

AUTOREFERAT

Grażyna Majkowska-Skrobek

dziedzina *NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH*
dyscyplina *NAUKI BIOLOGICZNE*

Zakład Biologii Patogenów i Immunologii

Wydział Nauk Biologicznych

Uniwersytet Wrocławski

Wrocław 2022

1. Imię i nazwisko

Grażyna Majkowska-Skrobek

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

2002 – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie mikrobiologii

Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski (UWr)

Tytuł rozprawy doktorskiej: Synteza IgA₁ i IgA₂ u dzieci z izolowanym niedoborem immunoglobulin klasy A

Promotor: prof. dr hab. n. med. Adam Jankowski (Wydział Nauk Przyrodniczych, UWr)

Recenzenci:

prof. dr hab. Iwona Kątnik-Prastowska (Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, Wrocław)

prof. dr hab. n. med. Ewa Bernatowska (Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa)

1995 – tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii

Wydział Nauk Przyrodniczych, UWr

Tytuł pracy magisterskiej: Związki lizosomotropowe. Genetyka i fizjologia form na nie opornych

Opiekun: prof. dr hab. Tadeusz Lachowicz (Wydział Nauk Przyrodniczych, UWr)

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach

01.10.2004 – obecnie	adiunkt, początkowo w Pracowni Immunologii Zakładu Mikrobiologii, a od 2010 roku w nowo powstałym Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii, UWr
01.10.2003 – 01.10.2004	asystent w Pracowni Immunologii Zakładu Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, UWr
01.10.1997 – 05.2002	studia doktoranckie na Wydziale Nauk Przyrodniczych, UWr
1.09.1995 – 30.09.1997	samodzielny biolog (etat inżynieryjno-techniczny) w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii, UWr
15.03.1995 – 30.06.1995	½ etatu technicznego w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii, UWr (jako studentka)

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.)

Osiągnięciem naukowym, stanowiącym podstawę wszczęcia postępowania habilitacyjnego i znaczny wkład w rozwój dyscypliny *Nauki Biologiczne* jest cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, na który składa się jedna publikacja przeglądowa i pięć prac oryginalnych. Artykuły zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Report* (JCR) w latach 2015-2022. Łączny współczynnik wpływu IF (*Impact Factor*) dla publikacji

składających się na osiągnięcie wynosi 29,014, natomiast całkowita liczba cytowań tych prac wg bazy *Scopus* – 273 (260 – bez autocytowań oraz 232 – bez autocytowań wszystkich autorów). Sumaryczna liczba punktów przyznanych przez MNiSW/MEiN dla prac składających się na cykl habilitacyjny wynosi 525 (zgodnie z listą obowiązującą dla roku opublikowania artykułu) i 720 (zgodnie z listą obowiązującą dla roku składania wniosku).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Analiza wybranych interakcji patogen-gospodarz do oceny możliwości zastosowania fagów i depolimeraz fagowych w kontroli zakażeń *Klebsiella pneumoniae*

4.2. Wykaz prac naukowych dokumentujących osiągnięcia naukowe, stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego uwzględniający dane naukometyczne czasopism oraz liczbę cytowań wg bazy *Scopus*

Lp.	Publikacja	IF*	Punktacja MNiSW/MEiN		Liczba cytowań*** (bez autocytowań)
		w roku opublikowania	w roku opublikowania**	w roku składania wniosku	
Publikacja przeglądowa					
H1	Drulis-Kawa Z [✉] , Majkowska-Skropek G, Maciejewska B. Bacteriophages and phage-derived proteins-application approaches. <i>Current Medicinal Chemistry</i> , 2015 , 22(14):1757-1773. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współpracowaniu założeń i struktury artykułu, przeprowadzeniu przeglądu literatury, zaplanowaniu i napisaniu rozdziału dotyczącego depolimeraz fagowych (rozdz. 3) oraz udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i ostatecznej wersji pracy.</i>	3,455	40	100	127 (123)
Publikacje oryginalne					
H2	Majkowska-Skropek G [✉] , Łątka A, Berisio R, Maciejewska B, Squeglia F, Romano M, Lavigne R, Struve C, Drulis-Kawa Z. Capsule-targeting depolymerase, derived from <i>Klebsiella</i> KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy. <i>Viruses</i> , 2016 , 8(12): 324. <i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, udziale w przeprowadzeniu doświadczeń związanych z otrzymaniem białka w formie rekombinowanej i określeniem jego cech strukturalnych w roztworach, zaprojektowaniu i wykonaniu badań dotyczących oceny aktywności depolimerazy w warunkach in vitro i in vivo, a także stabilności tego enzymu. Wykonałam analizę statystyczną danych i zinterpretowałam wyniki, a także opracowałam rycinę i napisałam tekst manuskryptu. Przygotowałam również odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz ostateczną wersję artykułu. Jestem autorem korespondencyjnym..</i>	3,465	30	100	69 (64)

H3	<p>Majkowska-Skropek G [✉], Latka A, Berisio R, Squeglia F, Maciejewska B, Briers Y, Drulis-Kawa Z [✉]. Phage-borne depolymerases decrease <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistance to innate defense mechanisms. <i>Frontiers in Microbiology</i>, 2018, 9: 2517.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji badań, udziale w realizacji części badawczej związanej z otrzymaniem depolimeraz w formie rekombinowanej, określeniem ich cech strukturalnych w roztworach oraz typowaniu serotypów K. pneumoniae. Zaprojektowałam i przeprowadziłam badania dotyczące oznaczenia stabilności depolimeraz oraz ich aktywności w warunkach in vitro, a także wykonałam pomiary cytometryczne, testy oceniające lityczne działanie surowicy i testy in vivo. Wykonałam analizę statystyczną danych, zinterpretowałam wyniki, opracowałam ryciny i napisałam tekst manuskryptu. Przygotowałam również odpowiedzi na uwagi recenzentów oraz ostateczną wersję artykułu. Jestem autorem współkorespondencyjnym.</i></p>	4,259	35	100	61 (59)
H4	<p>Kaszowska M[#], Majkowska-Skropek G [#], Markwitz P, Lood C, Jachymek W, Maciejewska A, Lukasiewicz J [✉], Drulis-Kawa Z [✉]. The mutation in <i>wbaP cps</i> gene cluster selected by phage-borne depolymerase abolishes capsule production and diminishes the virulence of <i>Klebsiella pneumoniae</i>. <i>International Journal of Molecular Sciences</i>, 2021, 22: 11562.</p> <p># równorzędni autorzy</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na: współpracowaniu koncepcji pracy, zaprojektowaniu i nadzorowaniu badań, przeprowadzeniu doświadczeń związanych z izolacją mutanta i jego charakterystyką fenotypową zobrażowaną na rycinach 1 i 4, izolacji i oczyszczeniu CPS i EPS oraz na przygotowaniu fagów i rekombinowanej depolimerazy. Przeanalizowałam wyniki, wykonałam analizę statystyczną danych i napisałam tekst manuskryptu z wyłączeniem części eksperymentalnej, związanej z analizą strukturalną polisacharydów (rozdział 2.3). Byłam odpowiedzialna za ostateczną wersję artykułu łącznie z przygotowaniem odpowiedzi dla recenzentów. Zapewniłam częściowe finansowanie publikacji z voucherów przyznanych przez wydawnictwo. Jestem równorzędnie pierwszym autorem.</i></p>	6,208	140	140	3 (3)
H5	<p>Majkowska-Skropek G [✉], Markwitz P, Sosnowska E, Lood C, Lavigne R, Drulis-Kawa Z [✉]. The evolutionary trade-offs in phage-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> entail cross-phage sensitization and loss of multidrug resistance. <i>Environmental Microbiology</i>, 2021, 23(12): 7723-7740.</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: współpracowaniu koncepcji pracy, zaproponowaniu i wykonaniu badań dotyczących wyznaczenia relatywnego wzrostu mutantów (RGB) oraz określenia ich wzrostu w obecności pojedynczych fagów i koktajli fagowych. Wykonałam również eksperymenty określające podatności mutantów na lityczne działanie dopełniacza oraz część antybiogramów. Ponadto opracowałam i zinterpretowałam dane eksperymentalnie, wykonałam analizę statystyczną, napisałam wstępną wersję manuskryptu oraz opracowałam ryciny i tabele (z wyłączeniem ryc. 5 i 6 oraz tab. 2, S1, S4 i S5). Przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów i ostateczną wersję manuskryptu. Jestem autorem współkorespondencyjnym.</i></p>	5,476	140	140	13 (11)

H6	Smug BJ, Majkowska-Skrobek G, Drulis-Kawa Z [✉] . PhREEPred: Phage Resistance Emergence Prediction web to foresee encapsulated bacterial escape from phage cocktail treatment. <i>Journal of Molecular Biology</i> , 2022 , 434(14): 167670.	6,151	140	140	0
<p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji biologicznej części pracy oraz zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich badań eksperymentalnych, których wyniki stanowiły inspirację do opracowania modelu matematycznego. Przeanalizowałam wyniki badań oraz napisałam część manuskryptu obejmującą biologiczne aspekty pracy wraz z przygotowaniem zdjęć oraz zaprojektowaniem i wykonaniem graficznego abstraktu. Uczestniczyłam również w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów i ostatecznej wersji publikacji.</i></p>					
SUMARYCZNA LICZBA PUNKTÓW		29,014	525	720	273 (260)

* Impact factor (IF) z roku ukazania się publikacji

** na podstawie części A wykazu czasopism stanowiących załącznik do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) z dnia 18.12.2015 r. (H1), 25.01.2017 r. (H2 i H3) oraz załącznika do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki (MEiN) z dnia 9.02.2021 r. (prace H4, H5 i H6) w sprawie wykazu czasopism i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych

*** liczba cytowań (liczba bez autocytowań) wg bazy *Scopus* (stan na dzień 21.12.2022)

Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie każdej z publikacji stanowią Załącznik nr 5, natomiast kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia zostały zawarte w Załączniku nr 6. Prace włączone do pozostałych „osiągnięć naukowo-badawczych” zaznaczono poprzez podkreślenie.

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

WPROWADZENIE I UZASADNIENIE WYBORU TEMATU BADAWCZEGO

W ostatniej dekadzie oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR) została uznana za „jedno z 10 największych globalnych zagrożeń dla zdrowia publicznego¹”, zarówno z powodów klinicznych, jak i ekonomicznych [Ahmad i Khan, 2019; Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022]. W obliczu tego kryzysu poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych stanowi wyjątkowo pilną potrzebę, zwłaszcza wobec patogenów z grupy ESKAPE [De Oliveira i wsp., 2020]. Wymieniony pod literą „K” kompleks gatunkowy *K. pneumoniae* obejmuje liczne i zróżnicowane pod względem chorobotwórczości szczepy, w tym wielolekooporne, odpowiedzialne za oportunistyczne zakażenia szpitalne i wysoce zjadliwe (*hypervirulent*), będące czynnikiem etiologicznym inwazyjnych zakażeń pozaszpitalnych [Dong i wsp., 2022; Wyres i wsp., 2020]. Skalę problemu potęguje pojawianie się przypadków zakażeń szczepami wykazującymi zarówno fenotypy lekooporności, jak i wysokiej zjadliwości, co czyni je wyjątkowo trudnymi do leczenia [Yao i wsp., 2018]. Niepokojące są również wtórne zakażenia *K. pneumoniae* odnotowywane u pacjentów z COVID-19 [Montrucchio i wsp., 2020].

¹ <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>

Różnorodność patotypów doskonale obrazuje możliwości adaptacyjne *K. pneumoniae* do różnych środowisk. Plastyczność ich genomów wyraża się m. in. wysoką zdolnością do (i) pozyskiwania genów AMR, w tym β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) i/lub karbapenemaz oraz (ii) modyfikacji i rearanżacji kilku kluczowych loci wirulencji. Tym samym pangenom *K. pneumoniae* stanowi ważny rezerwuuar informacji genetycznej, w tym genów AMR, która może być przekazywana zarówno wewnątrz, jak i między gatunkami, włączając w to klinicznie istotne bakterie Gram-ujemne [Wyres i Holt, 2018]. To skutkuje dalszą dywersyfikacją patogenów, powstawaniem ognisk epidemicznych zakażeń, a także wysoką prewalencją opornych szczepów (puli genów AMR) wśród nosicieli oraz w naturalnych ekosystemach [Navon-Venezia i wsp., 2017].

Spośród determinant wymaganych do wirulencji *K. pneumoniae* na szczególną uwagę zasługują elementy osłon komórkowych, w tym polisacharydy otoczkowe (CPS), lipopolisacharyd (LPS) i (egzo)polisacharydy (EPS) stanowiące macierz biofilmu. One ułatwiają kolonizację tkanek i rozprzestrzenianie bakterii w organizmie, sprzyjają tworzeniu biofilmu, jak również chronią patogen przed układem odpornościowym gospodarza, (bakterio)fagami i antybiotykami [Paczosa i Mecsas, 2016; Bengoechea i Sa Pessoa, 2019]. Z uwagi na ich istotną rolę w patogenezie bakterii sugeruje się, że terapeutyczne celowanie w ww. struktury może stanowić skuteczną strategię zapobiegania i leczenia zakażeń *K. pneumoniae*. Jednak różnorodność w strukturze i składzie glikanów (> 77 zdefiniowanych serotypów antygeny K w obrębie około 140 typów loci *cps*, określanych jako typy KL i co najmniej 11 typów O-antygeny LPS) oraz towarzysząca im zmienność sekwencji aminokwasowych białek zaangażowanych w ich biosyntezę i transport [Follador i wsp., 2016], okazuje się być poważnym wyzwaniem na etapie projektowania uniwersalnego leku lub poliwalentnej szczepionki [Opoku-Temeng i wsp., 2019; Patro i Rathinavelan, 2019]. Kolejnym problemem jest wyżej wspomniana zdolność *K. pneumoniae* do modyfikowania składowych CPS i LPS. Wnioski wynikające ze stosowania antybiotyków w XX wieku wskazują również, że każdy nowy lek zwykle stanowi tylko tymczasowe rozwiązanie problemu AMR.

Poszukiwanie skutecznych sposobów leczenia zakażeń powinno zatem obejmować nie tylko tworzenie preparatów farmakologicznych nowej generacji, ale także opracowywanie alternatywnych strategii, które zastąpią, uzupełnią lub wspomogą działanie dostępnych środków przeciwdrobnoustrojowych. W tym kontekście ponownie rozważa się wykorzystanie fagów, których terapeutyczne możliwości sugerowano już ponad 100 lat temu. Skuteczność tej formy leczenia potwierdzają również eksperymenty *in vitro* oraz wyniki badań klinicznych [Melo i wsp., 2020; Pirnay i wsp., 2022] i studiów przypadków na pacjentach [Eskenazi i wsp., 2022; Suh i wsp., 2022]. Obecnie fagi są podawane w postaci preparatów monofagowych, w koktajlach fagowych lub w połączeniu z antybiotykami. Stosuje się je zarówno w krajach, które w przeszłości inwestowały w fagoterapię, jak Gruzja czy Polska, ale też krajach, w których jest to stosunkowo nowa praktyka [Górski i wsp., 2020; Pires i wsp. 2020].

Jednym z wyzwań stojących przed terapią fagową, które przemawia na jej niekorzyść i może poważnie zagrozić jej dalszemu rozwojowi jest antagonistyczna (ko)ewolucja między fagami i bakteriami. Bakterie wykształciły wiele mechanizmów umożliwiających zakłócenie każdego etapu cyklu litycznego faga, a fagi mają równie imponujący zestaw mechanizmów przełamania tej oporności [Tal i Sorek, 2022]. To wzajemne dopasowanie pod względem zakaźności pasożyta i oporności gospodarza może mieć rozmaite implikacje na poziomie populacji [Koskella i Brockhurst, 2014], które ostatecznie mogą decydować o sukcesie lub porażce leczenia fagami. Spośród nich

warto wymienić: zwiększanie tempa ewolucji oraz różnorodności genetycznej i fenotypowej fagów i bakterii, wpływ na strukturę społeczności oraz kształtowanie ewolucji klinicznie istotnych cech bakterii. Retrospektywna analiza przypadków terapii fagowej stosowanej w leczeniu zakażeń *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* wykazała, że częstotliwość występowania szczepów opornych na użyte w leczeniu fagi wahała się między 17% a 85% [Międzybrodzki i wsp., 2012]. Ponadto Oeschlin [2018], w oparciu o obszerny przegląd modeli eksperymentalnych, również potwierdził, że pojawianie się fagoopornych wariantów bakteryjnych jest częstym zjawiskiem. Jeśli więc ewolucja oporności jest nieunikniona, a mimo tego nie wyklucza pozytywnego wyniku leczenia fagami to odnowione podejście do terapii powinno uwzględnić jej przebieg i wykorzystać narzuconą przez fagi presję jako narzędzie do selekcji pożądanych w praktyce klinicznej fenotypów bakterii docelowych [Kortright i wsp., 2019].

Pierwszą i prawdopodobnie najczęściej stosowaną przez bakterie linią obrony przed fagami jest blokowanie adsorpcji [Labrie et al., 2010]. Ten mechanizm wiąże się z usuwaniem, modyfikacją lub fizycznym maskowaniem receptorów komórkowych rozpoznawanych przez białka wiążące receptor (RBP) faga. Kiedy stosujemy fagi lityczne ukierunkowane na struktury komórkowe kluczowe dla wirulencji patogenu czy mechanizmu oporności na antybiotyki [Bertozzi Silva i wsp., 2016] to można oczekiwać selekcji populacji odpornej na fagi a jednocześnie mniej zjadliwej i/lub bardziej wrażliwej na antybiotyki. W selekcji nowych fenotypów szczególnie ważne są zmiany w receptorach polisacharydowych (CPS/LPS/EPS) oraz białkach błony zewnętrznej (OMP) stanowiących elementy pomp efflux. Ta wykorzystująca zjawisko kompromisu koncepcja opiera się na założeniu, że fagi selekcyjując oporność jednocześnie wymuszają jej ewolucyjny koszt w odniesieniu do innej cechy bakteryjnego gospodarza [Torres-Barcelo i Hochberg, 2016]. Istnienie kompromisów osiągniętych za pośrednictwem receptorów komórkowych wykorzystywanych przez fagi wykazano w przypadku kilku gatunków bakterii, w tym *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* oraz *K. pneumoniae* ST258 [Hasan i Ahn, 2022]. Poza zmianą w zjadliwości i wrażliwości na antybiotyki, wynikiem kompromisu mogą być również inne zmiany fenotypowe bakterii obejmujące m. in. formowanie biofilmu, tempo wzrostu lub też podatność na mechanizmy obronne gospodarza.

Podobnego efektu zmiany fenotypu zwalczanych bakterii należy się spodziewać wprowadzając do terapii białka pochodzenia fagowego, określane jako depolimerazy [Oliveira i wsp., 2022]. Te wyspecjalizowane RBP faga o aktywności enzymatycznej są zaprogramowane na rozpoznanie i degradację polisacharydów wchodzących w skład osłon komórkowych bakterii, w celu ułatwienia fagom dostępu do receptorów ukrytych głębiej i zainicjowania infekcji [Drulis-Kawa i wsp., 2012; publikacja H1; Latka i wsp., 2017; Knecht i wsp., 2020]. W konsekwencji ‘demontaż’ istotnych w wirulencji patogenu struktur (CPS/LPS/EPS) może wpłynąć na podatność bakterii na mechanizmy obronne gospodarza, inne fagi oraz antybiotyki a także na degradację biofilmów bakteryjnych. Potwierdzają to m. in. zmiany indukowane depolimerazami w CPS kilku patogenów, w tym *A. baumannii* [Oliveira i wsp., 2019], *E. coli* [Lin i wsp., 2018] czy *K. pneumoniae* [publikacje H2 i H3], jak również w O-antygenie LPS *P. aeruginosa* [Olszak i wsp., 2017].

Warto jednak zauważyć, że synergistyczne powiązania między fenotypami bakterii mogą również zagrozić skuteczności nowych terapii wykorzystujących fagi/białka fagowe lub fagi w połączeniu z antybiotykami. Dzieje się tak, gdy po wcześniejszym narażeniu na jeden stresor pozostaje populacja oporna na działanie innych fagów, antybiotyków albo bardziej zjadliwa.

Synergistyczną plejotropię pomiędzy opornością na fagi a opornością na antybiotyki i rozwojem oporności wielolekowej wykazano już w populacjach *P. aeruginosa* [Moulton-Brown i Friman, 2018], *K. pneumoniae* [Uddin i wsp., 2019] oraz *E. coli* [Burmeister i wsp., 2020]. Zrozumienie mechanizmów kluczowych dla rozwoju oporności na fagi/depolimerazy oraz zmienności bakterii w wyniku mutacji i/lub adaptacji do środowiska, a także kosztów ‘nakładanych’ zwłaszcza na czynniki lub mechanizmy kluczowe w patogenezie bakterii, jest zatem niezbędne do określenia przebiegu procesu selekcji i ewolucji bakterii. Ma to również znaczenie dla przewidywania konsekwencji stosowania w terapii preparatów opartych na fagach a także może wskazywać uwarunkowania zapewniające skuteczność tej strategii leczenia zakażeń.

Dotychczasowe badania sugerują jednak, że oporność na fagi nie odzwierciedla genealogii ewolucyjnej organizmu i jest cechą wysoce specyficzną dla gatunku bakterii [Martiny i wsp., 2015]. Tak więc, aby można było wdrożyć strategię oparte na kompromisach i wspomóc dostępne metody leczenia, konieczne są systematyczne badania z udziałem kluczowych patogenów bakteryjnych i różnych fagów/depolimeraz fagowych, przy uwzględnieniu uwarunkowań środowiskowych, w których one współistnieją lub będą wykorzystywane. Szczególnie ważne jest to w przypadku bakterii o dużej zdolności adaptacyjnej i związanym z tym zróżnicowaniem określonych struktur powierzchniowych, stanowiących receptory dla fagów. Kluczem do korzystania z tego rozwiązania jest odpowiedni dobór faga. Należy poszukiwać fagów o zdolności do zabijania podatnych bakterii oraz zmniejszania wirulencji, oporności na leki lub upośledzania innych funkcji sprawnościowych wariantów opornych. Można do tego celu wykorzystać wiele fagów-kandydatów, ale obecnie brakuje ustalonych kryteriów ich doboru. To samo założenie dotyczy depolimeraz fagowych, które pomimo braku bezpośredniego działania litycznego, powinny efektywnie ‘rozbrajać’ patogen ze struktur kluczowych dla jego wirulencji. Z uwagi na wysoką specyficzną interakcji fag-bakteria i depolimeraza-bakteria, konsekwencje wynikające ze zmian w genomie i/lub w fenotypie nowo wyłaniających się populacji zwalczanych bakterii są trudne do przewidzenia. Równie istotne są pytania o interakcje zmienionych fenotypowo bakterii z innymi gatunkami (w szczególności ich gospodarzem eukariotycznym) oraz mechanistyczne zrozumienie synergii między fagami (lub enzymami fagowymi) i antybiotykami, w celu osiągnięcia idealnego wyniku terapii skojarzonych, a także oszacowanie kosztów populacyjnych, jakie ponoszą bakterie rozwijając jednocześnie oporność na antybiotyki i fagi/białka fagowe.

Kilkuletnie badania grupy naukowej, której jestem członkiem od 2010 roku, dotyczące fagów specyficznych wobec wielolekoopornych bakterii Gram-ujemnych, zaowocowały m. in. stworzeniem kolekcji fagów specyficznych wobec *K. pneumoniae* [Drulis i wsp., 2011, Kęsik-Szeloch i wsp., 2013]. Ogólną charakterystykę fagów będących przedmiotem moich badań, ich przynależność taksonomiczną wraz z numerami akcesyjnymi genomów zdeponowanych w bazie NCBI GenBank, zestawiono w tabeli 1.

Wybrane fagi charakteryzują się różnorodnością aparatów ogonkowych rozpoznających różne receptory gospodarza. Stanowią zatem dobry model eksperymentalny do badania interakcji fag-bakteria i depolimeraza-bakteria na poziomie pojedynczej komórki i populacji. Wśród nich są (i) dwa podowirusy z rodziny *Autographiviridae*, w tym fag KP34 z rodzaju *Drulisvirus* i KP32 z rodzaju *Przondovirus*, (ii) sifowirus KP36 z rodziny *Drexlerviridae* oraz (iii) dwa fagi z rodziny *Myoviridae* (KP15 i KP27). Podczas gdy fagi KP34 i KP36 kodują depolimerazy ukierunkowane na serotyp otoczkowy K63 [**publikacja H2**], podowirus KP32 wytwarza dwie depolimerazy, z których

jedna jest specyficzna wobec serotypu K3, druga zaś wobec serotypu K21 [publikacja H3]. Natomiast miowirusy KP27 i KP15 nie posiadają genów kodujących depolimerazy i najprawdopodobniej rozpoznają receptory natury białkowej [Maciejewska i wsp., 2017].

Tabela 1. Charakterystyka fagów *K. pneumoniae* wykorzystanych w badaniach

NAZWA FAGA (akronim)	TAKSONOMIA	WIELKOŚĆ GENOMU (bp)	ZAKRES GOSPODARZA* (serotyp antygeny K i O)	DEPOLIMERAZA (nr akcesyjny w bazie NCBI GenBank)	GENOM (nr akcesyjny w bazie NCBI GenBank)
vB_KpnS_KP36 (fag KP36)	<i>Drexleriviridae</i> , <i>Webevirus</i>	49 797	Kp486 (K63, O1v2) Kp77 (K63, O1v2)	KP36gp50 (YP_009226011.1)	NC_029099.1
vB_KpnP_KP34 (fag KP34)	<i>Autographiviridae</i> , <i>Drulisvirus</i>	43 810	Kp486 (K63, O1v2) Kp77 (K63, O1v2)	KP34gp57 (YP_003347651.1)	NC_013649.2
vB_KpnP_KP32 (fag KP32)	<i>Autographiviridae</i> , <i>Przondovirus</i>	41 119	Kp271 (K3, O1v2) Kp358 (K21, O1v1) Kp 45 (K21, O1v1) Kp 968 (K21, O2v1)	KP32gp37 (YP_003347555) KP32gp38 (YP_003347556)	NC_013647.1
vB_KpnM_KP27 (fag KP27)	<i>Myoviridae</i> , <i>Slopekvirus</i>	174 413	Kp767 (K10, O1v1) Kp700603 (K20, O3/O3a)	brak	NC_020080.1
vB_KpnM_KP15 (fag KP15)	<i>Myoviridae</i> , <i>Slopekvirus</i>	174 438	Kp767 (K10, O1v1) Kp700603 (K20, O3/O3a)	brak	NC_014036.1

* szczepy *K. pneumoniae* (Kp) stanowiły izolaty kliniczne, z wyjątkiem szczepu Kp700603 pochodzącego z kolekcji ATCC (American Type Culture Collection)

CEL BADAŃ

Nadrzędnym celem badań, których wyniki złożyły się na prezentowane osiągnięcie naukowe, była analiza interakcji fag-bakteria-gospodarz i związanych z tym adaptacyjnych kompromisów wynikających z bezpośredniego działania depolimeraz fagowych, jak i samych fagów, ukierunkowanych na wybrane czynniki wirulencji bakterii.

Analiza tych oddziaływań ma charakter poznawczy i poszerza wiedzę na temat: (i) zmienności fenotypowej i genomowej populacji *K. pneumoniae* selekcjonowanej depolimerazami oraz fagami, ukierunkowanymi na CPS, (ii) mechanizmów odpowiedzialnych za nabywanie oporności bakterii na fagi i depolimerazy fagowe, (iii) istnienia zależności między opornością *K. pneumoniae* na fagi/białka fagowe a opornością na antybiotyki, (iv) możliwości wspomaganie przez fagi/depolimerazy mechanizmów obronnych gospodarza w zwalczaniu infekcji bakteryjnych oraz (v) wpływu środowiska abiotycznego na te zjawiska. Zrozumienie tych interakcji a następnie wykorzystanie fagów i ich depolimeraz jako narzędzi do uwrażliwienia bakterii na dostępne antybiotyki i/lub mechanizmy układu immunologicznego to zagadnienia, które powinny być uwzględniane przy opracowywaniu nowych metod leczenia zakażeń wywołanych *K. pneumoniae*. Może to również pomóc wyjaśnić obserwowane w praktyce klinicznej różnice w skuteczności leczenia fagami.

Podjęte badania wpisują się zatem w zalecenia Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), która z uwagi na lawinowo rosnącą oporność *K. pneumoniae* na antybiotyki, w szczególności

karbapenemy i cefalosporyny III generacji, zaklasyfikowała ten patogen do grupy „krytycznie ważnych” ze względu na potrzebę pilnego opracowywania nowych strategii terapeutycznych [Tacconelli i wsp., 2018]. Ponieważ odporne szczepy bakteryjne wyselekcjonowane w trakcie terapii mogą następnie rozprzestrzeniać się zarówno w środowisku szpitalnym, jak i w naturalnych ekosystemach, to wnioski wynikające z moich badań mają również istotne znaczenia dla zdrowia publicznego oraz ekologii i biologii ewolucyjnej.

FAGOWE DEPOLIMERAZY POLISACHARYDÓW JAKO CZYNNIKI ANTYWIRULENTNE

H1. Drulis-Kawa Z[✉], Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and phage-derived proteins-application approaches. *Curr. Med. Chem.*, **2015**, 22(14): 1757-1773.

Cykl prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego otwiera publikacja przeglądowa dotycząca fagów i ich białek [**publikacja H1**]. Mój wkład w tę publikację polegał na opracowaniu zagadnień dotyczących depolimeraz fagowych w sposób, który stanowił syntetyczne podsumowanie ówczesnego stanu wiedzy na ten temat. W wyniku przeglądu literatury przedstawiłam oryginalną klasyfikację depolimeraz, opartą o ich specyficzność wobec polisacharydów strukturalnych (peptydoglikan, LPS) i otoczkowych (kwas polisialowy, alginian, hialuronian, amylozoran) gospodarza. Na tej podstawie wyodrębniłam związane z wirionem hydrolazy peptydoglikanu, endoramnozydazy i endosialidazy z grupy hydrolaz (EC 3.2.1.X) oraz liazy alginatowe i hialuronidazy z grupy liaz (EC 4.2.2.X). Te ostatnie, w odróżnieniu od hydrolaz, rozszczepiają substraty bez uwolnienia cząsteczki wody, w oparciu o mechanizm β -eliminacji. Charakteryzując poszczególne grupy depolimeraz zdefiniowałam ich aktywność enzymatyczną względem substratu oraz biochemiczne i strukturalne właściwości tych białek, wyszczególniłam fagi, które je kodują, a także, jeśli było to możliwe, ustaliłam lokalizację enzymu w wirionie. Wynikiem analizy literatury było również wskazanie na możliwość zastosowania depolimeraz w biotechnologii, diagnostyce oraz terapii, co stanowiło szczególny obszar moich zainteresowań badawczych.

Chociaż dowody istnienia depolimeraz fagowych są znane od ponad 60 lat [Adams and Park, 1956], to zaprezentowany przegląd literatury wskazywał, iż stan wiedzy na temat tych białek, kodowanych przez fagi specyficzne wobec bakterii z rodzaju *Klebsiella*, zwłaszcza w kontekście ich właściwości antywirulentnych, był niewystarczający i wymagał uzupełnienia. Wcześniejsze badania koncentrowały się na określeniu związanej z wirionem aktywności depolimeryzującej nowo izolowanych fagów, ze szczególnym uwzględnieniem ich specyficzności względem heteropolisacharydów określonego serotypu *Klebsiella* [Rieger-Hug i Stirm, 1981]. Wraz z rozwojem bioinformatyki i technik biologii molekularnej rozpoczęto identyfikację genów kodujących te enzymy oraz badania depolimeraz uzyskanych w formie białek rekombinowanych. Brakowało jednak danych doświadczalnych charakteryzujących właściwości, strukturę i funkcje tego typu białek oraz wskazań, co do możliwości ich praktycznego wykorzystania, poza już wskazywanym działaniem antybiofilmowym [Chhiber i wsp., 2013].

Ponadto złożoność interakcji wynikającej z szerokiego panelu serotypów otoczkowych *K. pneumoniae* oraz różnorodności fagów w środowisku powoduje, iż konsekwencje wynikające z degradacji CPS przez depolimerazy czy z rozwoju oporności bakterii na te enzymy są trudne do

przewidzenia. To uzasadnia potrzebę dogłębnych badań nad tymi białkami i ich wykorzystaniem do opracowania skutecznych metod kontroli zakażeń [publikacje H2, H3, H4 i H6]. Wymiernym potwierdzeniem znaczenia podjętego kierunku badań jest chociażby fakt, iż obecnie w bazie PubMed znajduje się ponad 50 nowo scharakteryzowanych, rekombinowanych depolimeraz pochodzących z fagów *Klebsiella*.

IDENTYFIKACJA NOWYCH DEPOLIMERAZ FAGOWYCH ZAANGAŻOWANYCH W DEGRADACJĘ POLISACHARYDÓW

H2. Majkowska-Skrobek G[✉], Łatka A, Berisio R, Maciejewska B, Squeglia F, Romano M, Lavigne R, Struve C, Drulis-Kawa Z. Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool of anti-virulent strategy. *Viruses*, **2016**, 8(12): 324.

H3. Majkowska-Skrobek G[✉], Latka A, Berisio R, Squeglia F, Maciejewska B, Briers Y, Drulis-Kawa Z[✉]. Phage-borne depolymerases decrease *Klebsiella pneumoniae* resistance to innate defense mechanisms. *Front. Microbiol.*, **2018**, 9: 2517.

Do typowania genów kodujących depolimerazy fagowe wykorzystaliśmy metodę wyszukiwania w genomach wybranych fagów sekwencji kodujących białka, które wykazują podobieństwo do innych białek dostępnych w bazach danych (BLASTP²). Poszukiwano też domen oraz motywów charakterystycznych dla fagowych białek ogonkowych oraz enzymów degradujących polisacharydy. Wybór fagów KP36 oraz KP32, jako przedmiotu badań, był podyktowany obecnością na murawie ich bakteryjnego gospodarza tzw. strefy halo, która pojawia się wokół łyśinki w następstwie propagacji faga i sygnalizuje jego zdolność do degradacji polisacharydów [Adams and Park, 1956]. W badaniach uwzględniono również odmienną architekturę aparatu ogonkowego (sifowirus KP36, z kolcem przymocowanym do długiego i elastycznego ogonka vs podovirus KP32, z włóknami ogonkowymi przymocowanymi do krótkiego i niekurczliwego ogonka) i różny zakres gospodarzy fagów, co pozwoliło na ocenę lokalizacji i liczby RBP w wirionach.

Stwierdzono, że genom sifowirusa KP36 zawiera jedną otwartą ramkę odczytu (ORF) dla domniemanego kolca ogonkowego (gp50), z fragmentem N-końcowym homologicznym do N-końca białek należących do innych sifowirusów specyficznych wobec *Klebsiella* i *Enterobacter* [publikacja H2]. Pomimo, iż żadne z tych białek nie zostało scharakteryzowane *in vitro*, to ich przynależność do fagów o tym samym morfotypie sugerowała domenę strukturalną odpowiedzialną za kotwiczenie białka kolca w aparacie ogonkowym faga. Kolejną przesłanką wskazującą, że znaleziona w bazie sekwencja koduje depolimerazę, była obecność w regionie C-końcowym domeny typowej dla białek z nadrodziny liazy pektatowej (pfam12708). Ta konserwatywna domena często występuje w białkach pochodzenia wirusowego lub bakteryjnego, które rozkładają pektyny [Jenkins i wsp., 1998], oraz w rodzinie autotransporterów bakteryjnych systemów sekrecyjnych [Junker i wsp., 2006]. Prawoskrętne motywy β -helikalne charakterystyczne dla struktury drugorzędowej tej domeny zostały także zidentyfikowane w części centralnej gp50 za pomocą narzędzi HHPRED³ i PSIPRED⁴. Wcześniej podobne strukturalnie domeny katalityczne ujawniono już w innych kolcach ogonkowych degradujących polisacharydy i należących do fagów specyficznych m. in. dla *E. coli* (HK620), *Salmonella* (P22 i Det7) oraz *Shigella* (Sf6).

² <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

³ <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/>

⁴ <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

Ponadto stwierdziliśmy, że region C-końcowy gp50 wykazuje homologię na poziomie 42% identyczności z gp57 podowirusa KP34. Te dane w połączeniu z identyfikacją wspólnego zakresu gospodarzy dla sifowirusa KP36 i podowirusa KP34 [Kęsik-Szeloch i wsp., 2013; Drulis-Kawa i wsp., 2011] sugerowały, że moduł C-końcowy jest odpowiedzialny zarówno za aktywność katalityczną, jak i rozpoznanie receptora. Warto podkreślić, że uzyskane wyniki analiz pozwoliły ustalić, iż gp50 pełni rolę depolimerazy, ale także zdają się potwierdzać model ewolucji fagowych RBP na drodze poziomego transferu domen enzymatycznych w obrębie różnych rodzajów fagów [Latka i wsp., 2019].

Stosując te same założenia badawcze w odniesieniu do podowirusa KP32, w jego genomie wytypowano dwa ORF-y, w tym sekwencję dla białka włókien ogonkowych (gp37) i zanotowaną w jego sąsiedztwie sekwencją kodującą białko hipotetyczne (gp38) [publikacja H3]. Analiza sekwencji aminokwasowej gp37, z wykorzystaniem narzędzia SMART⁵ oraz InterProScan⁶, wykazała obecność N-końcowej domeny modelowego faga T7, centralnie usytuowanej domeny liazy pektatowej i C-końcowej domeny peptydazy_S74 (pfam13884). Domeny włókna ogonkowego faga T7 zidentyfikowano również w N-końcach innych włókien ogonkowych podowirusów z "rodzaju T7-podobnych", "wirusów KP32" i miowirusów, co wskazywało na miejsce łączenia białka włókna z rurką ogonkową. Natomiast domena opiekuńcza (chaperon) w regionie C-końcowym jest elementem odpowiedzialnym za trimeryzację białka i często występuje w strukturze endosialidaz oraz innych RBP zaangażowanych w wiązanie i degradację CPS lub łańcuchów O-swoistych LPS [Schwarzer i wsp., 2007].

Przedstawione powyżej wyniki analiz bioinformatycznych, w zestawieniu z ujawnieniem lokalizacji domeny liazy pektatowej w części centralnej oraz umiarkowanej homologii strukturalnej do egzo-poli- α -D-galakturonozydazy (PDB ID:3jur), pozwoliły przypuszczać, iż gp37 pełni rolę depolimerazy. W innych analizach przewidziano obecność dodatkowej domeny T4gp10, znajdującej się poniżej N-końca gp37, która stanowi potencjalne miejsce przyłączenia gp38, poprzez jego fragment N-końcowy [Latka i wsp., 2019]. To wyjaśnia organizację dwóch RBP w wirionie faga KP32 i trzech innych przondowirusów o podwójnej specyficzności, w sposób poszerzający zasięg gospodarza [Hsieh i wsp., 2017; Pan i wsp., 2019; Squelia i wsp., 2020].

Drugie białko (gp38) faga KP32 zostało włączone do badań na podstawie obecności sekwencji aminokwasowej homologicznej do białka kolca ogonka faga K5 *Klebsiella* (99% podobieństwa i 87% identyczności) oraz umiarkowanej homologii strukturalnej z enzymami degradującymi oligosacharydy i polisacharydy, należącymi do nadrodziny podobnej do liazy pektynowej oraz blisko spokrewnionej z nią rodziny hydrolaz glikozydowych 28 (PDB ID:1bhe).

W wyniku analiz bioinformatycznych zidentyfikowaliśmy trzy nowe, dotąd niescharakteryzowane białka fagowe, z typową dla RBP organizacją modułową. Ich struktura obejmuje domenę N-końcową, odpowiedzialną za przyłączenie RBP do aparatu ogonkowego faga oraz moduł C-końcowy, zaangażowany w wiązanie receptora i degradację polisacharydów. Pozwoliło to sformułować hipotezę, że białka te pełnią rolę związanych z wirionem depolimeraz i są zaangażowane w proces adsorpcji faga do komórki bakteryjnej.

⁵ <http://smart.embl-heidelberg.de>

⁶ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>

Kolejnym krokiem było zaplanowanie cyklu badań mających na celu poznanie funkcji tych białek, jak również ich właściwości fizykochemicznych i strukturalnych, które mogłyby stanowić podstawę terapeutycznego i biotechnologicznego wykorzystania nowo odkrytych depolimeraz. **Białko kodowane przez faga KP36 zostało zidentyfikowane i scharakteryzowane w publikacji H2 pod nazwą depoKP36.** W niniejszym opracowaniu oraz w publikacji H4 zostało oznaczono jako KP36gp50. **Natomiast białka kodowane przez faga KP32 i opisane w publikacji H3 nazwano KP32gp37 i KP32gp38.** Warto zaznaczyć, iż **publikacja H2 stanowi pierwsze doniesienie naukowe, w którym scharakteryzowano depolimerazę kodowaną przez sifowirusa specyficznego wobec *K. pneumoniae*.** Uzyskane wyniki badań zostały również zaprezentowane w formie referatu (Załącznik 4A, pkt II.3b) oraz plakatów na czterech konferencjach międzynarodowych (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 10, 18, 19 i 20).

Te badania realizowałam jako wykonawca w ramach finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) projektu badawczego nr 2017/26/M/NZ1/00233 oraz polsko-włoskiego projektu nr 0015976 (Załącznik 4A, pkt II.5).

STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA CHARAKTERYSTYKA REKOMBINOWANYCH DEPOLIMERAZ FAGOWYCH

Aby uzyskać białka KP36gp50, KP32gp37 i KP32gp38 w formie rekombinowanej, wytypowane sekwencje nukleotydowe kodujące depolimerazy sklonowano do wektorów pEXP5-NT/TOPO lub pEXP5-CT/TOPO, a następnie poddano heterologicznej ekspresji w komórkach *E. coli*. Uzyskane białka oczyszczano dwuetapowo, stosując chromatografie powinowactwa oraz wykluczenia. W rezultacie **otrzymano trzy nowe białka charakteryzujące się wysoką homogennością**, co potwierdzono elektroforetycznie w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Podczas gdy KP36gp50 i KP32gp38 migrowały w postaci oddzielnych prążków widocznych w żelu na wysokości odpowiadającej przewidywanej masie cząsteczkowej ich monomeru (odpowiednio ~94 kDa i ~62 kDa), to prążek dla KP32gp37 pojawił się na wysokości niższej niż przewidywana. Tym samym **eksperymentalnie potwierdziliśmy obecność domeny opiekuńczej w regionie C-końcowym KP32gp37**, której autoproteolityczne usunięcie jest niezbędne do prawidłowego zwijania białka i uzyskania stabilnej kinetycznie konformacji. **Udokumentowaliśmy również** typowy dla RBP wirusów [Weigele i wsp., 2003], **trimeryczny stopień oligomeryzacji każdego z trzech białek**, stosując metody chromatografii wykluczenia sprzężonej z detektorem rozpraszania światła (SEC-MALS) oraz elektroforezy natywnej. Ponadto **przebieg widm dichroizmu kołowego (CD)**, wykazujący minimum absorpcji pomiędzy 210 a 220 nm i dodatnie maximum pomiędzy 195 a 200 nm, **potwierdził istotną dla stabilności termodynamicznej, dużą zawartość struktury drugorzędowej typu β -kartki w prawidłowo sfaldowanych białkach rekombinowanych.** Za pomocą narzędzi oferowanych przez serwery Expasy⁷ wyznaczyliśmy długość sekwencji aminokwasowych, punkty izoelektryczne i masy cząsteczkowe rekombinowanych depolimeraz, których wartości dla form trimerycznych potwierdziliśmy również eksperymentalnie (tab. 2).

Badania nad uzyskaniem rekombinowanych białek prowadziłam wspólnie ze studentką, Agnieszką Łątką, która realizowała pod moją opieką pracę magisterską a obecnie uzyskała już tytuł doktora po kierunkiem prof. Zuzanny Drulis-Kawy. Natomiast analizy strukturalne białek w

⁷ <https://web.expasy.org/protparam/>

roztworach przeprowadziłam we współpracy z Zespołem prof. Rity Berisio, specjalizującej się w badaniach strukturalnych białek, podczas dwóch staży badawczych w *Institute of Biostructures and Bioimaging, National Research Council* w Neapolu.

Ze względu na brak uniwersalnej metody oceny aktywności depolimeraz, w celu określenia wpływu stężenia jonów wodorowych oraz temperatury na stabilność tych białek, zoptymalizowałam metody badawcze i wprowadziłam odpowiednie protokoły metodologiczne, z użyciem bakteryjnego EPS oraz orto-nitrofenylo- α -D-galaktopiranozydu (ONPG) jako substratów. Uzyskane wyniki analiz w dużej mierze okazały się zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi [Kassa i Chhibber, 2012; Lin i wsp., 2014]. Stwierdziłmy, że **depolimerazy pochodzące z fagów KP36 i KP32 zachowują aktywność w zakresie pH od 4.0 do 9.0, z niewielkim przesunięciem w kierunku warunków bardziej kwaśnych lub alkalicznych (w zależności od białka), oraz w zakresie temperatur od 20°C do 50°C. Badane depolimerazy charakteryzowały się także relatywnie wysokimi temperaturami topnienia**, wyznaczonymi metodą spektroskopii CD, a w przypadku KP32gp37 również opornością na działanie proteazy i detergentu. **Ta wysoka stabilność wskazuje, że aktywność depolimeraz może być zachowana zarówno w naturalnych warunkach środowiskowych, jak i w organizmie człowieka. Te właściwości otwierają nowe perspektywy dla zastosowań biotechnologicznych tych białek, w tym produkcji powlekanych narzędzi i urządzeń medycznych, monitorowania biofilmu czy też analizy glikanów.**

Specyficzność substratową rekombinowanych depolimeraz wobec całych komórek bakteryjnych oraz wyizolowanych z nich (egzo)polisacharydów oceniono łącząc klasyczne podejście mikrobiologiczne (test spotowy) z testami biochemicznymi. Typowanie antygeny K szczepów *K. pneumoniae* wykorzystanych w **publikacji H2** wykonano w oparciu o analizę sekwencji genu *wzi* kodującego białko błony zewnętrznej *Wzi*, w *Statens Serum Institute* w Kopenhadze, we współpracy z prof. Carsten Struve. **Uzyskane wyniki potwierdziły wąskie spektrum działania depolimeraz, ograniczone do szczepów o serotypie otoczkowym K63 dla KP36gp50, K3 dla KP32gp37 oraz K21 dla KP32gp38.** Specyficzność depolimeraz kodowanych przez faga KP32 i pokrywających zasięg jego aktywności litycznej zweryfikowano także metodą ilościowego oznaczenia kwasu glukuronowego w CPS, wyekstrahowanym z bakterii rosnących w obecności każdego z enzymów. Natomiast wyniki analizy zymograficznej, potwierdzające zdolność KP36gp50 do degradacji EPS macierzy biofilmu, dostarczyły kolejnego dowodu na to, iż te enzymy mogą być przydatnym narzędziem do walki z biofilmem.

Warto również zauważyć, że struktura antygeny K63 *K. pneumoniae* [Joseleau i Marais, 1979] jest identyczna z CPS serotypu K42 bakterii z gatunku *E. coli* [Niemann i wsp., 1978]. To potencjalnie poszerza spektrum bakterii wrażliwych na ten enzym i stanowi dodatkowe potwierdzenie znaczącej roli nowo odkrytej aktywności enzymatycznej.

Wnioski wynikające z eksperymentów przeprowadzonych przy użyciu rozmaitych technik (tab. 2) potwierdziły hipotetyczny model strukturalny wytypowanych białek fagowych oraz tezę, że **depolimerazy pochodzące z fagów KP36 i KP32 tworzą stabilne białka trimeryczne, z dominującą zawartością β -helisy w strukturze drugorzędowej. Uzyskane białka rekombinowane charakteryzują się odmienną specyficznością substratową, ograniczoną do serotypów otoczkowych K63, K21 lub K3 *K. pneumoniae*, pozostają stabilne w warunkach umiarkowanie kwaśnych lub umiarkowanie zasadowych i są mezofilne.**

Tabela 2. Strukturalne i biologiczne właściwości rekombinowanych depolimeraz fagowych

WŁAŚCIWOŚCI	KP36gp50	KP32gp37	KP32gp38	ZASTOSOWANA METODA
specyficzność wobec serotypu CPS	K63	K3	K21	test spotowy, zymografia, analiza kwasu uronowego
liczba aminokwasów	883	869	578	serwer ExPASy - ProtParam
teoretyczny pI	5.0	5.28	7.57	serwer ExPASy - ProtParam
masa cząsteczkowa (kDa)	93.4	95.35	61.87	serwer ExPASy - ProtParam
stopień oligomeryzacji (kDa)	255	259.5 ± 0.52	179.4 ± 0.54	SEC-MALS, elektroforeza natywna w żelu poliakrylamidowym
struktura II-rzędowa	głównie β-kartka	głównie β-kartka	głównie β-kartka	spektroskopia CD
temperatura topnienia (T_m)	65 °C	74 °C	56 °C	spektroskopia CD
termostabilność	do 45 °C	do 45 °C	do 50 °C	test zmętnienia EPS lub test ONPG
stabilność w pH	4 – 7	4 – 6	6 – 9	test zmętnienia EPS lub test ONPG
podatność na SDS	wrażliwa	oporna	wrażliwa	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
podatność na proteolizę	wrażliwa	oporna	wrażliwa	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

DEPOLIMERAZY FAGOWE WSPOMAGAJĄ WRODZONĄ ODPOWIEDŹ GOSPODARZA W OBRONIE SKIEROWANEJ PRZECIW *K. PNEUMONIAE*

Ze względu na zewnątrzkomórkową lokalizację i właściwości, CPS odgrywa ważną rolę nie tylko w interakcji fag-bakteria, ale również w interakcji między bakterią a układem odpornościowym gospodarza, a tym samym w rozwoju zakażenia. Wykazano, iż otoczkowe szczepy *K. pneumoniae*, w porównaniu z ich bezotoczkowymi mutantami czy szczepami słabo otoczkującymi, są znacznie słabiej fagocytowane przez komórki żerne [March i wsp., 2013] a także wykazują słabsze właściwości adhezyjne do komórek nabłonkowych [Tan i wsp., 2020a] oraz mniejszą podatność na przeciwdrobnoustrojowe peptydy kationowe [Li i wsp., 2014]. Stwierdzono również, że CPS pokrywając antygen O cząsteczki LPS lub OMP, a także inne epitopy na powierzchni komórki rozpoznawane przez przeciwciała, może hamować aktywację kaskady dopełniacza i w konsekwencji zabijanie bakterii przy jego udziale [Doorduyn i wsp., 2016]. Oporność na ww. mechanizmy obronne jest również związana z różnicami w strukturze powtarzającej się podjednostki cukrowej określonego serotypu CPS i zdolnością niektórych szczepów do jej modyfikowania [Sahly i wsp., 2009].

Zatem niezwykle istotne znaczenie w ocenie potencjału antywirulentnego depolimeraz, a tym samym w realizacji celu, który od początku towarzyszył moim badaniom nad depolimerazami, było uzyskanie odpowiedzi na dwa pytania. 1) *Czy enzymy kodowane przez fagi mogą przeciwdziałać ochronnej roli CPS i znieść oporność bakterii otoczkowych na mechanizmy obrony wrodzonej gospodarza, takie jak aktywność lityczna dopełniacza i fagocytoza?* 2) *Jeśli tak, to jaką rolę w tych procesach odgrywa serotyp CPS i specyficzność depolimerazy?*

W modelu badawczym *in vitro*, oceniającym działanie dopełniacza oraz komórek fagocytarnych linii THP1 wobec bakterii eksponowanych na swoiste względem serotypu otoczkowego depolimerazy, wykorzystałam cztery szczepy *K. pneumoniae*, w tym jeden o serotypie K3, podatny na depolimerazę KP32gp37 (szczep Kp271) i trzy szczepy o serotypie K21, wrażliwe na KP32gp38 (szczepy Kp45, Kp358 i Kp968). Ocenę lektynofagocytozy przeprowadziłam z zastosowaniem dwóch metod, tj. cytometrii przepływowej, oceniającej pochłanianie bakterii przez monocyty oraz klasycznego testu wysiewu z rozcieńczeń, określającego internalizację i zabijania bakterii przez makrofagi.

W oparciu o test spontanicznej bakteriobójczości surowicy ludzkiej stwierdziłam, że **depolimerazy fagowe znoszą oporność *K. pneumoniae* na lityczne działanie dopełniacza, w sposób zależny od serotypu CPS.** Poza K3 do potwierdzonych obecnie serotypów CPS, po degradacji których *K. pneumoniae* staje się wrażliwa na dopełniacz, należą również: K2, K5, K8, K30/K69, K57, K64 oraz KN3 i KN4 [Pan i wsp., 2015, 2019; Hsieh i wsp., 2017; Volozhantsev i wsp., 2020]. Powtarzającą się jednostką strukturalną CPS serotypu K3 i K21 jest pentasacharyd, złożony z mannozy, galaktozy i kwasu glukuronowego w stosunku molowym odpowiednio 3:1:1 i 2:2:1 [Dutton i Choy, 1972; Dutton i wsp., 1986]. To pozwoliło stwierdzić, że **nawet niewielkie różnice w strukturze i składzie CPS są ważniejsze dla ochrony bakterii przed zabijaniem za pośrednictwem dopełniacza niż ilość CPS wytwarzanego przez komórki poddane działaniu depolimerazy.** Niemniej jednak, wysoka swoistość depolimeraz może okazać się niezwykle przydatna w opracowywaniu terapii celowanej przeciwko szczepom *Klebsiella* o zdefiniowanym antygenie K.

Skład cukrowy CPS może również tłumaczyć wzmożoną fagocytozę *K. pneumoniae* eksponowanych na działanie specyficznych depolimeraz, co potwierdzono statystycznie istotnym poziomem redukcji liczby bakterii. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest odsłonięcie i/lub odpowiednia prezentacja wcześniej niedostępnych reszt mannozy dla receptorów mannozowych makrofagów, co prowadzi do rozpoznania ligandu, pochłonięcia i zabicia patogenu. Jednak obserwowane zwiększone pochłanianie bakterii (z wyjątkiem szczepu Kp45) przez monocyty, które nie wykazują ekspresji tych receptorów [Shepherd i wsp., 1982] sugeruje, że także inne receptory lub mechanizmy mogą być zaangażowane w ten proces.

Wirulencję szczepów *K. pneumoniae* potraktowanych depolimerazami oraz potencjał terapeutyczny tych enzymów oceniłam również *in vivo* w modelu *Galleria mellonella*. Wybór owadziego modelu infekcyjnego podyktowany był względami etycznymi oraz faktem, iż wrodzona odpowiedź immunologiczna owadów w wielu aspektach odzwierciedla mechanizmy obronne uruchamiane u organizmów wyższych w następstwie zakażenia tym patogenem [Insua i wsp., 2013]. Wykazałam, że bakterie preinkubowane z depolimerazą przed inokulacją cechują się słabszą wirulencją *in vivo* w porównaniu do bakterii uprzednio nietraktowanych enzymem. Również pojedyncza dawka depolimerazy podana do hemocelu, w przeciągu paru minut od iniekcji bakterii, znacząco wydłużyła okres przeżycia zainfekowanych larw. **Zmiany w przeżywalności owadów były zależne od szczepu *K. pneumoniae* i czasu obserwacji, nie były natomiast zależne od serotypu CPS.** Znalazło to odzwierciedlenie w wynikach badań przy użyciu szczepów o serotypie K63, K3 i dwóch z trzech szczepów o serotypie otoczkowym K21. Wyjątek stanowił szczep Kp45, w którym degradacja CPS przez depolimerazę nie wpłynęła znacząco na pochłanianie przez

fagocyty, co należałoby uznać za najbardziej prawdopodobną przyczynę braku skuteczności KP32gp38 w leczeniu larw owadzych zakażonych bakteriami.

Wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* i *in vivo* pozwoliły wysnuć wniosek, że **depolimerazy pochodzenia fagowego, ukierunkowane na CPS typu K3, K21 i K63, uwrażliwiają bakterie na wybrane mechanizmy odpowiedzi nieswoistej gospodarza redukują wirulencję *K. pneumoniae* i mogą być uznane za obiecujące czynniki antywirulentne.** Wykorzystując te podstawowe badania oraz możliwości stwarzane przez rozwój inżynierii białek [Dunne i wsp., 2019] i biologii syntetycznej [Pirnay, 2020], nowo scharakteryzowane depolimerazy mogą stanowić podstawę do projektowania produktów fagowych lub syntetycznych enzymów o zoptymalizowanej aktywności, zwłaszcza że struktura kryształu Kp32gp38 została już rozwiązana [Squelia i wsp., 2020]. Ich zastosowanie mogłoby przynieść wymierne korzyści zarówno w sektorze medycznym, jak i rolnospożywczym oraz biotechnologicznym.

OPORNOŚĆ *K. PENUMONIAE* NA CZYNNIKI ANTYWIRULENTNE

H4. Kaszowska M, Majkowska-Skrobek G, Markwitz P, Lood C, Jachymek W, Maciejewska A, Lukaszewicz J[✉], Drulis-Kawa Z[✉]. The mutation in *wbaP cps* gene cluster selected by phage-borne depolymerase abolishes capsule production and diminishes the virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22: 11562.

Rozważania teoretyczne oraz wyniki nielicznych badań eksperymentalnych [Oliveira i wsp., 2019] sugerują niskie prawdopodobieństwo rozprzestrzeniania oporności na czynniki antywirulentne. Postawiono hipotezę, że jeśli ‘rozbrojenie’ komórki z czynnika wirulencji nie ma wpływu na wzrost bakterii, to warianty odporne mogą być generowane, ale nie powinny dominować z uwagi na brak przewagi sprawnościowej w odniesieniu do szczepu dzikiego [Russo i wsp., 2016]. Chociaż trudno sobie wyobrazić, że bakterie eksponują cechy, które nie mają żadnego wpływu na ich wzrost i/lub przetrwanie, to przykład oporności *P. aeruginosa* na inhibitory *quorum sensing* oraz inhibitory piowerdyny wydaje się potwierdzać to założenie [Imperi i wsp., 2019].

W alternatywnym scenariuszu zaproponowano, że rozprzestrzenianie się klonów opornych na środki antywirulentne może zależeć od ‘publicznej dostępności’ docelowego czynnika wirulencji w populacji bakterii. O ile czynniki wydzielane poza komórkę i/lub dzielone między patogenami są ‘dobrem publicznym’, z którego mogą korzystać zarówno subpopulacje odporne jak i bakterie typu dzikiego (wrażliwe), o tyle zindywidualizowane czynniki wirulencji (zwykle związane z komórką) są dobrem prywatnym, z którego korzysta tylko populacja oporna, zapewniając sobie w ten sposób selektywną przewagę nad populacją podatną [Allen i wsp., 2014; Maura i wsp., 2016].

Ponieważ powyższe hipotezy nie zostały jednoznacznie udowodnione ani rygorystycznie przetestowane w odniesieniu do depolimeraz fagowych, to celem kolejnych badań zaprezentowanych w cyklu habilitacyjnym [**publikacja H4**] było poznanie mechanizmu oporności bakterii na te enzymy oraz jej wpływu na sprawność i wirulencję *K. pneumoniae*. Szczególne znaczenie miało zbadanie, czy oporność na depolimerazy jest związana ze zmianami w strukturze osłon komórkowych bakterii oraz czy zmiana fenotypu populacji odpornej wpływa na tempo wzrostu bakterii a także ich podatność na mechanizmy odpowiedzi nieswoistej gospodarza i czynniki przeciwbakteryjne.

Do selekcji mutantów z populacji *K. pneumoniae* wykorzystałam rekombinowaną depolimerazę KP36gp50, zidentyfikowaną i scharakteryzowaną jako czynnik antywirulentny, w ramach badań przedstawionych w **publikacji H2** osiągnięcia naukowego. Rezultaty przeprowadzonej przez nas kompleksowej analizy genomów mutanta oznaczonego jako Kp7De i szczepu rodzicielskiego zostały uzupełnione o wyniki analiz strukturalnych polisacharydów powierzchniowych (CPS/LPS/EPS), które uzyskano we współpracy z grupą prof. Jolanty Łukasiewicz z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk (IITD PAN) we Wrocławiu, oraz wyniki badań funkcjonalnych.

Stwierdziliśmy, że **kluczową rolę w nadawaniu oporności *K. pneumoniae* na depolimerazę skierowaną przeciwko CPS typu K63 odgrywa mutacja punktowa i przesunięcie ramki odczytu w genie *wbaP*, zlokalizowanym w locus *cps***. Glikozylotransferazą WbaP pośredniczy w przeniesieniu galaktozy-1-fosforanu na nośnik lipidowy – fosforan undekaprenyłu (Und-P) i tym samym inicjuje syntezę powtarzalnej jednostki CPS grupy I u *E. coli* [Whitfield, 2006]. Brak typowych dla antygeny K63 reszt cukrowych w polisacharydach wyekstrahowanych z hodowli mutantu Kp7De potwierdziliśmy metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Tym samym po raz pierwszy udowodniliśmy, że **utrata WbaP w populacji *K. pneumoniae* pod wpływem depolimerazy powoduje zatrzymanie syntezy CPS na pierwszym z możliwych etapów. Dostarczyliśmy również nowych danych dotyczących strukturalnego zróżnicowania w obrębie antygeny K63 *K. pneumoniae***. W porównaniu z wcześniej zidentyfikowanej strukturą $\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3\text{)-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 3\text{)-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow$ (Joseleau i Marais, 1979; Dutton i Merrieffield, 1982), CPS wyizolowany ze szczepu dzikiego był pozbawiony typowych dla tego antygeny grup formylowych i O-acetylowych. **Kolejną interesującą obserwacją było stwierdzenie prawie 8-krotnie większej ilości LPS w mutancie Kp7De, ze wskazaniem na dłuższe łańcuchy O-swoiste**. Skład cukrowy łańcuchów w zmutowanym izolacie oraz w szczepie typu dzikiego był identyczny i pokrywał się zarówno z widmem referencyjnym antygeny O1v2 (szczep Kp24), jak i z serotypem LPS zidentyfikowanym za pomocą narzędzia *Kaptive Web* [Wick i wsp., 2018].

Modyfikacje powierzchniowych glikopolimerów w komórkach mutantu Kp7De sugerują koszt, jaki ponosi *K. pneumoniae* ewoluując oporność na depolimerazę. Utrata CPS w wyniku mutacji w genie, którego produkt inicjuje szlak biosyntezy CPS, wydaje się zapewniać bakteriom najlepsze warunki do przeżycia. To bowiem zmniejsza ryzyko akumulacji metabolitów wtórnych, które mogą wykazywać zarówno właściwości cytotoksyczne, jak również prowadzić do innych niepożądanych efektów ubocznych w komórce. Z kolei związane z utratą WbaP przekierowanie Und-P na szlak biosyntezy części O-swoistej LPS wydaje się kompensować brak CPS i pozwala bakteriom zachować integralność błony komórkowej. W efekcie wzrost populacji odpornej był porównywalny ze wzrostem bakterii typu dzikiego, co zostało potwierdzone eksperymentalnie. Tym samym **dostarczyliśmy dowodów na poparcie hipotezy, że koszt związany z opornością *K. pneumoniae* na depolimerazy nie zapewnia populacji odpornej przewagi sprawnościowej w odniesieniu do tempa wzrostu populacji podatnej i najprawdopodobniej będzie czynnikiem ograniczającym jej dominację w środowisku**.

Warto również zauważyć, iż profil wrażliwości mutantu Kp7De na fagi rozpoznające różne typy receptorów komórkowych pokrywał się z profilem charakteryzującym odporne populacje bakterii, do selekcji których wykorzystano fagi ukierunkowane na ten sam co depolimeraza serotyp

CPS [publikacja H5]. Wskazuje to, iż **indukowane depolimerazą zmiany w zewnątrzkomórkowych glikopolimerach *K. pneumoniae* warunkują (krzyżową) oporność na fagi i depolimerazy rozpoznające ten sam receptor komórkowy. Jednocześnie, poprzez odsłonięcie receptorów uprzednio ‘zawoalowanych’ ochronną warstwą CPS, nadają bakteriom wrażliwość na inne, wcześniej nieaktywne wobec nich fagi.** Podobny efekt zaobserwowano na murawie bakteryjnej szczepu typu dzikiego po ekspozycji na depolimerazę oraz specyficzne i niespecyficzne fagi. Oznacza to, że przy projektowaniu koktajli złożonych z depolimeraz i fagów należy nadać priorytet selekcji pod kątem specyficzności wobec kolejno odsłanianych receptorów, a nie skuteczności określonej in vitro wobec wrażliwej bakterii docelowej.

Ponieważ zarówno CPS, jak i O-antygen LPS są kluczowymi wyznacznikami fenotypów istotnych z medycznego punktu widzenia, w kolejnym etapie badań podjęłam się wyjaśnienia roli, jaką odgrywa utrata CPS i związana z tym nadprodukcja LPS w interakcji *K. pneumoniae* z komórkami gospodarza. W oparciu o wyniki testów (lektyno)fagocytozy, stwierdziłam, że selekcjonowane przez depolimerazę zmiany w strukturze osłon komórkowych zwiększają podatność *K. pneumoniae* na fagocytozę przez monocyty linii THP-1. Ta obserwacja jest zgodna z wynikami naszych wcześniejszych badań [publikacja H3] i potwierdza, że **usunięcie CPS sprzyja procesowi fagocytozy. Ponadto większa dostępność adhezyn na powierzchni komórek bakteryjnych, wcześniej ukrytych pod warstwą CPS, lub ich nadekspresja, gdy synteza CPS jest wyłączona** [Favre-Bonte i wsp., 1999], **zwiększyła właściwości adhezyjne fenotypowo zmienionych bakterii, jak również ich internalizację przez ludzkie komórki płuc linii A549.** Internalizacja bakterii przez komórki nefagocytarne w połączeniu z fagocytozą może stanowić wrodzony mechanizm obronny powstrzymujący infekcje, co zostało zasugerowane w przypadku niektórych patogenów układu oddechowego, w tym *K. pneumoniae* [de Astorza i wsp., 2004]. Niestety, nie zaobserwowano, aby przemodelowanie osłon komórkowych uwrażliwiło populację oporną *K. pneumoniae* na lityczne działanie układu dopełniacza.

Uzyskane rezultaty uzupełniają wyniki badań zaprezentowanych w **publikacji H5** cyklu habilitacyjnego oraz prace innych autorów [Hesse i wsp., 2020; Tan i wsp., 2020b] dotyczące oporności *K. pneumoniae* na fagi (białka fagowe) warunkowanej zmianami w genie *wbaP* lub *wcaJ* (odpowiednik genu *wbaP* w szczepach, w których do inicjacji syntezy CPS wykorzystywany jest glukozo-1-fosforan). Jednocześnie wnioski płynące z analiz zaprezentowanych w publikacji H4 oraz wcześniejszych obserwacji [publikacja H3] pogłębiają wiedzę na temat konsekwencji zmian fenotypu *K. pneumoniae* pod wpływem depolimeraz fagowych. Wynika z nich, iż **zmiany w strukturach powierzchniowych bakterii związane z opornością na depolimerazy lub wynikające z ich działania enzymatycznego mogą uwrażliwić *K. pneumoniae* na mechanizmy komórkowej odpowiedzi nieswoistej gospodarza i wcześniej nieaktywne fagi. To ma szczególne znaczenie dla opracowywania strategii terapeutycznej z wykorzystaniem depolimeraz i odpowiada za skuteczność leczenia z ich udziałem.** I chociaż można oczekiwać, że niezależnie selekcjonowane populacje odporne na depolimerazy mogą mieć różne mutacje w locus *cps*, to ich fenotypy prawdopodobnie będą podobne lub identyczne. Należy również przypuszczać, że analogiczne zmiany mogą być charakterystyczne także dla innych bakterii otoczkowych z grupy ESKAPE, takich jak *A. baumannii* czy *Enterobacter* spp., u których szlak biosyntezy CPS jest zależny od Wzx/Wzy. To, w pewnym sensie, nadaje tym wynikom bardziej uniwersalny charakter.

Uzyskane wyniki zaprezentowaliśmy także w postaci plakatu na 6th *Viruses of Microbes Meeting* w Guimarães w Portugalii oraz na Sympozjum Bakteriofagowym w Gdańsku (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 23 i 36).

ODPOWIEDŹ *K. PNEUMONIAE* NA INFEKCJĘ FAGIEM LITYCZNYM

H5. Majkowska-Skrobek G[✉], Markwitz P, Sosnowska E, Lood C, Lavigne R, Drulis-Kawa Z[✉]. The evolutionary trade-offs in phage-resistant *Klebsiella pneumoniae* entail cross-phage sensitization and loss of multidrug resistance. *Environ. Microbiol.*, **2021**, 23(12): 7723-7740.

Celem kolejnych badań wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego [**publikacja H5**] było poznanie odpowiedzi adaptacyjnej *K. pneumoniae* na fagi lityczne ukierunkowane na CPS oraz następstw interakcji fag-bakteria dla terapii fagowej i/lub antybiotykoterapii, a także dla wirulencji patogenu. W badaniach weryfikowano **hipotezę badawczą, zgodnie z którą mutanty bakteryjne odporne na fagi *Klebsiella* są bardziej podatne na inne czynniki antybakteryjne oraz mechanizmy obrony nieswoistej gospodarza**. Istotnym było również zbadanie wpływu, jaki na oporność w ewoluujących układach bakteryjno-fagowych ma morfotyp faga oraz środowisko abiotyczne oraz to, czy zmiany obserwowane u jednego szczepu bakteryjnego pojawiają się również u innego.

Przedmiotem badań była kolekcja mutantów *K. pneumoniae*, która powstała w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN (nr 015/18/M/NZ6/00413) i związanej z nim pracy doktorskiej mgr Eweliny Sosnowskiej, w realizacji której pełniłam funkcję promotora pomocniczego. Do selekcji 112 mutantów z populacji dwóch szczepów klinicznych (Kp77 i Kp486), bytujących w biofilmie, wykorzystano fagi KP34 i KP36, które różnią się pozycją taksonomiczną, morfotypem (podowirus vs sifowirus) i wielkością genomu (tab. 1). Cechą łączącą obydwie fagi jest zakres gospodarza, ograniczony do szczepów *K. pneumoniae* z antygenami K63 i O1v2. Przy doborze ww. szczepów bakteryjnych uwzględniliśmy wstępne wyniki analiz ich genomów oraz cech fenotypowych. Do badań wybraliśmy szczepy *K. pneumoniae* typu sekwencyjnego (ST) 111 z 99% podobieństwem sekwencji genomu, które cechuje (i) zestaw czterech prawie identycznych, nienaruszonych profagów (identyczność sekwencji na poziomie 99,98%-100% przy 99%-100% pokrycia), (ii) oporność na surowicę ludzką oraz (iii) obecność dwóch różnych plazmidów.

Wybrane szczepy charakteryzują się również odmiennym zestawem kodowanych plazmidowo determinant oporności, co znalazło odzwierciedlenie w profilach wrażliwości na antybiotyki. Szczep Kp77 był wielolekooporny i wytwarzał β -laktamazy typu ESBL, warunkujące oporność na cefalosporyny oraz monobaktamy. Pozostawał on również odporny na sulfonamidy i gentamycynę, ale jednocześnie zachowywał wrażliwość na inne β -laktamy (piperacylina z tazobaktamem i meropenem), ciprofloksacynę i kolistynę. Natomiast szczep Kp486 wykazywał jedynie naturalną oporność na aminopenicyliny. W celu sprawdzenia, czy oporność na fagi może ewoluować bez presji wynikającej z ich aktywności litycznej, a jedynie jako efekt naturalnej adaptacji bakterii do osiadłego trybu życia, w badaniach uwzględniono również 25 losowo wybranych izolatów z populacji kontrolnej, nietraktowanej fagiem. Badane mutanty poddano wielokierunkowym analizom pod względem oporności na (i) fagi, rozpoznające różne receptory bakteryjne, (ii) lityczne działanie dopełniacza oraz (iii) na antybiotyki.

W oparciu o profile oporności na fagi, wyznaczone dwoma metodami w układach homo- i heterologicznych, stwierdziliśmy, że **pojedyncze fagi selekcionują (krzyżową) oporność na fagi, które wykorzystują ten sam typ receptora komórkowego w procesie adsorpcji. To zjawisko było niezależnie od przynależności taksonomicznej faga, szczepu *K. pneumoniae* i czasu wzrastania w biofilmie.** Warto przy tym zauważyć, że **oporne mutanty *K. pneumoniae* jednocześnie nabywają wrażliwość na fagi ukierunkowane na alternatywne receptory, uprzednio ukryte pod ochronną warstwą CPS i zachowują niewrażliwość na te fagi, które wykorzystują odmienny typ CPS w procesie infekcji.** Ciekawym spostrzeżeniem było także i to, iż w populacjach kontrolnych obu szczepów, nietraktowanych fagami, dominowały profile oporności analogiczne do tych, które uzyskano po selekcji sifowirusem KP36. To wskazuje, że ten fenotyp może również ewoluować w następstwie adaptacji bakterii do specyficznych warunków abiotycznych. Ponadto wykazałam, że **kombinacje fagów, z których jeden rozpoznaje CPS, a drugi alternatywny receptor, przypuszczalnie natury białkowej, opóźniają pojawienie się oporności *K. pneumoniae* na fagi.** Ta obserwacja ma istotne znaczenie praktyczne dla projektowania koktajli fagowych, które mogą zagwarantować skuteczność tego typu terapii. Takie koktajle w swoim składzie powinny zawierać wzajemnie uzupełniające się fagi, które celują w różne receptory i to nawet wówczas, gdy wstępne badanie *in vitro* zakresu gospodarza dla każdego z nich osobno nie potwierdzają ich specyficzność wobec bakterii docelowej.

Aby wyjaśnić oporność fenotypową na poziomie genomowym, **zsekwencjonowaliśmy genomy 31 izolatów *K. pneumoniae*, w tym 21 z populacji selekcionowanej fagami i 10 z populacji kontrolnej.** Otrzymane sekwencje wraz z dwoma sekwencjami genomów szczepów rodzicielskich zostały zdeponowane w bazie NCBI GenBank, w ramach prezentowanego osiągnięcia. Kompleksową analizę danych sekwencjonowania, w tym plazmidów mogących przenosić determinanty oporności wykonaliśmy przy użyciu jedenastu narzędzi bioinformatycznych. Analizy przeprowadziliśmy we współpracy z prof. Robem Lavigne i Cedric Lood z *Laboratory of Gene Technology*, KU Leuven w Belgii. Oceniliśmy również zmiany w (egzo)polisacharydach eksponowanych na powierzchni komórki, a także koszt przystosowania izolatów do czynników selekcyjnych w kategoriach wzrostu bakterii w nieobecności faga.

W efekcie **zidentyfikowaliśmy dwa różne i niewykluczające się wzajemnie mechanizmy leżące u podstaw (krzyżowej) oporności *K. pneumoniae* ST111 na fagi.** Oba mechanizmy są oparte o modyfikacje struktury powierzchniowej komórek, co wskazuje na blokowanie adsorpcji fagów do ich powierzchni. Pierwszy z nich obejmuje zmiany w obrębie klastra genów *cps*, których produkty są zaangażowane w szlak biosyntezy otoczki, co wykazano również w wyniku badań nad *K. pneumoniae* ST258 [Ernst i wsp., 2020; Hesse i wsp., 2020; Tan i wsp., 2020b; De Angelis i wsp., 2021]. Jako kluczowe zidentyfikowano mutacje (i) punktowe, w tym mutacje zmiany sensu i nonsensowne w genie *wzc* kodującym kinazę tyrozynową oraz (ii) zmieniające ramkę odczytu (*frameshift*) w *wzc*, a także w genach *wbaP* i *wcaI*, kodujących odpowiednio glikozylotransferazę inicjującą biosyntezę CPS i transferazę fukozyliu.

Drugi mechanizm oporności obejmuje adaptacyjne zmiany jakościowe w (egzo)polisacharydach eksponowanych na powierzchni komórki (warianty mukoidalne), które w konsekwencji zapobiegają przyłączeniu fagów do specyficznych receptorów. Oceniając zdolność izolatów do tworzenia śluzowatych kolonii na podłożu z krwią wykazaliśmy, że **nadprodukcja (egzo)polisacharydów i związana z tym konwersja fenotypu z niemukoidalnego na mukoidalny,**

zapewnia oporność krzyżową na fagi u 48% izolatów, zarówno w populacji mutantów wyselekcjonowanych fagami, jak i w populacji kontrolnej. Zmiana fenotypu bakterii na mukoidalny pozostawała istotnie zależna od szczepu *K. pneumoniae*, co potwierdzono analizą wieloczynnikową danych pomiarowych z wykorzystaniem regresji logistycznej. I choć wyniki analizy jednoczynnikowej wskazywały, iż mukoidalny fenotyp szczepu Kp486 kształtuje presja selekcyjna faga, podczas gdy dla szczepu Kp77 istotnym był czas wzrostu bakterii w biofilmie, to jednak po dostosowaniu modelu te zależności okazały się statystycznie nieistotne.

Z kolei wyniki analiz bioinformatycznych wykazały, że podłoże genetyczne fenotypu mukoidalnego nie obejmuje mutacji w genach, które uczestniczą w regulacji ekspresji genów klastra *cps* u *Klebsiella*, w odpowiedzi na uwarunkowania środowiskowe [Walker i Miller, 2020]. Te mutanty nie są również nosicielami czynników powiązanych z wysoką zjadliwością i nadprodukcją CPS, takich jak RmpA/A2 czy aerobaktyna, które cechują azjatycką linię szczepów *K. pneumoniae* [Tan i wsp., 2019]. Natomiast zaobserwowano związek fenotypu mukoidalnego z mutacją zmiany sensu w genie *wzc*, choć nie zostało to wyraźnie podkreślone w publikacji H5. Te współistniejące zmiany pojawiały się w odpowiedzi zarówno na infekcje fagowe, jak i na specyficzne warunki panujące w biofilmie. Analogiczne mutacje w genie *wzc* współwystępujące z nadprodukcją CPS i zwiększoną wirulencją ujawniono również w klinicznych izolatach *A. baumannii* oraz *K. pneumoniae* ST258 [Geisinger i Isberg, 2015; Ernst i in., 2020]. Takiej korelacji nie zaobserwowano natomiast w przypadku mutantów noszących inne typy mutacji w genie *wzc* oraz w pozostałych genach szlaku biosyntezy CPS. Wyniki tych badań nie tylko pogłębiają zrozumienie genetycznego podłoża oporności *K. pneumoniae* na fagi oraz złożoności szlaku regulującego pojawianie się fenotypu mukoidalnego, ale także podkreślają konieczność uwzględnienia zmiennych abiotycznych, jeśli fagi mają stanowić podstawę terapii.

Nasze badania wykazały również, że w porównaniu do szczepu dzikiego **mutanty odporne na fagi charakteryzował spadek wartości trzech z czterech parametrów opisujących kinetykę ich wzrostu, a obserwowany efekt zależał od szczepu *K. pneumoniae* i był związany z fenotypem mukoidalnym** (Kp486 – mniej ‘sprawny’, bardziej mukoidalny). Natomiast oporność w populacjach kontrolnych była "bezkosztowa", na co wskazuje ich wzrost równoważny ze wzrostem szczepu dzikiego. Uznając za prawdziwą tezę, że CPS jest produktem ubocznym adaptacji bakterii do środowiska zewnętrznego [Rendueles i wsp., 2017], to należy wnioskować, że **nadprodukcja (egzo)polisacharydów wynikająca z interakcji z fagiem ukierunkowanym na CPS jest bardziej kosztowna niż zmiany genetyczne w klastrze genów odpowiedzialnych za biosyntezę receptora.**

Rozpatrując kwestię sprawności w kontekście zdolności bakterii do unikania mechanizmów obrony nieswoistej gospodarza wykazano, że w wyniku zmian selekcjonowanych przez fagi jedynie 15% mutantów z populacji Kp77 nabyło wrażliwość na lityczne działanie dopełniacza. Uzyskane wyniki nie wyjaśniły ani genetycznego podłoża zmiany fenotypu oporności na dopełniacz, ani też nie wykazały związku tego fenotypu z fenotypem mukoidalnym i niewątpliwie wymagają dalszych badań.

Oporność bakterii na fagi może być również modulowana przez pulę profagów obecnych w genomie bakterii, jak również przez różne mutacje, które plejotropowo mogą zmienić fenotyp bakterii, a tym samym ich wirulencję i/lub podatność na środki przeciwdrobnoustrojowe. Zmiany genetyczne zbadane pod kątem polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) obejmowały

mutacje punktowe w kilku różnych genach chromosomowych. Wśród nich były m. in. gen *rpoS*, kodujący czynnik sigma polimerazy RNA, *araA*, kodujący enzym uczestniczący w metabolizmie L-arabiny oraz gen *malt_3*, którego produkt reguluje operon maltozy na poziomie transkrypcji. Mutacje w tych genach odnotowano zarówno w populacji mutantów szczepu Kp77 wyselekcjonowanych przez podowirusa KP34, jak i wśród izolatów kontrolnych tego szczepu. Ich efektem mogą być zaburzenia w regulacji transkrypcji, naprawie i replikacji DNA, metabolizmie RNA oraz interakcjach białko-białko w różnych szlakach sygnalizacyjnych a w konsekwencji ucieczka profagów oraz elementów mobilnych. To zjawisko zostało potwierdzone w naszych badaniach i wiązało się z utratą jednego z czterech profagów i jednego z dwóch plazmidów w ww. populacjach szczepu Kp77. Równie interesujące następstwa mogą wynikać z mutacji indukowanych sifowirusem KP36 w genach *hfq* i *licC-4* mutantów szczepu Kp486. Produkty tych genów, tj. białko wiążące RNA oraz komponent IIC systemu fosfotransferazy (PST), są zaangażowane w tworzenie biofilmu oraz regulację aktywności operonów uczestniczących w metabolizmie związków węgla u bakterii. Utrata tych białek, w odpowiedzi na czynnik stresowy, prowadzi m. in. do zmian w składzie białek błony zewnętrznej i zwiększonej produkcji CPS, a zatem mogło to być przyczynkiem do zmiany zakresu gospodarza i konwersji fenotypowej.

Aby sprawdzić, czy presja selekcyjna spowodowana aktywnością lityczną fagów *Klebsiella* promuje kompromis między fenotypami oporności na fagi oraz antybiotyki i ostatecznie zweryfikować naszą hipotezę badawczą, określiliśmy profile antybiotykooporności analizowanych mutantów. Do tego celu wykorzystano wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost bakterii (MIC), które wyznaczyliśmy dla jedenastu rodzajów antybiotyków należących do ośmiu klas. W porównaniu do szczepów rodzicielskich, istotnych zmian we wrażliwości na antybiotyki nie wykazaliśmy w populacjach mutantów obu szczepów *K. pneumoniae* wyselekcjonowanych przez podowirusa KP34 oraz w izolatach kontrolnych. Jednocześnie, co jest bardzo ważne, udowodniliśmy, że **50% mutantów Kp77 wyselekcjonowanych przez sifowirusa KP36 wykazało zmianę profilu oporności. Z powodu dużych delecji w jednym z plazmidów i związanej z tym utraty klastra genów oporności wielolekowej (*bla_{CTX-M}*, *sul2*, *ant(3'')*), *folA* i *mph(E)/mph(G)*), te mutanty odzyskały wrażliwość na cefalosporyny i monobaktam, jak również na sulfonamidy/trimetoprim i aminoglikozydy.** Uzyskane wyniki są pierwszym opisanym w literaturze dowodem utraty zdolności *K. pneumoniae* do produkcji beta-laktamazy typu CTX-M i zmiany fenotypu ESBL-dodatniego na negatywny za pośrednictwem fagów. Prowadzi to do wniosku, że fagi poprzez selekcję oporności mogą sterować ewolucją w kierunku pożądanых atrybutów populacji bakterii takich jak podatność na dostępne leki przeciwbakteryjne. Przeprowadzone badania potwierdzają jednocześnie synergistyczny potencjał dla skojarzonej terapii antybiotykowo-fagowej.

Istotnym osiągnięciem było wykazanie, że oporność *K. pneumoniae* na infekcje fagowe, będąca wynikiem mutacji w klastrze biosyntezy otoczki i/lub zmian jakościowych w (egzo)polisacharydach, może być związana z utratą plazmidu lub delecją genów oporności wielolekowej, co przywraca wrażliwość *K. pneumoniae* na antybiotyki. Jednocześnie może to skutkować odsłonięciem odmiennego typu receptorów i uwrażliwieniem bakterii na inne fagi, prawie przy tym samym koszcie przystosowania. W świetle kompromisów ewolucyjnych promowanych przez fagi, wyniki badań przedstawionych w publikacji H5 pozwoliły na stwierdzenie, że **terapia fagowa może być podwójnie skuteczna. Sukces terapeutyczny zostaje**

osiągnięty, gdy fagi infekują i lizują docelowe bakterie, ale także wówczas, gdy bakterie ewoluując zmieniają swój fenotyp, a tym samym uwrażliwiają się na wcześniej nieaktywne wobec nich fagi i/lub antybiotyki. Można zatem stwierdzić, że fagi mogą być wykorzystywane nie tylko w oparciu o wiedzę na temat ich specyficzności wynikającej z aktywności litycznej, ale także w połączeniu z wiedzą a posteriori na temat ich receptorów komórkowych i mechanizmów oporności bakterii, a to znacznie poszerza spektrum możliwości terapeutycznych.

Wyniki tych badań przedstawiłam również w formie plakatu na 23rd *Biennial Evergreen International Phage Meeting* w USA oraz zaprezentowałam w formie wykładu na XXIX Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Warszawie (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 21 i pkt II.3b).

KOKTAJLE FAGOWE I KOMBINACJE DEPOLIMERAZA-FAG OGRANICZAJĄ EWOLUCJĘ OPORNOŚCI

H6. Smug BJ, Majkowska-Skropek G, Drulis-Kawa Z[✉]. PhREEPred: Phage Resistance Emergence Prediction web to foresee encapsulated bacterial escape from phage cocktail treatment. *J. Mol. Biol.*, **2022**, 4: 167670.

Jednym z rozwiązań stosowanych do poszerzenia zakresu gospodarzy dla fagów i obalenia krytyki ‘wąskiego spektrum’ ich działania jest łączenie wielu fagów i tworzenie koktajli fagowych. O fagach wchodzących w skład koktajli wiadomo (lub czasami zakłada się), że są ukierunkowane na różne struktury powierzchniowe bakterii docelowej, wykorzystywane jako receptory w procesie adsorpcji. I chociaż istnieje coraz więcej danych pochodzących z badań *in vitro* oraz praktyki klinicznej potwierdzających skuteczność koktajli fagowych w leczeniu różnego typu zakażeń, to dotychczas nie opracowano ‘złotego standardu’ ich projektowania [Lood i wsp., 2022; Würstle i wsp., 2022]. Ogromna różnorodność fagów w środowisku oraz ich wysoka specyficzność paradoksalnie sprawiają, że procedura doboru fagów do koktajli jest znacznie bardziej złożona niż opracowanie modelu leczenia skojarzonego z użyciem antybiotyków. Ponadto interakcje między fagami w mieszaninie, zarówno konkurencyjne jak i synergistyczne (jak w każdej społeczności ekologicznej) powodują, że skuteczność koktajlu fagowego często odbiega od sumy efektów działania poszczególnych fagów wchodzących w jego skład [Sanjuán, 2017]. Oprócz badań eksperymentalnych do projektowania koktajli fagowych można również wykorzystać modele matematyczne i komputerowe symulacje interakcji fag-bakteria [Díaz-Galián i wsp., 2022]. To pozwala analizować zmiany w liczebności fagów i bakterii w zdefiniowanym środowisku i w czasie, w zależności od szybkości adsorpcji lub innych opcjonalnych parametrów, a także przewidywać dynamikę koewolucji opisywanej jako ‘wyścig zbrojeń’.

W dotychczas opracowanych modelach brakuje jednak podejścia uwzględniającego zmiany w strukturach powierzchniowych bakterii, które pojawiają się, gdy bakterie rozwijają oporność na fagi i które można wykorzystać, aby uczynić terapię bardziej skuteczną [publikacja H5]. Takie modele pozwoliłyby badać wzorce kombinacji fagów, które swoją specyficznością podążają za gospodarzem adaptującym się do środowiska. Z tego względu równie ważna jak dobór fagów do terapii jest znajomość naturalnej heterogenności bakterii docelowej oraz zmienności genotypowej i fenotypowej selekcjonowanej przez fagi oraz ich białka.

W ostatniej pracy wchodzącej w skład cyklu habilitacyjnego [publikacja H6] połączyliśmy zatem podejście ewolucyjne, badania eksperymentalne oraz modelowanie matematyczne i

wyznaczyliśmy model odwzorowujący synergę, w której jeden fag lub jego depolimeraza zapewniają powstanie populacji bakterii podatnej na drugiego faga. Rozwiązania modelu matematycznego zostały zweryfikowane i przetestowane eksperymentalnie na dwóch szczepach *K. pneumoniae*, trzech różnych fagach i jednej depolimerazie. Ponadto bazując na modelu opracowaliśmy i udostępniliśmy środowisku naukowemu narzędzie internetowe PhREEPred (Phage Resistance Emergence Prediction) (<https://phartner.shinyapps.io/PhREEPred/>), które można wykorzystać do przeprowadzenia symulacji wzrostu bakterii otoczkowych poddanych działaniu różnych fagów oraz ich mieszanin, a także kombinacji fagów z depolimerazą.

Parametry dostępne na serwerze internetowym opisują reprezentatywne cechy oddziaływań fag-bakteria, w tym: (i) wirulencję faga specyficznego i niespecyficznego wobec bakterii docelowej (długość okresu latencji i plon faga), (ii) kinetykę wzrostu bakterii, kalkulowaną na podstawie czasu i stężenia bakterii oraz (iii) konfigurację eksperymentu (czas trwania, początkowe stężenie bakterii, wielokrotność infekcji, zasób substancji odżywczych). Poza parametrami, które są mierzone standardowo w oparciu o pojedynczy cykl lityczny faga i krzywą wzrostu bakterii, nasze narzędzie uwzględnia również parametry trudniejsze do oszacowania, takie jak: szybkość adsorpcji faga, szybkość rozpadu fagów czy zużycie enzymu. Dzięki temu PhREEPred może być stosowany do badania wzorców kombinacji fagów w ramach podstawowej wiedzy na ich temat oraz na temat bakterii docelowych. W oparciu o wyniki symulacji można przewidzieć skuteczność kombinacji fag-fag oraz depolimeraza-fag i tym samym zoptymalizować dobór fagów i depolimeraz fagowych w sposób ograniczający ewolucję oporności bakterii. Należy podkreślić, że to narzędzie może być pomocne nie tylko w projektowaniu badań eksperymentalnych, ale również przy opracowywaniu nowych terapii wykorzystujących koktajle złożone z fagów i ich białek.

Bazując na wynikach eksperymentalnych [**publikacje H5 i H6**] oraz na modelu zbudowanym w **pracy H6**, jak również na wnioskach z przeprowadzonych symulacji potwierdziliśmy prawdziwość hipotezy, że **koktajle złożone z fagów podanych jednocześnie, ale działających sekwencyjnie, opóźniają pojawianie się oporności w populacji *K. pneumoniae***. Tym samym udowodniliśmy, że projektując koktajle fagowe w oparciu o kolejno odślaniane receptory komórkowe możemy optymalizować ich spektrum działania i jednocześnie ograniczać rozwój oporności bakterii na fagi. Skuteczność tak zaprojektowanych koktajli nie zależy od pochodzenia oporności bakterii na fagi, warunkowanej zmianą w CPS, ale jest zależna od szczepu bakterii docelowej i typu faga celującego w alternatywny receptor komórkowy. Stwierdziliśmy także, iż **depolimeraza w kombinacji z fagiem niespecyficznym wobec populacji docelowej może również opóźnić lub zapobiegać rozwojowi oporności bakterii poprzez odsłonięcie alternatywnego receptora**, w sposób zależny od wielokrotności infekcji.

Warto zaznaczyć, że choć 24-godzinny eksperyment terapeutyczny, przeprowadzony i zaprezentowany w **publikacji H6**, potwierdza słuszność naszych założeń badawczych, to jednak w dłuższej perspektywie czasowej nie można wykluczyć pojawienia się oporności na wszystkie stosowane fagi. Strategia polegająca na ‘rozbrojeniu patogenu’ i utrzymaniu stężenia bakterii na niższym poziomie przez określony czas, może jednak ułatwić działanie mechanizmom obronnym układu odpornościowego a w konsekwencji zapewnić sukces terapeutyczny.

Badania przedstawione w publikacjach H4 i H6 realizowałam jako wykonawca w ramach projektu badawczego NCN nr 2017/26/M/NZ1/00233.

PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ

Wykorzystanie fagów i białek fagowych w leczeniu zakażeń bakteryjnych, choć nie rozwiąże kryzysu wywołanego wzrostem oporności bakterii na antybiotyki, to jednak jest niewątpliwie obiecującą strategią terapeutyczną. Definiując AMR jako fenotyp można bowiem przyjąć, że podobnie jak w przypadku innych fenotypów jest to przejściowy stan danej populacji bakterii, który podlega zmianie i ewolucji opartej na selekcji pod wpływem określonej presji. Kiedy promujemy ewolucję populacji bakterii poprzez zwiększanie ekspozycji na środki przeciwdrobnoustrojowe, to selekcjonujemy fenotyp AMR. **Lepszym podejściem, popartym wynikami moich badań i będącym efektem zastosowania ‘myślenia ewolucyjnego’ przy wprowadzaniu fagów do terapii, jest każda strategia oparta na kompromisach, które mogą przezwyciężyć negatywny wpływ rozwoju oporności bakterii.** Do tego celu można wykorzystać depolimerazy fagowe, koktajle złożone z fagów lub kombinacje depolimeraz z fagami, jak również fagi skojarzone z antybiotykami oraz nieswoiste mechanizmy obronne gospodarza.

W szczególności dotyczy to badanych fagów litycznych oraz ich depolimeraz, które wchodząc w interakcje z czynnikami kluczowymi dla wirulencji *K. pneumoniae*, takim jak CPS czy EPS, zmniejszają zjadliwość, uwrażliwiają na inne fagi i/lub przywracają podatność na już niedziałające antybiotyki. Zaprezentowane podejście stanowi jednocześnie propozycję zmiany w sposobie myślenia o zwalczaniu infekcji. Wydaje się to szczególnie przydatne w przypadku patogenów oportunistycznych, takich jak *K. pneumoniae*, które ewoluując w kierunku zapewniającym pożądany efekt leczenia mogą nadal namnażać się w środowisku naturalnym. W szerszej perspektywie te badania, w połączeniu z wynikami badań oddziaływań fagów specyficznych wobec różnych patogenów wielolekoopornych, pozwolą wyznaczyć kierunek ewolucji bakterii. Tym samym udoskonalą metody wyboru fagów (enzymów fagowych), które minimalizując niekorzystny wpływ rozwoju oporności lub po prostu selekcjonując określone fenotypy, będą mogły być wykorzystywane jako część strategii terapeutycznej, określanej mianem antywirulentnej.

Do najważniejszych, oryginalnych osiągnięć badawczego przedstawionego cyklu należą zatem:

- zebranie, usystematyzowanie i opracowanie informacji dotyczących depolimeraz pochodzenia fagowego [H1];
- uzyskanie i scharakteryzowanie trzech nowych, wytypowanych w analizach bioinformatycznych depolimeraz fagowych, w tym pierwszej pochodzącej z sifowirusa specyficznego wobec rodzaju *Klebsiella*. Właściwości depolimeraz, w tym motyw β -helisy w strukturze drugorzędowej i względnie wysokie temperatury topnienia, potwierdziły ważną pod względem aplikacyjnym, umiarkowaną stabilność termiczną uzyskanych enzymów [H2 i H3];
- wykazanie w badaniach *in vitro* i *in vivo*, że depolimerazy pochodzenia fagowego, poprzez degradację cukrów wchodzących w skład CPS serotypu K3, K21 i K63 lub też selekcję populacji odpornej, uwrażliwiają bakterie na wybrane mechanizmy odpowiedzi nieswoistej gospodarza i redukują wirulencję *K. pneumoniae*, dlatego mogą być rozważane jako obiecujące czynniki antywirulentne [H2, H3, H4];

- wykazanie, że *K. pneumoniae* ewoluuje oporność na fagi/depolimerazy fagowe ukierunkowane na CPS szybko i do pewnego stopnia w sposób powtarzalny i przewidywalny, i to głównie poprzez modyfikację receptora i blokowanie adsorpcji fagów. Wyselekcjonowane w wyniku mutacji w locus *cps i*/lub konwersji fenotypowej populacje odporne, w zależności od szczepu bakteryjnego i typu faga wykorzystanego do selekcji, są podatne na wybrane mechanizmy odporności nieswoistej gospodarza, antybiotyki lub inne fagi, a zatem łatwiejsze do eradykacji [H4 i H5];
- wyznaczenie w oparciu o dane eksperymentalne modelu matematycznego, który opisuje działanie synergistyczne fagów/depolimeraz fagowych ukierunkowanych na CPS z fagami rozpoznającymi odmienny typ receptora komórkowego. Tym samym ustalono, że koktajle fagowe w swoim składzie powinny zawierać sekwencyjnie działające fagi i to nawet wówczas, gdy wstępne badanie *in vitro* zakresu gospodarza dla każdego z nich osobno nie potwierdzą ich aktywności litycznej wobec bakterii docelowej. Analogiczny wniosek dotyczy projektowania składu mieszanin zawierających depolimerazy i fagi [H6];
- stworzenie podstawy biologicznej do opracowania i udostępnienia środowisku naukowemu narzędzia internetowego PhREEPred, umożliwiającego przeprowadzenie symulacji wzrostu bakterii otoczkowych poddanych działaniu różnych fagów oraz ich mieszanin, a także kombinacji fagów z depolimerazą [H6];
- udział w selekcji i charakterystyce mutantów, których genomy zostały zsekwencjonowane i zdeponowane w bazie NCBI GenBank (łącznie 34 nowych i kompletnych sekwencji genomowych *K. pneumoniae*) [H4 i H5].

PLANY BADAWCZE

W ramach projektu badawczego dotyczącego charakterystyki zmian fenotypowych i genomowych w populacjach *K. pneumoniae* selekcjonowanych przez fagi, finalizuję badania z wykorzystaniem fagów ukierunkowanych na inne niż CPS typy receptorów komórkowych. Równoległe prowadzę pogłębione badania inspirowane wynikami przedstawionymi w pracy H5. Ich celem jest wyjaśnienie powiązań między fenotypem śluzowatym a opornością na fagi oraz między fenotypami oporności na fagi a opornością na działanie dopełniacza. Ponadto, w ramach projektu badawczego NCN nr 2017/26/M/NZ1/00233, kontynuujemy prace nad dalszą charakterystyką depolimeraz pochodzących z fagów *Klebsiella*.

W moich dotychczasowych badaniach następstwa interakcji między fagiem a bakteryjnym gospodarzem są rozpatrywane w parach gatunków. Jednak większość infekcji fagowych występujących zarówno w przyrodzie, jak i w praktyce klinicznej przebiega w ramach sieci różnych interakcji ekologicznych. Prototypem mogą być koktajle fagowe, w których dochodzi do koinfekcji bakterii docelowych przez różne gatunki fagów ukierunkowanych na odmienne typy receptorów komórkowych oraz konkurencji między tymi pasożytami o zasoby gospodarza. Do stosowanych terapeutycznie fagów mogą jednocześnie dołączyć inne populacje fagów i bakterii obecnych w ludzkim mikrobiomie, co w sposób niezamierzony wpłynie na wynik interakcji. W dalszej pracy

naukowej zamierzam zatem rozszerzyć model badawczy interakcji fag-bakteria i wprowadzić kilka różnych fagów i szczepów bakterii. To pozwoli lepiej poznać przebieg ewolucji oporności bakterii w naturalnych społecznościach patogen-gospodarz. Interesujące jest zbadanie, jak zwiększenie różnorodności fagów wpłynie na selekcję mechanizmów oporności, tempo ewolucji oraz różnorodność fenotypową zwalczanych bakterii, zwłaszcza w aspekcie terapii skojarzonej z antybiotykami oraz mechanizmów obronnych gospodarza.

4.4 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych, nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

W trakcie prawie dwudziestoletniej pracy naukowej uczestniczyłam w licznych projektach badawczych realizowanych z kilkoma zespołami badawczymi UW, a także z zewnętrznymi instytucjami naukowymi. W syntetycznym ujęciu prace, które nie zostały włączone do cyklu stanowiącego podstawę prezentowanego osiągnięcia naukowego, obejmują trzy obszary wiedzy.

Głównym nurtem moich zainteresowań naukowo-badawczych jest biologia fagów infekujących wielolekooporne bakterie Gram-ujemne, w tym ich charakterystyka pod kątem wykorzystania w kontroli zakażeń bakteryjnych. Kolejnym obszarem badań jest poszukiwanie i charakteryzowanie różnych związków będących wynikiem syntezy chemicznej lub substancji pochodzenia naturalnego, które docelowo mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii nowotworów oraz w leczeniu zakażeń grzybiczych. Chronologicznie najwcześniej podejmowane przeze mnie badania koncentrowały się na analizie humoralnej odpowiedzi immunologicznej oraz immunomodulacyjnych właściwości związków pochodzenia roślinnego.

Poza zaprezentowanym osiągnięciem naukowym, w swoim dotychczasowym dorobku naukowym posiadam 27 publikacji (w tym 11 publikacji, które w roku opublikowania były poza bazą JCR) (Załącznik 4A, pkt II.2) oraz cztery rozdziały w podręcznikach akademickich i dwa rozdziały w monografiach (Załącznik 4A, pkt II.1).

Badania dotyczące właściwości immunomodulujących związków pochodzenia roślinnego oraz roli przeciwciał w odpowiedzi immunologicznej

Majkowska-Skrobek G[✉], Augustyniak D, Jankowski A. Assessment of IgA subclasses synthesis in children with selective and partial IgA deficiency. *Centr. Eur. J. Immunol.*, **2003**, 28(3): 110–118.

Majkowska-Skrobek G[✉], Jankowski A. Izolowany niedobór IgA a geneza komórek plazmatycznych wytwarzających IgA. *Adv. Clin. Exp. Med.*, **2004**, 13(4): 637-644.

Majkowska-Skrobek G[✉], Augustyniak D. Struktura i funkcja podklas immunoglobuliny klasy A. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, **2004**, 2(53): 155–165.

Czyżewska-Buczyńska A, **Majkowska-Skrobek G**, Jankowski A. Association of HLA-B*08: DRB1*03 with immunoglobulin A-deficiency. *Indian J. Pediatr.*, 2007, 74(11): 1021-4.

Styrzewska M, Kostyn A, Kulma A, **Majkowska-Skrobek G**, Augustyniak D, Prescha A, Czuj T, Szopa J. Flax fiber hydrophobic extract inhibits human skin cells inflammation and causes remodeling of extracellular matrix and wound closure activation. *Biomed. Res. Int.*, **2015**, 2015: 862391.

Augustyniak D, Piekut M, **Majkowska-Skrobek G**, Skała J. Bactericidal, opsonophagocytic and anti-adhesive effectiveness of cross-reactive antibodies against *Moraxella catarrhalis*. *Pathog. Dis.*, **2015**, 73(3): pii: ftu026.

Augustyniak D, **Majkowska-Skrobek G**, Roszkowiak J, Dorotkiewicz-Jach A. Defensive and offensive cross-reactive antibodies elicited by pathogens: The Good, the Bad and the Ugly. *Curr. Med. Chem.*, **2017**, 24(36): 4002-4037.

Pierwsze publikacje w moim dorobku naukowym wiążą się z tematem i wynikami badań mojej pracy doktorskiej, którą realizowałam na Wydziale Nauk Przyrodniczych UWr pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Adama Jankowskiego. Celem rozprawy była ocena stopnia upośledzenia syntezy IgA₁ i IgA₂ zarówno w układowym, jak i śluzówkowym układzie odporności u dzieci ze zdiagnozowanym izolowanym niedoborem IgA (IgAD) oraz częściowym (pIgAD) niedoborem przeciwciał tej klasy, a także określenie syntezy obu podklas IgA w badaniach *in vitro*. W badaniach wykorzystywałam materiał kliniczny pochodzący od pacjentów z Katedry Propedeutyki Pediatrii i Kliniki Immunologii Wieku Rozwojowego Akademii Medycznej we Wrocławiu. Analizując stężenia zarówno surowiczych, jak i wydzielniczych podklas IgA w populacjach badanych dzieci potwierdziłam heterogenności obu typów niedoborów odporności humoralnej, co może tłumaczyć zróżnicowany przebiegu kliniczny tych chorób oraz stanowić istotny marker prognostyczny. Stwierdziłam również, że jednym z czynników warunkujących wystąpienie zaburzenia może być niedobór cytokin, zwłaszcza szlaku Th2, uczestniczących w immunoregulacji procesu zmiany klas syntetyzowanych przeciwciał w kierunku podklas IgA i/lub końcowego różnicowania limfocytów B. Ponadto zaobserwowałam, że zaburzony lub opóźniony rozwój syntezy IgA, a szczególnie podklasy IgA₂, może mieć wpływ na rozwój schorzeń atopowych, zwłaszcza u dzieci młodszych. Wyniki pochodzące z części eksperymentalnej badań oraz ówczesny stan wiedzy na temat budowy, funkcji oraz genetyki IgA z uwzględnieniem nieprawidłowości charakterystycznych dla IgAD, zostały przedstawione w formie jednej publikacji oryginalnej [Majkowska-Skrobek i wsp., 2003] oraz dwóch prac przeglądowych [Majkowska-Skrobek i wsp., 2004; Majkowska-Skrobek i Jankowski, 2004] w czasopismach, które w owym czasie znajdowały się poza bazą JCR. Te wyniki zaprezentowałam także w formie referatu na konferencji 14th *European Immunology Meeting, EFIS 2000* w Poznaniu (Załącznik 4A, pkt II.3a). W kolejnych badaniach wykazaliśmy, że niedobór IgA w populacji polskiej jest znacząco silniej związany z haplotypem głównego układu zgodności tkankowej, oznaczonym jako HLA-B*08: DRB1*03, niż z każdym z alleli z osobna [Czyżewska-Buczyńska i wsp., 2007].

Do grupy badawczej prof. Jankowskiego, który jednocześnie kierował ww. Katedrą i Kliniką, dołączyłam tuż po ukończeniu studiów magisterskich i pracowałam w niej jako pracownik techniczny (1995–1997), a następnie po uzyskaniu tytułu doktora, jako pracownik naukowo-dydaktyczny (2003–2010). W początkowym okresie byłam zaangażowana w kilka projektów realizowanych w zespole, dzięki czemu mogłam rozwijać swój warsztat badawczy w zakresie różnych metod stosowanych w badaniach immunologicznych, w tym m. in.: technik immunoenzymatycznych i immunochemicznych, technik hodowli komórek pierwotnych i linii komórkowych, izolacji komórek eukariotycznych, badania ich aktywności oraz ekspresji antygenów powierzchniowych, a także analizy statystycznej danych biomedycznych.

Moja wiedza i zdobyte umiejętności zaowocowały współpracą z prof. dr hab. Iwoną Kątnik-Prastowską z Uniwersytetu Medycznego (UM) we Wrocławiu. Efektem było m. in. współautorstwo trzech rozdziałów w podręczniku akademickim zatytułowanym „Immunochemia w biologii medycznej. Metody laboratoryjne”, wydanym przez Wydawnictwo Naukowe PWN i kierowanym do studentów wyższych uczelni o profilu biologicznym oraz medycznym (Załącznik 4A, pkt II.1). Z kolei współpraca z grupą lekarzy z ww. Katedry i Kliniki przyczyniła się do powstania kilku artykułów naukowych dotyczących skuteczności naturalnych preparatów roślinnych lub

bakteryjnych działających immunostymulująco, które zostały opublikowane w czasopiśmie spoza listy JCR (Załącznik 4A, pkt II.2, poz. 3, 6, 8, 11). Za najważniejsze ustalenia naukowe, wynikające z tych badań, należałoby uznać (i) Padma 28 modulując właściwości fagocytarne neutrofilów i monocytów oraz liczbę i aktywność limfocytów T znacząco zmniejsza liczbę zakażeń układu oddechowego, skraca czas trwania choroby i zapewnia jej łżejszy przebieg, a w konsekwencji ogranicza stosowanie antybiotyków [Jankowski i wsp., 2004], (ii) Rybomunyl podawany przez dłuższy okres zmniejsza częstotliwość epizodów nawracających infekcji dróg oddechowych u dzieci [Jankowski i wsp., 2006]. Jestem również współautorką rozdziału w „Kompedium pediatrii praktycznej” pod redakcją prof. Adama Jankowskiego przeznaczonego dla studentów medycyny oraz dla lekarzy pediatrów i rodzinnych (Załącznik 4A, pkt II.1).

Interesujące badania w zakresie immunomodulujących właściwości substancji roślinnych realizowałam we współpracy z grupą badawczą prof. dr. hab. Jana Szopy z Zakładu Biochemii Genetycznej (Wydział Biotechnologii, UW). Te badania koncentrowały się na określeniu składu i biologicznych właściwości związków hydrofobowych zawartych w ekstrakcie z włókien lnianych, wpisując się tym samym w obszar badawczy niniejszego Zespołu. Poszukując związków bioaktywnych przeprowadzono analizę zarówno pełnego ekstraktu, jak i jego poszczególnych składników zidentyfikowanych za pomocą metod chromatograficznych. Szczególnym przedmiotem badań był zawarty w ekstrakcie kannabidiol, ze względu na jego charakterystyczną aktywność biologiczną i unikatowość w świecie roślin, oraz fitosterole jako związki o znanych i cennych właściwościach prozdrowotnych. Wyniki analiz mających na celu określenie wpływu tych substancji na procesy związane z leczeniem trudno gojących się ran przedstawiono w publikacji Styrczewska i wsp. [2015].

Wykorzystując moje doświadczenie w technikach hodowli komórek *in vitro* wykazaliśmy, że hydrofobowe związki zawarte w ekstrakcie z włókien lnianych nie wpływają znacząco na proliferację prawidłowych komórek ludzkich, w tym fibroblastów skóry linii NHDF oraz pierwotnych keratynocytów naskórka (NHEK). Mogą jednak zmieniać kształt tych komórek, co często jest efektem ich zwiększonej ruchliwości. Ekstrakt przyspieszał także proces porostania rany przez komórki skóry w testach *in vitro*. Te wyniki, uzupełnione o dane obrazujące wzrost aktywności metaloproteinazy macierzy w obu typach komórek, w sposób zależny od stężenia ekstraktu, pozwoliły stwierdzić, iż związki hydrofobowe z włókien lnianych promują migrację komórek skóry oraz przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. W wyniku analizy ekspresji genów kodujących kolagen i cytokiny metodą PCR w czasie rzeczywistym, dostarczyliśmy również dowodów na to, iż istotny wpływ na te procesy ma zawarty w ekstrakcie fitosterol. Natomiast kannabidiol (działający w większości przypadków synergistycznie z β -sitosterolem) wykazuje głównie działanie przeciwzapalne oraz stymulujące produkcję kolagenu. W konkluzji stwierdziliśmy, że ekstrakt z włókien lnianych działając na różnych etapach procesu gojenia się ran, w tym hamując proces zapalny i promując reorganizację macierzy zewnątrzkomórkowej, może stanowić składową preparatu stosowanego leczniczo na trudno gojące się rany.

W ramach zainteresowań związanych z humoralną odpowiedzią immunologiczną gospodarza na patogeny wzięłam udział w projekcie realizowanym w macierzystym zakładzie i dotyczącym krzyżowej reaktywności przeciwciał. Takie przeciwciała mogą wchodzić w interakcje z epitopami, które są immunologicznie istotne i wspólne dla różnych antygenów wielu drobnoustrojów. To zwiększa prawdopodobieństwo rozpoznania zarówno szerokiej gamy

patogenów (w układach wewnątrz- i międzygatunkowych), jak i własnych antygenów [Augustyniak i wsp., 2017]. Głównym celem badań, których wyniki zaprezentowano w publikacji autorstwa Augustyniak i wsp. [2015], było zidentyfikowanie i kompleksowa analiza funkcjonalności przeciwciał, które zostały wygenerowane *de novo* w modelu mysim. Do immunizacji myszy BALB/c wykorzystano multiwalentne antygeny *Moraxella catarrhalis*, w tym całe zabite komórki bakterii oraz oczyszczone OMP. Mój udział w badaniach polegał na porównaniu aktywności opsonofagocytarnej przeciwciał reagujących krzyżowo w układach homologicznych i heterologicznych, złożonych z czterech różnych fenotypowo i odległych filogenetycznie szczepów *M. catarrhalis*. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że przeciwciała reagujące krzyżowo z antygenami powierzchniowymi *M. catarrhalis* są w pełni funkcjonalne i zapewniają gospodarzowi ochronę przed fenotypowo różnymi szczepami tej bakterii. Ponadto wykazaliśmy, że przeciwciała krzyżowo rozpoznające wyłącznie OMP wzmagają proces fagocytozy przez makrofagi linii THP1 oraz aktywność lityczną dopełniacza, a także blokowały adhezję *M. catarrhalis* do komórek nabłonkowych płuc linii A549 w sposób bardziej efektywny niż przeciwciała specyficzne wobec całych komórek bakteryjnych. Te przeciwciała cechowała również znacznie wyższa awidność w porównaniu z przeciwciałami, które rozpoznawały epitopy eksponowane na całej powierzchni komórki, co zostało potwierdzone testem immunoenzymatycznym.

Poza publikacją oryginalną [Augustyniak i wsp., 2015] wyniki dotyczące krzyżowej reaktywności przeciwciał specyficznych wobec kilku patogenów układu oddechowego zostały zaprezentowane w formie plakatu na międzynarodowym kongresie immunologicznym w Mediolanie (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 11), jak również przedyskutowane w kontekście badań dostępnych w literaturze przedmiotu [Augustyniak i wsp., 2017]. Jako współautorka opracowania dokonałam przeglądu literatury i syntetycznie omówiłam zarówno pozytywną, jak i negatywną rolę przeciwciał krzyżowo reaktywnych w przeciwwirusowej odpowiedzi immunologicznej. Wśród proponowanych strategii obronnych wyodrębniłam (i) neutralizację, definiowaną jako znoszenie infekcyjności wirusów z udziałem przeciwciał neutralizujących oraz (ii) zabijanie komórek zakażonych wirusem, w której pośredniczą przeciwciała nieneutralizujące oraz efektorowe komórki układu odpornościowego. Jako niepożądany efekt działania przeciwciał reagujących krzyżowo wskazałam zjawisko wzmocnienia infekcji wirusowej zależnej od przeciwciał. Ponadto w artykule omówiliśmy również właściwości ochronne i ofensywne przeciwciał krzyżowo reaktywnych, których powstanie było indukowane przez inne patogeny, w tym bakterie, grzyby i pierwotniaki. Podsumowaliśmy także ówczesny stan wiedzy na temat licznych funkcji efektorowych tych przeciwciał, takich jak: aglutynacja, neutralizacja infekcyjności, aktywacja dopełniacza, zwiększenie fagocytozy i cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał. Wśród wniosków wynikających z przeprowadzonej analizy literatury znalazło się stwierdzenie, że ochrona krzyżowa uzyskana w wyniku immunizacji stanowi dodatkową i unikatową, obok swoistej odpowiedzi humoralnej, formę kontroli interakcji gospodarz-patogen. Jednak częsty brak możliwości rozróżnienia antygenów własnych od obcych przez przeciwciała reagujące krzyżowo przeczy kluczowemu dogmatowi odporności nabytej i wydaje się wskazywać, iż reaktywność krzyżowa powinna być ewolucyjnie ograniczana, aby zapobiec zaostrzaniu chorób infekcyjnych, alergicznych czy autoimmunologicznych.

Badania dotyczące biologii bakteriofagów litycznych i ich białek

Kęsik-Szeloch A, Drulis-Kawa Z, Weber-Dąbrowska B, Kassner J, **Majkowska-Skropek G**, Augustyniak D, Lusiak-Szelachowska M, Zaczek M, Górski A, Kropinski AM. *Virol. J.*, **2013**, 10:100.

Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kęsik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dąbrowska B, Dorotkiewicz-Jach A, Augustyniak D, **Majkowska-Skropek G**, Bocer T, Empel J, Kropinski AM. Isolation and characterisation of KP34 – a novel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2011**, 90(4): 1333-45.

Eriksson H, Maciejewska B, Latka A, **Majkowska-Skropek G**, Hellstrand M, Melefors Ö, Wang JT, Kropinski AM, Drulis-Kawa Z, Nilsson AS. A suggested new bacteriophage genus, "Kp34likevirus", within the *Autographivirinae* subfamily of *Podoviridae*. *Viruses*, **2015**, 7(4): 1804-22.

Maciejewska B, Roszniowski B, Espaillat A, Kęsik-Szeloch A, **Majkowska-Skropek G**, Kropinski A, Briers Y, Cava F, Lavigne R, Drulis-Kawa Z. *Klebsiella* phages representing a novel clade of viruses with an unknown DNA modification and biotechnologically interesting enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2017**, 101(2): 673-684.

Drulis-Kawa Z, Olszak T, Danis K, **Majkowska-Skropek G**, Ackenmann HW. A giant *Pseudomonas* phage from Poland. *Arch. Virol.*, **2014**, 159(3): 567-72.

Danis-Włodarczyk K, Olszak T, Arabski M, Wąsik S, **Majkowska-Skropek G**, Augustyniak D, Guła G, Briers Y, Bin Jang H, Vandenheuevel D, Duda KA, Lavigne R, Drulis-Kawa Z. Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS One*, **2015**, 10(5): e0127603.

Drulis-Kawa Z, **Majkowska-Skropek G**, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Science*, **2012**, 13(8): 699-722.

Latka A, Maciejewska B, **Majkowska-Skropek G**, Briers Y, Drulis-Kawa Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2017**, 101(8): 3103-3119.

Ważnym momentem dla mojego rozwoju naukowego było rozpoczęcie pracy w nowo powstałym Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii UW, w którym prowadzę prace badawcze z głównego obszaru moich zainteresowań naukowych. Jako członek zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Zuzannę Drulis-Kawę wzięłam udział w kilku projektach badawczych. Naszym celem było pozyskanie z prób środowiskowych nowych fagów litycznych, specyficznych wobec patogenów Gram-ujemnych, oraz ich biologiczna i genetyczna charakterystyka. W efekcie stworzyliśmy kolekcję dobrze scharakteryzowanych fagów specyficznych wobec bakterii z rodzaju *Klebsiella*, które stanowią cenny materiał badawczy. Został on opisany w cyklu trzech artykułów [[Drulis-Kawa i wsp., 2011](#); [Kęsik-Szeloch i wsp., 2013](#); [Maciejewska i wsp., 2017](#)] i wykorzystany w badaniach składających się na cykl habilitacyjny. Kolekcja obejmuje 32 nowe izolaty fagowe, scharakteryzowane pod względem morfologii wirionu, morfologii lysinek oraz zakresu gospodarza, do ustalenia którego wykorzystano ponad 250 szczepów bakterii z rodzin *Enterobacteriaceae* i *Erwiniaceae*, w tym izolaty kliniczne wytwarzające ESBL. Wyniki badań uzyskanych z transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) pozwoliły odpowiednio przyporządkować te fagi do morfotypów podo-, myo- i sifowirusa, co w owym czasie stanowiło podstawowe kryterium przynależności taksonomicznej do rzędu *Caudovirales* i rodzin *Podoviridae*, *Myoviridae* i *Siphoviridae*. Ponadto stwierdziliśmy, że miowirusy wykazują szersze spektrum gospodarza niż podowirusy czy sifowirusy i swoją aktywnością lityczną obejmują zarówno szczepy *K. pneumoniae*, jak i *Klebsiella oxytoca*. W celu dalszej charakterystyki część fagów została również przebadana pod względem fizjologicznych i molekularnych aspektów ich biologii.

Analizując parametry opisujące pojedynczy cykl lityczny faga wykazaliśmy podobieństwo pomiędzy podowirusami i sifowirusami, które namnażały się szybciej i wydajniej w komórkach swojego gospodarza niż miowirusy. Te właściwości są pożądanymi cechami fagów, bowiem

przyczyniają się do ich wysokiej zjadliwości względem komórek bakteryjnych. Natomiast wyniki analiz restrykcyjnych fagowego DNA dostarczyły dodatkowego dowodu, że podowirusy KP32 i KP34 należą do odmiennych rodzajów wirusów. Zsekwencjonowaliśmy także genomy pięciu wybranych fagów, w tym: dwóch podowirusów (KP32 i KP34), dwóch miowirusów (KP15 i KP27) oraz jednego sifowirusa (KP36). Uzyskane sekwencje razem z anotacjami wszystkich ORF-ów występujących w genomach zostały zdeponowane w bazie GenBank pod numerami akcesyjnymi zestawionymi w tabeli 1. Tym samym znacząco zwiększyliśmy liczbę dostępnych genomów fagów specyficznych wobec *K. pneumoniae*. Co istotne, na podstawie porównawczych analiz genomowych i proteomowych faga KP34 i innych podowirusów dostępnych w bazie GenBank wykazaliśmy powiązania filogenetyczne w obrębie podrodziny *Autographivirinae* oraz przynależność podowirusa KP34 do jednego z czterech klastrow w jej obrębie [Drulis-Kawa i wsp., 2011]. Wśród porównywanych genomów fagów specyficznych wobec γ -*Proteobacteria* i sklasyfikowanych jako phiKMV-podobne, fagiem najbliższym spokrewnionym z KP34 okazał się fag VP93, specyficzny wobec *Vibrio* sp.

W trakcie badań prowadzonych nad fagami specyficznymi wobec rodzaju *Klebsiella*, nawiązaliśmy również współpracę z grupą naukowców ze Szwecji (*Department of Molecular Biosciences, the Wenner-Gren Institute, Stockholm University*). Wynikiem tej współpracy jest publikacja autorstwa Eriksson i wsp. [2015], w której kompleksowo scharakteryzowaliśmy i porównaliśmy między sobą dwa nowe fagi (SU503 i SU552A), wyizolowane z próbek ścieków w Sztokholmie. Wyniki badań dotyczących morfologii wirionu, zakresu gospodarza oraz zdolności propagacji fagów w komórkach szczepu gospodarza analizowano równoległe z danymi uzyskanymi dla innych fagów z rodzaju *Phikmvlikevirus* (*Autographivirinae*, *Podoviridae*), takim jak fag KP34, pochodzący z naszej kolekcji [Drulis i wsp., 2011] i fag NTUH-K2044-K1-1, wyizolowany w Chinach [Lin i wsp., 2014]. To pozwoliło ustalić przynależność taksonomiczną nowo wyizolowanych fagów do podrodziny *Autographivirinae* i zróżnicować te fagi pod względem szerokiego i wąskiego spektrum gospodarza (NTUH-K2044-K1-1 < SU503, SU552A < KP34). Istotnym spostrzeżeniem wynikającym z analizy porównawczej genomów ww. fagów oraz faga F19 (NC_023567) było stwierdzenie wysokiej homologii sekwencji nukleotydowej oraz podobnego układu genów, z zachowaniem 29 genów konserwatywnych. Ponadto na podstawie analizy filogenetycznej sekwencji aminokwasowych kodowanych przez trzy różne geny (polimeraza RNA, DNA matura B i białko łączące główkę z ogonkiem) u 33 fagów z podrodziny *Autographivirinae*, ujawniliśmy podobieństwo fagów NTUH-K2044-K1-1, SU503, SU552A i F19 do faga KP34. W efekcie zaproponowaliśmy kolejną rewizję systemu taksonomicznego podrodziny *Autographivirinae* poprzez wyodrębnienie faga KP34 z rodzaju *Phikmvlikevirus* i utworzenie nowego rodzaju wirusów o nazwie „*KP34likevirus*”.

Kolejną interesującą obserwacją potwierdzającą odmienną taksonomiczną obu rodzajów fagów była konfiguracja i warianty genów ‘kasety lizującej’. Wykazaliśmy, że kasetta lizująca wirusów podobnych do faga KP34 ma jedną cząsteczkę spaniny (z grupy u-spanin) i układ spanina-holina-endolizyna, natomiast kasetta lizująca fagów podobnych do phiKMV ma układ holina-endolizyna-spanina, z kompleksem podwójnego białka spaniny (i-spanina/o-spanina) podobnym do tego, jaki występuje u faga lambda. Ostatecznie ten nowy rodzaj wirusów obejmujący fagi KP34, SU503, SU552A, NTUH-K2044-K1-1 i F19, zaproponowaliśmy Międzynarodowemu Komitetowi Taksonomii Wirusów (ICTV) do ratyfikacji.

W wyniku kolejnego etapu badań, których wyniki zaprezentowano w publikacji autorstwa Maciejewska i wsp. [2017], zaproponowaliśmy rewizję systemu taksonomicznego podrodziny *Tevenvirinae* i wprowadzenie nowego rodzaju pod nazwą ‘KP15virus’ <https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2016.022a-dB.A.v1.Kp15virus.pdf> (obecnie rodzaj *Slopekvirus*, rodzina *Straboviridae*). Na tym etapie badań zaproponowany rodzaj obejmował pięć gatunków miowirusów specyficznych wobec bakterii z rodzaju *Klebsiella* i *Enterobacter*. Wśród nich były pochodzące z naszej kolekcji fagi KP15 i KP27 oraz fagi wyizolowane w USA (Matisse i Miro) i w Chinach (phiEap-3). Jako kryterium klasyfikacji przyjęliśmy organizację genomu i 95% identyczność sekwencji DNA, co zostało potwierdzone algorytmem BLASTN. Genomy przedstawicieli tego rodzaju mają wielkość średnio 175,36 kb i zawierają 274 sekwencje kodujące białka, w tym metylazy Dcm i Dam oraz dwie sekwencje kodujące tRNA.

Innym ważnym ustaleniem naukowym badań było zidentyfikowanie w genomach zarówno faga KP15, jak i KP27, zestawu genów kodujących wysoce zaawansowany i złożony z czterech białek (holina, antyholina, spanina i endolizyna) system lizy bakterii Gram-ujemnych. W wyniku ekspresji heterologicznej genu kodującego endolizynę faga KP27 uzyskaliśmy to białko w formie rekombinowanej i eksperymentalnie potwierdziliśmy jego lityczne działanie wobec peptydoglikanu kilku gatunków bakterii Gram-ujemnych, których komórki były uprzednio permeabilizowane chloroformem. Ten enzym okazał się endopeptydazą tnącą wiązania między resztą L-alaniny a resztą kwasu D-glutaminowego w mostkach peptydowych, przyłączonych bezpośrednio do reszt kwasu N-acetylmuraminowego peptydoglikanu. Wykazanie szerokiej aktywności litycznej oraz potwierdzenie względnej stabilności i braku właściwości toksycznych wobec komórek ludzkiej linii nabłonkowej płuc A549 skłoniły nas do wniosku, że nowo scharakteryzowana endolizyna faga KP27 może znaleźć zastosowanie jako środek przeciwdrobnoustrojowy nie tylko wobec szczepów *Klebsiella*, ale także przeciwko innym patogenom Gram-ujemnym.

Jestem również wykonawcą badań i współautorką prac dotyczących fagów specyficznych wobec *P. aeruginosa* [Drulis-Kawa i wsp., 2014; Danis-Włodarczyk i wsp., 2015]. Celem tych badań była charakterystyka wyizolowanych ze ścieków komunalnych fagów litycznych pod kątem ich interakcji z gospodarzem oraz możliwości wykorzystania w biologicznej kontroli zakażeń przebiegających z udziałem biofilmu. Wyniki badań z użyciem TEM pozwoliły na określenie morfologii wirionów i na tej podstawie trzy nowo wyizolowane bakteriofagi (KT28, KTN6 i PA5oct) zaklasyfikowaliśmy do rzędu *Caudovirales* i rodziny *Myoviridae*. Należy podkreślić, że fagi KT28 i KTN6 były zbliżone do innych fagów z rodzaju *Pbunalikeyvirus* (obecnie *Pbunavirus*) zarówno pod względem budowy kapsydu, jak i wielkości oraz organizacji genomu. Natomiast fag PA5oct okazał się największym jak dotąd wirusem specyficznym wobec *Pseudomonas* i trzecim, co do wielkości, fagiem opisanym na świecie. Mój wkład w powstanie ww. prac polegał na zaprojektowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej umożliwiającej ocenę parametrów opisujących pojedynczy cykl lityczny fagów. Uzyskane dane w połączeniu z zakresem gospodarzy infekowanych przez badane fagi i ustalonym przy użyciu kolekcji 58 izolatów klinicznych *P. aeruginosa*, a następnie potwierdzonym na 43 szczepach z międzynarodowego panelu referencyjnego tego patogenu [De Soya i wsp., 2013] pozwoliły stwierdzić, że fagi *P. aeruginosa* o szerszym spektrum aktywności litycznej namnażają się wydajniej niż te, u których to spektrum jest węższe (KTN6 > KT28 > PA5oct). Genomy fagów KT28 i KTN6 zostały również zsekwencjonowane i opatrzone anotacjami,

a uzyskane sekwencje zdeponowane w bazie GenBank pod numerami akcesyjnymi KP340287 i KP340288.

Na podstawie analizy porównawczej genomów ustaliliśmy również, że fagi KTN6 i KT28 są blisko spokrewnione z rozpowszechnionymi w przyrodzie wirusami z grupy podobnych do PB1, zwłaszcza z fagiem LMA2. W oparciu o wyniki typowania fagowego przy użyciu szeregu określonych mutantów szczepu *P. aeruginosa* PAO1 a także testu wiązania LPS oraz testu neutralizacji fagów udowodniliśmy, że analogicznie do innych fagów z tej grupy, również fagi KT28 i KTN6 rozpoznają LPS jako receptor w procesie adsorpcji. Co ważne, wykorzystując metodę wysiewu z rozcieńczeń oraz spektrometryczną i fluorometryczną analizę barwników stwierdziliśmy także, że oba fagi redukują liczbę bakterii występujących w biofilmie oraz hamują ich zdolność do produkcji czynników wirulencji takich jak pirocyjanina i piowerdyna. Skuteczność tych fagów w eradykacji biofilmu *P. aeruginosa* potwierdziliśmy także w eksperymentach dyfuzyjnych i goniometrycznych. Ponadto zasugerowaliśmy obecność depolimeraz w wirionach tych fagów oraz ich rolę w degradacji macierzy biofilmu.

Moje zainteresowanie tematyką fagów i ich białek jako czynników przeciwdrobnoustrojowych znalazło swoje odzwierciedlenie również w trzech publikacjach przeglądowych, z których jedna weszła w skład cyklu habilitacyjnego i została wyszczególniona oraz omówiona w pkt 4.3 autoreferatu [[Drulis-Kawa i wsp., 2012](#); **publikacja H1**; [Latka i wsp., 2017](#)]. W każdej z tych prac opracowywane przeze mnie problemy badawcze dotyczyły depolimeraz fagowych.

W pierwszej części artykułu [Drulis-Kawa i wsp. \[2012\]](#) skoncentrowaliśmy się na zaletach i ograniczeniach związanych ze stosowaniem antybiotyków, bakteriofagów i białek fagowych z uwzględnieniem sposobu ich działania, właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych oraz rozwoju oporności. Druga część tego artykułu została poświęcona charakterystyce białek fagowych zaangażowanych w kluczowe etapy cyklu litycznego, w tym (i) depolimeraz odpowiedzialnych za pierwszy etap infekcji, tj. rozpoznanie i wiązanie receptora na powierzchni komórki, (ii) wczesnych białek fagowych, które wchodząc w interakcje z białkami bakterii wpływają na replikację DNA, transkrypcję i syntezę białek oraz podział komórki bakteryjnej, a także (iii) endolizyn i holin umożliwiających lizę komórki gospodarza i uwolnienie wirionów potomnych.

W kolejnej pracy [[Latka i wsp., 2017](#)] podsumowaliśmy ówczesny stan wiedzy na temat depolimeraz oraz lizyn związanych z wirionem (VAL) i ukierunkowanych na peptydoglikan. W wyniku analizy aktualnej literatury wyodrębniliśmy cechy różniące te dwa typy białek fagowych, w tym ich lokalizację w wirionie, organizację strukturalną oraz specyficzność enzymatyczną. W pracy podkreśliliśmy również rolę pionowego i poziomego transferu genów w ewolucji depolimeraz oraz jego wpływ na kształtowanie zakresu gospodarza. Ponadto przedstawiliśmy metody stosowane do oznaczania aktywności tych enzymów, które mogą być wykorzystywane do oceny ich przydatności jako środków przeciwbakteryjnych, antywirulentnych oraz narzędzi diagnostycznych. Kończącym wnioskiem naszych rozważań było stwierdzenie, że fagi ewoluując wysoce wyspecjalizowane i związane z wirionem białka zdolne do rozpoznania, wiązania i degradacji polisacharydów, szybko dostosowują się do istniejącej różnorodności barier węglowodanowych obecnych na powierzchni komórki bakteryjnej. Tym samym fagi dostarczają nam bardzo wszechstronnego zestawu narzędzi w postaci wysoce specyficznych enzymów, które można wykorzystać do zabijania, osłabiania

zjadliwości lub wykrywania bakterii. Co więcej, te białka, ze względu na szersze spektrum działania, mniejszą immunogenność oraz niższe prawdopodobieństwo rozwoju oporności, wydają się bardziej obiecujące jako czynniki przeciwdrobnoustrojowe niż fagi izolowane ze środowiska.

Badania dotyczące działania związków przeciwnowotworowych i przeciwgrzybiczych

Majkowska-Skrobek G, Augustyniak D, Lis P, Bartkowiak A, Gonchar M, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, Ułaszewski S. Killing multiple myeloma cells with the small molecule 3-bromopyruvate: implications for therapy. *Anti-cancer Drugs*, **2014**, 25(6): 673-82

Niedźwiecka K, Dyląg M, Augustyniak D, **Majkowska-Skrobek G**, Cal-Bąkowska M, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, Ułaszewski S. Glutathione may have implications in the design of 3-bromopyruvate treatment protocols for both fungal and algal infections as well as multiple myeloma. *Oncotarget*, **2016**, 7(40): 65614-65626.

Dyląg M, Pruchnik H, Pruchnik F, **Majkowska-Skrobek G**, Ułaszewski S. Antifungal activity of organotin compounds with functionalized carboxylates evaluated by the microdilution bioassay *in vitro*. *Med. Mycol.*, **2010**, 48(2): 373-83.

Murzyn A, Krasowska A, Augustyniak D, **Majkowska-Skrobek G**, Łukaszewicz M, D. Dziadkowiec D. The effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* infected human intestinal cell lines Caco-2 and Intestine 407. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2010**, 310: 17-23.

Kolejnym obszarem moich zainteresowań naukowo-badawczych były badania dotyczące antynowotworowego i przeciwgrzybiczego działania różnych związków, w szczególności 3-bromopirogronianu (3-BP). Badania dotyczące 3-BP były realizowane w ramach zainicjowanej przez prof. André Goffeau międzynarodowej współpracy trzech ośrodków naukowych, w której polską grupę badawczą reprezentował prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski z UW i [Ko i wsp., 2018]. Przesłanką do podjęcia badań były doniesienia naukowe wskazujące na możliwość zastosowania 3-BP w leczeniu nowotworów [Pedersen i wsp., 2012]. To założenie oparto na zweryfikowanej w modelu raka wątrobowokomórkowego hipotezie, zgodnie z którą 3-BP w komórkach nowotworowych hamuje aktywności kluczowych enzymów metabolizmu energetycznego komórki, zwłaszcza glikolizy zachodzącej w warunkach tlenowych, wykazując przy tym znikomą toksycność wobec komórek prawidłowych.

W pierwszym projekcie dotyczącym 3-BP porównaliśmy właściwości cytotoksyczne tego związku względem nowotworowych komórek linii szpiczaka mnogiego (RPMI 8226) oraz komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi obwodowej zdrowych osób (PBMC) [**Majkowska-Skrobek i wsp.**, 2014; **Niedźwiecka i wsp.**, 2016]. Mój udział w badaniach polegał na przeprowadzeniu szeregu testów biologicznych, których wyniki umożliwiły analizę cytotoksycznego działania zarówno samego 3-BP, jak i 3-BP stosowanego jednocześnie z inhibitorem syntezy glutationu, takim jak sulfoksymina butioniny (BSO), a także porównanie działania 3-BP z lekiem przeciwnowotworowym o nazwie Glivec. W wyniku przeprowadzonych badań wykazaliśmy, że 3-BP wywołuje efekt cytotoksyczny w komórkach szpiczaka już po 8 godzinach działania. Wydłużenie czasu ekspozycji do 24 godzin spowodowało, że efekt ten był obserwowany przy dwukrotnie niższym stężeniu związku 3-BP niż w komórkach prawidłowych. Porównując kinetykę pobierania znakowanego radioizotopowo 3-BP przez oba rodzaje komórek stwierdziliśmy istotnie wyższą akumulację związku w komórkach szpiczaka. Przyczyną zwiększonego wychwytu 3-BP była zwiększona ekspresja jednego z czterech transporterów kwasów monokarboksylowych (MCT), co wykazaliśmy metodą PCR w czasie rzeczywistym. Natomiast bezpośrednim skutkiem był drastyczny spadek poziomu ATP w komórkach nowotworowych, co z kolei potwierdziliśmy metodą luminometryczną. Tym samym udowodniliśmy, że jako pochodna pirogronianu, 3-BP pokonuje barierę błonową na

zasadzie symportu zależnego od transportera MCT1. Następnie indukuje spadek wewnątrzkomórkowego poziomu ATP i w konsekwencji zaburza gospodarkę energetyczną komórki prowadząc do jej śmierci w sposób specyficzny i selektywny. Wśród zmian indukowanych przez 3-BP na poziomie komórkowym stwierdziliśmy również obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia głównego antyoksydanta komórkowego, jakim jest glutation, co zdaje się stanowić kolejny ważny element mechanizmu cytotoksycznego 3-BP. Wykazaliśmy także, że stosowanie BSO jednocześnie z 3-BP synergistycznie wzmacnia cytotoksyczne działanie związku. Ponadto oznaczając luminescencyjnie reaktywne formy tlenu generowane w komórkach szpiczaka w odpowiedzi na 3-BP, zaobserwowaliśmy ich wzrost w sposób zależny od stężenia i czasu ekspozycji na związek, co może świadczyć o indukowaniu procesu apoptozy. Uzyskane dane skłoniły nas do wnioskowania, że silna indukcja stresu oksydacyjnego związana z deplecją wewnątrzkomórkowego poziomu ATP i wynikająca z istotnego obniżenia poziomu glutationu w komórkach szpiczaka pod wpływem 3-BP, ostatecznie powodują śmierć komórki.

W drugim projekcie dotyczącym działania 3-BP, prowadziliśmy badania z wykorzystaniem patogennych grzybów z rodzaju *Cryptococcus* i mikroalg z rodzaju *Prototheca* [Niedźwiecka i wsp., 2016]. Analizując wartości MIC dla 3-BP zaobserwowaliśmy zależność pomiędzy stężeniem glutationu występującym fizjologicznie w komórkach a ich wrażliwością na bójcze działanie związku, co oznacza, że im niższe było jego stężenie, tym komórki cechowała większa wrażliwość na 3-BP. Analogicznie do komórek szpiczaka, również i w komórkach grzybów i glonów, sam 3-BP znacząco obniżał poziom glutationu i wykazywał działanie wysoce synergistyczne z BSO.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że 3-BP, jako analog kluczowego metabolitu komórkowego jakim jest pirogronian, może stanowić alternatywną opcję terapeutyczną tak w leczeniu szpiczaka mnogiego, jak też kryptokokozy. Warto również podkreślić, iż 3-BP okazał się związkiem bardziej skutecznym w zabijaniu komórek szpiczaka *in vitro* niż Glivec, który jest zalecany w standardowym leczeniu nowotworów hematologicznych. Nie wykazywał on również właściwości mutagennych. Poza opisanymi publikacjami oryginalnymi, te wyniki zostały również zaprezentowane na dwóch konferencjach naukowych (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 7 i 12).

Innym aspektem moich poszukiwań naukowych były badania dotyczące przeciwgrzybiczego działania nowo zsyntezowanych związków chemicznych. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na dwóch konferencjach międzynarodowych (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 6 i 7) oraz opublikowane w artykule autorstwa Dyląg i wsp. [2010]. W tej pracy wykorzystując zalecaną przez CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) metodę mikrorozcieńczeń zbadaliśmy aktywność trzech nowych związków cynoorganicznych wobec szczepów środowiskowych oraz klinicznych, należących do ośmiu różnych gatunków grzybów drożdżopodobnych i jedenastu gatunków grzybów strzępkowych. Mój udział w projekcie polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej umożliwiającej ocenę cytotoksycznego działania związków wobec komórek nowotworowych pochodzących z ludzkiego nabłonka płuc (linia A549) oraz mysich fibroblastów tkanki łącznej (linia L929) z użyciem testu SRB. Wyniki badań jednoznacznie potwierdziły właściwości przeciwgrzybicze związków cynoorganicznych. Specyficzne dla gatunku zróżnicowanie wrażliwości grzybów, a tym samym różnice w grzybobójczym lub grzybostatycznym działaniu związków $[R_nSnX_{4-n}]$ były stosunkowo niewielkie i zależne zarówno od cząsteczki $[R_nSn]^+$, jak i typu liganda X. Niestety, stwierdziliśmy również dość wysokie właściwości cytotoksyczne tych związków w stosunku do dwóch linii komórkowych ssaków. Uzyskane wyniki badań *in vitro* mogą

stanowiąc podstawę do poszukiwania innych kompleksów $[R_3SnX]$ lub $[R_2SnX_2]$, gdzie X oznacza pochodne kwasów karboksylowych, grupy fosfonowe, sulfonowe lub amonowe. Takie związki powinny cechować się mniejszą toksycznością wobec komórek ssaczych, a w konsekwencji przyczynić się do wyznaczenia nowego kierunku syntezy bardziej skutecznych leków przeciwgrzybiczych.

W ramach rozwijania zainteresowań tematyką związków przeciwdrobnoustrojowych nawiązałam również współpracę z zespołem badawczym prof. dr hab. Marcina Łukaszewicza (Zakład Biotransformacji, Wydział Biotechnologii, UWr). W realizowanym wspólnie projekcie prowadziłam badania mające na celu określenie wpływu probiotycznego szczepu drożdżowego *Saccharomyces boulardii* na adhezję patogenu *Candida albicans* do ludzkich komórek nabłonka jelita cienkiego (linia Intestine 407) oraz jelita grubego (linia Caco-2). Wymiernym efektem tych badań jest publikacja autorstwa Murzyn i wsp. [2010], w której wykazaliśmy, że zarówno komórki *S. boulardii*, jak i ekstrakt z podłoża pochodzącego tego organizmu, znacząco hamują adhezję *C. albicans* do komórek nabłonkowych obu linii. Zaobserwowaliśmy również, że aktywne substancje zawarte w ekstrakcie hamują proces filamentacji i tworzenie strzępek *C. albicans*, a więc struktur, które determinują wirulencję patogenu [Yang i wsp., 2003]. Ekstrakt zmniejsza też wywołaną przez *C. albicans* i zależną od cytokin reakcję prozapalną w komórkach linii Caco-2, co potwierdziliśmy metodą PCR w czasie rzeczywistym. Tym samym dostarczyliśmy dowodów, że związki wydzielane przez *S. boulardii* do środowiska działają antyadhezyjnie i antywirulentnie wobec *C. albicans*, a także wykazują właściwości przeciwzapalne, dzięki czemu mogą znaleźć zastosowanie w terapii zakażeń tym patogenem. W kolejnych badaniach prowadzonych przez ten zespół badawczy wykazano, że spośród kilkudziesięciu różnych związków zawartych w ekstrakcie *S. boulardii*, główną substancją czynną odpowiedzialną za hamowanie filamentacji *C. albicans* jest kwas kaprynowy [Murzyn i wsp., 2010].

PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

	Liczba prac	IF*	Punkty MNiSW lub MEiN*	Punkty MEiN**
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	6	29,014	525	720
Pozostałe publikacje w czasopismach z bazy JCR	16	43,062	455	1330
Publikacje w czasopismach spoza bazy JCR*	11	-	41,5	360
Publikacje łącznie (po uzyskaniu stopnia doktora)	33	72,076	1021,5	2410
Rozdziały w podręcznikach akademickich i monografiach	6	-	-	-
Doniesienia konferencyjne krajowe i zagraniczne	35	-	-	-
Liczba cytowań wg <i>Scopus</i>	1010 (968 bez autocytowań)			
Index Hirscha wg <i>Scopus/Web of Science</i>	15			

* wskaźniki podane zgodnie z rokiem opublikowania

** punkty zgodnie z listą z 2021

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

Interdyscyplinarne podejście w rozwiązywaniu podjętych przeze mnie problemów badawczych wymagało nawiązania współpracy z naukowcami z różnych ośrodków naukowo-badawczych, w ramach której realizowane były badania oraz analizowane ich wyniki. Chciałabym przy tym podkreślić istotną rolę prof. dr hab. Zuzanny Drulis-Kawa w ułatwieniu mi tych kontaktów naukowych, jak również w pozyskaniu źródeł finansowania moich badań. Praca przy realizacji kilku projektów badawczych, w których pełniłam rolę wykonawcy (Załącznik 4A, pkt II.5), pozwoliła mi na wymianę poglądów i współdziałanie ze światowej klasy ekspertami m. in. z dziedziny biologii, genetyki i taksonomii wirusów, w tym z **prof. Andrew M. Kropinski** (*Department of Molecular & Cellular Biology, University of Guelph, Canada*), **prof. Rob Lavigne** (*Department of Biosystems, Laboratory of Gene Technology, KU Leuven, Belgium*) oraz **prof. Yves Briers** (*Laboratory of Applied Biotechnology, Department of Biotechnology, Ghent University, Ghent, Belgium*). Te badania dotyczyły biologii i genetyki fagów oraz otrzymywania rekombinowanych depolimeraz fagowych. Wymiernym efektem tej współpracy jest **dziewięć publikacji** [H2; H3; H5; Drulis-Kawa i wsp., 2011; Drulis-Kawa i wsp., 2012; Kęsik Szelołch i ws., 2013; Danis-Włodarczyk i wsp., 2015; Maciejewska i wsp., 2017; Latka i wsp., 2017] i **osiem doniesień konferencyjnych** (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 8, 10, 14, 17, 19, 20, 31 i 32). Uczestniczyłam również w warsztatach prowadzonych przez prof. Andrew M. Kropinski i prof. Rob Lavigne (Załącznik 4A, pkt V.1).

W ramach bilateralnego polsko-włoskiego projektu badawczego realizowanego w ramach porozumienia pomiędzy PAN i Krajową Radą ds. Badań Naukowych we Włoszech (AMMCNT-CNR n. 0015976) **odbyłam dwa staże naukowo-badawcze w Institute of Biostructure and Bioimaging, Italian National Research Council w Neapolu, we Włoszech** (Załącznik 4A, pkt II.7). Dzięki temu miałam okazję zapoznać się z technikami analizy strukturalnej białek i wspólnie w zespole kierowanym przez prof. Rita Berisio przeprowadziłam badania strukturalne rekombinowanych depolimeraz KP36gp50, KP32gp37 i KP32gp38. Podczas pierwszego pobytu wspólnie zainicjowaliśmy również badania nad uzyskaniem kryształu jednej z depolimeraz, w celu poznania jej struktury przestrzennej. Niestety, pomimo podjętych licznych prób krystalizacji, do tej pory nie udało się otrzymać kryształów o jakości umożliwiającej ich badania rentgenograficzne. Badania nad optymalizacją warunków krystalizacji są jednak nadal prowadzone w ramach finansowanego przez NCN projektu badawczego nr 2017/26/M/NZ1/00233, w którym pełnię rolę wykonawcy.

W tym samym czasie nawiązałam również **współpracę z prof. Carsten Struve** (*Department of Microbiology and Infection Control, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark*), w celu oznaczenia serotypów CPS analizowanych szczepów *K. pneumoniae*. **Wyniki tych wspólnych, międzynarodowych badań zostały opisane w publikacjach H2 i H3, wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, a także zaprezentowane w formie plakatów na czterech międzynarodowych konferencjach naukowych** (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 17, 18, 19 i 20).

W trakcie badań prowadzonych nad depolimerazą KP36gp50 **nawiązałam również współpracę z Zespołem prof. Jolanty Łukaszewicz** (*Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek, IITD PAN, Wrocław*), który zajmuje się m.in. analizą struktury białek i wykorzystuje w swych badaniach spektroskopię NMR. Mam również przyjemność

współpracować z dr Bogną Smug z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Wynikiem tej współpracy są publikacje, odpowiednio **H4** i **H6**, który wchodzi w skład osiągnięcia naukowego oraz dwa doniesienia konferencyjne (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 23 i 36).

Inne jednostki naukowe i osoby spoza macierzystej uczelni, z którymi współpracowałam wraz z wymiernym efektem współpracy:

- Katedra Propedeutyki Pediatrii i Klinika Immunologii Wieku Rozwojowego, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (obecnie III Katedra i Klinika Pediatrii, Immunologii i Reumatologii Wieku Rozwojowego) – współautorstwo pięciu publikacji i rozdziału w podręczniku (Załącznik 4A, pkt II.2, poz. 3, 6, 8, 9 i 11 oraz pkt II.1) oraz kilka doniesień konferencyjnych (Załącznik 4A, pkt II.3c, poz. 1, 3 i 4), a także organizacja dwóch konferencji naukowo-szkoleniowych o zasięgu krajowym (Załącznik 4A, pkt II.4)
- Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, prof. dr hab. Iwona Kątnik-Prastowska – współautorstwo trzech rozdziałów w podręczniku akademickim (Załącznik 4A, pkt II.1).
- Laboratorium Bakteriofagowe, IITD PAN we Wrocławiu, Zespół prof. dr hab. n. med. Andrzeja Górskiego – publikacje Drulis-Kawa i wsp., 2011 i Kęsik-Szeloch i wsp., 2013
- *Department of Molecular Biosciences, the Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Sweden* – publikacja Eriksson i wsp., 2015

Szczegółowy wykaz zespołów badawczych, z którymi podjęłam współpracę naukową wraz z wymiernym efektem tej współpracy zestawiono w załączniku 4A, pkt. II.9.

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

Osiągnięcia dydaktyczne i opieka naukowa nad studentami

Od czasu zatrudnienia w Zakładzie Mikrobiologii UW, najpierw na stanowisku asystenta, a później adiunkta, a następnie w trakcie mojej pracy w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii, działalność dydaktyczna stanowiła (i nadal stanowi) istotną część moich obowiązków zawodowych. W tym okresie prowadziłam zajęcia dla pięciu kierunków studiów, w tym: *Biologii*, *Biologii człowieka*, *Biotechnologii*, *Genetyki i Biologii Eksperymentalnej* oraz *Mikrobiologii*, łącznie z dziewięciu przedmiotów (Załącznik 4A, pkt V.4a). Dla pięciu z nich (*Wirusologia*, *Epidemiologia*, *Podstawy wirusologii*, *Zarys Wirusologii* i *Zarys wirusologii molekularnej*) opracowałam program przedmiotu oraz przygotowałam, a następnie prowadziłam wykłady. Dla przedmiotów *Wirusologia* i *Epidemiologia* opracowałam również program innej formy zajęć, które obecnie współprowadzę, jak również koordynuję ich dalszy przebieg. Wzięłam również udział w opracowaniu i przygotowaniu cyklu wykładów z *Biologii fagów*. Ponadto, w ramach projektu NCBiR „Zintegrowany Program Rozwoju Uniwersytetu Wrocławskiego 2018-2022”, opracowałam program prowadzonego przeze mnie przedmiotu *Patogeneza i diagnostyka zakażeń wirusowych* dla studiów

magisterskich na kierunku *Biologia*. Brałam również udział w opracowaniu programu i przygotowaniu ćwiczeń w ramach Letniej Szkoły Mikrobiologii (*General Microbiology*, Biol 4503) dla studentów z *University of Minnesota, Duluth, USA*, w latach 2008–2015 oraz dla studentów z *University of Clemson, South Caroline, USA* w latach 2017 i 2019.

W trakcie swojej pracy sprawowałam opiekę naukową nad przeszło 40 studentami pełniąc funkcję promotora 18 prac magisterskich i 23 prac licencjackich, a także przygotowałam kilkanaście recenzji prac dyplomowych. W latach 2013–2019 pełniłam rolę opiekuna studentów odbywających wolontariat lub praktykę zawodową w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii UW. Od 2019 roku jestem promotorem pomocniczym słuchaczki Studiów Doktoranckich na Wydziale Nauk Biologicznych UW realizującej temat pt: „Charakterystyka mutantów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych z populacji traktowanej fagami litycznymi” (obrona przewidziana na początku roku 2023 roku). Szczegółowy wykaz aktywności dydaktycznej przedstawiłam w załączniku 4A, pkt V.3 oraz V.4a i V.4b).

Popularyzacja nauki

W ramach promocji Wydziału Nauk Biologicznych i UW byłam współautorką scenariuszy i osobą prowadzącą dwa cykle warsztatów dla dzieci, w ramach Uniwersytetu Dzieci, w latach 2013 i 2015. Kilkakrotnie brałam też udział w przygotowaniu i prowadzeniu warsztatów oraz wykładów podczas Dolnośląskiego Festiwalu Nauki oraz w ramach dolnośląskiej edycji Nocy Biologów. Byłam również wykładowcą specjalistycznego kursu „*Badania układu odpornościowego*” w ramach szkolenia podyplomowego diagnostów laboratoryjnych w latach 2008 i 2009. Pełen wykaz tych aktywności przedstawiłam w załączniku 4A, pkt V.4c i II.3b.

Recenzje artykułów naukowych

Dotychczas wykonałam 39 recenzji artykułów naukowych zgłoszonych do publikacji w 21 czasopismach z bazy JCR, w tym m. in. w *Frontiers in Microbiology* (IF 6.064), *Computer Methods and Programs in Biomedicine* (IF 7.027), *Molecules* (IF 4.927), *Microbial Biotechnology* (IF 6.575), *Viruses* (IF 5.818). Wykonałam również 5 recenzji prac naukowych przeznaczonych do publikacji w czasopismach spoza bazy JCR oraz oceny przydatności podręcznika akademickiego „*Immunologia. Podstawowe zagadnienia i aktualności*” autorstwa Witolda Laska dla Wydawnictwa Naukowego PWN. Pełen wykaz tytułów czasopism wraz z liczbą recenzji zestawiałam w załączniku 4A, pkt II.8.

Członkostwo w towarzystwach naukowych i udział w komitetach organizacyjnych konferencji naukowych

Od 2014 roku należę do ISVM (*International Society for Viruses of Microbes*) i jako członek komitetu organizacyjnego aktywnie uczestniczyłam w organizacji jednej z największych międzynarodowych konferencji wirusologicznych *Viruses of Microbes: Biodiversity and future applications* realizowanej pod patronatem *European Molecular Biology Organization* (EMBO) oraz ISVM, która odbyła się w dniach 9-13 lipca 2018 roku we Wrocławiu. Brałam również udział w organizacji krajowych III i IV Konferencji Naukowo-Szkoleniowych, które odbyły się odpowiednio w 2001 r. (jako słuchaczka Studium Doktoranckiego) i w 2003 r. we Wrocławiu. Od 2022 roku jestem również członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

Działalność na rzecz Uniwersytetu Wrocławskiego

W ramach mojej działalności na rzecz UWr (Załącznik 4A, pkt V.5) pełniłam funkcje opiekuna studentów studiów licencyjnych na kierunku *Biologia*, specjalizacja *Mikrobiologia* w roku akademickim 2004/2005. Byłam również członkiem Komisji Kasacyjnej w latach 2010–2011 oraz członkiem Rady Instytutu Genetyki i Mikrobiologii UWr (od roku 2016). W latach 2013/2014–2016/2017 uczestniczyłam w pracach Zespołu Autorskiego powołanego do opracowania programu kształcenia na Stacjonarnych Studiach Doktoranckich Biologii. W tym samym czasie (2013) zostałam powołana na Przewodniczącą Zespołu ds. utworzenia i wdrożenia programu kształcenia na Studiach Niestacjonarnych Biologii zarówno na poziomie studiów licencyjnych, jak i magisterskich. Jako Członek Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej na rok akademicki 2013/2014 uczestniczyłam w naborze studentów na niestacjonarne studia I i II stopnia (kierunek *Biologia*). Pełniłam również funkcję członka Wydziałowej Komisji powołanej do przeprowadzenia egzaminu licencyjnego na kierunku *Biologia* w roku akademickim 2009/2010 oraz Egzaminatora Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej na Wydziale Nauk Biologicznych w ramach rekrutacji na studia stacjonarne II stopnia (kierunek *Mikrobiologia*) w roku akademickim 2018/2019. Od 2016 roku do chwili obecnej jako członek Kierunkowego Zespołu ds. Jakości Kształcenia dla kierunku *Mikrobiologia*, stale uczestniczę w pracach mających na celu dostosowanie programu i jakości kształcenia do zmieniających się wymagań ustawowych.

Nagrody

Za działalność dydaktyczną i organizacyjną czterokrotnie otrzymałam nagrodę Rektora (2008, 2013, 2018, 2019). Jestem również laureatką oraz Nagrody Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2014) za zespołowe osiągnięcia dydaktyczne: opracowanie i realizację angielskojęzycznego kursu *General Microbiology* dla studentów z *University of Minnesota Duluth*, USA. W 2022 roku zostałam wyróżniona nagrodą Rektora za osiągnięcia naukowe (Załącznik 4A, pkt V.2).

Literatura

- Adams MH, Park BH. An enzyme produced by a phage host-cell system. II. The properties of the polysaccharide depolymerase. *Virology*, 1956, 2: 719–736.
- Ahmad M, Khan AU. Global economic impact of antibiotic resistance: A review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2019, 19:313-316.
- Allen RC, Popat R, Diggle SP, et al. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2014, 12: 300–308.
- Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 2022, 399: 629–55.
- Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2019, 43: 123–144.
- Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2016, 363(4): fnw002.
- Burmeister AR, Fortier A, Roush C, et al. Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, 117: 11207–11216.
- Chhibber S, Nag D, Bansal S. Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage. *BMC Microbiol.*, 2013,13: 174.
- De Angelis HL, Poerio N, Di Pilato V, et al. Phage resistance is associated with decreased virulence in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of the clonal group 258 clade II lineage. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 762.
- de Astorza B, Cortés G, Crespi C, et al. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2004, 72(3): 1767-1774.
- De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2020, 33: e00181-19.
- De Soya A, Hall AJ, Mahenthalingam E, et al. EU FP7 funded COST Action BM1003 “Cell surface virulence determinants of cystic fibrosis pathogens”. Developing an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel. *Microbiologyopen*, 2013, 2(6): 1010-23.
- Díaz-Galián MV, Vega-Rodríguez MA, Molina F. PhageCocktail: An R package to design phage cocktails from experimental phage-bacteria infection networks. *Comput. Methods Programs Biomed.*, 2022, 221: 106865.
- Dong N, Yang X, Chan EW, et al. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*, 2022, 79: 103998.
- Doorduyn DJ, Rooijackers SHM, van Schaik W, et al. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiol.*, 2016, 221: 1102–1109.
- Dunne M, Rupf B, Tala M, et al. Reprogramming bacteriophage host range through structure-guided design of chimeric receptor binding proteins. *Cell Rep.*, 2019, 29(5): 1336-1350.e4.
- Dutton GG, Merrifield EH. Acylated oligosaccharides from *Klebsiella* K63 capsular polysaccharide: depolymerization by partial hydrolysis and by bacteriophage-borne enzymes. *Carbohydr Res.*, 1982, 103(1): 107-128.
- Dutton GGS, Choy YM. Capsular polysaccharide from *Klebsiella* type 21. *Carbohydr. Res.*, 1972, 21: 169–172.
- Dutton GGS, Parolis H, Joseleau J-P, et al. The use of bacteriophage depolymerization in the structural investigation of the capsular polysaccharide from *Klebsiella* serotype K3. *Carbohydr. Res.*, 1986, 149: 411–423.
- Ernst CM, Braxton JR, Rodriguez-Osorio CA, et al. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat. Med.*, 2020, 26:705–711.
- Eskenazi A, Lood C, Wubbolts J, et al. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat. Commun.*, 2022, 13, 302.
- Favre-Bonte S, Joly B, Forestier C. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. *Infect Immun.*, 1999, 67(2): 554-561.
- Follador R, Heinz E, Wyres KL et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb. Genom.*, 2016, 25;2(8): e000073.
- Geisinger E, Isberg RR. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog.*, 2015, 11(2): e1004691.
- Gorski A, Miedzybrodzki R, Wegrzyn G, et al. Phage therapy: current status and perspectives. *Med. Res. Rev.*, 2020, 40: 459 – 463.
- Hasan M, Ahn J. Evolutionary dynamics between phages and bacteria as a possible approach for designing effective phage therapies against antibiotic-resistant bacteria. *Antibiotics*, 2022, 11: 915.
- Hesse S, Rajaure M, Wall E, et al. Phage resistance in multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 evolves via diverse mutations that culminate in impaired adsorption. *MBio*, 2020, 11: e02530–e02519.
- Hsieh PF, Lin HH, Lin TL, et al. Two T7-like bacteriophages, K5-2 and K5-4, each encodes two capsule depolymerases: isolation and functional characterization. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1): 4624.
- Imperi F, Fiscarelli EV, Visaggio D, et al. Activity and Impact on Resistance Development of Two Antivirulence Fluoropyrimidine Drugs in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, 9: 49.
- Insua JL, Llobet E, Moranta D et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.*, 2013, 81: 3552–65.
- Jenkins J, Mayans O, Pickersgill R. Structure and evolution of parallel beta-helix proteins. *J. Struct. Biol.*, 1998, 122(1-2): 236-246.
- Joseleau JP, Marais MF. Structure of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* K-type 63. *Carbohydr. Res.*, 1979, 77: 183–190.

- Junker M, Schuster CC, McDonnell AV, et al. Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(13): 4918-4923.
- Kassa T, Chhibber S. Thermal treatment of the bacteriophage lysate of *Klebsiella pneumoniae* B5055 as a step for the purification of capsular depolymerase enzyme. *J. Virol. Methods*, 2012, 179: 135–141.
- Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. Diversity and function of phage encoded depolymerases. *Front. Microbiol.*, 2020, 10: 2949.
- Ko YH, Niedźwiecka K, Casal M, et al. 3-Bromopyruvate as a potent anticancer therapy in honor and memory of the late Professor André Goffeau. *Yeast*, 2019, 36(4): 211-221.
- Kortright KE, Chan BK, Koff JL, et al. Turner Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe*, 2019, 25: 219-232.
- Koskella B, Brockhurst MA. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. 2014. *FEMS Microbiol. Rev.*, 38: 916-931.
- Labrie, S.J.; Samson, J.E.; Moineau, S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, 8: 317.
- Latka A, Leiman PG, Drulis-Kawa Z, et al. Modeling the architecture of depolymerase-containing receptor binding proteins in *Klebsiella* phages. *Front. Microbiol.*, 2019, 10: 2649.
- Li B, Zhao Y, Liu C et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.*, 2014, 9(9): 1071-81.
- Lin H, Paff ML, Molineux IJ, et al. Antibiotic therapy using phage depolymerases: robustness across a range of conditions. *Viruses*, 2018, 10(11): 622.
- Lin TL, Hsieh PF, Huang YT, et al. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: Implication in typing and treatment. *J. Infect. Dis.*, 2014, 210: 1734–1744.
- Lood C, Haas PJ, van Noort V, et al. Shopping for phages? Unpacking design rules for therapeutic phage cocktails. *Curr. Opin. Virol.*, 2022, 52: 236-243.
- March C, Cano V, Moranta D, et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS One*, 2013, 8:e56847.
- Martiny JB, Jones SE, Lennon JT, et al. Microbiomes in light of traits: A phylogenetic perspective. *Science*, 2015, 350(6261): aac9323.
- Maura D, Ballok AE, Rahme LG. Considerations and caveats in anti-virulence drug development. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2016, 33:41–46.
- Melo LDR, Oliveira H, Pires DP, et al. Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2020, 46(1): 78-99.
- Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, et al. Clinical aspects of phage therapy. *Advances in virus research*, 2012, 83: 73-121.
- Montrucchio G, Corcione S, Sales G, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in ICU-admitted COVID-19 patients: Keep an eye on the ball. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2020, 23: 398-400.
- Moulton-Brown CE, Friman VP. Rapid evolution of generalised resistance mechanisms can constrain the efficacy of phage-antibiotic treatments. *Evol. Appl.*, 2018, 11: 1630–1641.
- Murzyn A, Krasowska A, Stefanowicz P, et al. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. *PLoS One*, 2010, 5: e12050.
- Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2017, 41: 252–275.
- Niemann H, Chakraborty AK, Friebolin H, et al. Primary structure of the *E. coli* serotype K42 capsular polysaccharide and its serological identity with the *Klebsiella* K63 polysaccharide. *J. Bacteriol.*, 1978, 133: 390–391.
- Oechslin, F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*, 2018, 10(7): 351.
- Oliveira H, Drulis-Kawa Z, Azeredo J. Exploiting phage-derived carbohydrate depolymerases for combating infectious diseases. *Trends Microbiol.*, 2022, 30(8): 707-709.
- Oliveira H, Mendes A, Fraga AG, et al. K2 capsule depolymerase is highly stable, is refractory to resistance, and protects larvae and mice from *Acinetobacter baumannii* sepsis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2019, 85(17): e00934-19.
- Olszak T, Shneider MM, Latka A, et al. The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence. *Sci. Rep.*, 2017, 24:7(1): 16302.
- Opoku-Temeng C, Kobayashi SD, DeLeo FR. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2019, 17:1360-1366.
- Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2016, 80:629–661.
- Pan YJ, Lin TL, Chen YY, et al. Identification of three podoviruses infecting *Klebsiella* encoding capsule depolymerases that digest specific capsular types. *Microb. Biotechnol.*, 2019, 12(3): 472-486.
- Pan Y-J, Lin T-L, Lin Y-T, et al. Identification of capsular types in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by *wzc* sequencing and implications for capsule depolymerase treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, 59: 1038–1047.
- Patro LPP, Rathinavelan T. Targeting the sugary armor of *Klebsiella* species. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, 9: 367.
- Pedersen PL. 3-Bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective “small molecule” anti-cancer agent taken from labside to bedside: Introduction to a special issue. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2012, 44: 1–6.
- Pires DP, Costa AR, Pinto G, et al. Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2020, 44(6): 684–700.
- Pirnay JP, Ferry T, Resch G. Recent progress toward the implementation of phage therapy in Western medicine. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2022, 46(1): fuab040.
- Pirnay J-P. Phage therapy in the year 2035. *Front. Microbiol.*, 2020, 11: 1171.

- Rendueles O, Garcia-Garcera M, Neron B, et al. Abundance and co-occurrence of extracellular capsules increase environmental breadth: Implications for the emergence of pathogens. *PLoS Pathog.*, 2017, 13(7): e1006525.
- Rieger-Hug D, Stirm S. Comparative study of host capsule depolymerase associated with *Klebsiella* bacteriophages. *Virology*, 1981, 113: 363–378.
- Russo TA, Spellberg B, Johnson J R. Important complexities of the antivirulence target paradigm: a novel ostensibly resistance-avoiding approach for treating infections. *J. Infect. Dis.*, 2016, 213: 901–903.
- Sahly H, Keisari Y, Ofek I. Manno(rhamno)biose-containing capsular polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* enhance opsono-stimulation of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Innate Immune*, 2009, 1: 136–44.
- Sanjuán R. Collective infectious units in viruses. *Trends Microbiol.*, 2017, 25(5): 402–412.
- Schwarzer D, Stummeyer K, Gerardy-Schahn R, et al. Characterization of a novel intramolecular chaperone domain conserved in endosialidases and other bacteriophage tail spike and fiber proteins. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282: 2821–2831.
- Shepherd VL, Campbell EJ, Senior R, et al. Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 1982, 32:423–431.
- Squeglia F, Maciejewska B, Łątka A, et al. Structural and functional studies of a *Klebsiella* phage capsule depolymerase tailspike: mechanistic insights into capsular degradation. *Structure*, 2020, 28(6): 613–624.
- Suh GA, Lodise TP, Tamma PD, et al. Antibacterial resistance leadership group. Considerations for the use of phage therapy in clinical practice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2022, 66(3): e0207121.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, 18, 318–327.
- Tal N, Sorek R. SnapShot: Bacterial immunity. *Cell*, 2022, 185: 578–578.
- Tan D, Zhang Y, Qin J, et al. A frameshift mutation in *wcaJ* associated with phage resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms*, 2020b, 8: 1–13.
- Tan TY, Ong M, Cheng Y, et al. Hypermucoviscosity, *rmpA*, and aerobactin are associated with community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2019, 52(1): 30–34.
- Tan YH, Chen Y, Chu WHW, et al. Cell envelope defects of different capsule-null mutants in K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* can affect bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 2020a, 113(5): 889–905.
- Torres-Barceló C, Hochberg ME. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends Microbiol.*, 2016, 24(4): 249–256.
- Uddin MJ, Kim B, Dawan J et al. Assessment of antibiotic resistance in bacteriophage-insensitive *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathog.*, 2019, 135: 103625.
- Volozhantsev VN, Shpirt MA, Borzilov IA, et al. Characterization and therapeutic potential of bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with β -galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 Capsular Type. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9(11): 732.
- Walker KA, Miller VL. The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2020, 54: 95–102.
- Weigele PR, Scanlon E, King J. Homotrimeric, beta-stranded viral adhesins and tail proteins. *J. Bacteriol.*, 2003, 185(14): 4022–4030.
- Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, 75: 39–68.
- Wick RR, Heinz E, Holt KE, et al. Kaptive Web: user-friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. *J. Clin. Microbiol.*, 2018, 56: e00197–18.
- Würstle S, Stender J, Hammerl JA, et al. Practical assessment of an interdisciplinary bacteriophage delivery pipeline for personalized therapy of Gram-negative bacterial infections. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022, 15(2): 186.
- Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, 18: 344–359.
- Wyres, KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2018, 45: 131–139.
- Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2003, 36(4):223–8.
- Yao H, Qin S, Chen S et al. Emergence of carbapenem resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect. Dis.*, 2018;18:25–3099(17)30628-X.