterii *Escherichia coli*, wydajność translacji bezliderowych transkryptów jest znacznie niższa od translacji kanonicznych mRNA (Beck et al. 2016). Zależność ta może być odwrócona poprzez działanie antybiotyków lub wskutek aktywacji wewnętrznych systemów toksyna-antytoksyna, co prowadzi do generowania subpopulacji wyspecjalizowanych rybosomów, dokonujących selektywnej translacji transkryptów bezliderowych (Kaberina et al. 2009; Vesper et al. 2011). Dotychczasowe badania nad prątkami gruźlicy wykazały, że w przybliżeniu 25% ich transkryptów jest bezlid-

erowych (Cortes et al. 2013; Shell et al. 2015), odsetek istotnie wyższy niż odnotowany u innych bakteryjnych patogenów (1.2–3%) (Sharma et al. 2010; Kröger et al. 2012; Seo et al. 2012; Thomason et al. 2015). W modelowym organizmie *Mycobacterium smegmatis*, który ma podobnie wysoki odsetek transkryptów bezliderowych co *M. tuberculosis*, odnotowano porównywalną skuteczność ich translacji do transkryptów kanonicznych (Shell et al. 2015; Nguyen et al. 2020). To zasugerowało nam, że inaczej niż u *E. coli* i wielu bakteryjnych patogenów, centralną rolę w regulacji fizjologii mykobakterii może odgrywać właśnie translacja bezliderowa. Dogłębne analizy transkryptomocne wykazały, że w komórkach *M. tuberculosis* bezliderowe transkrypty kodują w znacznej mierze białka o funkcjach adaptacyjnych, takie jak systemy toksyna-antytoksyna, a stosunek wydajności translacji bezliderowej do kanonicznej rośnie w modelu zatrzymania wzrostu (ang. *growth arrest*) wskutek ograniczenia składników pokarmowych (Cortes et al. 2013), odpowiadającemu warunkom panującym podczas aktywnej formy gruźlicy. Te obserwacje pozwoliły wysunąć hipotezę o odmiennym charakterze regulacji translacji różnych typów transkryptów (bezliderowych vs kanonicznych) w warunkach stresów napotykanym podczas infekcji człowieka. Jak dotąd taka zależność nie była badana.

Celem powyższej pracy było określenie roli translacji bezliderowej w odpowiedzi *M. tuberculosis* na różnego rodzaju warunki stresowe *in vitro*, jak i podczas infekcji. W tym celu zaplanowałam i skonstruowałam bioluminescentne szczepy reporterowe *M. tuberculosis*, kodujące gen lucyferazy wyrażany jako transkrypt bezliderowy lub kanoniczny i określiłam zmiany wydajności translacji tych dwóch typów transkryptów w różnych warunkach wzrostu zewnątrzkomórkowego oraz podczas infekcji makrofagów. Pomiary luminescencji szczepów reporterowych podczas wzrostu wykładniczego w warunkach optymalnych i niewykładniczego w warunkach stresowych, tj. ograniczenia dostępności składników odżywczych, ekspozycji na działanie reaktywnych form azotu (tlenku azotu, NO) i infekcji makrofagów, wykazały, że bezliderowa translacja *M. tuberculosis* jest bardziej odporna niż translacja kanoniczna na zmiany warunków wzrostu i działanie czynników stresowych, analogicznych dla warunków istniejących podczas infekcji organizmu ludzkiego. Wyniki moich badań potwierdziły, że bezliderowa translacja stanowi korzyść adaptacyjną w fizjologii *M. tuberculosis* w porównaniu z kanoniczną translacją, zwłaszcza podczas adaptacji do zmieniających się warunków panujących podczas infekcji.

Mój wkład w powstanie tej pracy, zgodnie z deklaracją zawartą w sekcji ‘Author Contributions’, polegał na stworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wygenerowaniu bakteryjnych szczepów reporterowych, które posłużyły do badań, zaproponowaniu, zaprojektowaniu i sa-modzielnym przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, analizie i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz napisaniu manuskryptu.

**b2. Sawyer E, Grabowska AD, Cortes T. Translational regulation in mycobacteria and its implications for pathogenicity. Nucleic Acids Research. 2018;46(14):6950-6961. (IF 11,147; 40 punktów MEiN)**

Ta praca pogładowa stanowi zestawienie i omówienie dostępnej literatury dotyczącej elementów komórkowych odpowiedzialnych za biosyntezę białek mykobakteryjnych, mechanizmów regulacji translacji u mykobakterii i jej znaczenia dla wirulencji.

Translacja, czyli synteza polipeptydowych łańcuchów białkowych, jest podstawowym procesem życiowym wyrażania genów wszelkich komórek i organizmów, służącym przeżyciu i namnażaniu/replikacji. Jak dotąd przeprowadzone zostały liczne badania genetyczne i biochemiczne mechanizmów translacji i jej regulacji w modelowej bakterii *Escherichia coli*, nieliczne są natomiast prace charakteryzujące ten proces u innych mikroorganizmów, np. u wolno replikujących się bakterii takich jak prątek gruźlicy. W tej pracy skupiliśmy się na analizie istotnych różnic maszyneryi translacyjnej *M. tuberculosis* i modelowego mikroorganizmu *E. coli*, zwracając szczególną uwagę na obecność dwóch dodatkowych białek i elementów stabilizujących podjednostki rybosomu, np. mostka B9. Rozważaliśmy rolę translacji bezliderowej w warunkowaniu zdolności *M. tuberculosis* do wejścia w stan uśpienia metabolicznego i wywołania infekcji bezobjawowej (tzw. latentnej). Omówiliśmy dowody eksperymentalne na udział mechanizmów regulacji translacji mykobakterii w ich adaptacji do zmieniających się warunków otoczenia, zwłaszcza warunków stresowych, związanych z infekcją gospodarza ludzkiego. Skupiliśmy się na różnicach pomiędzy systemami toksyna-antytoksyna w komórkach *M. tuberculosis* i *E. coli* oraz na roli regulacji bezbłędnej translacji w nabywaniu oporności fenotypowej na antybiotyki. Ostatecznie dyskutowaliśmy implikacje różnic w regulacji translacji pomiędzy kanonicznymi a bezliderowymi transkryptami w kontekście biologicznej adaptacji *M. tuberculosis* i rozważaliśmy, w jaki sposób te mechanizmy regulatorowe mogłyby zostać wykorzystane do rozwoju nowoczesnych metod zwalczania



gruźlicy. Ta praca pogładowa powstała równolegle z moimi badaniami nad regulacją translacji i jej adaptacyjną rolą w cyklu życiowym prątków gruźlicy *M. tuberculosis* i stanowiła znaczące wsparcie koncepcyjne i interpretacyjne pracy eksperymentalnej (wyniki zamieszczone zostały w pracy opisanej w podpunkcie 4b1).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji artykułu, studiowaniu literatury, konstruktywnej dyskusji i pisaniu manuskryptu.

**b3. Grabowska AD**, Brison Y, Maveyraud L, Gavalda S, Faille A, Nahoum V, Bon C, Guilhot C, Pedelacq J, Chalut C, Mourey L. Molecular Basis for Extender Unit Specificity of Mycobacterial Polyketide Synthases. *ACS Chemical Biology*. 2020;15(12):3206-3216. **(IF 5,100; 100 punktów MEiN)**

Artykuł ten dotyczy molekularnych podstaw specyficzności i selektywności mykobakteryjnych enzymów, syntaz poliketydów, warunkujących wyjątkową strukturę osłon komórkowych tych mikroorganizmów.

*Mycobacterium tuberculosis*, podobnie jak pozostałe mykobakterie patogenne, wykształcił szeroką gamę unikalnych cech warunkujących wirulencję i promujących przeżywanie wewnątrz organizmu gospodarza ludzkiego. Jedną z takich cech jest specyficzna budowa osłon komórkowych o wysokiej zawartości lipidów (Daffe 2015). Wiele składników osłon komórek mykobakteryjnych, m.in. kwasy mykolowe, dimykocerosaty ftiocerolu (ang. *phthiocerol dimycocerosates*) i glikolipidy fenolowe, stanowią poliketydy, wtórne metabolity syntetyzowane przez bardzo zróżnicowaną grupę wielomodułowych enzymów. Syntazy poliketydów (PKS, ang. *polyketide synthases*) składają się z wielu podjednostek katalitycznych, spośród których kluczową rolę dla wyboru i transferu substratu wymaganego do wydłużania łańcucha poliketydowego pełni domena acylotransferazy. W prezentowanej pracy rozwiązaliśmy trzy nowe, nieznane dotąd struktury krystaliczne domeny acylotransferazy mykobakteryjnych PKS i wykonaliśmy szczegółowe eksperymenty biochemiczne, które pozwoliły zidentyfikować reszty aminokwasowe determinujące specyficzność tej domeny względem podjednostek substratu. Odkrycie molekularnego podłoża specyficzności i selektywności tych ważnych megaenzymów ma nie tylko znaczenie podstawowe dla rozwoju nauki, ale i ogromne znaczenie praktyczne, zważywszy że rodzaj podjednostki substratu włączanej do łańcucha poliketydu determinuje strukturę i właściwości ostatecznego produktu, stanow-

iącego kluczowy komponent komórek mykobakterii. Ta praca stanowi znaczący wkład w rozwój badań aplikacyjnych nad mykobakteryjnymi syntazami poliketydów i wykorzystania ich w terapii. Opublikowane wyniki przyczyniły się do uaktualnienia algorytmów przewidywania specyficzności substratowej nieznanymi dotąd PKS i bioinżynierii tej klasy enzymów o pożądanej specyficzności, np. do produkcji antybiotyków, leków obniżających ciśnienie lub poziom cholesterolu we krwi, środków przeciwgrzybiczych, przeciw pasożytniczych, czy nawet antynowotworowych.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, zaplanowaniu i konstrukcji bakteryjnych szczepów, które posłużyły do przeprowadzenia eksperymentów, zapewnieniu dodatkowego finansowania (grant Agence Nationale de la Recherche, francuskiej Narodowej Agencji Nauki, ANR), zaprojektowaniu i wykonaniu eksperymentów genetycznych i biochemicznych, analizie i interpretacji wyników, na sformułowaniu wniosków oraz napisaniu manuskryptu.

**b4.** Ariyachaokun K, **Grabowska A\***, Gutierrez C, Neyrolles O. Multi-Stress Induction of the Mycobacterium tuberculosis MbcTA Bactericidal Toxin-Antitoxin System. *Toxins*. 2020;12(5):1-14. (IF 4,546; 100 punktów MEiN)

\* równorzędny pierwszy autor

Artykuł ten dotyczy charakterystyki systemu toksyna-antytoksyna (TA) MbcTA i identyfikacji czynników pobudzających aktywność tego systemu w komórkach prątka gruźlicy.

Bakteryjne systemy toksyna-antytoksyna służą regulacji przechodzenia ze stanu aktywnego metabolicznie w stan uśpienia komórek w odpowiedzi na niekorzystne lub gwałtownie zmieniające się warunki zewnętrzne, np. obniżenie lub brak dostępności substancji odżywczych, obecność związków toksycznych, aktywacja mechanizmów odpornościowych gospodarza, itp. (Harms et al. 2018). W naszych badaniach skupiliśmy się na systemie toksyna-antytoksyna typu II, MbcTA *Mycobacterium tuberculosis*. Toksyna MbcT wywołuje śmierć komórek mykobakteryjnych, zarówno w warunkach hodowli *in vitro*, jak i infekcji *in vivo* na drodze fosforolizy niezbędnego do przeżycia metabolitu NAD<sup>+</sup>. Bakteriobójcza aktywność toksyny może być neutralizowana przez jej bezpośrednie oddziaływanie z odpowiednią antytoksyną, MbcA. Dla zbadania regulacji ekspresji operonu *mbcAT* pod wpływem zmieniających się czynników zewnętrznych skonstruowaliśmy nowatorski dwuelementowy układ re-

porterowy. Wykorzystaliśmy integracyjny plasmid mykobakteryjny kodujący konstytutywnie wyrażany reporter, stanowiący wewnętrzny odnośnik dla monitorowania ekspresji genów mykobakteryjnych i dodatkowy reporter indukowany, którego ekspresja zależała ściśle od promotora badanego systemu TA. Jako reportery zastosowaliśmy białka fluorescencyjne, wyrażane zarówno w komórkach mykobakterii modelowych *Mycobacterium smegmatis*, jak i mykobakterii patogennych, prątków gruźlicy *M. tuberculosis*. Pozwoliło nam to na odkrycie zjawiska autoregulacji w ekspresji operonu *mbcAT*, na przeprowadzenie precyzyjnych badań promotora operonu *mbcA*, a także na scharakteryzowanie regulacji transkrypcji operonu *mbcAT* zależnej od promotora *PmbcA* w rozmaitych warunkach stresowych, odpowiadających infekcji organizmu ludzkiego, włączając w to badania nad infekcją makrofagów i infekcją myszy *in vivo*. Rezultaty naszych badań stworzyły podstawy wykorzystania systemu MbcTA w nowoczesnych metodach terapii gruźlicy i innych chorób infekcyjnych. Dalsze badania nad czynnikami indukującymi toksyny i identyfikacja związków mogących przeciwdziałać lub destabilizować antytoksyny doprowadzą do wykorzystania wewnętrznych elementów kodowanych przez genom *M. tuberculosis* i innych patogenów bakteryjnych do ich eliminacji z zakażonego organizmu ludzi.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji projektu, zapewnieniu finansowania projektu z dwuletniego grantu (francuskiej Fondation pour la Recherche Medicale, Fundacji Nauk Medycznych, FRM), opracowaniu metod, przeprowadzeniu eksperymentów genetycznych, mikrobiologicznych, biochemicznych i komórkowych (konstrukcja plazmidów i szczepów bakteryjnych *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, mutageneza specyficzna genu toksyny i antytoksyny systemu MbcTA, testy przeżywalności szczepów *M. smegmatis*, testy czynników stresowych aktywujących system MbcTA, izolacja i hodowla komórek eukariotycznych, eksperymenty infekcji makrofagów ludzkich i mysich szczepami *M. tuberculosis*), analizie i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu i edytowaniu manuskryptu.

Prowadzone przeze mnie badania nad systemami toksyna-antytoksyna *M. tuberculosis* doprowadziły do opublikowania jeszcze jednej pracy (wymienionej poniżej), której nie włączyłam jednak do cyklu habilitacyjnego, ponieważ stanowiła badania trójosrodkowe i jestem jej czwartym autorem.

**b5.** Freire D, Gutierrez C, Garza-Garcia A, **Grabowska A**, Sala A, Ariyachaokun K, Panikova T, Beckham K, Colom A, Pogenberg V, Cianci M, Tuukkanen A, Boudehen Y, Peixoto A, Botella L, Svergun D, Schnappinger D, Schneider T, Genevoux P, de Carvalho L, Wilmanns M, Parret A, Neyrolles O. **An NAD<sup>+</sup> Phosphorylase Toxin Triggers Mycobacterium tuberculosis Cell Death.** *Molecular cell.* 2019;73(6):1282-1291. (IF 15,584; 200 punktów MEiN)

Ta praca stanowi dogłębną charakterystykę nieopisaną dotąd toksyny prątka gruźlicy, *Mycobacterium tuberculosis*, wzbogaconą o odkrycie komórkowego mechanizmu jej działania i o potwierdzenie jej działania bakteriobójczego.

Bakteryjne systemy toksyna-antytoksyna (TA) regulują fundamentalne procesy komórkowe i stanowią potencjalny cel terapeutyczny dla nowoczesnych metod zwalczania chorób infekcyjnych (Harms et al. 2018; Równicki et al. 2020). Genom *M. tuberculosis* koduje wyjątkowo wysoką liczbę, ponad 80 systemów TA, które regulują skomplikowany cykl życiowy tego patogenu (Sala et al. 2014; Slayden et al. 2018). Nasze badania doprowadziły do odkrycia i scharakteryzowania nieznanego dotąd systemu TA RES-Xre działającego w komórkach *M. tuberculosis*. Toksyna tego systemu, MbcT, ma działanie bakteriobójcze, które może być zneutralizowane przez odpowiednią antytoksynę MbcA. Dla zgłębienia komórkowego mechanizmu działania toksyny MbcT zastosowaliśmy kombinację metod mikrobiologicznych, biochemicznych i strukturalnych. Rozwiązanie struktury krystalicznej kompleksu MbcTA na poziomie rozdzielczości 1.8 Å pozwoliło odkryć podobieństwo toksyny MbcT do wydzielanych przez bakterie egzotoksyn zależnych od NAD<sup>+</sup>, np. toksyny błonicy. Badania, które przeprowadziliśmy w modelu *in vitro* i *in vivo*, dostarczyły dowodów na to, że toksyna MbcT ma dotychczas nieznaną i nieopisaną wśród toksyn aktywność fosforylasy NAD<sup>+</sup>, a katalizowany przez nią efekt bakteriobójczy stymulowany jest obecnością nieorganicznych fosforanów. W dalszych eksperymentach udokumentowaliśmy synergistyczny efekt protekcyjny aktywności tej toksyny przy równoczesnym zastosowaniu antybiotyków w terapii myszy zainfekowanych prątkami *M. tuberculosis*. Zaobserwowaliśmy, że wobec zablokowania lub obniżenia aktywności antytoksyny MbcA, toksyna MbcT powoduje szybką śmierć komórek *M. tuberculosis*, co przyczynia się do wzrostu przeżycia zainfekowanych myszy. Odkrycie przez nas nowej aktywności, nieopisaną dotąd dla bakteryjnych wewnętrznych toksyn należących do systemów TA, zainicjowało badania nad niez-

naną dotychczas klasą enzymów fosforylaz o potencjale aplikacyjnym dla kontroli i zwalczania gruźlicy, a także innych chorób infekcyjnych.

Mój wkład w powstanie tej pracy, zgodnie z deklaracją zawartą w sekcji ‘Author Contributions’, polegał na zaprojektowaniu badań, opracowaniu metod i przeprowadzeniu części eksperymentów (metody genetyczne: konstrukcja szczepów bakteryjnych, poszukiwanie czynników stresowych aktywujących system MbcTA oraz metody biologii komórkowej: infekcja makrofagów), analizie i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków i konsultacji w procesie pisania manuskryptu.

### **c. Zwięzłe omówienie celu naukowego**

Wiodący temat moich badań stanowiły procesy metaboliczne prątków gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis* warunkujące skuteczną wirulencję wobec człowieka. Prowadzone przez mnie eksperymenty miały na celu charakterystykę tych mechanizmów, które mają potencjał aplikacyjny i mogą zostać wykorzystane jako cel ukierunkowanej terapii. Zarówno badania nad alternatywnymi mechanizmami translacji w wyrażaniu genów mykobakterii chorobotwórczych, badania nad systemami toksyna-antytoksyna, jak i badania nad syntetazami mykobakteryjnymi poliketydów stwarzają możliwości aplikacyjne. Zablokowanie mechanizmu alternatywnej translacji bezliderowej, powiązanej z adaptacją metabolizmu prątków gruźlicy do niekorzystnych warunków panujących w organizmie infekowanego gospodarza ludzkiego, stanowi innowacyjny sposób atakowania i eliminacji patogenu w stanie uśpienia, niewrażliwego na działanie wielu antybiotyków. Systemy toksyna-antytoksyna mają potencjał wzmacniania antybiotykoterapii poprzez zintegrowane działania destabilizujące równowagę mykobakteryjnych systemów toksyna-antytoksyna, prowadzące do osłabienia komórek patogenu od wewnątrz. Z kolei bioinżynieria mykobakteryjnych i innych syntaz poliketydów może doprowadzić do powstania tych enzymów o pożądanej specyficzności, np. do produkcji antybiotyków, leków obniżających ciśnienie, czy antynowotworowych.

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

Zarówno podczas studiów licencyjnych, magisterskich oraz doktoranckich, jak i od momentu uzyskaniu stopnia doktora (2010 r.) do chwili obecnej prowadzę intensywną działalność naukową. Po ukończeniu realizacji projektu doktorskiego na Uniwersytecie Warszawskim podjęłam pracę w Narodowym Instytucie Leków, a następnie odbyłam dwa czteroletnie staże podoktorskie w prestiżowych zagranicznych ośrodkach naukowych w London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM) w Wielkiej Brytanii i w Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) we Francji. Pracując w tych instytucjach zapewniłam finansowanie projektów naukowych ze środków międzynarodowych (granty francuskiej Fondation pour la Recherche Medicale (FRM) i Agence Nationale de la Recherche (ANR)), jak również realizowałam projekty badawcze rozpoczęte w jednostkach mojego zatrudnienia (grant europejski European Research Centre (ERC)). Poza prowadzeniem badań w projektach własnych lub jako wykonawca projektów, stale rozwijałam swoją wiedzę i umiejętności w formie bezpłatnych praktyk lub płatnych stażów zawodowych, a także kursów, na które uzyskałam finansowanie w ramach realizowanych grantów lub stypendiów (np. stypendium FEMS).

- 2016-2017**    jednodniowe kursy wewnętrzne: Proces Rekrutacji i Selekcji, Zarządzanie Czasem, Skuteczne Mentorstwo, Prowadzenie Prac Dyplomowych  
London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), Londyn, Wielka Brytania
- 2017**       tygodniowy kurs ‘Sekwencjonowanie Nowej Generacji: przygotowanie bibliotek cDNA’, finansowany z grantu ERC, który realizowałam w latach 2015-2019 w London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM)  
EMBL (Europejskie Laboratorium Biologii Molekularnej), Heidelberg, Niemcy
- 2008**       trzymiesięczny staż w Laboratorium UMR MD-1, finansowany przez stypendium naukowe FEMS (Federacja Europejskich Towarzystw Mikrobiologicznych)  
Université de la Méditerranée, Marsylia, Francja
- 2005-2008**   praca na umowę zlecenie nad projektami badawczymi  
GfK Polonia sp. z o.o., Warszawa, Polska

- 2005** dwumiesięczne praktyki płatne  
GfK Polonia sp. z o.o., Warszawa, Polska
- 2005** miesięczny staż zawodowy  
Instytut Matki i Dziecka (IMiD), Warszawa, Polska
- 2004** miesięczny staż zawodowy  
Instytut Żywności i Żywienia (IŻŻ), Warszawa, Polska
- 2003/2004** semestr studiów i pięciomiesięczny staż w laboratorium w ramach programu wymiany międzynarodowej Socrates-Erasmus  
Uniwersytet Alcalá de Henares, Madryt, Hiszpania
- 2003** miesięczny staż zawodowy  
Narodowy Instytut Leków (NIL), Warszawa, Polska

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

Od momentu uzyskania stopnia doktora (2010 r.) do chwili obecnej kontynuuję działalność dydaktyczną i popularyzatorską, którą rozpoczęłam podczas studiów doktoranckich (w latach 2005-2009). Prowadziłam zajęcia grupowe i staże indywidualne dla studentów polskich i zagranicznych. Aktualnie oprócz przedmiotów obowiązkowych prowadzę zajęcia fakultatywne.

### **6.1. Działalność dydaktyczna**

Od początku studiów doktoranckich (2005 r.) włączyłam się w prowadzenie zajęć dydaktycznych w ramach przedmiotów kursowych dla studentów III roku studiów licencjackich i I roku uzupełniających studiów magisterskich oraz opieki merytorycznej prac licencjackich i magisterskich na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Od momentu uzyskania stopnia doktora (2010 r.) do chwili obecnej kontynuuję działalność dydaktyczną; w latach 2010-2019, odbywając staże podoktorskie we Francji i w Wielkiej Brytanii, objęłam opieką merytoryczną 11 prac magisterskich i 5 prac licencjackich oraz liczne staże z Biologii Molekularnej, Mikrobiologii Molekularnej, Biochemii i Biologii Komórkowej, a od roku 2019r., kiedy podjęłam zatrudnienie na etacie adiunkta badawczo-dydaktycznego w Zakładzie Biofizyki i Fizjologii Człowieka (obecnie Zakład Biofizyki, Fizjologii i Patofizjologii) w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, prowadzę zajęcia dydaktyczne z Biofizyki, Fizjologii i Patofizjologii dla studentów Wydziału Lekarskiego i Wydziału Nauk o Zdrowiu.

- 2019-obecnie** **wykłady, seminaria i ćwiczenia:** ‘Biofizyka’ dla Wydziału Lekarskiego, ‘Fizjologia’ i ‘Patofizjologia’ dla Kierunku Położnictwa, ‘Fizjologia z elementami Biofizyki’ dla Kierunku Pielęgniarstwa i Ratownictwa Medycznego, ‘Nauka o Człowieku’ dla Kierunku Zdrowia Publicznego  
Wydział Lekarski i Wydział Nauk o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska
- 2015-2019** **opieka merytoryczna** nad 3 magistrantami Mikrobiologii Medycznej (3-miesięczne staże) oraz 3 studentami wizytującymi (miesięczne staże z Biologii Molekularnej i/lub Komórkowej)  
London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), Londyn, Wielka Brytania
- 2011-2015** **opieka merytoryczna** nad 4 magistrantami (2-miesięczne staże z Mikrobiologii Molekularnej/Biochemii i z Biologii Komórkowej)  
Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Tuluza, Francja
- 2010** **opieka merytoryczna** nad 3 magistrantami (miesięczne staże z Mikrobiologii Molekularnej)  
Narodowy Instytut Leków (NIL), Warszawa, Polska
- 2006-2009** **opieka merytoryczna** nad 4 magistrantami (2-letnie staże), 1 magistrantem i 5 licencjantami (staże roczne) z Genetyki Bakterii  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski (UW), Polska
- 2006-2009** **zajęcia praktyczne (ćwiczenia):** Molekularne Podstawy Bakteryjnej Patogenezy (analizy *in silico*, klonowanie molekularne, RT-PCR, mutageneza insercyjna i punktowa, enzymatyka, produkcja i oczyszczanie białek heterologicznych, otrzymywanie specyficznych przeciwciał poliklonalnych)  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski (UW), Polska
- 2006-2009** **wykłady w ramach Warszawskiego Festiwalu Nauki:** Molekularne Podstawy Bakteryjnej Patogenezy, Antybiotyki i Antybiotykooporność, Markery stosowane w badaniach molekularnych  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski (UW), Polska
- 2006-2009** **warsztaty w ramach Warszawskiego Festiwalu Nauki:** Nowoczesne metody stosowane w badaniach molekularnych  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski (UW), Polska



## 6.2. Działalność popularyzatorska

### 6.2.1. Wystąpienia ustne

W ostatnich latach zostałam wyselekcjonowana do wygłoszenia wystąpień ustnych na trzech konferencjach międzynarodowych: FEMS Congress w 2019r., ESM Conference w 2019r. oraz PSN Conference w 2018r. i na jednej zagranicznej konferencji krajowej, TB Centre Retreat w 2017r. Ponadto wyniki moich badań były trzykrotnie prezentowane w postaci ustnych wystąpień przez mojego bezpośredniego przełożonego na dwóch zjazdach międzynarodowych (Keystone Conference: Tuberculosis w 2018r. i ASM Conference w 2017r.) oraz przez koleżankę z grupy na jednym zagranicznym zjeździe krajowym, Translation UK meeting w 2017r. Poniżej przedstawiam szczegóły wystąpień ustnych. (**#autor prezentujący**)

1. **Grabowska AD**#, Sawyer E, Cortes T. Translation 'specialisation' underlies the adaptation of human pathogen Mycobacterium tuberculosis. 8<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Microbiological Societies, FEMS 2019. Glasgow, Wielka Brytania.
2. **Grabowska AD**#, Sawyer E, Cortes T. Adaptation through diversity: differential regulation of leaderless versus canonical translation in Mycobacterium tuberculosis. Congress of the European Society of Mycobacteriology, ESM 2019. Walencja, Hiszpania.
3. **Grabowska AD**#. Translational regulation contributes to biological adaptation in the human pathogen Mycobacterium tuberculosis. Polish Scientific Networks Conference, PSN 2018. Łódź, Polska.
4. Freire, DM, Gutierrez C, Garza-Garcia A, **Grabowska AD**, Sala A, Nukdee K, Panikova T, Beckham KSH, Pogenberg V, Cianci M, Botella L, Schnappinger D, Schneider T, Genevaux P, de Carvalho LPS, Wilmanns M, Parret AHA, Neyrolles O#. A unique NAD(+) phosphorylase toxin mediates bacterial suicide in Mycobacterium tuberculosis. Keystone Conference: Tuberculosis: Translating Scientific Findings for Clinical and Public Health Impact (X7). 2018. Whistler, Kolumbia Brytyjska, Kanada.
5. Freire D, Gutierrez C, **Grabowska AD**, Sala A, Schnappinger D, Genevaux P, Wilmanns M, Parret AH, Neyrolles O#. Exploitation of a novel Mycobacterium tuberculosis cidal toxin for the development of new medicines against tuberculosis. ASM Conference on Tuberculosis: Past, Present and Future. 2017. Nowy Jork, NY, USA.

6. **Grabowska AD<sup>#</sup>**, Cortes T. Translation regulation in the adaptive response of *Mycobacterium tuberculosis*. TB Centre Retreat. 2017. Watford, Wielka Brytania.
7. **Sawyer E<sup>#</sup>**, **Grabowska AD**, Cortes T. Investigation into the role and mechanism of leaderless translation in mycobacteria. Translation UK meeting. 2017. Nottingham, Wielka Brytania.

### 6.2.2. Plakaty

Wielokrotnie prezentowałam wyniki moich badań w formie plakatów na dziesięciu konferencjach międzynarodowych, jednej zagranicznej konferencji lokalnej i jednej konferencji krajowej. Siedem z tych konferencji miało miejsce od momentu otrzymania przez mnie stopnia doktora nauk biologicznych (w 2010r.). Poniżej przedstawiam szczegóły prezentacji plakatowych w porządku chronologicznym. (**#autor prezentujący**)

1. Sawyer E, **Grabowska AD**, Cortes T. Isolation of RNCs as a strategy to characterise ribosomal heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis*. The Royal Society Meeting. Changing Views of Translation: from ribosome profiling to high resolution imaging of single molecules in vivo. 2018. Chicheley Hall, Milton Keynes, Wielka Brytania.
2. **Grabowska AD**, Faulkner V, Andreu N, Cortes T. Evaluation of selective translation in mycobacteria using reporter strains. EMBO Conference: Tuberculosis 2016. Paryż, Francja.
3. **Grabowska AD**, Wösten MMSM, Łasica A, Radomska K, Godlewska R, Jagusztyn-Krynicka EK. Relevance of Dsb system for protein activity: a case of alkaline phosphatase PhoX from *Campylobacter jejuni*. XVII<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, CHRO 2013. Aberdeen, Wielka Brytania.
4. **Grabowska AD**, Brison Y, Faille A, Gavalda S, Pedelacq JD, Mourey L, Guilhot C, Chalut C. Unraveling the determinants of polyketide synthases (PKS) substrate specificity. 38<sup>th</sup> Congress of Federation of European Biochemical Societies, FEBS 2013. Sankt Petersburg, Rosja.
5. **Grabowska AD**, Brison Y, Faille A, Bergeret F, Gavalda S, Nahoum V, Bon C, Pedelacq JD, Mourey L, Guilhot C, Chalut C. Deciphering of the molecular programming of polyketide synthases (PKS) of pathogenic mycobacteria – determinants of the PKS substrate specificity. 22<sup>nd</sup> Congress of International Union of Biochemistry and Molecular

Biology & 37<sup>th</sup> Congress of Federation of European Biochemical Societies, IUBMB & FEBS 2012. Sewilla, Hiszpania.

6. **Grabowska AD**, Malinowska A, Łasica A, Godlewska R, Dadlez M, Jagusztyn-Krynicka EK. Substrates and potential auxiliary proteins of the *Campylobacter jejuni* disulfide bond system (Dsb). XVI<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, CHRO 2011. Vancouver, Kanada.
7. Baraniak A\*, **Grabowska A\***, Izdebski R\*, Fiett J, Herda M, Bojarska A, Żabicka D, Młynarczyk G, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Early stage of dissemination of KPC-producing Enterobacteriaceae in Poland (2008/2009). 21<sup>st</sup> European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases & 27<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy, ECCMID & ICC 2011. Mediolan, Włochy. (\*równorzędni pierwsi autorzy)
8. Roszczenko P, **Grabowska A**, Wandel M, Przanowski P, Pawłowski M, Bujnicki JM, Jagusztyn-Krynicka EK. Analysis of the protein complex formed by *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* DsbI membrane oxidoreductase – searching for DsbI partners. XV<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, CHRO 2009. Niigata, Japonia.
9. **Grabowska AD**, Staroń A, Radomska K, Wösten MM, Jagusztyn-Krynicka EK. Insights into *Campylobacter* DsbAs-DsbBs cooperation. XV<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, CHRO 2009. Niigata, Japonia.
10. **Grabowska AD**, Łasica AM, Łaniewski P, Nesteruk M, Pawłowski M, Bujnicki JM, Jagusztyn-Krynicka, EK. Relation between sequence, structure and function of the *Campylobacter jejuni* DsbI oxidoreductase. 33<sup>rd</sup> Congress of Federation of European Biochemical Societies & 11<sup>th</sup> Congress of International Union of Biochemistry and Molecular Biology, FEBS & IUBMB, 2008. Ateny, Grecja.
11. Roszczenko P, **Grabowska A**, Pawłowski M, Bujnicki JM, Jagusztyn-Krynicka EK. Relation between structure and function of the *Helicobacter pylori* DsbI oxidoreductase. 8<sup>th</sup> International Meeting on Molecular and Epidemiological Markers, IMMEM 2008. Zakopane, Polska.

- 12.** Łaniewski P, Raczko A, **Grabowska A**, Jagusztyn-Krynicka EK. Campylobacter jejuni Dsb protein activity influences the cellular level of Ggt. 2<sup>ga</sup> Polsko-ukraińska konferencja Weiglowska. Mikrobiologia XXI wieku. 2007. Warszawa, Polska.
- 13.** **Grabowska AD**, Łasica AM, Jagusztyn-Krynicka EK. The dba and dsbI translational coupling is necessary for Campylobacter jejuni DsbI oxidoreductase synthesis. XIV<sup>th</sup> International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, CHRO 2007. Rotterdam, Holandia.

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

Podczas studiów doktoranckich (lata 2005-2009), jak i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (2010 r.), uczestniczyłam w realizacji i kierowałam grantami naukowymi, zarówno krajowymi, jak i międzynarodowymi. Nawiązałam bogatą współpracę krajową i międzynarodową. Otrzymałam również znaczące nagrody i wyróżnienia. Poniżej wymieniam najważniejsze z nich.

**7.1. Realizowane granty i projekty naukowe**

- 2015-2019** Projekt finansowany przez European Research Council (Europejską Radę Naukową, ERC): ‘Translation regulation in the persistence and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*’ (60 miesięcy; wykonawca projektu)
- 2013-2015** Grant finansowany przez francuską Fondation pour la Recherche Medicale (Fundację Nauk Medycznych, FRM): ‘Evolutionary portrait of a pathogen: horizontal gene transfer and genomic reprogramming in *Mycobacterium tuberculosis*.’ (24 miesiące; kierownik i główny wykonawca projektu)
- 2011-2012** Grant finansowany przez francuską Agence Nationale de la Recherche (Narodową Agencję Nauki, ANR): ‘Deciphering the molecular programming of polyketide synthases from pathogenic mycobacteria’ (24 miesiące; wykonawca projektu)
- 2010-2011** Europejski Zintegrowany Projekt MOSAR (ang. ‘Mastering hOSpital Acquired Resistance’) koordynowany przez francuski Inserm (Narodowy Instytut Zdrowia i Badań Naukowych), wspierany przez

- Europejską Komisję Szóstego Programu Ramowego ‘Mastering hospital antimicrobial resistance and its spread into the community’ (15 miesięcy; wykonawca projektu)
- 2008-2010** Grant doktorski Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego ‘Charakterystyka transkrypcyjna i translacyjna genów *dsb* fałdowania oksydacyjnego w komórkach *Campylobacter jejuni*’ (18 miesięcy; kierownik i jedyny wykonawca projektu)
- 2008** Grant wewnętrzny Uniwersytetu Warszawskiego ‘Rozwiązanie struktury białka DsbI *Campylobacter jejuni* – przygotowanie preparatu do badań krystalograficznych’ (12 miesięcy; kierownik i główny wykonawca projektu)
- 2006-2009** Grant finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ‘Charakterystyka funkcji i oddziaływań białek Dsb Epsilonproteobakterii (*Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *Helicobacter pylori*)’ (36 miesięcy; wykonawca projektu)

## 7.2. Nagrody i wyróżnienia

- 2016** **Stypendium FEMS** (ang. Federation of European Microbiological Societies) na uczestnictwo w zjeździe 'EMBO Conference: Tuberculosis 2016'. Paryż, Francja
- 2012** **1-sza Nagroda Naukowa PTM** (Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów) **im. Prof. Mikulaszka** za pracę eksperymentalną młodego naukowca w dziedzinie mikrobiologii/bakteriologii i biochemii
- 2012** **Stypendium IUBMB/FEBS/SEBBM** (ang. International Union of Biochemistry and Molecular Biology/Federation of European Biochemical Societies/Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology) na uczestnictwo w zjeździe '22<sup>nd</sup> IUBMB & 37<sup>th</sup> FEBS Congress'. Sewilla, Hiszpania
- 2009** **Mazowieckie Stypendium Doktoranckie** za całokształt prowadzonych badań w ramach doktoratu i uczestnictwo w międzynarodowych konferencjach naukowych
- 2009** **Nagroda YSA** (ang. Young Scientist Award) za najlepszą prezentację naukową w formie plakatu podczas zjazdu ‘XV<sup>th</sup> International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (CHRO)’. Niigata, Japonia
- 2008** **Stypendium PTM** (Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów) na uczestnictwo w zjeździe w Szczecinie

- 2008 Stypendium FEMS** (ang. Federation of European Microbiological Societies) na odbycie 3-miesięcznego stażu w laboratorium UMR MD-1 kierowanym przez Prof. Jean-Marie Pagès (Université de la Méditerranée, Marsylia, Francja) podczas realizacji projektu doktorskiego
- 2005 Nagroda Ministra Edukacji Narodowej i Sportu** za całokształt osiągnięć naukowych podczas studiów realizowanych w trybie indywidualnym (MISMaP) na Uniwersytecie Warszawskim

### 7.3. Współpraca krajowa i międzynarodowa

- Laboratorium Metabolizmu Mykobakterii i Badania Antybiotyków, Francis Crick Institute, Londyn, Wielka Brytania (Dr L. P. S. de Carvalho, A. Garza-Garcia): badania metabolomiczne;
- Laboratorium Oddziaływań Gospodarz-Patogen w Gruźlicy, Francis Crick Institute, Londyn, Wielka Brytania (Dr M. Gutierrez, Dr A. Prashar): optymalizacja infekcji komórek THP-1 i RAW;
- Europejskie Laboratorium Biologii Molekularnej (EMBL), Hamburg, Niemcy (Prof. M. Willmanns, Dr A. Parret, Dr V. Pogenberg, D. Freire): badania strukturalne;
- Grupa Biofizyki Strukturalnej, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (Instytut Farmakologii i Biologii Strukturalnej, IPBS), Tuluza, Francja (Dr L. Mourey, Dr J. D. Pedelacq, Dr Y. Brison, A. Faille): badania krystalograficzne;
- Grupa Jądrowego Rezonansu Magnetycznego (RMN) i Interakcji Białek Błonowych, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (Instytut Farmakologii i Biologii Strukturalnej, IPBS), Tuluza, Francja (Dr P. Demange): nadprodukcja białek;
- Grupa Otoczki Mykobakteryjnej, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (Instytut Farmakologii i Biologii Strukturalnej, IPBS), Tuluza, Francja (Dr. M. Daffé): optymalizacja testów wiązania substratu, analiza komponent lipidowych;
- Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białek, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej (IIMCB), Warszawa, Polska (Prof. J. M. Bujnicki, Dr M. Pawłowski, Dr E. Wywiół, Ł. Kozłowski, M. Magnus): analizy *in silico*;
- Środowiskowe Laboratorium Spektroskopii Mas, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk (IBB PAN), Warszawa, Polska (Prof. M. Dadlez, Dr A. Malinowska): analiza białkowych frakcji peryplazmatycznych;
- Uniwersytet w Utrechcie, Utrecht, Holandia (Prof. J. van Putten, Dr M. M. Wösten): testy enzymatyczne;
- Université de la Méditerranée (Uniwersytet Śródziemnomorski), Marsylia, Francja (Dr J. M. Pagès, Dr J. M. Bolla): konstrukcja szczepów produkujących His-tagowane białka.

## Cytowana literatura

- Beck H, Fleming I, Janssen, G. 5'-Terminal AUGs in *Escherichia coli* mRNAs with Shine-Dalgarno sequences: identification and analysis of their roles in non-canonical translation initiation. *PLoS One*. 2016;11:e0160144. doi: 10.1371/journal.pone.0160144.
- Bentrup K, Russell D. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol*. 2001;9:597-605. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02238-7.
- Byrgazov K, Vesper O, Moll I. Ribosome heterogeneity: another level of complexity in bacterial translation regulation. *Curr. Opin. Microbiol*. 2013;16:133-139. doi: 10.1016/j.mib.2013.01.009.
- Cortes T, Schubert O, Rose G, Arnvig K, Comas I, Aebersold R, Young D. Genome-wide mapping of transcriptional start sites Defines an extensive leaderless transcriptome in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep*. 2013;5:1121-1131. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.031.
- Daffe M. The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis (Oxford, U. K.)*. 2015;95(1):S155-S158. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.024.
- Ehrt S, Schnappinger D, Rhee K. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Rev. Microbiol*. 2018;16:496-507. doi: 10.1038/s41579-018-0013-4.
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I, Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H. R., Santangelo, M. de la P, Cataldi A, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013;4:3-66. doi: 10.4161/viru.22329.
- Harms A, Brodersen D, Mitarai N, Gerdes K. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. *Mol. Cell*. 2018;70:768-784. doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.003.
- Houben R, Dodd P. The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. *PLoS Med*. 2016;13:e1002152. doi: 10.1371/journal.pmed.1002152.
- Kaberina A, Szaflarski W, Nierhaus K, Moll I. An unexpected type of ribosomes induced by kasugamycin: a look into ancestral times of protein synthesis? *Mol. Cell* 2009;33:227-236. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.014.
- Kröger C, Dillon S, Cameron A, Papenfort K, Sivasankaran S, Hokamp K, Chao Y, Sittka A, Hébrard M, Händler K, Colgan A, Leekitcharoenphon P, Langridge G, Lohan A, Loftus B, Lucchini S, Ussery D, Dorman C, Thomson N, Vogel J, Hinton J. The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012;109:E1277-E1286. doi: 10.1073/pnas.1201061109.
- Nakagawa S, Niimura Y, Gojobori T. Comparative genomic analysis of translation initiation mechanisms for genes lacking the Shine–Dalgarno sequence in prokaryotes. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:3922-3931. doi: 10.1093/nar/gkx124.
- Nguyen T, Vargas-Blanco D, Roberts L, Shell S. The impact of leadered and leaderless gene structures on translation efficiency, transcript stability, and predicted transcription rates in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol*. 2020;202:e00746-19. doi: 10.1128/JB.00746-19.
- Równicki M, Lasek R, Tryska J, Bartosik D. Targeting Type II Toxin-Antitoxin Systems as Antibacterial Strategies. *Toxins (Basel)*. 2020;12(9):568. doi: 10.3390/toxins12090568.

- Sala A, Bordes P, Genevaux P. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins* 2014;6:1002-1020. doi: 10.3390/toxins6031002.
- Seo J, Hong J, Kim D, Cho B, Huang T, Tsai S, Palsson B, Charusanti P. Multiple-omic data analysis of *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 reveals its transcriptional architecture and regulatory features. *BMC Genomics* 2012;13:679. doi: 10.1186/1471-2164-13-679.
- Sharma C, Hoffmann S, Darfeuille F, Reignier J, Findeiß S, Sittka A, Chabas S, Reiche K, Hackermüller J, Reinhardt R, Stadler P, Vogel J. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 2010;464(7286):250-255. doi: 10.1038/nature08756.
- Shell S, Wang J, Lapierre P, Mir M, Chase M, Pyle M, Gawande R, Ahmad R, Sarracino D, Ioerger T, Fortune S, Derbyshire K, Wade J, Gray T. Leaderless transcripts and small proteins are common features of the Mycobacterial Translational landscape. *PLoS Genet.* 2015;11(11):e1005641. doi: 10.1371/journal.pgen.1005641.
- Shine J, Dalgarno L. The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1974;71:1342-1346. doi: 10.1073/pnas.71.4.1342.
- Slayden R, Dawson C, Cummings J. Toxin-antitoxin systems and regulatory mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathog. Dis.* 2018;76:fty039. doi: 10.1093/femspd/fty039.
- Thomason M, Bischler T, Eisenbart S, Förstner K, Zhang A, Herbig A, Nieselt K, Sharma C, Storz G. Global transcriptional start site mapping using differential RNA sequencing reveals novel antisense RNAs in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2015;197(1):18-28. doi: 10.1128/JB.02096-14
- Udagawa T, Shimizu Y, Ueda T. Evidence for the translation initiation of leaderless mRNAs by the intact 70 S ribosome without its dissociation into subunits in eubacteria. *J. Biol. Chem.* 2004;279:8539-8546. doi: 10.1074/jbc.M308784200
- Vesper O, Amitai S, Belitsky M, Byrgazov K, Kaberdina A, Engelberg-Kulka H, Moll I. Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell* 2011;147(1):147-157. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.047
- WHO. Global Tuberculosis Report 2020. Geneva: World Health Organization.
- Xue S, Barna M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13:355-369. doi: 10.1038/nrm3359
- Zheng X, Hu G-Q, She Z-S, Zhu H. Leaderless genes in bacteria: clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *BMC Genomics* 2011;12:361. doi: 10.1186/1471-2164-12-361

**Anna Henriques dos Santos de Sepulveda**

(podpis wnioskodawcy)