

Struktura i funkcja kompleksów nukleoproteinowych w replikacji DNA

AUTOREFERAT



Dr Katarzyna Ewa Węgrzyn

Zakład Biologii Molekularnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2023

Załącznik 3

do Wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego
dr Katarzyny Ewy Węgrzyn

Autoreferat

1. *Imię i nazwisko.*

Katarzyna Ewa Węgrzyn

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

2009 Doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii

Stopień nadany przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku na podstawie rozprawy pt. „Wpływ bakteryjnych białek partycyjnych na lokalizację i stabilność plazmidu RK2”, wykonanej w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii. Promotor: prof. dr hab. Igor Konieczny. Rozprawa uzyskała wyróżnienie Rady MWB UG-AMG.

2005 Magister biotechnologii

Tytuł nadany przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku. Praca magisterska pt. „Lokalizacja minireplikonów plazmidu RK2 w komórkach bakterii *Escherichia coli*”, wykonana została w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii pod opieką dr Moniki Witosińskiej oraz prof. dr hab. Igor Koniecznego.

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

2012 – obecnie

Adiunkt, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański

2009-2012

Asystent, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański

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.).*

4.1. *Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych*

Osiągnięciami naukowymi, które stanowią podstawę niniejszego wniosku są:

I. opis struktury białek Rep plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy oraz określenie mechanizmu działania tych białek w komórkach *Caulobacter crescentus*

II. odkrycie oddziaływania białek Rep i *ApOrc1* z jednoniciowym DNA rejonu *DUE origin* oraz opis struktury kompleksów nukloproteinowych białka RepE

III. określenie wpływu oddziaływań z DNA w procesie proteolizy białek Rep

Osiągnięcia I-III udokumentowane są w publikacjach stanowiących cykl prac pt. „**Struktura i funkcja kompleksów nukleoproteinowych w replikacji DNA**”.

W pracach dokumentujących osiągnięcia I-III gwiazdką * oznaczono współautorów o jednakowym ze mną wkładzie w powstanie danej pracy. Krzyżykiem # oznaczono współautorów pełniących razem ze mną rolę autora korespondencyjnego.

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego autora w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załączniku nr 3A.

I. Opis struktury białek Rep plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy oraz określenie mechanizmu działania tych białek w komórkach *Caulobacter crescentus*

W momencie podejmowania przeze mnie tematu badawczego związanego z analizą struktury białek Rep wiadomo było, że plazmidowe inicjatory replikacji, białka Rep, zbudowane są z dwóch domen typu oskrzydłonej helisy (WH). Nieznana była struktura inicjatorów replikacji plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy. Przeprowadzone

przeze mnie badania pozwoliły opisać trójdomenową strukturę kodowanego przez plazmid RK2 białka TrfA oraz określić znaczenie wszystkich trzech domen w procesie inicjacji replikacji plazmidu o szerokim zakresie gospodarzy jakim jest RK2. Ponieważ białko TrfA kodowane jest w dwóch formach (w wersji krótszej 33kDa TrfA-33 oraz dłuższej 44kDa TrfA-44), które w różnym stopniu są w stanie inicjować replikację plazmidu w różnych gatunkach bakterii, zbadalam mechanizm działania tych dwóch form inicjatora w komórkach *Caulobacter crescentus*. Scharakteryzowałam proces replikacji plazmidu o szerokim zakresie gospodarzy w *C. crescentus* w czasie trwania cyklu komórkowego.

Osiągnięcie to zostało opisane w dwóch pracach oryginalnych:

1. **Węgrzyn, K.***, Zabrocka, E.*, Bury, K., Tomiczek, B., Wieczor, M., Czub, J., Uciechowska, U., Moreno-Del Alamo, M., Walkow, U., Grochowina, I., Dutkiewicz, R., Bujnicki, J.M., Giraldo, R., Konieczny, I.; (2021) Defining a novel domain that provides an essential contribution to site-specific interaction of Rep protein with DNA. *Nucleic Acids Research*, 49 (6), pp. 3394-3408
(IF₂₀₂₁ 19,160; MEiN₂₀₂₁ = 200)
2. **Węgrzyn, K.**, Witosińska, M., Schweiger, P., Bury, K., Jenal, U., Konieczny, I.; (2013) RK2 plasmid dynamics in *Caulobacter crescentus* cells - Two modes of DNA replication initiation *Microbiology-SGM* 159:1010-1022.
(IF₂₀₁₃ 2,835; MNiSW₂₀₁₃ = 30)

II. Odkrycie oddziaływania białek Rep i ApOrc1 z jednoniciowym DNA rejonu DUE origin oraz opis struktury kompleksów nukloproteinowych białka RepE

Zbadalam i odkrylam, że tak jak wykazano to dla chromosomalnych inicjatorów replikacji, białek DnaA, plazmidowe inicjatory replikacji (Rep) tworzą kompleksy z jednoniciowym DNA (ssDNA), a ich tworzenie zależy od sekwencji DNA i jest niezbędne do zajęcia procesu inicjacji replikacji. Wykazałam, że oddziaływanie to jest istotne dla tworzenia stabilnego kompleksu otwartego na etapie inicjacji replikacji. Podobne oddziaływanie odkrylam także dla inicjatora z archebakterii *Aeropyrum pernix*, białka Orc1. Uzyskałam struktury krystaliczne białka RepE plazmidu F z ssDNA oraz kompleksu potrójnego dsDNA-RepE-ssDNA. Struktura kompleksu potrójnego oraz przeprowadzone przeze mnie analizy biochemiczne są pierwszym bezpośrednim dowodem potwierdzającym szeroko dyskutowany w literaturze model inicjacji replikacji DNA według mechanizmu odwróconej pętli (ang. loop-back model).

Osiągnięcie to zostało opisane w trzech pracach oryginalnych:

1. **Węgrzyn, K.**, Fuentes-Perez, M.E., Bury, K., Rajewska, M., Moreno-Herrero, F., Konieczny, I., (2014) Sequence-specific interactions of Rep proteins with ssDNA in the AT-rich region of the plasmid replication origin *Nucleic Acids Res.* 42 (12), pp. 7807-7818.

(IF₂₀₁₄ 9,112; MNiSW₂₀₁₄ = 40)

2. **Węgrzyn, K.#**, Oliwa, M., Nowacka, N., Zabrocka, E., Bury, K., Purzycki, P., Czaplewska, P., Pipka, J., Giraldo, R., Konieczny, I.# (2023) Rep protein accommodates together dsDNA and ssDNA which enables a loop-back mechanism to plasmid DNA replication initiation. *Nucleic Acids Research*, DOI: 10.1093/nar/gkad740

(IF₂₀₂₃ 14,90; MEiN₂₀₂₃ = 200)

3. **Węgrzyn, K.#**, Konieczny, I.; Archaeal Orc1 protein interacts with T-rich single-stranded DNA. (2021) *BMC Research Notes*, 14 (1), art. no. 275

(IF₂₀₂₁ 0,521 ; MEiN₂₀₂₁ = 70)

oraz trzech pracach przeglądowych:

4. Rajewska, M., **Węgrzyn, K.**, Konieczny, I.; AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons (2012) *FEMS Microbiology Reviews* 36 (2), pp. 408-434.

(IF₂₀₁₂ 13,231; MNiSW₂₀₁₂ = 45)

5. Zabrocka, E., **Węgrzyn, K.**, Konieczny, I.; Two replication initiators - one mechanism for replication origin opening? (2014) *Plasmid* 76, pp. 72-78.

(IF₂₀₁₄ 1,578; MNiSW₂₀₁₄ = 15)

6. **Węgrzyn, K.*#**, Gross, M.* , Uciechowska, U., Konieczny, I.#; Replisome assembly at bacterial chromosomes and iteron plasmids (2016) *Front Mol Biosci.* 3:39.

(IF₂₀₁₆ 1,774; MNiSW₂₀₁₆ = -)

III. Określenie wpływu oddziaływań z DNA w procesie proteolizy białek Rep

Badania zespołu prof. Igora Koniecznego, w których brałam udział wykazały, że aktywność proteolityczna proteazy Lon względem białek Rep jest uwarunkowana oddziaływaniami substratu z DNA. Kontynuując te badania odkryłam, że również proteaza Lon, dla proteolizy białek Rep musi wiązać DNA. Zidentyfikowałam reszty

aminokwasowe proteazy Lon niezbędne do tworzenia kompleksu nukleoproteinowego i wykazałam, że substytucje tych reszt skutkują brakiem aktywności proteolitycznej względem plazmidowych inicjatorów replikacji.

Wyniki tych badań opisane zostały w pracy oryginalnej:

1. Karłowicz, A.*, **Węgrzyn, K.***, Gross, M., Kaczynska, D., Ropelewska, M., Siemiakowska, M., Bujnicki, J.M., Konieczny, I.; (2017) Defining the crucial domain and amino acid residues in bacterial Lon protease for DNA binding and processing of DNA-interacting substrates *J Biol Chem.* 292 (18), pp. 7507-7518.

(IF₂₀₁₇ 4,010; MNiSW₂₀₁₇ = 35)

i przeglądownej:

2. Karłowicz A.*, **Węgrzyn K.***, Dubiel A., Ropelewska M., Konieczny I., (2016) „Proteolysis in plasmid DNA stable maintenance in bacterial cells.” *Plasmid* 86:7-13.

(IF₂₀₁₆ 1,545; MNiSW₂₀₁₆ = 15)

Publikacje opisujące przedstawione osiągnięcia I-III, opublikowane w latach 2012-2023, stanowią **cykl prac pt. „Struktura i funkcja kompleksów nukleoproteinowych w replikacji DNA”**. Łączna wartość wskaźnika cytowań IF dla prac składających się na przedstawiony cykl wynosi **68,666**. Łączna liczba punktów MNiSW dla prac składających się na przedstawiony cykl wynosi **650 pkt.** (zgodnie z załącznikiem do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 18 grudnia 2019 r.).

Powyższy cykl publikacji przedstawia wyniki otrzymane w trakcie mojej pracy w latach 2009 – 2023 w Zakładzie Biologii Molekularnej (wcześniej Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej) Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed oraz stażu naukowego w laboratorium prof. Fernando Moreno-Herrero w Narodowym Centrum Biotechnologii w Madrycie (Hiszpania) i wizyt studyjnych w laboratorium prof. Marcina Nowotnego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

W trakcie realizacji mojego projektu doktorskiego zajmowałam się zagadnieniem związanym z lokalizacją cząsteczek plazmidowego DNA w komórkach bakterii oraz ich partycją do komórek potomnych (Załącznik 4, pozycja II 1 zestawienia całkowitego dorobku naukowego). Modelem badawczym w prowadzonych przeze mnie badaniach był plazmid RK2, utrzymujący się w wielu Gram ujemnych bakteriach, w tym patogenach zwierząt i ludzi. Doświadczenie i umiejętności zdobyte podczas projektu doktorskiego postanowiłam

wykorzystać i rozwijać w dalszej pracy naukowej nad strukturą i znaczeniem kompleksów nukleoproteinowych w metabolizmie DNA, a przede wszystkim w procesie replikacji.

Proces replikacji DNA jest niezbędny do przeżycia każdej komórki i od wielu lat jest przedmiotem badań licznych zespołów badawczych. Dzięki zastosowaniu zaawansowanych technik badawczych możliwe jest coraz bardziej szczegółowe poznanie i opisanie przebiegu tego procesu. W przypadku chromosomów bakterii, inicjacja replikacji DNA zależy przede wszystkim od dostępności i aktywności inicjatora replikacji, białka DnaA oraz innych białek replikacyjnych takich jak helikaza (np. DnaB), gyraza czy primaza. Replikacja plazmidowego DNA, w szczególności plazmidów iteronowych zawierających powtórzone sekwencje (iterony) w *origin* replikacji, zależy natomiast od aktywności kodowanego przez plazmid inicjatora, białka Rep oraz bardzo często również inicjatora chromosomalnego DnaA. Także aktywność pozostałych białek replikacyjnych gospodarza jest niezbędna do zapoczątkowania i prawidłowego przebiegu procesu powielenia plazmidowego DNA. W procesie inicjacji replikacji niezwykle istotna jest również prawidłowa sekwencja i wzajemna orientacja motywów znajdujących się w rejonie *origin*, czyli miejscu startu replikacji. Znaczenie budowy rejonu *origin* zostało opisane w pracy **Rajewska, Węgrzyn, Konieczny 2012 FEMS Microbiology Reviews, której jestem współautorem** (pozycja 4 dokumentująca osiągnięcie II, stanowiące podstawą niniejszego wniosku).

Niezwykle ważne jest, aby proces replikacji DNA zachodził w odpowiednim momencie cyklu komórkowego. Precyzyjne zainicjowanie tego procesu, związane jest z dostępnością i aktywnością białek inicjacji replikacji, które tworzą odpowiednie kompleksy nukleoproteinowe w miejscu startu replikacji. W przypadku plazmidów jako pozachromosomalnych elementów genetycznych, nie wiadomo było na ile ich replikacja skorelowana jest z replikacją chromosomalnego DNA komórki gospodarza. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem plazmidu o szerokim zakresie gospodarzy RK2 oraz jako gospodarza komórek bakterii *Caulobacter crescentus* dzielących się asymetrycznie (kompartyment matczyny komórki jest dobrze rozróżnialny od kompartymentu komórki potomnej), pozwoliły mi zbadać tą zależność. Wyniki tych badań opisałam w publikacji **Węgrzyn i wsp., 2013 Microbiology-SGM** (pozycja 2 dokumentująca osiągnięcie I). Dzięki synchronizacji komórek *C. crescentus* poprzez wirowanie gęstościowe i wyodrębnienie komórek w fazie G1 cyklu komórkowego, możliwe było śledzenie w kolejnych fazach cyklu: lokalizacji i liczby kopii plazmidu, poziomu syntezy DNA oraz tworzenia kompleksów nukleoproteinowych w *origin* replikacji. Obserwacje mikroskopowe z wykorzystaniem systemu do przyżyciowego znakowania DNA w komórkach, FROS (Fluorescent Repressor–Operator System), pozwoliły zaobserwować, że cząsteczki

plazmidu RK2 tworzą skupiska, które lokalizują się asymetrycznie, przede wszystkim w kompartmentie matczynym komórki, a nie kompartmentie komórki potomnej. Przeprowadzona przeze mnie analiza liczby kopii plazmidowego DNA pozwoliła określić, że w jednym skupisku znajdują się najczęściej dwie kopie plazmidowego DNA, niezależnie od fazy cyklu komórkowego oraz kompartmentu. Detekcja syntezy DNA w komórkach synchronizowanej hodowli *C. crescentus* wykazała, że plazmidowy DNA, podobnie jak chromosom, replikuje przede wszystkim w fazie S cyklu komórkowego. **Otrzymane przeze mnie i współpracowników wyniki po raz pierwszy pokazały replikację plazmidowego DNA w odniesieniu do cyklu komórkowego bakterii.** Co ciekawe, pomimo wielu lat badań, kwestia zależności metabolizmu plazmidowego DNA od metabolizmu komórki gospodarza nie jest do końca jasna, jednak badania prowadzone obecnie przeze mnie i nasz zespół wskazują, że ta zależność występuje i ma szczególnie istotny wpływ na metabolizm plazmidowego DNA w momencie stresu komórkowego.

Przeprowadzone przeze mnie analizy z wykorzystaniem metody ChIP (Chromatin Immunoprecipitation), którą zoptymalizowałam w celu wykrywania kompleksów w rejonie *origin* plazmidów i chromosomu bakterii, wykazały, że w odróżnieniu od chromosomu, poziom syntezy plazmidowego DNA nie koreluje z liczbą kompleksów tworzonych przez białko inicjacji replikacji gospodarza DnaA w *origin* replikacji plazmidu. Białko DnaA związane w *origin* plazmidu wykrywałam we wszystkich fazach cyklu komórkowego, natomiast w *origin* chromosomalnego DNA przede wszystkim w fazie S, kiedy wykrywano również najwyższy poziom syntezy DNA. Różnicę w liczbie kompleksów nukleoproteinowych w *origin* plazmidu w trakcie trwania cyklu komórkowego *C. crescentus* obserwowałam dla kodowanego przez plazmid białka inicjacji replikacji TrfA. To od odpowiedniej ilości białka TrfA związanego z iteronami zależało więc zachodzenie replikacji DNA plazmidu RK2. Białko TrfA kodowane jest na plazmidzie w dwóch formach: dłuższej o masie 44 kDa (TrfA-44) i krótszej o masie 33 kDa (TrfA-33). W komórkach *Escherichia coli* obie formy są aktywne replikacyjnie, jednakże wymagają współdziałania z białkiem DnaA bakterii. Z kolei w komórkach *Pseudomonas aeruginosa* tylko białko TrfA-44 jest zdolne inicjować replikację plazmidu RK2, bez udziału białka DnaA. Sposób inicjowania replikacji plazmidu RK2 w komórkach *C. crescentus* nie był znany. Dlatego sklonowałam i oczyściłam białka DnaA i helikazę DnaB z tej bakterii i zbadalam aktywność inicjatorów TrfA-33 i TrfA-44 w *origin* plazmidu RK2. Badania aktywności dwóch form białka TrfA przeprowadziłam również *in vivo*. **Uzyskane przeze mnie wyniki wskazały po raz pierwszy na możliwe dwa różne mechanizmy inicjacji replikacji plazmidu RK2 w komórkach tych bakterii, jeden zależny i drugi niezależny od**

aktywności białka DnaA. Wyniki opublikowane zostały w pracy **Węgrzyn i wsp., 2013 Microbiology-SGM.**

Plazmidowe inicjatory replikacji, białka Rep zbudowane są przede wszystkim z dwóch domen typu oskrzydłonej helisy (ang. winged helix, WH). W przypadku białka TrfA-33, inicjatora replikacji plazmidu RK2, oprócz dwóch domen WH, występuje N-terminalna część białka, której struktura nie była znana. Ponieważ oczyszczone białko TrfA jest niestabilne, niemożliwym okazało się uzyskanie preparatu o stężeniu niezbędnym w analizach strukturalnych. Dlatego w badaniach nad strukturą tego białka zastosowaliśmy podejście bioinformatyczne. Współpraca z zespołem prof. Janusza Bujnickiego z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie zaowocowała modelem białka TrfA-33, który zawierał dwie domeny WH i krótki fragment je poprzedzający. Niestety zastosowanie metod opartych o modelowanie homologiczne nie pozwoliło na uzyskanie pełnego modelu białka. Do uzyskania modelu białka TrfA-33 o pełnej sekwencji zastosowaliśmy więc nowe podejście. We współpracy z dr Bartłomiejem Tomiczkiem z Zakładu Ewolucji Molekularnej MWB UG i GUMed oraz zespołem prof. Jacka Czuba z Politechniki Gdańskiej, przeprowadzona została analiza ewolucyjna pochodzenia białka TrfA oraz zastosowane zostało wieloetapowe podejście do uzyskania modelu strukturalnego białka i jego kompleksu z dsDNA. Analiza filogenetyczna pozwoliła na wyodrębnienie nowej rodziny białek TrfA-podobnych, które charakteryzowała obecność dodatkowej sekwencji poprzedzającej domeny WH. Natomiast do przygotowania modelu białka wykorzystano modelowanie homologiczne (dla domen WH), modelowanie *ab initio* (dla N-terminalnej domeny) oraz dane biochemiczne (z analiz spektrometrii mas kompleksów TrfA-dsDNA oraz z przeprowadzonych przeze mnie analiz tworzenia kompleksów z dsDNA przez warianty białka TrfA). W pierwszym etapie przygotowano wstępny model białka, na podstawie którego wraz z zespołem, zaprojektowałam trzynaście wariantów zawierających pojedyncze substytucje aminokwasów. Dla dziewięciu z nich skonstruowałam wektory ekspresyjne, a następnie oczyściłam wszystkie warianty i sprawdziłam ich zdolność do oddziaływania z dsDNA wykorzystując technikę analizy oddziaływania w czasie rzeczywistym - powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR). Analiza SPR pozwoliła mi wyznaczyć stałe kinetyczne oddziaływania z DNA dla wszystkich oczyszczonych białek. Dla wszystkich tych białek sprawdziłam również zdolność do inicjowania replikacji plazmidowego DNA *in vitro*. Dane te zostały następnie wykorzystane do weryfikacji i optymalizacji wstępnego modelu, a następnie wskazania najbardziej prawdopodobnego modelu białka TrfA-33 o pełnej sekwencji, w kompleksie z dsDNA. **Uzyskany przez nas model potwierdził nasze wcześniejsze badania**

biochemiczne, wskazujące, że N-terminalna sekwencja białka TrfA-33 tworzy niezależną domenę. Był to pierwszy model strukturalny białka Rep o trójdomenowej strukturze. Postanowiłam sprawdzić, czy wiązanie wszystkich domen jest niezbędne do stabilnego wiązania białka do DNA. Przeprowadzone analizy SPR potwierdziły, że N-terminalna domena samodzielnie tworzy kompleks z dsDNA, ale tylko białko zawierające zarówno domenę N-terminalną jak i dwie domeny WH jest w stanie stabilnie z wiązać sekwencję iteronów. Co ciekawe, o ile pojedyncze domeny wiążą dsDNA niezależnie od sekwencji, to całe białko TrfA wiąże się specyficznie, tylko do sekwencji iteronów. **Uzyskane przeze mnie wyniki były pierwszymi pokazującymi, że specyficzność względem sekwencji DNA w *origin* replikacji plazmidów o szerokim zakresie gospodarzy zależy od oddziaływania wszystkich domen białka inicjatorowego.** Wyniki te zostały opublikowane w pracy **Węgrzyn, Zabrocka i wsp., 2021 Nucleic Acids Research** (pozycja 1 dokumentująca osiągnięcie I, stanowiące podstawę niniejszego wniosku).

Pomimo wieloletnich badań, których przedmiotem są białka inicjujące replikację DNA zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych, oraz po mimo rozwoju technik strukturalnych, mechanizm procesu powielania materiału genetycznego, a szczególnie jego inicjacji nie jest w pełni poznany. Badania z ostatnich lat wykazały między innymi, że bakteryjne białko DnaA, oprócz oddziaływania ze specyficznymi sekwencjami DnaA-box, znajdującymi się w *origin* replikacji chromosomu, oddziałuje również z jednoniciowym DNA (ssDNA), który pojawia się w rejonie DUE (DNA unwinding element) w momencie rozplecenia dwuniciowej helisy DNA. W przypadku innych inicjatorów replikacji taka aktywność nie była znana. Postanowiłam zająć się tym zagadnieniem, a badania przeprowadzić zarówno dla białek plazmidowych (białka Rep: TrfA, RepE) jak i białka archebakterii *Aeropyrum pernix* (*ApOrc1*). W badaniach nad oddziaływaniem białek Rep z ssDNA wykorzystałam zarówno techniki biochemiczne jak i bardziej zaawansowaną metodę obrazowania kompleksów nukleoproteinowych – mikroskopię sił atomowych (AFM). Technika AFM pozwala na uzyskanie obrazu pojedynczych cząsteczek biomolekuł i bezpośrednią obserwację tworzenia kompleksów białko – DNA. Dzięki nawiązanej współpracy z **prof. Fernando Herrero-Moreno z Madrytu w Hiszpani**, specjalistą w wykorzystaniu AFM do analizy kompleksów białko-DNA, możliwy był **mój trzykrotny wyjazd do jego laboratorium** (3 - 27. 10.2011, 8-21.07.2012 i 5-18.08.2012) i przeprowadzenie analiz oddziaływania białek Rep z ssDNA rejonu DUE plazmidów. Badania przeprowadzone przeze mnie w Madrycie były zgodne z wynikami uzyskanymi w Gdańsku. Białka Rep oddziaływały z ssDNA rejonu DUE, ale tylko z jedną specyficzną nicią. Ponieważ rejon DUE zawiera

powtórzone sekwencje (13-mery plazmid RK2; 8-mery plazmid F) zbadalam, czy oddziaływanie białek Rep z tym rejonem wymaga obecności wszystkich powtórzeń. Wykazałam, że zmiana sekwencji nawet jednego z czterech powtórzeń skutkuje zaburzeniem tworzenia kompleksu nukleoproteinowego i w rezultacie brakiem replikacji plazmidowego DNA. Ponad to analizy, które przeprowadziłam z wykorzystaniem sączenia molekularnego oraz AFM wykazały możliwość tworzenia kompleksów potrójnych między dsDNA zawierającym iterony, białkiem Rep i fragmentem ssDNA zawierającym sekwencję jednej z nici rejonu DUE. Uzyskane przeze mnie wyniki zostały opublikowane w pracy **Węgrzyn i wsp., 2014 Nucleic Acids Research** (pozycja 1 dokumentująca osiągnięcie II). **Było to pierwsze doniesienie na temat oddziaływania białek Rep z ssDNA.** Wyniki tych oraz wcześniejszych badań podsumowałam w pracach przeglądowych **Zabrocka, Węgrzyn, Konieczny 2014 Plasmid** (pozycja 5 dokumentująca osiągnięcie II), w której jestem współautorem oraz w pracy **Węgrzyn*#, Gross*, Uciechowska, Konieczny# 2016 Front Mol Biosci.** (pozycja 6 dokumentująca osiągnięcie II), w której jestem równorzędnym pierwszym autorem i jednym z dwóch autorów korespondencyjnych.

Przeprowadzone do tego momentu badania nie rozstrzygały czy jedna cząsteczka białka Rep wiąże zarówno iterony jak i ssDNA, czy też niektóre cząsteczki oddziałują tylko z dsDNA a inne z ssDNA. Nieznana była również struktura i funkcja tych kompleksów. Otwarta pozostawała kwestia, czy inne inicjatory replikacji np. w komórkach Archebakterii, tworzą kompleksy nukleoproteinowe z ssDNA rejonu DUE. Tymi zagadnieniami zajęłam się po powrocie z długotrwałego zwolnienia lekarskiego (01.2014-08.2014) i urlopu macierzyńskiego (09.2014-02.2015). W pierwszej kolejności sprawdziłam czy poza bakteryjnym białkiem DnaA i plazmidowymi białkami Rep, również inicjatory replikacji chromosomu archebakterii posiadają zdolność do oddziaływania z ssDNA rejonu DUE *origin*. Sklonowałam i oczyściłam białko Orc1 z archebakterii *Aeropyrum pernix* (*ApOrc1*), a następnie wykorzystując takie techniki jak opóźnienie migracji prążka w żelu (EMSA), SPR czy Interferometria wielowarstwowa (BLI), przeprowadziłam analizę oddziaływania tego białka z ssDNA zawierającym sekwencję rejonu, uważanego za miejsce tworzenia kompleksu otwartego w czasie inicjacji replikacji. Przeprowadzone przeze mnie analizy wykazały, że białko *ApOrc1* wiąże ssDNA i wykazuje specyficzność względem sekwencji bogatej w reszty tyminy. Być może więc również w przypadku innych organizmów niż bakterie tworzenie takiego kompleksu ma znaczenie w procesie inicjacji replikacji. **Badania te były finansowane z uzyskanych przeze mnie środków z Narodowego Centrum Nauki, projekt MINIATURA,** a uzyskane wyniki opublikowane w pracy **Węgrzyn# i Konieczny, 2021 BMC Research**

Notes (pozycja 2 dokumentująca osiągnięcie II), w której pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

Kolejnym pytaniem, na które postanowiłam odpowiedzieć było to jaką strukturę tworzą kompleksy białek Rep z ssDNA i jaką rolę pełnią w procesie inicjacji replikacji DNA. Ponieważ uzyskanie struktury kompleksów nukleoproteinowych wymaga oczyszczenia białka w wysokim stężeniu, a dla białka TrfA nie było to możliwe, w dalszych badaniach nad strukturą kompleksów nukleoproteinowych białek Rep wykorzystałam białko RepE plazmidu F, które byłam w stanie oczyścić w wymaganym stężeniu. **Badania te zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu SONATA, którego byłam kierownikiem i głównym wykonawcą.** Wyniki uzyskane w ramach tego projektu zostały opisane w pracy **Wegrzyn i wsp., 2023 Nucleic Acids Research** (pozycja 3 dokumentująca osiągnięcie II), w której jestem pierwszym autorem oraz jednym z dwóch autorów korespondencyjnych. Dzięki nawiązanej współpracy z zespołem **prof. Marcina Nowotnego** z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, **mogłam przeprowadzić w jego laboratorium krystalizację oczyszczonego białka RepE z ssDNA.** Jednocześnie wizyty w laboratorium w Warszawie (11-12.07.2017 i 11-12.12.2018) pozwoliły mi na zapoznanie się z całym procesem uzyskiwania struktury białka, od przygotowania mieszaniny do krystalizacji, poprzez odławianie kryształów, aż do sprawdzenia ich jakości. Dane uzyskane dla kryształów kompleksów RepE – ssDNA pozwoliły na opracowanie struktury o rozdzielczości 1,6Å. Uzyskana struktura i dane z analizy spektrometrii mas kompleksów RepE - ssDNA, pozwoliły mi zaprojektować warianty białka RepE zawierające pojedyncze substytucje w aminokwasach mogących mieć znaczenie dla oddziaływania z ssDNA. Na podstawie danych literaturowych zaprojektowałam również wariant białka RepE (R205E/R206E/R207E), który powinien mieć zaburzone oddziaływanie z dsDNA. Dla wszystkich tych wariantów skonstruowałam wektory ekspresyjne, oczyściłam białka i przeprowadziłam analizy fenotypu uzyskanych białek. Analiza z wykorzystaniem techniki EMSA oraz SPR wykazały, że spośród dwunastu oczyszczonych wariantów białka RepE, trzy (zawierające substytucje N22E, F146E i Y172E) były niezdolne do oddziaływania z ssDNA DUE. Pozostałe białka, poza wariantem z substytucją I180E, który zachował zdolność do wiązania z ssDNA, wykazywały obniżone oddziaływanie z ssDNA. Co ciekawe, wszystkie te białka były zdolne do oddziaływania z dsDNA, zawierającym sekwencję iteronów, na poziomie podobnym do białka typu dzikiego. Jednocześnie wariant RepE R205E/R206E/R207E, zgodnie z moimi oczekiwaniami wykazywał zaburzone oddziaływanie z dsDNA, ale był zdolny wiązać się do ssDNA. **Uzyskane przeze mnie wyniki jednoznacznie wykazały, że wiązanie dsDNA i ssDNA przez białka Rep jest niezależne.** We wcześniejszej

pracy z 2014 roku wykazałam, że oddziaływanie z ssDNA jest niezbędne w procesie replikacji plazmidowego DNA. Przeprowadzenie analizy replikacji *in vitro* oraz analizy KMnO₄ footprinting dla przygotowanych wariantów białka RepE pozwoliło mi **wykazać, że kompleks Rep-ssDNA pełni rolę w utrzymaniu stabilnego kompleksu otwartego w rejonie DUE origin plazmidu**. Analogiczne badania zostały również przeprowadzone dla drugiego z modeli badawczych, plazmidu RK2 i kodowanego przez niego białka TrfA. Analiza wariantów białka TrfA niezdolnych do wiązania ssDNA, ale oddziałujących z dsDNA, pokazała, że białka te nie są zdolne do tworzenia stabilnego kompleksu otwartego w rejonie DUE plazmidu RK2. Badania te zostały przeprowadzone przez **doktorantkę Monikę Oliwę, w której przewodzie doktorskim pełni funkcję promotora pomocniczego**.

W pracy Wegrzyn i wsp., 2014 pokazałam, że białka Rep mogą tworzyć kompleks potrójny. Pytaniem otwartym pozostała kwestia, czy jedna cząsteczka białka może jednocześnie oddziaływać i z dsDNA i z ssDNA DUE. Zagadnienie to jest aktualnie dyskutowane w literaturze również w odniesieniu do bakteryjnego inicjatora replikacji DnaA. Proponowane są dwa modele kompleksu nucleoproteinowego inicjatora replikacji i DNA rejonu *origin*. W jednym modelu proponuje się, że pewna pula cząsteczek białka oddziałuje ze specyficznymi sekwencjami w dsDNA, a następnie po utworzeniu bąbla replikacyjnego inne cząsteczki białka oddziałują z jedną z nici w tym rejonie. Drugi z modeli zakłada, że część cząsteczek inicjatora wiąże jednocześnie i sekwencje w dsDNA i jedną z nici rejonu DUE (tak zwany „model odwróconej pętli”, ang. „loop-back model”). Żaden z modeli nie był jednak dotychczas poparty danymi strukturalnymi. Wykorzystując mój model badawczy postanowiłam zbadać to zagadnienie. Ponownie we współpracy z zespołem prof. Nowotnego, przygotowałam w jego laboratorium mieszaniny do krystalizacji zawierające białko RepE, dwuniciowy fragment zawierający sekwencję iteronu oraz fragment ssDNA rejonu DUE. Uzyskane kryształy pozwoliły na rozwiązanie struktury kompleksu potrójnego o rozdzielczości 3,2Å. Przeprowadziłam również analizy biochemiczne, wykorzystujące uzyskane warianty białka RepE o zaburzonym oddziaływaniu z ssDNA i zdolne do wiązania dsDNA oraz wariant, który był zdolny tylko do wiązania dsDNA ale nie ssDNA. Wykazałam, że zdolność białka Rep do oddziaływania z ssDNA i dsDNA, nie może występować *w trans* w dwóch różnych cząsteczkach białka, ale musi być aktywna w obrębie jednej cząsteczki. **Uzyskane przeze mnie dane strukturalne jak i biochemiczne są pierwszym bezpośrednim dowodem na to, że model odwróconej pętli jest wysoce prawdopodobny**. Uzyskane wyniki zostały opisane w pracy **Wegrzyn i wsp., 2023 Nucleic Acids Research** (pozycja 3 dokumentująca osiągnięcie II).

Tworzenie kompleksów nukleoproteinowych przez białka inicjatorowe jest istotne dla rozpoczęcia procesu powielania materiału genetycznego. Istotne jest również jak długo taki kompleks występuje w komórce. Potrzebne są więc mechanizmy, które będą regulować trwałość takich kompleksów w miejscu *origin*. Jednym z nich jest proteoliza białek inicjacji replikacji przez proteazy komórkowe. Badania prowadzone z wykorzystaniem oczyszczonych proteaz komórkowych *E. coli* oraz plazmidowego inicjatora replikacji TrfA wykazały, że obecność DNA i związanie TrfA do DNA stymulują degradację białka przez proteazy Lon i ClpAP. Jednocześnie przeprowadzone przeze mnie analizy typu EMSA pokazały zdolność samej proteazy do oddziaływania z DNA. Wyniki te zostały opublikowane w pracy Kubik, Węgrzyn, Pierechod, Konieczny (2012) Nucleic Acid Research (Załącznik 4, pozycja II 3 zestawienia całkowitego dorobku naukowego). Kontynuując te badania, zaprojektowałam mutanty punktowe w proteazie Lon, które mogłyby skutkować brakiem oddziaływania z DNA. Zaprojektowane zmiany zostały wprowadzone do sekwencji genu białka i uzyskane **warianty Lon oczyszczone w ramach projektu magisterskiego, którego byłam opiekunem**. Następnie zbadałam wpływ obecności DNA na degradację inicjatorów replikacji, plazmidowych (TrfA, RepE) i fagowego (λ O przez uzyskane warianty proteazy Lon). Wykazałam, że wprowadzone substytucje w rejonie domeny ATPazowej proteazy skutkowały brakiem oddziaływania z DNA i zahamowaniem aktywności proteolitycznej względem badanych substratów. Co ciekawe, takiego efektu nie obserwowałam dla białka IbpB, które nie oddziałuje z DNA. Również uniwersalny substrat, α -kazeina, był degradowany zarówno przez białko typu dzikiego jak i uzyskane warianty proteazy Lon. Przeprowadzona przeze mnie analiza szybkości degradacji substratu przez analizowane warianty Lon, wykazała, że białko zawierające cztery substytucje w domenie ATPazowej, (R306E/K308E/K310E/K311K) jest w stanie degradować FITC-kazeinę szybciej niż białko typu dzikiego, co mogło wynikać z różnic w stanie oligomerycznym tych białek. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy **Karłowicz*, Węgrzyn*, Gross, M., Kaczynska, D., Ropelewska, M., Siemiakowska, M., Bujnicki, J.M., Konieczny (2017) J Biol Chem.** (pozycja 1 dokumentująca osiągnięcie III), w której jestem równorzędnym pierwszym autorem. Badania nad znaczeniem proteolizy w metabolizmie plazmidowego DNA zostały przedstawione w pracy przeglądowej **Karłowicz A.*, Węgrzyn K.*, Dubiel A., Ropelewska M., Konieczny I., (2016) Plasmid**, w której jestem jednym z dwóch pierwszych autorów. Jest to druga z prac opisujących osiągnięcie III.

Na podstawie wyników przeprowadzonych przeze mnie badań oraz licznych badań innych autorów widać jak złożonym procesem jest replikacja DNA oraz regulacja tego procesu. Do tej pory nie poznana została dokładna rola bakteryjnego białka DnaA w inicjacji

plazmidowego DNA. Brak jest również danych strukturalnych, które pokazałyby, jak wygląda pełen kompleks w *origin* replikacji, w skład którego wchodzi co najmniej kilka cząsteczek białka inicjatorowego, białka histono-podobne (HU, IHF), białko SSB, helikaza, gyraza, primaza i białka wchodzące w skład kompleksu repikacyjnego. W dalszych prowadzonych przeze mnie badaniach chciałabym zająć się tym zagadnieniem.

4.2. Pozostałe osiągnięcia naukowe

Badania nad analizą kompleksów nukleoproteinowych pozwoliły mi na rozwinięcie warsztatu badawczego związanego z oddziaływaniem biomolekuł. Szczególnie duże doświadczenie zdobyłam w prowadzeniu badań kinetyki oddziaływań biomolekuł w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR). Tą i inne techniki analizy oddziaływań stosuję z powodzeniem między innymi w badaniach związanych z poszukiwaniem nowych związków o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. Badania takie prowadzę między innymi jako **wykonawca projektu finansowanego przez Fundację Polpharmy, kierowanego przez prof. dr hab. Sylwię Rodziewicz-Motowidło z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego**. W ramach tych badań, w tym wykonanych przeze mnie analiz SPR oddziaływania peptydów i białek, udało się zidentyfikować peptydy blokujące oddziaływanie między białkami PD-L1 i PD-1, które odpowiada za hamowanie proliferacji limfocytów T i ma bardzo duże znaczenie w rozwoju nowotworów. **Wyniki tej pracy opublikowano w pracy wieloautorskiej** (Bojko, M., **Węgrzyn, K.**, Sikorska, E., Kocikowski, M., Parys, M., Battin, C., Steinberger, P., Kogut, M.M., Winnicki, M., Sieradzan, A.K., Spodzieja, M., Rodziewicz-Motowidło, S.; Design, synthesis and biological evaluation of PD-1 derived peptides as inhibitors of PD-1/PD-L1 complex formation for cancer therapy. (2022) *Bioorganic Chemistry*, 128, art. no. 106047), **w której jestem drugim autorem** (Załącznik 4, pozycja II 11 zestawienia całkowitego dorobku naukowego).

Badania o podobnej tematyce prowadzę również w ramach innych projektów kierowanych przez prof. Sylwię Rodziewicz-Motowidło oraz we współpracy z zespołami z poza Uniwersytetu Gdańskiego. Opis mojej aktywności naukowej w tych badaniach przedstawiłam w punkcie 7 niniejszego Autoreferatu.

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

Analiza tworzenia kompleksów nukleoproteinowych może być przeprowadzona z wykorzystaniem różnych technik biochemicznych, mikroskopowych i strukturalnych. Ponieważ technikami wykorzystywanymi przeze mnie na co dzień w tego typu analizie były przede wszystkim metody biochemiczne, postanowiłam poszerzyć mój warsztat badawczy o nowatorską w ówczesnym czasie technikę obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM). Technika AFM umożliwiała bowiem analizę pojedynczych biomolekuł i bezpośrednie obserwacje tworzenia się kompleksów białko-DNA. Jednym z zespołów specjalizujących się w analizie kompleksów białko-DNA z wykorzystaniem AFM jest zespół **prof. Fernando Morreno Herrero z Narodowego Centrum Biotechnologii w Madrycie, Hiszpania**. Dzięki jego uprzejmości **mogłam odbyć najpierw w 2011 roku miesięczną, a później w 2012 roku dwie dwutygodniowe wizyty naukowe w jego laboratorium (Załącznik 3C)**. Wyjazdy te były możliwe dzięki uzyskanemu przeze mnie w konkursie finansowaniu dla młodych naukowców ze środków Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. **W ramach ww. wizyt naukowych przeprowadziłam analizy tworzenia kompleksów nukleoproteinowych przez plazmidowe inicjatory replikacji, białka TrfA i RepE, z fragmentami ssDNA o sekwencji rejonu DUE**. W analizach wykorzystywałam fragmenty DNA o sekwencji typu dzikiego oraz z wprowadzonymi zmianami. Analiza polegała na przygotowaniu przeze mnie odpowiednich mieszanin reakcyjnych, następnie przygotowaniu preparatu do obrazowania w AFM, zeskanowaniu przygotowanej powierzchni, a następnie opracowaniu uzyskanych danych z wykorzystaniem odpowiedniego oprogramowania. Przeprowadzone analizy pozwoliły po raz pierwszy wykazać, że plazmidowe inicjatory replikacji wiążą się specyficznie z jedną z nici rejonu DUE i potwierdziły wcześniejsze obserwacje przeprowadzone przeze mnie z wykorzystaniem technik biochemicznych. **W wyniku danych uzyskanych przeze mnie w Gdańsku oraz w trakcie pobytu w Madrycie powstała publikacja opublikowana w czasopiśmie o wysokim wskaźniku oddziaływania Wegrzyn i wsp., 2014 Nucleic Acids Research, w której jestem pierwszym autorem**. Publikacja ta jest pierwszą pozycją dokumentującą osiągnięcie II w przedłożonym wniosku. Pobyt w laboratorium prof. Fernando Moreno Herrero i moje doświadczenie związane z przeprowadzaniem analiz AFM, pozwoliły na **wprowadzenie techniki AFM do Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed**. Początkowo były to współorganizowane przeze mnie warsztaty mikroskopii sił atomowych, a w późniejszym czasie utworzenie stanowiska do mikroskopii AFM w Zakładzie Laboratoriów Specjalistycznych MWB, wyposażonego obecnie w trzy różne mikroskopy AFM do zastosowań biologicznych.

Kontynuując badania nad kompleksami białek inicjujących replikację plazmidowego DNA z ssDNA w rejonie DUE *origin* replikacji, zajęłam się analizą struktury tych kompleksów. W celu przeprowadzenia analizy strukturalnej kompleksów białek Rep i ssDNA nawiązałam współpracę z zespołem **prof. Marcina Nowotnego z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie**, który jest ekspertem w badaniach struktury kompleksów białko-DNA. **W 2017 i 2018 odbyłam wizyty w laboratorium prof. Nowotnego, gdzie przygotowałam oczyszczone przeze mnie białko RepE do krystalizacji w obecności, odpowiednio, ssDNA oraz ssDNA i dsDNA.** W rezultacie prac przeprowadzonych w trakcie tych wizyt udało się uzyskać kryształy kompleksów nukleoproteinowych, których struktura została następnie rozwiązana. Uzyskane struktury, w połączeniu z eksperymentami przeprowadzonymi w Zakładzie Biologii Molekularnej, **pozwoły mi wykazać, że inicjacja replikacji DNA w komórce bakterii zachodzi najprawdopodobniej według modelu odwróconej pętli (ang. loop-back model).** Uzyskane wyniki zostały opisane w pracy w **Wegrzyn i wsp., 2023 Nucleic Acids Research**, która jest trzecią pozycją dokumentującą osiągnięcie II w przedłożonym wniosku. Doświadczenie zdobyte dzięki współpracy z zespołem prof. Nowotnego **chcę wykorzystać i rozwijać w dalszych badaniach nad strukturą replikacyjnych kompleksów nukleoproteinowych.**

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

Od początku mojej pracy w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii **aktywność dydaktyczna** jest istotną częścią mojej pracy. Zaangażowana jestem w prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów kierunku Biotechnologia, przede wszystkim I stopnia studiów. W ramach działalności dydaktycznej prowadzę zarówno wykłady, seminaria jak i ćwiczenia laboratoryjne i audytoryjne.

W latach 2005-2019 prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne: Pracownia Inżynierii genetycznej, do których **opracowałam skrypt pt. „Pracownia inżynierii genetycznej – materiały do ćwiczeń”**. Skrypt przygotowałam w wersji w **języku polskim i angielskim** w ramach projektu współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego; tytuł projektu: „Zwiększenie aktywności studentów MWB UG i GUMed w działaniach poprawiających atrakcyjność absolwentów na rynku pracy”. W 2019, po wprowadzeniu nowego programu kształcenia w MWB, w którego przygotowywaniu brałam udział, treści programowe ćwiczeń laboratoryjnych Pracowni Inżynierii Genetycznej weszły w skład nowych ćwiczeń

laboratoryjnych: Biomolekuły – budowa, synteza i właściwości, Organizmy jednokomórkowe – genetyka i Organizmy jednokomórkowe – metabolizm. Na potrzeby nowych zajęć laboratoryjnych zmodyfikowałam dotychczas prowadzone zajęcia, przygotowując nowe ćwiczenia dotyczące np. techniki ELISA czy detekcji białek w żelach poliakrylamidowych barwionych srebrem. Przygotowałam również nowe, uzupełnione materiały dydaktyczne dla studentów.

Zajęciami, które prowadzę są również proseminaria z Metodyki I (wcześniej Metodyki inżynierii genetycznej), Metodyki II (wcześniej Metodyki biologii molekularnej) oraz Nowe trendy w biotechnologii. W ramach tych zajęć omawiane są zarówno podstawowe jak i zaawansowane techniki inżynierii genetycznej, biologii molekularnej i biotechnologii. **W trakcie zajęć wykorzystuję metody dydaktyczne oparte o nowe technologie oraz nowe rozwiązania dydaktyczne, które angażują studenta w proces dydaktyczny** (tutoring grupowy i indywidualny; peer-feedback, blended learning; rubrics). Aby przybliżyć studentom niektóre z omawianych zaawansowanych metod biologii molekularnej i umożliwić im bezpośrednio zapoznanie się z omawianymi metodami, **w 2012 roku zorganizowałam** razem z firmą Olympus **warsztaty mikroskopowe**, a **w 2015 roku** we współpracy z firmą Labsoft **warsztaty mikroskopii sił atomowych**. W latach **2016-2018 organizowałam i prowadziłam autorskie warsztaty pt. „Metodyka Biologii Molekularnej – ćwiczenia”**; które były **współfinansowane ze środków Funduszu Innowacji Dydaktycznych Uniwersytetu Gdańskiego, uzyskanych w ramach konkursu**. Od 2019 roku warsztaty te zostały na stałe wprowadzone do programu kształcenia na kierunku Biotechnologia MWB, jako zajęcia do wyboru. Moją wiedzę dotyczącą metodyki badania kompleksów nukleoproteinowych wykorzystywałam również do **przygotowania, wraz z prof. dr hab. Igorem Koniecznym, skryptu pt. „Molecular biology of nucleic acids – experimental methodology”**, wykorzystywanego przez studentów studiów II stopnia Biotechnologii.

Od 2019 roku wraz z prof. Michałem Obuchowskim, **prowadzę autorskie zajęcia audytoryjno-komputerowe Organizmy jednokomórkowe – genetyka**, podczas których studenci zapoznają się z projektowaniem i wprowadzaniem zmian w materiale genetycznym (modyfikacje genomów, klonowanie genów).

Do prowadzonych przeze mnie zajęć należą również wykłady dotyczące przede wszystkim klonowania genów i inżynierii genetycznej (Kamile milowe w biotechnologii: Klonowanie; Organizm jednokomórkowe – genetyka: Modyfikacje genów i genomów; Organizmy jednokomórkowe – środowisko życia: *Caulobacter crescentus*).

W latach 2010-2023 **byłam opiekunem 28 studentów przygotowujących prace licencjackie oraz 11 studentów przygotowujących prace magisterskie**. Pełniłam również rolę przewodniczącego oraz członka Komisji Egzaminu Dyplomowego na studiach I stopnia kierunku Biotechnologia, a także recenzenta prac dyplomowych magisterskich. Kilkukrotnie pełniłam rolę opiekuna praktyk studenckich odbywanych w Zakładzie Biologii Molekularnej (wcześniej Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej). **W 3 przewodach doktorskich pełniłam rolę promotora pomocniczego**, z czego dwie rozprawy doktorskie zostały już obronione (Marta Gros 8.03.2019; Andrzej Dubiel 23.10.2020), a jedna jest w trakcie przygotowania (Monika Oliwa).

Za swoją działalność naukową i dydaktyczną **otrzymałam w 2017 roku Medal Komisji Edukacji Narodowej**.

Oprócz zajęć i warsztatów skierowanych do środowiska akademickiego **staram się również popularyzować naukę**. W ramach Bałtyckiego Festiwalu Nauki organizowałam warsztaty i pokazy otwarte „Czy DNA jest niebieski?”. A w latach 2016-2018, **jako członek Wydziałowego zespołu ds. organizacji imprez promocyjnych i edukacyjnych, współorganizowałam imprezy popularnonaukowe na Wydziale**. A w bieżącym roku **pełniłam funkcję jednego z dwóch opiekunów studentów biorących udział w międzynarodowym konkursie biologii syntetycznej iGEM** organizowanym przez The iGEM Foundation. Jest to konkurs, w którym młodzi pasjonaci nauki starają się opracować rozwiązanie aktualnego problemu dotyczącego środowiska, cywilizacji, człowieka, w oparciu o wykorzystanie biologii syntetycznej, a jednocześnie popularyzować wykorzystanie inżynierii genetycznej dla poprawy jakości życia. Na zaproszenie zespołu studentów z MWB startujących w konkursie, wspierałam ich swoim doświadczeniem i wiedzą w zakresie inżynierii genetycznej bakterii.

Od początku mojej pracy jako nauczyciel akademicki **stawiam duży nacisk na podnoszenie moich kompetencji dydaktycznych biorąc udział w szkoleniach i programach dedykowanych nauczycielom oraz konferencjach naukowych poświęconych dydaktyce akademickiej**. Między innymi brałam udział w projektach organizowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Mistrzowie dydaktyki” oraz „Mistrzowie dydaktyki – wdrożenie”. W ramach pierwszego z projektów w kwietniu 2019 roku **odbyłam tygodniową wizytę studyjną w Uniwersytecie w Ghent (Belgia)**, gdzie miałam możliwość poznać i przećwiczyć stosowaną tam metodę tutoringów grupowych. W roku akademickim 2021/2022 odbyłam kurs i uzyskałam **certyfikat tutora akademickiego**. W ramach mojej pracy tutorskiej miałam okazję między innymi pomóc studentom w przygotowaniu przez nich

prac dyplomowych, czy artykułu popularnonaukowego (Matulewska, Węgrzyn, Ziętkiewicz (2022) *Tutoring Gedanensis* 7(2)/2022 (13 – 22)). W latach 2022-23 brałam również **udział w zaawansowanym programie “Advanced Qualification in Teaching”**, dedykowanym nauczycielom akademickim, współorganizowanym przez Uniwersytet w Groningen (Holandia).

W swojej pracy jako nauczyciel akademicki **staram się angażować w aktywności związane nie tylko z samym nauczaniem, ale również organizowaniem kształcenia w Uniwersytecie Gdańskim**, a przede wszystkim w Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii. W roku akademickim 2018/2019 **zostałam powołana do Wydziałowego zespołu ds. opracowania nowego programu kształcenia** i brałam czynny udział w opracowaniu nowatorskiego programu opartego nie o klasyczne przedmioty a moduły tematyczne (ang. concept-based learning). Opracowany **program został doceniony przez Jego Magnificencję Rektora Uniwersytetu Gdańskiego i wyróżniony Nagrodą zespołową I stopnia**. Współtworzony przeze mnie nowatorski program kształcenia doceniła również Państwowa Komisja Akredytacyjna, która przyznała kierunkowi Biotechnologia certyfikat Doskonały Kierunek. Po wdrożeniu nowego programu kształcenia, w maju 2019 roku **zostałam powołana na koordynatora jednego z Modułów studiów I stopnia na kierunku Biotechnologia**, a w 2020 roku **na członka Rady Programowej Kierunku Biotechnologia MWB UG i GUMed**. W 2022 roku na zlecenie Instytut Badań Edukacyjnych (IBE) i Uniwersytetu Gdańskiego przygotowałam opis syntetyczny charakterystyk kwalifikacji dla studiów I stopnia kierunku Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego.

Do mojej **działalności organizacyjnej** należy również udział w pracach Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii oraz Rady Dyscypliny biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego, do których zostałam wybrana. Zostałam także powołana decyzją Dziekana na członka Uniwersyteckiej komisji dyscyplinarnej do spraw studentów Uniwersytetu Gdańskiego oraz Wydziałowej komisji do spraw bezpieczeństwa zamkniętego użycia genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów (GMM) oraz genetycznie modyfikowanych organizmów (GMO).

Szkolenia dydaktyczne, w których brałam udział:

2010 – pilotażowy Kurs Dydaktyki Akademickiej, Uniwersytet Gdański

2015-2018 – szkolenia Laboratorium Inicjatyw Dydaktycznych, Uniwersytet Gdański

2019-2020 - udział w projekcie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Mistrzowie Dydaktyki”; tygodniowa wizyta studyjna w Ghent University, Belgia

2019-2021- udział w projekcie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Mistrzowie Dydaktyki – Wdrożenie”

2021-2022 – kurs Tutoringu akademickiego, Centrum Doskonalenia Dydaktycznego i Tutoringu UG; certyfikat Tutora akademickiego

2022 - szkolenia Fundacji Instytutu Rozwoju Regionalnego w ramach projektu „Dostępny UG”: Wsparcie studentów/studentek z zaburzeniami poznawczymi; Praca ze studentami z trudnościami natury psychicznej

2022-2023 – udział w projekcie Ministerstwa Edukacji i Nauki oraz University of Groningen (Holandia) “Advanced Qualification in Teaching

Konferencje dydaktyczne:

06.2019 – VII Ogólnopolska Konferencja Dydaktyki Akademickiej IDEATORIUM

K. Węgrzyn „Wykorzystanie wysokospecjalistycznej aparatury badawczej w nauczaniu Metodyki biologii molekularnej – warsztatowe ćwiczenia laboratoryjne” (poster)

09.2020 – konferencja MNiSW w ramach projektu Mistrzowie dydaktyki

K. Węgrzyn „The educational innovation project: Introduction of peer assessment activity into the course Seminar I - Experimental publications in molecular biology and biotechnology” (wystąpienie ustne)

05.2021 - Biochemical Society Conference: Evolving molecular bioscience education

06.2021 – konferencja MNiSW: Masters of Didactics. Improving the teaching competences of academic teachers;

K. Węgrzyn „ Teaching together - effective involvement of Students into teaching process” (wystąpienie ustne)

07.2021 FEBS Conference

K. Węgrzyn, R. Czajkowski, S. Jafra, P. Koszałka, A. Lipińska, S. Ołdziej, , W. Żmudzińska „Boosting the learning of Biotechnology by Concept-based teaching” (wystąpienie ustne)

Funkcje pełnione w Uniwersytecie Gdańskim:

1. Członek komisji egzaminu dyplomowego dla studiów pierwszego stopnia na kierunku Biotechnologia
2. Członek uniwersyteckiej komisji dyscyplinarnej do spraw studentów Uniwersytetu Gdańskiego (kadencja 2012-2016; 2016-2020; 2020-2024).
3. Członek zespołu ds. organizacji imprez promocyjnych i edukacyjnych na MWB UG-GUMed (2016-2018)
4. Członek Rady Wydziału Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii (kadencja 2016-2020; 2020-2024).
5. Członek Wydziałowej komisji do spraw bezpieczeństwa zamkniętego użycia genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów (GMM) oraz genetycznie modyfikowanych organizmów (GMO)
6. Członek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne (2020-2022)
7. Członek Rady Dyscypliny Biotechnologia (od 02.2023)
8. Członek Rady Programowej Kierunku Biotechnologia
9. Członek Komisji ds. oceny aktywności nauczycieli akademickich MWB UG-GUMed
10. Członek Centrum Tutorów UG (tutor)

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

Działalność naukowo-badawcza nie przedstawiona w punkcie 4:

W związku z prowadzonymi badaniami nad strukturą i funkcją kompleksów nukleoproteinowych **zdołałam duże doświadczenie w analizie oddziaływania biomolekuł**. Doświadczenie to **wykorzystałam w badaniach prowadzonych na zaproszenie innych zespołów badawczych z kraju i z zagranicy**. Analizy oddziaływania biomolekuł prowadzę przede wszystkim z wykorzystaniem takich technik jak opóźnienie migracji prążka w żelu (EMSA) czy termoforeza mikroskalowa (MST), a przede wszystkim powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR), który pozwala na badanie kinetyki oddziaływań w czasie rzeczywistym. **Nawiązane współprace zaowocowały kilkunastoma pracami już opublikowanymi lub złożonymi do publikacji (Załącznik 4, pkt. II)**, a kolejne są w przygotowaniu. Szczególnie interesujące są dla mnie badania związane z poszukiwaniem nowych związków, molekuł, peptydów, których zadaniem jest blokowanie oddziaływania między białkami komórkowymi skutkujące stanem chorobowym. Stosowane przeze mnie techniki analizy oddziaływań

pozwalają bowiem w szybki i precyzyjny sposób wytypować cząsteczki o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym, które mogą być dalej testowane *in vivo*. Badania prowadzone we współpracy z zespołem **prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego** nad oddziaływaniem białek BTLA i HVEM związanych z kontrolą układu odpornościowego, pozwoliły na identyfikację peptydów, zawierających fragmenty sekwencji białek BTLA i glikoproteiny D, które blokują to oddziaływanie. Wyniki tych badań opublikowano w pracach: *International Journal of Molecular Sciences* (2020) 21 (2), art. no. 636 (Załącznik 4, pkt. II 8), *Bioorganic Chemistry* (2022) 122, art. no. 105748 (Załącznik 4, pkt. II 10) i *Biomed Pharmacother.* (2023) 165:115161 (Załącznik 4, pkt. II 15), w których jestem współautorem. Podobnie udało się zidentyfikować wspomniane już peptydy blokujące oddziaływanie między białkami PD-L1 i PD-1 (*Bioorganic Chemistry* (2022) 128, art. no. 106047) (punkt 4.2 Autoreferatu).

Poszukiwanie molekuł o potencjalnym terapeutycznym działaniu, stało się również podstawą współpracy z zespołem **prof. dr hab. Macieja Bagińskiego z Politechniki Gdańskiej**. W ramach badań nad zablokowaniem oddziaływania białek TRF1 i TIN2, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania telomerów i stanowiących potencjalny cel w terapii przeciwnowotworowej, udało się znaleźć peptydomimetyki o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym. Wyniki tych badań zostały częściowo opublikowane w pracy w *Chemistry* (2023) e202300970, doi: 10.1002/chem.202300970 (Załącznik 4, pkt. II 14), w której jestem współautorem; przygotowano również **zgłoszenie patentowe**: “Inhibitors of interactions between TRF1-TIN2 or TRF2-TIN2 telomeric proteins for use in anticancer therapy”, Patent Office of the Republic of Poland (RO/PL), Ref. No. PZ/8885/RW/PCT International application number: PCT/PL2022/050017 (Załącznik 4, pozycja III).

W ostatnim czasie zostałam również **zaproszona do współpracy przez zespół prof. Johna Matsoukas z Uniwersytetu w Patras (Grecja)**, w celu znalezienia potencjalnych nowych leków w walce z infekcją wirusa SARS-CoV-2. Uzyskane do tej pory wyniki zostały opublikowane w pracy **Kelaidonis K i wsp., (2023) Int J Mol Sci. 24(9):8454**, a kolejny manuskrypt został wysłany do czasopisma *Advanced Science* i obecnie jest w trakcie recenzji. To jak duże znaczenie ma poszukiwanie nowych leków, szczególnie w terapii przeciwnowotworowej czy przeciwwirusowej pokazuje nie tylko zainteresowanie tym zagadnieniem przez liczne grupy badawcze, ale także firmy biotechnologiczne i farmaceutyczne. W celu poszukiwania nowych terapeutyków **przeprowadziłam analizy SPR dla firmy Recepton Sp. z o.o., z Gdańska**, realizującej projekt POIR.01.01.01-00-0129/18 „Technology platform designed for the development and study of therapeutics used in cancer

immunotherapy. Development of small molecules for the immune checkpoint blockade in combination cancer immunotherapies”.

Nagrody i stypendia otrzymane po uzyskaniu stopnia doktora:

2010 - Stypendium Fundacji Rozwoju Uniwersytetu Gdańskiego

2012 - Stypendium w ramach projektu „Kształcimy najlepszych: kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów i akademickiej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Gdańskiego, Komponent: Wsparcie stypendialne i szkoleniowe dla doktorantów i młodych doktorów”

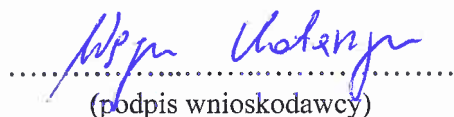
2016 – Elsevier-Plasmid Prize za poster pt. ”Disclosing the multiple role of plasmid replication initiator during DNA replication initiation.” Prezentowany w trakcie International Plasmid Biology Conference, 18-23.09.2017 Cambridge, UK

2017 – Medal Komisji Edukacji Narodowej

2020 – otrzymanie grantu przyznanego przez COST (European Cooperation in Science and Technology); reference number COST-TS-ECOST-TRAINING_SCHOOLCA15126-270120 - 111550 na udział w konferencji i szkoleniu FEBS HyThaBio w Grenoble, Francja

2019 – Nagroda zespołowa Rektora I stopnia za opracowanie nowego, nowatorskiego Programu Kształcenia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed

2022 - Nagroda Zespołowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcia naukowe poparte publikacjami naukowymi


.....
(podpis wnioskodawcy)