

Załącznik 3

*do Wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego
dra Szymona Ziętkiewicza*

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Szymon Krzysztof Ziętkiewicz

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

2006 Doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii

Stopień nadany przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku na podstawie rozprawy pt. „Współdziałanie białek opiekuńczych systemów Hsp70 i Hsp100”, wykonanej w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii. Promotor prof. dr hab. Krzysztof Liberek.

Rozprawa została nagrodzona Nagrodą Prezesa Rady Ministrów.

2001 Magister biotechnologii

Stopień nadany przez Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku. Praca magisterska pt. „Wpływ acylowych pochodnych L-karnityny na fizykochemiczne właściwości dwuwarstwy lipidowej” wykonana została pod opieką prof. dr hab. Wiesławy Łysiak – Szydlowskiej, w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Żywienia Klinicznego Akademii Medycznej w Gdańsku. Część laboratoryjna wykonana została w Sezione di Biochimica, Dipartimento di Medicina Interna Uniwersytetu w Perugii w trakcie 10-miesięcznego pobytu w laboratorium prof. Giuseppe Arientiego, zaś część obliczeniowa we współpracy z Zakładem Modelowania Molekularnego Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (prof. dr hab. Adam Liwo).

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

2007 – obecnie

Adiunkt, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański

2006 – 2007

Asystent, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Osiągnięcie naukowe przedstawione przeze mnie w niniejszym wniosku stanowi cykl powiązanych tematycznie pięciu publikacji opublikowanych w latach 2010-2021. Cykl ten, zatytułowany „Właściwości i molekularny mechanizm działania dezagregaz AAA+” składa się z następujących prac oryginalnych:

- 1) **Ziętkiewicz, S.**, Ślusarz, M., Ślusarz, R., Liberek, K., Rodziewicz-Motowidło, S. (2010). *Conformational stability of the full-atom hexameric model of the ClpB chaperone from Escherichia coli*. *Biopolymers*, 93(1), 47–60. DOI:10.1002/bip.21294 (IF_{2y}=2,572; pkt MNiSW=25)
- 2) Lipińska, N*, **Ziętkiewicz, S***, Sobczak, A.,* Jurczyk, A., Potocki, W., Morawiec, E., Waurzycka A., Gumowski K., Ślusarz M., Rodziewicz-Motowidło S., Chruściel E., Liberek, K. (2013). *Disruption of Ionic Interactions between the Nucleotide Binding Domain 1 (NBD1) and Middle (M) Domain in Hsp100 Disaggregase Unleashes Toxic Hyperactivity and Partial Independence from Hsp70*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2857–2869. DOI:10.1074/jbc.M112.387589 (IF_{2y}=4,6; pkt MNiSW=35)

- 3) Wortmann, S.♦, Ziętkiewicz, S.*, Kousi, M.,* Szklarczyk, R.,* Haack, T. B., Gersting, S. W., Muntau AC., Rakovic A., Renkema GH., Rodenburg RJ., Strom TM., Meitinger T., Rubio-Gozalbo ME., Chrusciel E., Distelmaier F., Golzio C., Jansen JH., van Karnebeek C., Lillquist Y., Lücke T., Öunap K., Zordania R., Yapfite-Lee J., van Bokhoven H., Spelbrink JN., Vaz FM., Pras-Raves M., Ploski R., Pronicka E., Klein C., Willemsen MA., de Brouwer AP., Prokisch H., Katsanis N., Wevers, RA. (2015). *CLPB mutations cause 3-methylglutaconic aciduria, progressive brain atrophy, intellectual disability, congenital neutropenia, cataracts, movement disorder*. *American Journal of Human Genetics*, 96(2), 245–257.
DOI:10.1016/j.ajhg.2014.12.013
(IF_{2y}=10,794; pkt MNiSW=45)

- 4) Mróz D., Wyszowski H., Szablewski T., Zawieracz K., Dutkiewicz R., Bury K., Wortmann S. B., Wevers RA., Ziętkiewicz S.♦ (2020). *CLPB (caseinolytic peptidase B homolog), the first mitochondrial protein refoldase associated with human disease*. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2020, 1864(4), 1–3.
DOI:10.1016/j.bbagen.2020.129512
(IF_{2y}=3,422; pkt MNiSW=100)

- 5) Wortmann S.,*♦ B., Ziętkiewicz S.* Guerrero-Castillo S., Feichtinger R. G., Wagner M., Russell Jacqui, Ellaway C., Mróz D., Wyszowski H., Weis D., Hannibal I., von Stülpnagel C., Cabrera-Orefice A., Lichter-Konecki U., Gaesser J., Windreich R., Myers KC., Lorschbach R., Dale RC., Gersting S., Prada CE., Christodoulou J., Wolf N. I., Venselaar H., Mayr JA., Wevers RA.: *Neutropenia and intellectual disability are hallmarks of biallelic and de novo CLPB deficiency*. *Genetics in Medicine*, 2021, DOI:10.1038/s41436-021-01194-x
(IF_{2y}=8,904; pkt MNiSW=200)

Gwiazdką * oznaczono współautorów o jednakowym ze mną wkładzie w powstanie danej pracy. W nawiasie podano współczynnik oddziaływania liczony za okres 2 lat (IF_{2y}) oraz punktację z ministerialnego wykazu publikacji właściwego dla roku wydania danej pracy (MEiN). Romb ♦ oznacza autora korespondencyjnego.

Powyższy cykl publikacji przedstawia wyniki otrzymane w trakcie mojej pracy w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej (obecnie Zakład Biochemii Białek) Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG/GUMed. W ramach mojej pracy doktorskiej realizowanej w tej jednostce badałem współpracę bakteryjnego systemu białek opiekuńczych Hsp70 (DnaK wraz z białkami DnaJ i GrpE) z dezagregazą ClpB w reaktywacji zagregowanych białek przy użyciu opracowanej przeze mnie metodyki opartej o termicznie denaturowane GFP jako modelowy substrat (Załącznik 4: pozycje 1, 2 zestawienia całkowitego dorobku naukowego).

Po ukończeniu badań wchodzących w skład mojej rozprawy doktorskiej postanowiłem (korzystając z kompetencji zdobytych w zespole prof. dr hab. A. Liwo w ramach pracowni magisterskiej) rozwinąć dotychczasowy warsztat badawczy z zakresu biochemii białek o elementy analizy struktura-funkcja w odniesieniu do znacznie słabiej zbadanego wówczas komponentu Hsp100. Bakteryjne i drożdżowe (a także roślinne) dezagregazy Hsp100 należą do rodziny ATPaz AAA+ (ang. *ATPase Associated with various Activities*), szerokiej choć powiązanej strukturalnie grupy białek. Pomimo bardzo szerokiego wachlarza pełnionych przez białka AAA+ funkcji (obejmujących obok badanej przeze mnie reaktywacji agregatów białkowych m.in. degradację białek, rearanżacje kompleksów białkowych, udział w replikacji DNA) cechują się one, prócz podobieństwa sekwencji w obrębie definiującej grupę charakterystycznej domeny ATPazowej, również podobnym mechanizmem działania. Tworząc oligomeryczny (najczęściej heksameryczny) pierścień, wykorzystują one energię hydrolizy ATP do translokacji swojego substratu (może być nim rozwijany łańcuch polipeptydowy) przez kanał utworzony w centrum pierścienia. Bakteryjna dezagregaza ClpB posiada zdolność do reaktywacji białek poddanych uprzednio denaturacji termicznej, zależnej od ATP oraz obecności maszyny Hsp70, która leży u podłoża zjawiska indukowanej termotolerancji. Niestety jednak dane literaturowe dotyczące struktury atomowej pełnej długości białka ClpB obejmowały jedynie jedną strukturę krystalograficzną (PDB ID:1QVR) o rozdzielczości 3 Å (R_{free} 0.307) białka *T. thermophilus*, która jednakże nie przedstawiała funkcjonalnej formy heksamerycznej oraz pozostawiała nie rozwiązane fragmenty pętli. Wobec tego zainicjowałem współpracę z zespołem prof. Rodziewicz-Motowidło (Wydz. Chemii UG) mającą na celu odtworzenie struktury badanego przeze mnie heksameru ClpB z *E. coli* metodami *in silico*. Owocem tej współpracy jest pierwsza z publikacji cyklu będącego podstawą niniejszego wniosku, Ziętkiewicz S. i wsp., Biopolymers 2010. Celem uzyskania struktury heksameru zaproponowałem odtworzenie układu heksamerycznego dla rozwiązanej krystalograficznie struktury białka z *T. thermophilus* na podstawie opisanych w literaturze (Diemand, Lupas 2006, J. Struct. Biol.,156: 230) charakterystycznych cech strukturalnych heksamerów innych poznanych białek AAA+

a następnie nałożenie na tak otrzymany heksamery model homologicznego białka *E. coli* z zadokowanymi cząsteczkami ATP. Ponieważ dezagregazy ClpB posiadają w swojej sekwencji dwie domeny ATPazowe typowe dla rodziny AAA (domeny NBD1 i NBD2), możliwe było utworzenie dwóch modeli oligomerycznych, powstałych przez określenie kluczowych dla geometrii heksamery podstawników spośród leżących w NBD1 lub też leżących w NBD2. Przeprowadzona następnie symulacja dynamiki molekularnej (MD) pozwoliła na weryfikację stabilności obu modeli, wskazując, że model w którym geometria oligomeryzacji oparta była o podstawniki pierwszej domeny ATPazowej uległ dysocjacji, zaś model oparty o heksameryzację poprzez NBD2 pozostał stabilny. Analiza trajektorii MD (450 ps) uzyskanej dla stabilnego modelu wykazała pojawienie się licznych, nieobecnych w startowej strukturze, oddziaływań pomiędzy podjednostkami heksamery w ciągu pierwszych 50 ps symulacji, prowadzących do zmniejszenia powierzchni kompleksu dostępnej dla rozpuszczalnika, aczkolwiek odległości pomiędzy poszczególnymi parami podjednostek, pomimo ogólnej wysokiej symetrii struktury czwartorzędowej, okazały się zróżnicowane. Końcowa struktura cechowała się otwartym kanałem o szerokości min. 20 Å i długości ok. 90 Å. Analiza trajektorii wykazała, że obszar tzw. domeny M, będącej częścią domeny ATPazowej NBD1 i mającej α -helikalną strukturę typu „coiled coil”, wystającą radialnie na zewnątrz pierścienia, cechuje się największą swobodą konformacyjną, sięgającą ok 60 Å RMSD atomów α C. Tak duża ruchliwość tego fragmentu, niezbędnego do Hsp70-zależnej dezagregacji, tłumaczy zapewne trudności z uzyskaniem form krystalicznych heksamery ClpB. Mój wkład w powstanie tej pracy, prócz zainicjowania badań i zaproponowania metodyki modelowania heksamery, obejmował także udział w analizie i interpretacji wyników oraz pisaniu manuskryptu.

Dane w postaci trajektorii dynamiki molekularnej uzyskane w powyżej opisanej pracy zwróciły moją uwagę na oddziaływania pomiędzy resztami znajdującymi się w ruchliwej domenie M a resztami pozostałej, katalitycznej części NBD1 w dezagregazach AAA+. Dzięki kontynuacji współpracy z zespołem prof. Rodziejewicz-Motowidło uzyskaliśmy homologiczny model struktury białka Hsp104, pochodzącego z *S. cerevisiae* ortologu bakteryjnej dezagregazy ClpB. Okazało się, że podobnie jak w przypadku białka ClpB (dane nieopublikowane) również i w przypadku drożdżowego Hsp104 występuje charakterystyczny układ potrójnego mostka solnego, łączącego konserwowaną resztę domeny M D484_{Hsp104}/E481_{ClpB} (w pozycji tej w 100% z analizowanych 498 sekwencji występuje reszta z ładunkiem ujemnym) z równie silnie konserwowanymi dodatnio naładowanymi K358_{Hsp104}/R353_{ClpB} w obrębie domeny NBD1, oddziałującymi dalej w jej obrębie z ujemnie naładowanymi resztami domeny NBD1, tj. D184_{Hsp104}/D179_{ClpB}. Chcąc zweryfikować postawioną przeze mnie tezę o istnieniu oraz istotności tych oddziaływań w działaniu dezagregaz AAA+

zaprojektowałem badania oparte o mutagenezę miejscowo-specyficzną tego właśnie rejonu mającą zaburzyć te oddziaływania poprzez zamianę ładunku odpowiednich reszt na przeciwny oraz przywróceniu ich poprzez „odwrócenie” par ładunków w tychże pozycjach. Rezultaty tych badań opisuje publikacja Lipińska N., Ziętkiewicz S., Sobczak A. i wsp., JBC 2013, stanowiąca drugi element cyklu stanowiącego niniejsze osiągnięcie naukowe. W publikacji tej jestem autorem o jednakowym wkładzie wraz z dr. Natalią Litwińską (pełniąc rolę promotora pomocniczego jej rozprawy doktorskiej) oraz mgr Alicją Sobczak. Co ciekawe, moje początkowe założenie, mówiące iż odwrócenie ładunku u pojedynczych reszt stanowiących wspomniany podwójny mostek solny spowoduje utratę aktywności dezagregacyjnej Hsp104 i ClpB, okazało się jednak mylne – wprost przeciwnie, utrata oddziaływań między NBD1 a domeną M (warianty K358E oraz D484K białka Hsp104, wariant R353E białka ClpB) okazała się bardzo silnie aktywować działanie dezagregacyjne obydwu tych białek. Stanowi to jednak równie silne potwierdzenie zarówno istnienia postulowanych przez analizę strukturalną *in silico* oddziaływań, jak i ich rolę funkcjonalną w regulacji aktywności badanych dezagregaz. Dalsza analiza biochemiczna oczyszczonych wariantów wykazała ponadto, że hiperaktywność dezagregacyjna niektórych z analizowanych wariantów powiązana jest ze zniesieniem zależności od systemu Hsp70 (białek DnaK/DnaJ/GrpE w układzie bakteryjnym oraz Ssa1/Ydj1 w układzie drożdżowym). W przypadku mutacji odwracających ładunek pary aminokwasów (D184K/K358E dla Hsp104 i D197K/R353E u ClpB), przywracając przyciąganie elektrostatyczne pomiędzy domenami M i NBD1, obserwuje się utratę nadaktywności oraz przywrócenie zależności od Hsp70. Wynik ten oznacza, że domena M, za pośrednictwem badanych oddziaływań, utrzymuje dezagregazę ClpB/Hsp104 w stanie zahamowanym, zaś interakcja z białkami systemu Hsp70 powoduje odblokowanie i aktywną dezagregację substratu. Mechanizm ten, jak się następnie okazało, posiada istotne znaczenie fizjologiczne, w omawianej publikacji zostały zawarte również wyniki obserwacji *in vivo* komórek niosących analizowane warianty genów Hsp104 i ClpB. Wyniki obserwacji wskazały, że warianty genu Hsp104 które w badaniach *in vitro* wykazywały się nadaktywnością i zniesieniem zależności od Hsp70, *in vivo* powodowały toksyczność wobec komórek drożdżowych oraz wyraźną zmianę ich morfologii objawiającą się znacznym powiększeniem komórek; ich obecność prowadziła do utraty plazmidu niosącego badany wariant w szczepie $\Delta HSP104$. W przypadku bakterii, nadaktywne warianty ClpB nie niosły wprawdzie aż tak toksycznego fenotypu, jednakże wariant R353E powodował silne zahamowanie wzrostu w podwyższonej temperaturze. Morfologia komórek w tych warunkach również podlegała zasadniczej zmianie, obserwowaliśmy bowiem ich silną filamentację. W przypadku obu organizmów, w obserwacjach *in vivo* przywrócenie oddziaływań NBD1-M przez kompensujące mutacje przywracające odwrotnie spolaryzowany mostek

solny powodowały przywrócenie fizjologicznej morfologii i zniesienie toksyczności. Świadczy to o tym, że permanentna, pozostająca poza kontrolą systemu Hsp70, nadaktywność dezagregazy AAA+ jest silnie szkodliwa dla komórek, zapewne poprzez mechanizm w którym zamiast polipeptydu pochodzącego ze zagregowanego zdenaturowanego białka, translokacji przez kanał pierścienia dezagregazy podlegają (niezidentyfikowane jeszcze) czynniki natywne, co poprzez ich rozfałdowanie, dysocjację kompleksów itp. może tłumaczyć obserwowane efekty fenotypowe. Moja rola w powstanie tej pracy, prócz zainicjowania i zaplanowania badań, w tym wytypowania reszt poddanych mutagenizie, obejmowała także analizę strukturalną modelu Hsp104, wykonanie części pomiarów renaturacji GFP, udział oraz bezpośredni nadzór nad oczyszczaniem białek ClpB, Hsp104 i ich wariantów, analizę wyników oraz pisanie manuskryptu. Prowadziłem również opiekę nad pracą dr Natalii Lipińskiej, dotyczącej termotolerancji komórek drożdżowych i charakterystyki wariantów Hsp104 (będąc promotorem pomocniczym jej doktoratu).

W okresie, gdy prowadziłem badania nad dezagregującymi białkami AAA+ pochodzącymi z organizmów drożdży i bakterii, zostałem zaproszony przez prof. R. Weversa (Radboud University, Nijmegen, Holandia) do podjęcia współpracy nad badaniem ludzkiego białka noszącego tą samą nazwę: CLPB. Badania prof. Weversa dotyczyły pacjentów z ciężką, nieznaną dotąd chorobą genetyczną, cechującą się spektrum objawów od neutropenii poprzez zaburzenia rozwojowe układu nerwowego po zaćmę; towarzyszy im acyduria 3-matyloglutakonowa. Wyniki analizy genetycznej wskazały w grupie 9 niespokrewnionych pacjentów na obecność wariantów sekwencyjnych niescharakteryzowanego uprzednio genu *CLPB* (locus 11q13), co pozwoliło postawić hipotezę że uszkodzenie tego genu stanowi przyczynę choroby. Zespół prof. Weversa, zajmujący się metaboliką oraz genetyką kliniczną (dr S. Wortmann) rozpoczął więc interdyscyplinarne badania roli genu *CLPB* i jego białkowego produktu, zaprosił mnie do współpracy w zakresie części biochemicznej badań z powodu mojego dotychczasowego zainteresowania białkami dezagregującymi AAA+, w tym bakteryjnym ClpB. Produkt ludzkiego genu CLPB wykazuje bowiem bardzo duże podobieństwo sekwencyjne do bakteryjnej dezagregazy ClpB (stąd nazwa), dotyczy ono jednakże jedynie C-terminalnej części ludzkiego białka. Dezagregazy AAA+ z rodziny Hsp100, do których należą badane dotąd przeze mnie drożdżowe Hsp104 i bakteryjny ClpB, jak wynika z analiz ewolucyjnych (Erives, Fasler PLOS One 2015) zaniknęły u zwierząt. W odróżnieniu od nich, ludzkie mitochondrialne białko CLPB nie posiada pierwszej domeny ATPazowej wraz z niezbędną do dezagregacji domeną M – obszar ten zastąpiony jest fragmentem 327 aminokwasów nie wykazującym podobieństwa sekwencyjnego do innych białek. W obszarze tym wyróżnić można mitochondrialny peptyd sygnałowy oraz wzór sekwencji typowy dla

przynajmniej czterech powtórzeń ankyrinowych. Pozostała część ludzkiego białka CLPB wykazuje natomiast wysoką identyczność sekwencji z domeną NBD2 bakteryjnej dezagregazy ClpB, wyższą niż z domenami ATPazowymi innych (w tym ludzkich) białek AAA+ pełniących inne niż dezagregacja funkcje. W szczególności, domena ATPazowa CLPB posiada typową dla dezagregaz, a nieobecną u białek AAA+ pełniących pozostałe funkcje, pod-domenę D2.

W rezultacie podjętej współpracy powstała trzecia z publikacji cyklu, Wortmann S., Ziętkiewicz, S., Kousi M., Szklarczyk R. i wsp., Am J Hum Genet 2015. W pracy tej byłem drugim autorem, z jednakowym wkładem pracy wraz z M. Kousi oraz R. Szklarczykiem. Publikacja ta stanowi pierwszą pracę definiującą zespół MEGCANN (jak nazwana została nowo odkryta choroba genetyczna) oraz pierwszą pracę dotyczącą ludzkiego białka CLPB. Praca ta, oprócz części klinicznej i genetycznej, zawierała także badania funkcjonalne na modelu *Danio rerio* oraz poszukiwanie potencjalnych partnerów oddziaływań techniką BRET (wskazująca na powiązanie CLPB, za pośrednictwem oddziaływań z białkiem SERCA2, produktem genu *ATP2A2*, z białkiem regulatorowym HAX1, którego mutacje powodują zbliżoną fenotypowo chorobę – zespół Kostmanna), a także moje badania biochemiczne. Mój wkład w powstanie dotyczył całości zawartych w niej badań biochemicznych; jedyną pozostałą współautorką tej pracy z mojego laboratorium, dr Elżbieta Chruściel, odpowiedzialna była za przygotowanie wektorów do ekspresji białek w *E. coli*. Uzyskane przeze mnie wyniki obejmowały oczyszczenie po raz pierwszy białka CLPB (formy dzikiej oraz jednego z patogennych wariantów, R408G) z nadprodukcji heterologicznej w komórkach *E.coli* jak również oznaczenie aktywności ATPazowej. Jak wykazałem, w odróżnieniu od bakteryjnego ClpB ATPaza ludzkiego białka CLPB nie jest aktywowana przez obecność α -kazeiny, modelowego rozwiniętego substratu polipeptydowego. Wykazałem też, że wariant R408G cechuje się zniesioną (do poziomu 28% WT) aktywnością, co wskazuje na jego patogenny charakter. Preparatyka bakteryjnego białka ClpB nie nastręcza większych trudności technicznych, jednakże wyizolowanie aktywnego preparatu ludzkiego CLPB okazało się bardzo trudne, pomimo braku przesłanek wskazujących na modyfikacje posttranslacyjne; dopiero wytypowanie potencjalnego miejsca odcinania peptydu sygnałowego i użycie wektora ekspresyjnego niosącego sekwencję CLPB bez tego fragmentu pozwoliło na uzyskanie aktywnego ATP-azowo, rozpuszczalnego preparatu. Publikacja Wortmann S., Ziętkiewicz, S., Kousi M., Szklarczyk R i wsp., Am J Hum Genet 2015, chociaż poprzez swój pionierski charakter otworzyła nowe pole badań, nie zdołała jednak wyjaśnić fizjologicznej roli białka CLPB, włącznie z odpowiedzią na pytanie, czy białko ludzkie wykazuje podobnie do bakteryjnego odpowiednika aktywność dezagregacyjną, czy też moduł AAA+ służy do jednej z wielu innych funkcji pełnionych przez białka tego typu. Pragnąc

kontynuować obiecujące badania nad nowo poznany białkiem, uzyskałem w 2016 r. grant NCN Sonata Bis (I miejsce na liście rankingowej) pozwalający mi na skupienie się na tym nowym temacie. Pierwszym, fundamentalnym problemem który należało rozwiązać w celu dokładniejszego poznania tego białka było opracowanie systemu ekspresji i oczyszczania ludzkiego CLPB wydajnego na tyle, aby możliwe były dalej idące eksperymenty biochemiczne. Po długim szeregu wstępnych badań z zastosowaniem systemu ekspresyjnego opartego o drożdże *P. pastoris* udało mi się opracować metodę opartą o ekspresję białka fuzyjnego MBP (*Maltose Binding Protein*) – CLPB ΔN92 powtórnie w komórkach *E. coli* i, po wstępnej izolacji na złożu wiążącym MBP, odcinanie go poprzez proteazę TEV której miejsce rozpoznawania umieściłem przed sekwencją kodującą CLPB skrócony o N-terminalny motyw sygnałowy. Pozwoliło to na uzyskanie znacznych ilości preparatu, który posłużył do dalszych badań. W czwartej pracy cyklu, opisującej wyniki analizy biochemicznej białka CLPB, **Mróz D., [...], Ziętkiewicz S. BBA Gen Subj. 2020**, pełniłem rolę autora korespondencyjnego, zaś pierwszy autor, mgr Dagmara Mróz, jest doktorantką pracującą pod moją opieką jako stypendystka kierowanego przeze mnie grantu. W gronie autorów tej pracy znajdują się również mgr Katarzyna Zawieracz i mgr Tomasz Szablewski, którzy, również jako stypendyści tego grantu, realizowali pod moim kierunkiem swoje prace magisterskie. W pracy tej kierowany przeze mnie zespół po raz pierwszy wykazał aktywność dezagregacyjną ludzkiego białka CLPB (odkrycie to doczekało się niezależnego potwierdzenia przez konkurencyjny zespół prof. Shortera zaledwie 5 miesięcy później, w pracy Shorter, Cupo eLife 2020). Dokonana została także wstępna analiza stanu oligomerycznego białka CLPB. Okazało się bowiem, że białko to nie występuje w oczyszczonym preparacie w spodziewanej formie heksamerycznej, ale w postaci oligomerów o znacznie wyższej masie molowej (przynajmniej podwójnych heksamerów), które scharakteryzowałem za pomocą sączenia molekularnego (publikacja zawiera nadto wykonane przez moich współpracowników obrazowanie TEM i AFM, potwierdzające tę obserwację). W eksperymentach dotyczących renaturacji modelowego substratu, zrealizowanych przy udziale mgr. Huberta Wyszowskiego, okazało się, że ludzkie białko jest w stanie dezagregować i reaktywować w ATP-zależny sposób chemicznie inaktywowaną lucyferazę samodzielnie, zaś w połączeniu z innym znanym ludzkim systemem dezagregującym (złożonym z białek JA2 i Hsc70) nie wykazuje (w przeciwieństwie do drożdżowego Hsp104) synergii, a wręcz przeciwnie – hamuje jego działanie. Efektu dezagregacyjnego nie udało się natomiast zaobserwować dla innego modelowego substratu dezagregaz, jakim jest termicznie denaturowane GFP. Mój wkład w powstanie tej publikacji, oprócz opracowania projektu badawczego i zapewnienia finansowania badań polegał również na udziale w oczyszczaniu białka CLPB, części pomiarów aktywności ATPazowej białka CLPB,

przeprowadzeniu sączeń molekularnych, analizie wyników, pisaniu manuskryptu a także koordynacji badań i bezpośrednim nadzorze nad pracą doktorantki i magistrantów.

Kontynuacja badań prowadzonych nad ludzkim białkiem CLPB związana była z odkryciem przez dr Wortmann nowej grupy wariantów sekwencyjnych kodującego genu. Warianty te, podejrzane o patogeniczność, w odróżnieniu od opisanych w pracy z 2015 r. oraz innych doniesień literaturowych ukazujących się po jej opublikowaniu, powstały w wyniku mutacji *de novo* i obecne były w układzie heteroallelicznym, co wskazywało na dominujący charakter ich dziedziczenia. Z punktu widzenia genetyki klinicznej istotne było, czy obserwowane warianty sekwencyjne istotnie prowadzą do upośledzenia funkcji CLPB pomimo istnienia prawidłowej kopii tego białka w komórce, czy też obserwowane objawy przypisać należy raczej innym czynnikom genetycznym. W związku z tym podjąłem próbę oczyszczenia i charakterystyki tych właśnie wariantów. Rezultatem tych badań jest piąta, ostatnia pozycja cyklu stanowiącego przedłożone osiągnięcie, Wortmann S., Ziętkiewicz S., i wsp., Genetics in Medicine 2021. W publikacji tej pełniłem rolę pierwszego autora z równocennym do dr Wortmann wkładem pracy. Wkład ten obejmował, między innymi, postawienie hipotezy badawczej, stanowiącej iż koekspresja formy dzikiej i analizowanych wariantów prowadzi do powstania mieszanych oligomerów, w których obecność zmutowanych protomerów zaburza komunikację allosteryczną pomiędzy podjednostkami, utrudniając translokację substratu. Wykazałem, że badane warianty, K404T, P427L, G560R, wykazują się zniesioną aktywnością dezagregacyjną (jedynie w przypadku K404T wynosiła ok 10% WT, w pozostałych była niemierzalna). Aktywność ATPazowa tych wariantów natomiast zmniejszona jest jedynie w niewielkim stopniu, z czego wnioskować można że pomimo wpływu badanych mutacji białka zachowują jednak przynajmniej częściowo konformację zbliżoną do natywnej. Celem wykazania postulowanego mechanizmu „zatruwania” oligomeru CLPB w przypadku jednoczesnej obecności formy patogenicznej i dzikiej, po sprawdzeniu w drodze sączenia molekularnego, że stan oligomeryczny badanych wariantów oraz ich mieszaniny z formą dziką nie różni się od samej formy dzikiej, wykonano szereg pomiarów aktywności dezagregacyjnej w których przed dodaniem modelowego substratu inkubowano razem połączone preparaty WT i wariantów patogenicznych. Z eksperymentów tych wynikało, że obecność form zmutowanych wykazuje istotnie hamujący wpływ na aktywność formy dzikiej. Celem zweryfikowania, czy zmniejszenie wydajności reaktywacji w tym przypadku może wynikać z wymiarczkowania substratu przez bezproduktywne wiązanie go przez formę zmutowaną wykonano przy użyciu interferometrii biowarstwy (BLI) pomiarów powinowactwa badanych wariantów do agregatów lucyferazy. Okazało się, że powinowactwo to jest znacząco

obniżone, tak więc obserwowany efekt może wynikać z inkorporacji zmutowanych podjednostek do aktywnych oligomerów CLPB, powodując spadek ich aktywności. Wyniki te pozwoliły zaklasyfikować nowo odkryte warianty jako patogenne, a także, choć nie wykazałem bezpośrednio zjawiska wymiany podjednostek w obrębie oligomeru, wyjaśnić mechanizm patogenezy w układzie monoallelicznym poprzez hamowanie aktywności dzikiej formy CLPB. Pragnę podkreślić, że w dobie genomiki rosnącym problemem w praktyce klinicznej staje się odnajdywanie wariantów sekwencyjnych badanych genów, co do których brak jest podstaw, by ocenić czy są one patogenne, czy też nie wywołują zmian chorobowych u pacjentów (tzw. *VUS*, ang. *Variant of Unknown Significance*) taki stan rzeczy utrudnia genetykowi klinicznemu postawienie rozpoznania i udzielenie porady genetycznej. Stąd określenie patogenności nowo odkrytych wariantów na podstawie badań funkcjonalnych stanowi istotną wartość praktyczną. Mój udział w powstaniu tej pracy, realizowanej w części biochemicznej z kierowanego przeze mnie grantu polegał na koordynacji biochemicznej części badań, udziale w oczyszczaniu białek, wykonaniu sąceń molekularnych oraz części pomiarów dezagregacji lucyferazy, nadzorze nad pracą doktorantki, mgr Mróz, a także na udziale w analizie i interpretacji wyników oraz pisaniu manuskryptu.

W chwili obecnej kontynuuję badania nad mechanizmem działania ludzkiego białka CLPB. Cały czas bowiem nie jest jasne, czy dezagregacja agregatów białkowych jest istotnie fizjologiczną rolą CLPB – być może bowiem zdolność do reaktywacji agregatów lucyferazy jest jedynie pochodną np. aktywności remodelowania kompleksów białkowych poprzez analogiczny mechanizm translokacji. Ważne pytanie badawcze dotyczy oddziaływań CLPB z innymi białkami, można bowiem spodziewać się że posiada on nie tylko specyficzne (lub nie) substraty podlegające rozwijaniu, ale i nieznanie dziś białka współpracujące, bądź to regulatory, bądź dalsze efekторы (np. podjednostki proteazowe?). Rozpocząłem wstępną fazę eksperymentów mające na celu zbadanie oddziaływań i /lub wzajemnego wpływu na aktywność między białkiem CLPB a wspomnianym powyżej białkiem HAX1, a także białkami SERCA2 oraz HTRA2, co do których istnieją przesłanki sugerujące ich oddziaływanie ze sobą. Mam nadzieję, że pozwolą one na dokładniejsze wyjaśnienie roli fizjologicznej oraz mechanizmu działania białka CLPB.

W trakcie swojej dotychczasowej aktywności naukowej starałem się łączyć eksperymentalne techniki biochemii białek z analizami strukturalnymi wykorzystującymi techniki obliczeniowe. Przejście od układów bakteryjnych do zagadnień związanych z ludzkim białkiem dezagregującym i powiązaną z nim chorobą genetyczną wzbogaciło dodatkowo mój zakres zainteresowań o aspekty „biochemii translacyjnej”, przenoszącej osiągnięcia nauk podstawowych na grunt genetyki klinicznej i szerzej – medycyny. Kierunek ten uważam za istotny dla mojego dalszego rozwoju naukowego,

czego potwierdzenie uzyskałem w trakcie owocnego stażu w Uniwersytecie Warszawskim (vide pkt. 5 Autoreferatu) gdzie moja praca *in silico* pozwoliła na zaproponowanie mechanizmu patogeniczności szeregu wariantów innych, nie związanych z białkami AAA+ genów i umożliwiła rozpoczęcie przeze mnie prac *in vitro* nad badanymi białkami.

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

W roku 2020 JM Rektor Uniwersytetu Gdańskiego udzielił mi urlopu naukowego na podst. art. 130 pkt.1 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce w wymiarze 6 miesięcy. W trakcie tego urlopu dołączyłem do zespołu Zakładu Genetyki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na zaproszenie jego kierownika, prof. dra hab. Rafała Płoskiego. W zespole tym odpowiedzialny byłem za przeprowadzenie analiz i symulacji komputerowych służących przewidywaniu i wyjaśnieniu wpływu na strukturę białka wybranych wariantów sekwencyjnych genów człowieka podejrzanych o patogenność. Badania te obejmowały tworzenie modeli homologicznych białek w formie dzikiej i ich wariantów, symulacje dynamiki molekularnej oraz analizę otrzymanych struktur i trajektorii pod kątem wytłumaczenia obserwowanych efektów fenotypowych. W szczególności, prace te prowadziłem nad wariantami typu *missense* receptora kwasu retinowego RARA, wariantem syntazy glutaminowej GLUL pozbawionym 18 N-terminalnych aminokwasów oraz nad mutantem *missens* strukturalnego białka synaptycznego SHANK1. Prace nad białkiem SHANK1 zaowocowały opracowaniem manuskryptu pracy oryginalnej, (Paprocka J. i wsp., *SHANK1 mutation in a patient with epileptic encephalopathy responsive to Epidiolex treatment*) obecnie przyjętego do recenzji we *Frontiers in Genetics*, zaś rezultaty prac nad białkiem RARA zostały przekazane w ramach współpracy wieloosrodkowej zespołowi kanadyjskiemu (Prof. Oana Caluseriu, University of Alberta, Edmonton) celem opracowania manuskryptu dotyczącego szeregu wariantów tego białka. Po zakończeniu stażu i powrocie na Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG/GUMed rozpocząłem badania laboratoryjne będące kontynuacją badań strukturalnych prowadzonych w czasie urlopu naukowego nad białkiem GLUL celem empirycznego potwierdzenia postulowanego wpływu skróconej formy tego enzymu na jego aktywność. W tym celu zdołałem już oczyścić z nadprodukcji heterologicznej białka GLUL i GLUL Δ N18 i oznaczyć ich aktywność, wykazując spadek stabilności patogennego wariantu, obecnie zaś pracuję nad koekspresją obu wariantów celem

utworzenia mieszanych oligomerów (tworzy on bowiem strukturę dekameryczną z miejscem aktywnym na styku protomerów) odpowiadających sytuacji w komórkach pacjenta heterozygotycznego. Nawiązaną w trakcie pobytu w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym współpracę zamierzam kontynuować. Opinię prof. Rafała Płoskiego dotyczącą przebiegu mojej pracy w jego zespole załączam (Załącznik 3B).

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

Od początku mojego zatrudnienia w Uniwersytecie Gdańskim prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG/GUMed, kierunku Biotechnologia (uprzednio studentów jednolitych studiów magisterskich, obecnie studentów I i II stopnia)

W ramach działalności dydaktycznej prowadzę wykład „Strukturalna biochemia białek”, obecnie w wymiarze 30 godz. w języku angielskim, na potrzeby którego opracowałem szereg interaktywnych wizualizacji struktur w systemie JSmol. Prowadzę także ćwiczenia laboratoryjne dla przedmiotu „Biofizyka” (obecnie w wymiarze 18 godz. semestralnie na grupę, 2 semestry kursu). Do ćwiczeń tych opracowałem skrypt obejmujący 116 stron (2012r.) wraz z tłumaczeniem na j. angielski. Zmodernizowałem istniejące stanowiska eksperymentalne tego przedmiotu (opracowanie projektu i nadzór nad wykonaniem „modułowego” spektrofluorymetru oraz samodzielne wykonanie pomocy naukowej do określania wartości stałej Plancka na fotodiodzie próżniowej). Wraz z dr hab. Rafałem Dutkiewiczem, prof. UG, zaproponowałem, opracowałem program oraz realizuję zajęcia audytoryjne dla tegoż przedmiotu (w wymiarze 12 godz. na grupę). W ramach przedmiotu „Kamienie milowe w biotechnologii” przygotowałem i prowadzę 2-godzinny wykład poświęcony odkryciu białka GFP wraz z demonstracją eksperymentalną dotyczącą wariantu eksperymentu Anfinsena przy użyciu tegoż białka (wraz z konstrukcją urządzenia do demonstracji fluorescencji). Opracowałem i prowadzę w ramach bloku „Biomolekuły - Budowa, synteza i właściwości (M02_B1) - analiza biomolekuł – metody” 4-godzinny wykład o metodach chromatograficznych. W roku 2008 koordynowałem kurs „Biologia Molekularna Eucaryota” (kurs prowadzony przez zaproszonych wykładowców). Prowadzę także corocznie pracownię magisterską, opiekę nad realizacją prac licencjackich oraz pracownię indywidualne (opieka nad pracą laboratoryjną) dla studentów naszego wydziału (14 wypromowanych prac magisterskich i 17 licencjackich).

Od roku 2013 pełnię funkcję wydziałowego koordynatora współpracy ze szkołami ponadpodstawowymi. W ramach tej działalności wypracowałem model formalnej współpracy ze szkołami średnimi, a oprócz opieki nad stroną formalną zrealizowałem

szereg warsztatów laboratoryjnych (w tym opracowanie ćwiczeń dla uczniów dot. izolacji białka GFP z nadprodukcji bakteryjnej). Opiekowałem się laboratoryjnymi praktykami indywidualnymi dla uczestników olimpiady biologicznej oraz dla uczniów zdolnych. Wygłosiłem także szereg wykładów popularnonaukowych dla uczniów na uczelni oraz w szkołach. Wygłosiłem także wykłady popularnonaukowe w ramach „Targów Akademia” UG w latach 2007-2009, Uniwersytetu III Wieku w Kartuzach, Uniwersalnej Strefy Nauki 2010, Nocy Biologów 2012, finału „Quizu Wiedzy o Szczepionkach” 2018 (wykład z prezentacją 3D). W latach 2006-2015 uczestniczyłem w pracach Komitetu Wojewódzkiego Olimpiady Biologicznej. Za działalność tą zostałem w r. 2013 nagrodzony Medalem Komisji Edukacji Narodowej.

W trakcie studiów doktoranckich uczestniczyłem corocznie w Bałtyckim Festiwalu Nauki jako organizator i realizator warsztatów laboratoryjnych zaś w okresie 2006-2010 pełniłem funkcję członka Wydziałowego Zespołu Koordynującego BFN. W ramach BFN wygłosiłem również szereg wykładów popularnonaukowych. W r. 2009 zostałem zaproszony do wygłoszenia wykładów na Letniej Szkole Technologii Farmaceutycznej (Wydz. Farmacji AMG, Gdańsk).

Pełniłem funkcję promotora pomocniczego pracy doktorskiej dr Natalii Litwińczuk (2014r.) oraz dr Artura Piroga (2019r.) (promotor obydwu prac doktorskich - prof. dr hab. Krzysztof Liberek).

W kadencji 2008-2012 byłem członkiem Senatu Uniwersytetu Gdańskiego.

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

Inna działalność naukowo-badawcza

Oprócz zagadnień przedstawionych w opisie cyklu publikacji „Właściwości i molekularny mechanizm działania dezagregaz AAA+” oraz w pkt. 5 niniejszego Autoreferatu brałem także udział w realizacji innych projektów badawczych Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej pod kierownictwem prof. dra hab. Krzysztofa Liberka, dotyczących zwłaszcza biochemii małych białek szoku cieplnego *E. coli*, IbpA i IbpB, pełniących również rolę w procesach reaktywacji agregatów białkowych i ochrony przed agregacją. Zaowocowało to szeregiem publikacji oryginalnych (Załącznik 4: pozycje 4,8,9,12 zestawienia publikacji) Współpracowałem także

z zespołem prof. dr hab. Jerzego Limona (Gdański Uniwersytet Medyczny), wykonując modelowanie molekularne i analizy struktura-funkcja dla zidentyfikowanych wariantów patogennych ludzkich białek (Załącznik 4: poz. 5 i 13 zestawienia) a także z dr Martą Orlikowską (Wydz. Chemii UG) w zakresie nadprodukcji i oczyszczania białek będących przedmiotem jej badań krystalograficznych (Załącznik 4: poz. 14 zestawienia).

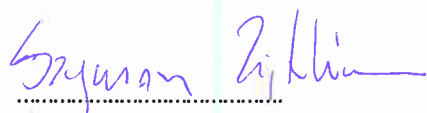
Udział i kierownictwo w grantach

Kierowałem jednym grantem NCN Sonata Bis (którego rezultaty współtworzą przedstawione powyżej osiągnięcie naukowe) a także jednym grantem typu „Badania Własne” przyznany przez Uniwersytet Gdański. Jako wykonawca uczestniczyłem w realizacji 5 grantów badawczych kierowanych przez prof. K. Liberka, a także jednym pod kierownictwem prof. Jerzego Limona, Akademia Medyczna w Gdańsku (szczegółowe dane w zał. 4). Zgodnie z wymogami dokumentacyjnymi załączam kopię umowy z NCN dot. mojego grantu Sonata Bis (Załącznik 3A)

Otrzymane stypendia, wyróżnienia i nagrody od uzyskania stopnia doktora:

2018	Nagroda Zespołowa I stopnia JM Rektora UG za współautorstwo publikacji naukowej.
2013	Medal Komisji Edukacji Narodowej
2012	Wyróżnienie w konkursie "Nauczyciel Roku" UG imienia Krzysztofa Celestyna Mrongowiusza
2010	Zespołowa Nagroda JM Rektora UG I stopnia za udział w pracach Wydziałowego Komitetu Koordynującego w ramach Bałtyckiego Festiwalu Nauki.
2010	Nagroda Polskiego Towarzystwa Genetycznego za najlepszą pracę naukową roku 2009
2009-2013	Stypendium w ramach programu FNP TEAM (Kierownik projektu prof. K. Liberek)
2009	Wydziałowa nominacja do Nagrody im. Celestyna Mrongowiusza dla najlepszego wykładowcy UG
2008	Przedłużenie stypendium „START” FNP
2007	Stypendium „START” FNP
2007	Nagroda Zespołowa Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za współautorstwo cyklu prac opisujących rolę białek opiekuńczych w metabolizmie komórki

2007	Stypendium „Zostańcie z nami” tygodnika „Polityka”
2007	Nagroda Prezesa Rady Ministrów za rozprawę doktorską
2006	Wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG/AMG


.....
(podpis wnioskodawcy)