

Załącznik nr. 3

Autoreferat

**Molekularne mechanizmy regulacji bakteryjnych
systemów toksyna-antytoksyna w *Salmonella***

Grzegorz Jan Grabe

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2025

1. Imię i nazwisko

Grzegorz Jan Grabe

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

- 2016 **Doktor nauk medycznych**
Tytuł rozprawy: *The Salmonella SPI-2 Type III secretion system: Regulation of a substrate specificity switch and functional analysis of the SpvD effector*
Promotor: profesor królewski David Holden
Imperial College London
Londyn, Wielka Brytania
- 2011 **Magister (MRes)**, kierunek Molekularne i Komórkowe Podstawy Infekcji
Imperial College London
Londyn, Wielka Brytania
- 2010 **Magister**, kierunek Biotechnologia
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny
Gdańsk, Polska
- 2007 **Licencjat**, kierunek Biotechnologia
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny
Gdańsk, Polska

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

- 2023 – obecnie **Adiunkt**
Kierownik projektów badawczych POLONEZ BIS, OPUS oraz EMBO IG
Grupa badawcza dr hab. Michała Szymańskiego, profesora UG
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny
Gdańsk, Polska
- 2019 – 2022 **Staż podoktorski**
Grupa badawcza profesor Sophie Helaine
Wydział Mikrobiologii
Harvard Medical School
Boston, Stany Zjednoczone Ameryki

2016 – 2019	Staż podoktorski Grupa badawcza profesor Sophie Helaine Centrum molekularnej bakteriologii i infekcji (CMBI) Imperial College London Londyn, Wielka Brytania
2011 – 2015	Doktorant Grupa badawcza profesora królewskiego Davida Holdena Centrum molekularnej bakteriologii i infekcji (CMBI) Imperial College London Londyn, Wielka Brytania
2010 – 2011	Magistrant (MRes) Grupy badawcze profesorów Stephena Matthews, Paula Farrella i profesora królewskiego Davida Holdena Imperial College London Londyn, Wielka Brytania
2008 – 2010	Magistrant Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny Gdańsk, Polska Grupa badawcza profesora Shoheia Koide Uniwersytet w Chicago Chicago, Stany Zjednoczone Ameryki
2007 – 2008	Asystent naukowy Grupa badawcza doktora Jana van der Wolfa Plant Research International Uniwersytet w Wageningen Wageningen, Holandia

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.).

Niniejsza aplikacja opiera się na wiedzy zdobytej podczas moich badań nad systemami toksyna-antytoksyna w bakterii *Salmonella enterica*. Praca ta zaowocowała trzema artykułami badawczymi opublikowanymi w wiodących czasopismach naukowych.

4.1. Tytuł cyklu artykułów, spełniających warunek wskazany w art. 219 ust. 1 pkt 2 ppkt (b) ustawy

Molekularne mechanizmy regulacji bakteryjnych systemów
toksyna-antytoksyna w *Salmonella*

4.2. Wykaz publikacji składających się na główne osiągnięcie, z wyszczególnieniem wkładu kandydata

Artykuł naukowy nr 1

Rycroft J.A., Gollan B., **Grabe G.J.**, Hall A., Cheverton A.M., Larrouy-Maumus G., Hare S.A., Helaine S., *Activity of acetyltransferase toxins involved in Salmonella persister formation during macrophage infection*. **Nature Communications** (2018) doi.org/10.1038/s41467-018-04472-6

Wskaźnik cytowań czasopisma (wg Journal Citation Reports 2023): **14,7**

Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki: **200**

Mój wkład w powyższej publikacji:

- otrzymałem konstrukty użyte do oczyszczenia białek toksynowych
- oczyściłem białka niezbędne do prac biochemicznych i strukturalnych
- przeprowadziłem eksperymenty precypitacji kompleksów z toksyną TacT2 (Rycina 4d)
- skryzalizowałem i określiłem strukturę toksyny TacT3 (Rycina 2c,d; PDB ID: 6G96)
- określiłem termostabilność wariantów toksyny TacT2 (Rycina S9)
- wykonałem i zanalizowałem eksperyment SEC-MALS dla toksyny TacT3 (Rycina S6b)
- przygotowałem ryciny 2c-d, 3b, 4a,c-d oraz S2, S5, S6, S9, a także tabele S2 i S4
- uczestniczyłem w projektowaniu doświadczeń
- brałem udział w pisaniu manuskryptu

Artykuł naukowy nr 2

Grabe G.J., Giorgio R.T., Hall A.M.J., Morgan R.M.L., Dubois L., Sisley T.A., Rycroft J.A., Hare S.A., Helaine S., *Auxiliary interfaces support the evolution of specific toxin-antitoxin pairing*. **Nature Chemical Biology** (2021) doi.org/10.1038/s41589-021-00862-y

Wskaźnik cytowań czasopisma (wg Journal Citation Reports 2023): **13,0**

Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki: **200**

Mój wkład w powyższej publikacji:

- uzyskałem konstrukty do ekspresji genów toksyn i antytoksyn wykorzystane do oczyszczania białek, testów toksyczności oraz neutralizacji
- oczyściłem wszystkie białka użyte w pracy
- skryzalizowałem oraz określiłem struktury krystaliczne kompleksów toksyna-antytoksyna: TacA3ND-TacT3 (PDB ID: 7AK9), TacA1ND-TacT1 (PDB ID: 7AK8) oraz TacA2-TacT2 (PDB ID: 7AK7)
- zanalizowałem otrzymane struktury krystaliczne
- przeprowadziłem eksperymenty pull-down białek oraz SEC-MALS

- przeanalizowałem bioinformatycznie koewoluujące aminokwasy toksyn i antytoksyn oraz dokonałem filogenetycznej analizy powiązanych wariantów toksyn
- we współpracy z ostatnim autorem inicjowałem, koordynowałem oraz napisałem artykuł
- przygotowałem wszystkie ryciny i tabele
- wykonałem i zinterpretowałem doświadczenia zalecone przez recenzentów

Artykuł naukowy nr 3

Grabe G.J.*, Giorgio R., Wieczór M., Gollan B., Sargen M., Orozco M., Hare S., Helaine S.*, *Molecular Stripping Underpins Derepression of a Toxin-Antitoxin System*. **Nature Structural and Molecular Biology** (2024) doi.org/10.1038/s41594-024-01253-2

*Autorzy korespondencyjni

Wskaźnik cytowań czasopisma (wg Journal Citation Reports 2023): **12,5**

Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki: **200**

Mój wkład w powyższej publikacji:

- stworzyłem konstrukty służące do ekspresji toksyn, antytoksyn oraz badania aktywności promotorów
- oczyściłem wszystkie białka użyte w badaniu
- zainicjowałem i koordynowałem współpracę w zakresie molekularnego modelowania oraz bioinformatyki z doktorem Modesto Orozco oraz doktorem Miłoszem Wieczorem z IRB Barcelona (Hiszpania)
- przeprowadziłem testy aktywności promotorów operonu toksyna-antytoksyna
- skryzalizowałem oraz określiłem struktury krystaliczne antytoksyny TacA1 (PDB ID: 7ZG6) oraz kompleksu TacA3-TacT3-DNA (PDB ID: 7ZG5)
- zanalizowałem otrzymane struktury krystaliczne
- przygotowałem wszystkie ryciny i tabele
- wspólnie z ostatnim autorem napisałem artykuł
- wykonałem i zinterpretowałem doświadczenia zalecone przez recenzentów

Dane naukometryczne dla prac wchodzących w skład cyklu:

Sumaryczny wskaźnik cytowań czasopism (wg Journal Citation Reports 2023): **40,2**

Suma punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki: **600**

4.3. Omówienie celu naukowego prac wymienionych w pkt 4.2 oraz otrzymanych wyników

4.3.1 Wprowadzenie i przesłanki do podjęcia badań

Antybiotykoterapia pozostaje najczęściej stosowanym podejściem terapeutycznym w walce z infekcjami bakteryjnymi. Jednak przedłużające się infekcje wymagające wielokrotnych cykli antybiotykowych, często prowadzą do antybiotykooporności, tzw. **AMR** (ang. antimicrobial resistance), charakteryzującej się niewrażliwością bakterii na obecność antybiotyku i kontynuacją ich wzrostu. Przewiduje się, że do 2050 roku AMR będzie stanowił znaczne obciążenie dla zdrowia publicznego, przyczyniając się do około 10 milionów zgonów rocznie¹. Chociaż dokładne mechanizmy, za pomocą których wrażliwa populacja bakterii przekształca się w oporną nie są dokładnie poznane, antybiotykooporność czyli tzw. **AR** (ang. antimicrobial recalcitrance), gdzie bakterie przeżywają ekspozycję na antybiotyki, jest uważana za kluczowy czynnik. Co ważne, podczas gdy w przypadku AMR komórki bakteryjne rosną pomimo obecności antybiotyków, w AR bakterie nie dzielą się lecz charakteryzują się wydłużonym przeżyciem podczas presji antybiotykowej. Coraz więcej badań sugeruje, że **AR może prowadzić do AMR**, poprzez opóźnianie śmierci komórek podczas leczenia, zwiększając w ten sposób prawdopodobieństwo pojawienia się mutacji nadających oporność na dany antybiotyk^{2,3}. Zwiększone przeżycie bakterii na antybiotyki w AR może objawiać się w całej populacji (tolerancja) lub w subpopulacji (**komórki przetrwałe**, ang. persister cells). Komórki przetrwałe reprezentują genetycznie wrażliwą na antybiotyki subpopulację, która wchodzi w stan zahamowania wzrostu, charakteryzującą się zwiększoną tolerancją na antybiotyki. Po wycofaniu antybiotyku komórki te mogą wznowić wzrost, potencjalnie prowadząc do nawrotu infekcji^{4,5}. Istnienie komórek przetrwałych niewrażliwych na leczenie penicyliną zostało po raz pierwszy udokumentowane w latach 40. XX wieku przez Gladys Hobby⁶ i Josepha Biggera⁷. Pomimo ich wczesnego odkrycia, badania nad komórkami przetrwałymi zatrzymały się na cztery dekady z powodu braku odpowiednich narzędzi do ich badania, braku wyraźnego związku z nawracającymi infekcjami, oraz ich przejściowego charakteru. Przełom nastąpił w 1983 roku, gdy Harris Moyed zidentyfikował w badaniu genetycznym mutanta *hipA7* w szczepie *E. coli*, który charakteryzował się 10000-krotnie wyższą częstotliwością występowania komórek przetrwałych niż szczep dzikiego typu⁸.

Mniej więcej w tym samym czasie dwie grupy badawcze odkryły toksyczne i antytoksyczne elementy genetyczne zaangażowane w utrzymanie plazmidów w bakteriach^{9,10}. Elementy te, mianowicie *hok-sok* i *ccdA-ccdB*, sklasyfikowano jako systemy **toksyna-antytoksyna** (zwrot dalej określany jako „**TA**”). Co ważne, mutacja *hipA7*, odkryta w 1983 roku przez Moyed, została zidentyfikowana jako mutant systemu TA *hipAB*, co połączyło zjawisko AR z systemami TA^{11,12}. Systemy TA to niewielkie, najczęściej bicistronowe (dwu-genowe) operony kodujące toksyczne białko - toksynę, która zakłóca kluczowe procesy bakteryjne, oraz antytoksynę, która neutralizuje toksynę. Zazwyczaj gen antytoksyny poprzedza gen toksyny w operonie. Dotychczas zidentyfikowano osiem typów systemów TA (I-VIII), które różnią się od siebie

cząsteczką antytoksyny (białko lub RNA) lub mechanizmem neutralizacji toksyny¹³. Spośród nich, systemy typu II są szczególnie dobrze zbadane. Tutaj antytoksyna jest białkiem, które bezpośrednio oddziałuje z toksyną, tworząc **kompleks toksyna-antytoksyna**¹⁴.

Wiele antytoksyn, oprócz neutralizowania swojej partnerskiej toksyny za pomocą domeny neutralizującej, wiąże się z operatorem DNA w promotorze TA i **blokuje transkrypcję operonu TA (represja)**. Jednak w warunkach stresu środowiskowego systemy te często ulegają transkrypcyjnej aktywacji. Ta aktywacja może być napędzana na przykład przez proteolizę puli antytoksyn, zwiększając poziom wolnej toksyny, która **odblokowuje transkrypcję TA (derepresja)**¹³. Redukcja puli antytoksyny lub dysocjacja kompleksu TA skutkują zwiększeniem poziomu komórkowego wolnej toksyny, która zakłóca kluczowe procesy bakteryjne, prowadząc do zatrzymania podziału komórkowego. Wyniki najnowszych badań wykazały, że owe zatrzymanie podziałów komórkowych oprócz wpływu na tworzenie bakterii przetrwałych, służy jako mechanizm obronny przed bakteriofagami¹⁵.

Salmonella enterica to bakteryjny patogen przenoszony przez zanieczyszczoną żywność i wodę, który zakaża rocznie niemal 15 milionów ludzi na całym świecie, powodując ponad 200 tysięcy zgonów¹⁶. Ta Gram-ujemna bakteria może wywoływać nieżyt żołądkowo-jelitowy, ograniczony do przewodu pokarmowego lub dur brzuszny i inwazyjną formę salmonellozy, gdzie bakterie rozprzestrzeniają się ogólnoustrojowo przez krwiobieg do narządów takich jak wątroba czy śledziona. Z ponad 2500 szczepów *Salmonella* sklasyfikowanych na podstawie składu antygenów powierzchniowych¹⁷, dur brzuszny jest powodowany przez szczepy **Typhi** i **Paratyphi**, charakteryzujące się wąskim zakresem gospodarza. W przeciwieństwie do nich, szczepy wywołujące nieżyt żołądkowo-jelitowy, takie jak **Typhimurium** i **Enteritidis**, wykazują szeroki zakres gospodarzy wśród kręgowców. Te ostatnie powodują zapalenie żołądka i jelit, a u osób z osłabioną odpornością - poważną bakteriamię. Bakteriemia wywołana tymi szczepami jest częstą przyczyną zgonów w Afryce Subsaharyjskiej¹⁸.

Ogólnoustrojowemu rozprzestrzenianiu się bakterii *Salmonella* sprzyjają liczne determinanty wirulencji, które wyewoluowały z czasem, ustanawiając ją jako fakultatywny patogen wewnątrzkomórkowy. Kluczowe wśród nich są wyspy patogenności 1 i 2 (SPI-1 i SPI-2), które kodują systemy sekrecji typu trzeciego (ang. type three secretion systems, **T3SS**), umożliwiające inwazję i replikację wewnątrz komórek nabłonkowych i makrofagów¹⁹. Systemy T3SS dostarczają około 25-30 różnych tzw. białek „efektorowych” do komórki gospodarza, które zakłócają jej szlaki sygnałowe, metabolizm lub indukują śmierć komórkową²⁰.

Przetrwaniu bakterii *Salmonella* w komórkach gospodarza sprzyja odporność na liczne stresory, takie jak reaktywne formy tlenu i azotu, głód, szok pH lub ekspozycja na peptydy przeciwbakteryjne. Wykazano, że wiele z tych czynników promuje tworzenie komórek przetrwałych w laboratoryjnych warunkach hodowlanych. Co istotne, ponad dekadę temu wykazano w komórkowym modelu infekcji, że półgodzinne wchłonięcie bakterii *Salmonella* przez makrofagi prowadzi do 1000-krotnego zwiększenia subpopulacji komórek przetrwałych²¹. Zjawisko to było zależne od czternastu systemów TA typu II, łącząc je z bakteryjną antybiotykoodpornością (AR). W tamtym czasie dla trzech z tych systemów funkcja toksyny nie

była znana. W późniejszym badaniu jedna z nich – toksyna z systemu *tacAT1* - została zidentyfikowana jako **acetylotransferaza modyfikująca aminokwasy na naładowanej cząsteczce tRNA**²².

Salmonella enterica szczep Typhimurium zawiera trzy paralogiczne systemy acetylotransferazowe TA: ***tacAT1***, ***tacAT2*** i ***tacAT3***. Początkowo nie było wiadomo czy każda z tych toksyn (TacT1, TacT2 i TacT3) jest aktywna, jaka jest ich specyficzność substratowa, jak ich odpowiednie antytoksyny (TacA1, TacA2 i TacA3) je neutralizują, oraz czy istnieje krzyżowa neutralizacja lub regulacja pomiędzy tymi systemami.

Głównym celem moich badań było wyjaśnienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw neutralizacji toksyn i regulacji transkrypcyjnej systemów acetylotransferazowych *tacAT1-3* w *Salmonella*. Badając te systemy odkryłem, że mnogość powierzchni oddziaływań, tzw. **interfejsów** TA i wynikająca z tego redundantna neutralizacja toksyn wspiera ewolucję specyficzności oddziaływań pomiędzy tymi białkami. Ponadto zidentyfikowałem molekularny mechanizm i allosterię leżącą u podstaw aktywacji transkrypcyjnej systemu *tacAT3*. Trzy publikacje omówione poniżej stanowią podstawę mojego wniosku o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego.

4.3.2 Szczegółowe omówienie prac składających się na cykl artykułów

Artykuł naukowy nr 1

Rycroft J.A., Gollan B., **Grabe G.J.**, Hall A., Cheverton A.M., Larrouy-Maumus G., Hare S.A., Helaine S., *Activity of acetyltransferase toxins involved in salmonella persister formation during macrophage infection.*²³ **Nature Communications** (2018) doi.org/10.1038/s41467-018-04472-6

Wprowadzenie

Szczepy bakteryjne *Salmonella enterica* Typhimurium i Enteritidis wywołują u ludzi stosunkowo niegroźny dla życia niezbyt żołądkowo-jelitowy. Jednak u pacjentów z niedożywieniem lub osłabionym układem odpornościowym zakażenie tymi bakteriami może prowadzić do **inwazyjnej salmonellozy** (ang. invasive non-typhoidal salmonellosis, **iNTS**), choroby o największej częstości występowania w Afryce Subsaharyjskiej. W regionie tym śmiertelność na tę chorobę u pacjentów dodatkowo zakażonych wirusem HIV sięga 50%, znacząco przewyższając śmiertelność w przypadku duru brzuszego²⁴. Leczenie zakażeń bakterią *Salmonella* opiera się na antybiotykach cefalosporynowych, jednak inwazyjne szczepy wykazują narastającą oporność na cefalosporyny pierwszej i drugiej generacji. Rosnąca częstość oporności tej bakterii na cefalosporyny trzeciej generacji w Afryce i w Europie dodatkowo utrudnia terapię zakażonych pacjentów^{25,26}. Ponadto, nawracające infekcje wynikające z ponownych zakażeń jeszcze bardziej komplikują skuteczne leczenie²⁷.

Wcześniejsze badania wykazały, że fagocytoza bakterii *Salmonella enterica* szczep Typhimurium (dalej określana jako **STm**) przez makrofagi znacząco wzbogaca subpopulację komórek przetrwałych²⁸. Komórki te między innymi dzięki zahamowaniu podziałów komórkowych przeżywają w obecności antybiotyków. Owe wzbogacenie subpopulacji komórek przetrwałych zależy od czternastu systemów TA typu II, które ulegają aktywacji transkrypcyjnej po wchłonięciu STm przez makrofagi. W roku 2016 odkryto, że jeden z tych systemów koduje toksynę acetylotransferazową, która modyfikuje grupę aminową aminokwasów znajdujących się na naładowanych tRNA (aa-tRNA)²². Toksynę tę nazwano TacT od angielskiego „tRNA acetylating toxin”. Acetylacja grupy aminowej aminokwasów znajdujących się na tRNA blokuje ich transfer podczas translacji białek i ostatecznie prowadzi do zatrzymania wzrostu bakterii. Ten toksyczny efekt może jednak zostać odwrócony przez hydrolazę peptydylo-tRNA (Pth), która usuwa zacetylowany aminokwas z tRNA, umożliwiając ponowne przyłączenie niezmodyfikowanego aminokwasu do tRNA²².

Cele badania

Głównym celem było ustalenie, czy siedem klinicznych szczepów *Salmonella enterica* (należących do szczepów Typhimurium i Enteritidis), wyizolowanych z próbek krwi pacjentów ze Szpitala Królowej Elżbiety w Malawi, tworzy komórki przetrwałe po wchłonięciu przez ludzkie makrofagi. Zbadano również dystrybucję systemów TA w tych szczepach, ze szczególnym uwzględnieniem trzech systemów acetylotransferazowych *tacAT1-3*. Dodatkowym celem było określenie funkcjonalnych różnic między paralogicznymi toksynami acetylotransferazowymi TacT1-3 pod względem ich struktury, specyficzności substratowej oraz aktywności.

Główne wyniki

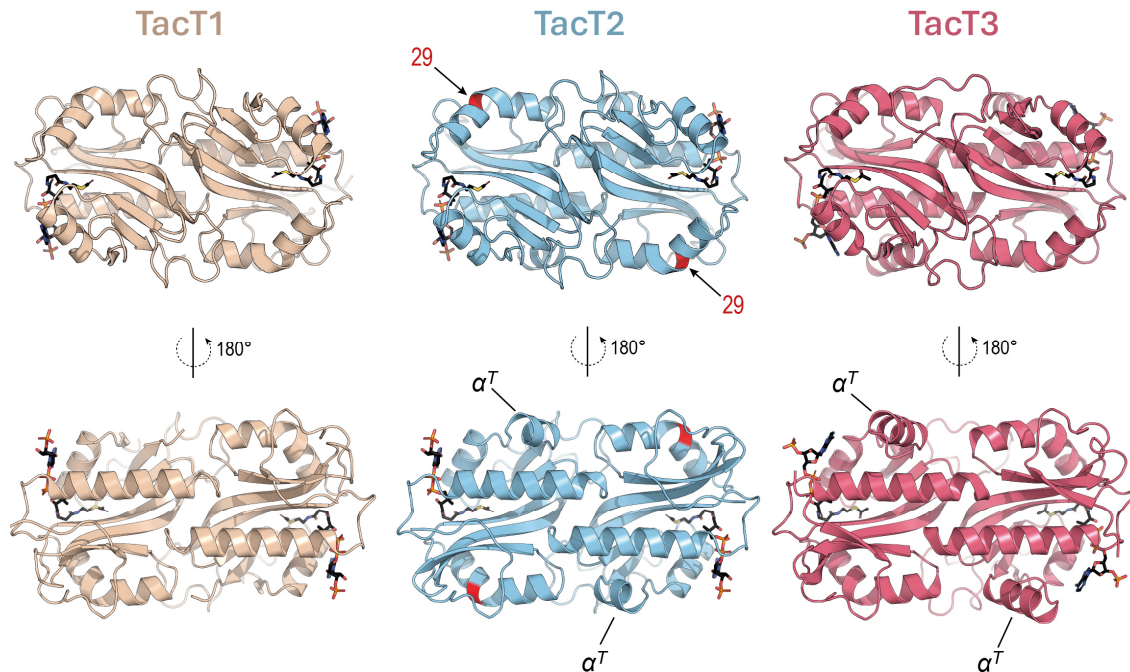
Biorąc pod uwagę, że nawracające infekcje są rezultatem klonalnej reinfekcji, która może mieć związek z komórkami przetrwałymi, przetestowano osiem klinicznie istotnych szczepów *Salmonella* (odpowiednio pięć Typhimurium i trzy Enteritidis) oraz szczepy referencyjne pod kątem tworzenia komórek przetrwałych po fagocytozie przez ludzkie makrofagi. Wszystkie szczepy kliniczne wykazały znaczący, **1000-krotny wzrost frakcji komórek przetrwałych po wchłonięciu przez makrofagi** w porównaniu do populacji wyjściowej, porównywalny do zaobserwowanego wcześniej w referencyjnym szczepie laboratoryjnym STm²¹. Sugeruje to, że zwiększone tworzenie komórek przetrwałych tolerujących antybiotyki jest wspólnym mechanizmem przeżycia zarówno klinicznych, jak i referencyjnych szczepów *Salmonella* w konfrontacji z komórkami odpornościowymi.

Następnie przeanalizowano systemy TA, których udział w tworzeniu komórek przetrwałych został wcześniej potwierdzony²¹. Izolaty kliniczne *Salmonella* posiadały identyczny rozkład systemów TA jak odpowiadające im referencyjne szczepy, jednak zauważono różnice między szczepami Enteritidis i Typhimurium. Szczep Enteritidis nie posiadał dwóch systemów TA (*parDE* i *relBE1*). Co więcej, szczepy Enteritidis oraz Typhimurium różniły się między sobą

wariantem toksyny TacT2 w pozycji 29 i posiadały odpowiednio lizynę (Enteritidis - **TacT2_{SEn}**) lub kwas glutaminowy (Typhimurium - **TacT2_{STm}**). Trzy paralogiczne systemy acetylotransferazowe (*tacAT1-3*) były obecne w obu szczepach, przy czym toksyny TacT2 oraz TacT3 wykazywały odpowiednio 47% oraz 28% identyczność sekwencji aminokwasowych w porównaniu z wcześniej zidentyfikowaną toksyną TacT1. Następnie zbadano czy nadekspresja genów toksyn **tacT2_{SEn}**, **tacT2_{STm}** i **tacT3** promuje tworzenie komórek przetrwałych *in vitro* podczas ekspozycji na antybiotyk cefotaksym. Spośród nich toksyny TacT2_{SEn} i TacT3 istotnie zwiększały frakcję komórek przetrwałych, a efekt ten był znoszony przez koekspresję genów partnerskich antytoksyn pochodzących z operonów, z których wywodziły się badane toksyny. Zaobserwowany minimalny wpływ nadekspresji toksyny **tacT2_{STm}** na tworzenie komórek przetrwałych sugerował, że Glu29 w tym wariantcie może mieć negatywny wpływ na jej aktywność.

Aby zrozumieć strukturalne zależności między toksynami acetylotransferazowymi, określiłem **strukturę krystaliczną toksyny TacT3 z rozdzielczością 1,5 Å (Ryc. 1)**. Dimerowa konformacja acetylotransferazy przyjęta przez białko TacT3 związane z kofaktorem Ac-CoA była podobna do dimeru TacT1, z główną różnicą w postaci C-końcowej helisy α^T obecnej jedynie w TacT3 (Ryc. 1). Wykorzystując TacT1 jako szablon, opracowałem modele strukturalne toksyn TacT2_{SEn} oraz TacT2_{STm}. Zarówno TacT2_{SEn}, jak i TacT3 posiadały znaczną, dodatnio naładowaną powierzchnię rozciągającą się od regionu pętli jednego monomeru do miejsca aktywnego drugiego monomeru. Mutacje tego regionu lub katalitycznej tyrozyny (odpowiedzialnej za transfer grupy acetylowej) znosiły toksyczność obu toksyn w *Salmonella*, co było zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dla TacT1²². Nadekspresja genu toksyny *tacT2_{STm}*, w której dodatkowo naładowana powierzchnia była częściowo zakłócona obecnością Glu29, nie hamowała wzrostu *Salmonella*, sugerując brak aktywności tego wariantu toksyny.

W testach biochemicznych oczyszczone toksyny TacT1, TacT2_{STm}, TacT2_{SEn} i TacT3 hamowały syntezę białek w systemie bezkomórkowym oraz acetylowały cząsteczki aa-tRNA *in vitro*. Podczas głębszej analizy wariantów TacT2, zauważono, że polimorfizm Lys29Glu zmienia rozkład ładunku powierzchniowego w modelach toksyn oraz ich teoretyczny punkt izoelektryczny (pI 7,1 dla TacT2_{SEn} oraz 6,6 dla TacT2_{STm}). Badanie aktywności acetylotransferazowej *in vitro* w zakresie pH (5,9-7,5) ujawniło wrażliwość TacT2_{STm} na pH, gdzie sygnał acetylacji tRNA był wyraźnie widoczny tylko w pH 7,5, podczas gdy toksyna TacT2_{SEn} była aktywna w każdym z testowanych warunków pH. Ponadto, toksyna TacT2_{SEn} charakteryzowała się zwiększoną stabilnością termiczną, prawdopodobnie dzięki stabilizującym wiązaniom wodorowym pomiędzy łańcuchem bocznym Lys29 a tlenami karbonyłowymi Thr15 i Phe17, których nie zaobserwowano w przypadku modelu TacT2_{STm}. Podobna stabilizacja miała miejsce w przypadku toksyny TacT1, gdzie łańcuch boczny Lys31 tworzył wiązania wodorowe z tlenami karbonyłowymi Ala17 i Phe19. Mutacja Lys31Glu w TacT1, która imitowała wariant Glu29 w TacT2_{STm}, zniósła toksyczność tego białka w *Salmonella*, podkreślając krytyczne znaczenie tego regionu dla aktywności toksyn TacT1 i TacT2. Test wiązania substratu z użyciem mutantów katalitycznych (TacT2^{Y137F}) wykazał, że TacT2_{SEn} wiąże tRNA skuteczniej niż TacT2_{STm}, co



Rycina 1. Toksyny TacT1, TacT2 oraz TacT3 acetylujące naładowane tRNA w *S. enterica*

Schematyczna reprezentacja dimerycznych toksyn acetylotransferazowych: **TacT1** (beż; PDB ID: 5FVJ), **TacT2** (błękit; model) oraz **TacT3** (róż; PDB ID: 6G96). Przedstawione są przednia (górny rząd) oraz tylna (dolny rząd) orientacja dimerów. Kofaktory Ac-CoA przedstawiono w formie pałeczkowej, głównie w kolorze czarnym. Naturalny polimorfizm Lys29Glu w TacT2 jest zaznaczony kolorem czerwonym. Dodatkowa C-kończynowa helisa α^T obecna w TacT2 oraz TacT3 jest wskazana czarną linią.

dotąd tłumaczy jej zwiększoną toksyczość i zdolność do indukcji komórek przetrwałych.

Specyficzność substratową toksyn TacT1-3 określono w bezkomórkowym teście translacji po dodaniu oczyszczonych toksyn TacT1, TacT2_{SEn}, TacT2_{STm} i TacT3, oraz kofaktora Ac-CoA. Po wyekstrahowaniu cząsteczek tRNA w celu uzyskania zacetylowanych aa-tRNA, zastosowano wcześniej wspomnianą hydrolazę Pth do uwolnienia zmodyfikowanych aminokwasów i późniejszej analizy LC-MS. Otrzymane ilości zacetylowanych aminokwasów, dobrze korelowały ze stopniem acetylacji obserwowanym *in vitro*. Spośród dwudziestu możliwych wykryto dwanaście zacetylowanych aminokwasów w różnych proporcjach, z dominującymi glicyną i leucyną/izoleucyną.

Podsumowanie

W tej pracy wykazano, że wchłonięcie klinicznych szczepów *Salmonella* przez ludzkie makrofagi prowadzi do 1000-krotnego wzrostu ilości komórek przetrwałych. Obecność komórek przetrwałych jest powiązana z nawracającymi infekcjami, a zdolność *Salmonella* do dramatycznego zwiększenia frakcji komórek przetrwałych, które tolerują obecność antybiotyków sugeruje rodzaj ewolucyjnej adaptacji będącej odpowiedzią na fagocytozę. Ta wywołana stresem, nierosnąca subpopulacja może stanowić rezerwuuar bakterii dla nawrotów

infekcji, gdyż wielokrotnie wykazano, że komórki przetrwałe mogą wznowić podziały komórkowe.

Chromosomalne systemy TA typu II wpływają na tworzenie komórek przetrwałych w *Salmonella*. Dodatkowo wykazano, że naturalnie występująca substytucja na pozycji 29 wpływa na aktywność toksyny TacT2 i formowanie komórek przetrwałych. Wyższa aktywność toksyny TacT2_{SEn} w szczepie Enteritidis mogłaby potencjalnie kompensować brak systemów TA *parDE* i *relBE1*, obecnych w szczepie Typhimurium. Zarówno TacT2, jak i TacT3 reprezentowały w czasie opublikowania tej pracy nowy typ acetylotransferaz modyfikujących w aa-tRNA^{22,29}.

Artykuł naukowy nr 2

Grabe G.J., Giorgio R.T., Hall A.M.J., Morgan R.M.L., Dubois L., Sisley T.A., Rycroft J.A., Hare S.A., Helaine S., *Auxiliary interfaces support the evolution of specific toxin-antitoxin pairing*.³⁰
Nature Chemical Biology (2021) doi.org/10.1038/s41589-021-00862-y

Wprowadzenie

Systemy TA są elementami odpowiedzi na stres promującymi przeżycie bakterii. W najlepiej zbadanych systemach typu II, antytoksyna jest białkiem, które kontroluje toksynę poprzez bezpośrednie oddziaływanie (neutralizacja) oraz przez represję transkrypcyjną. Składa się ona z dwóch kluczowych regionów: **domeny neutralizującej (ND)**, która bezpośrednio wiąże toksynę i blokuje jej aktywność, oraz **domeny wiążącej DNA (DBD)**, zaangażowanej w represję transkrypcyjną operonu TA. Ta ścisła kontrola nad toksyną na poziomach białkowym oraz transkrypcyjnym jest kluczowa, ponieważ niezwiązana toksyna może zahamować wzrost bakterii oraz doprowadzić do śmierci komórkowej. Wiele bakterii, w tym STm, posiada w swoim chromosomie paralogiczne systemy TA. Chociaż niektóre toksyny mogą być neutralizowane przez blisko spokrewnione antytoksyny³¹⁻³³, w większości paralogicznych systemów TA obecnych na tym samym chromosomie nie zachodzi neutralizacja krzyżowa. Sugeruje to, że interferencja między systemami TA jest szkodliwa dla komórki bakteryjnej³⁴⁻³⁷. Co ciekawe, badania strukturalne różnych toksyn w kompleksie z antytoksyną ujawniły pojedynczą powierzchnię oddziaływania, zwaną dalej **interfejsem**, która determinuje specyficzność i warunkuje neutralizację toksyny. Podczas ewolucji nowej specyficzności kompleksów TA, kontakt pomiędzy tymi białkami musi zostać zachowany z racji toksycznej natury toksyny. Nasunęło to przypuszczenie, że oprócz głównego interfejsu w systemach TA istnieją dodatkowe interfejsy utrzymujące interakcję pomiędzy toksyną a antytoksyną, które mogłyby wspierać ewolucję nowej specyficzności w tych kompleksach. Tutaj pomocną okazała się struktura heksamerycznego kompleksu TA, gdzie stosunek antytoksyny do toksyny wynosił 2:1 i w której zaobserwowano wiele interfejsów TA.

Cele badania

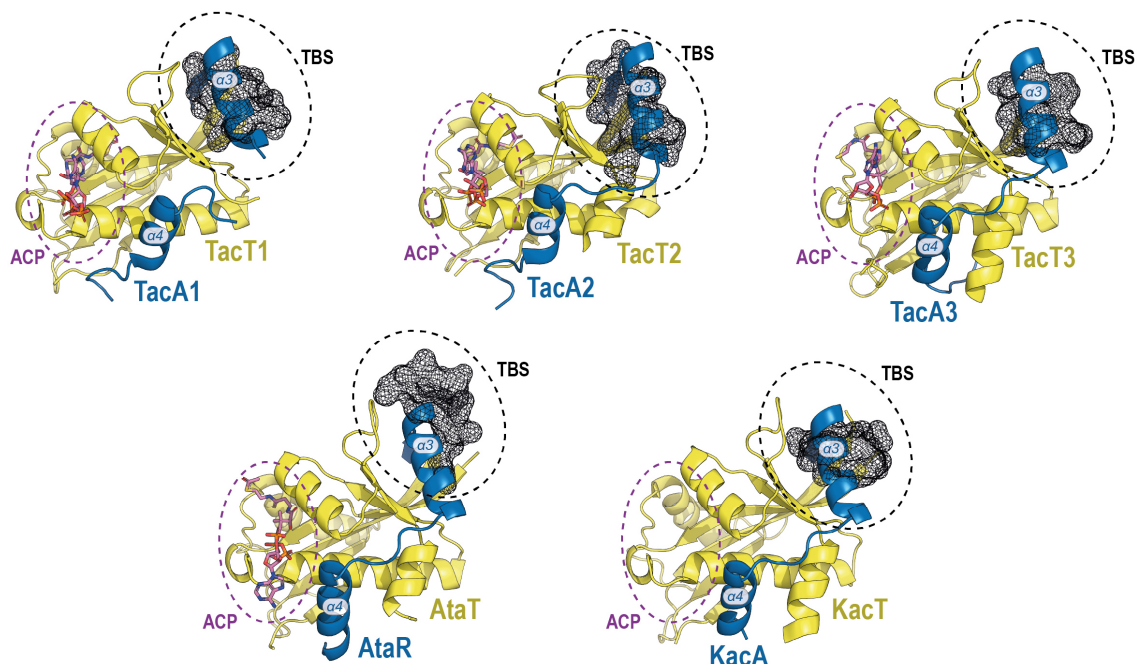
Celem pracy było zidentyfikowanie mechanizmu neutralizacji toksyn acetylotransferazowych TacT1-3 w STm przez odpowiednie antytoksyny TacA1-3 oraz odpowiedź na pytanie, czy dla paralogicznych par *tacTA1-3* neutralizacja zachodzi tylko w parach toksyna-antytoksyna w obrębie własnego operonu, czy może zachodzi neutralizacja krzyżowa pomiędzy toksynami i antytoksynami z paralogicznych operonów. Dodatkowym celem było zrozumienie, jak paralogiczne systemy *tacAT* ewoluują w kierunku nowej specyficzności przy jednoczesnym utrzymaniu oddziaływania z toksyną.

Główne wyniki

Wcześniejsze badania wykazały, że każda z antytoksyn TacA1, TacA2 i TacA3 neutralizuje toksyny z własnego operonu, czyli odpowiednio TacT1, TacT2 i TacT3^{22,23}. Biorąc pod uwagę podobieństwo ich sekwencji, sprawdzono czy spokrewnione antytoksyny mogą neutralizować toksyny pochodzące z paralogicznych operonów. Analizując krzywe wzrostu bakterii nie zaobserwowano neutralizacji krzyżowej, gdyż każda antytoksyna neutralizowała tylko toksynę z własnego operonu, co było zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi spokrewnionych toksyn z innych rodzin TA³⁴⁻³⁹. Stosując serię N-końcowych delecji sekwencji antytoksyn określono minimalny C-końcowy region (domena neutralizująca – ND) wymagany do neutralizacji toksyn. Wszystkie trzy antytoksyny w swojej skróconej formie, **TacA1-3ND**, nadal neutralizowały tylko toksyny z własnych operonów, potwierdzając, że region ten jest wystarczający dla zachowania specyficzności.

Aby poznać molekularny mechanizm neutralizacji i specyficzność acetylotransferazowych systemów TA, **rozwiązałem trzy struktury krystaliczne kompleksów toksyn TacT1-3 związanych z samą domeną ND antytoksyny (tetrameryczne TacA1ND-TacT1 i TacA3ND-TacT3) lub z antytoksyną pełnej długości (heksameryczny TacA2-TacT2)**. We wszystkich kompleksach region ND antytoksyn wiązał się w tym samym obszarze toksyny oraz miał podobną strukturę, w skład której wchodziły helisy $\alpha 3$ oraz $\alpha 4$ (Ryc. 2). Kluczową cechą tego oddziaływania było zaburzenie miejsca wiązania substratu aa-tRNA (**TBS**) współtworzonego przez pętlę toksyny. Mianowicie, pętle toksyn TacT1-3 były wyparte z ich pierwotnego położenia przez helisy $\alpha 3$ antytoksyn TacA1-3 (Ryc. 2). Oprócz tego, region C-końcowy antytoksyny z helisą $\alpha 4$ wiązał się w pobliżu kieszeni wiążącej acetylo-CoA (**ACP**), miejsca kluczowego dla enzymatycznej aktywności acetylotransferazowej. Zaobserwowany tryb wiązania był podobny do tego u pokrewnych antytoksyn KacA i AtaR, sugerując wspólną strategię neutralizacji opartą na blokowaniu wiązania i modyfikacji aa-tRNA^{40,41} (Ryc. 2).

Badania toksyczności bakteryjnej oraz precipitacja kompleksu (ang. pull-down) z tRNA potwierdziły kluczową rolę miejsca TBS dla aktywności toksyny i rozpoznawania substratu. W przeciwieństwie do samej toksyny TacT3, **toksyna TacT3 związana z TacA3ND nie wiązała tRNA**, co potwierdziło krytyczną rolę miejsca TBS w wiązaniu tRNA oraz, że antytoksyna blokuje



Rycina 2. Toksyny acetylotransferazowe w kompleksach z antytoksynami.

Struktury krystaliczne toksyn TacT1, TacT2, TacT3, AtaT oraz KacT (żółty) w kompleksie z antytoksynami odpowiednio TacA1, TacA2, TacA3, AtaR i KacA (niebieski). Antytoksynowe helisy $\alpha 3$ zaburzają miejsce biorące udział w wiązaniu tRNA (TBS; czarna przerywana linia), co widoczne jest nałożeniem się helisy z gęstością regionu toksyn odpowiedzialną za wiązanie tRNA (czarna siatka). Helisy $\alpha 4$ w antytoksynach natomiast wiążą się w okolicy kieszeni Ac-CoA (ACP; fioletowa przerywana linia). Identyfikatory PDB struktur użyte dla każdego z kompleksów podane w nawiasach: TacA1-TacT1 (7AK8), TacA2-TacT2 (7AK7), TacA3-TacT3 (7AK9), AtaR-AtaT (6GTR), KacA-KacT (5ZGN). Czarna siatka ukazująca gęstość aminokwasów tworzących TBS, w skład którego głównie wchodzi pętla toksynowa, została wygenerowana na podstawie struktur (identyfikatory PDB podane w nawiasach) lub modelowania toksyn bez obecności antytoksyny: TacT1 (5FVJ), TacT2 (Swiss model), TacT3 (6G96), AtaT (6GTP), KacT (5XUN).

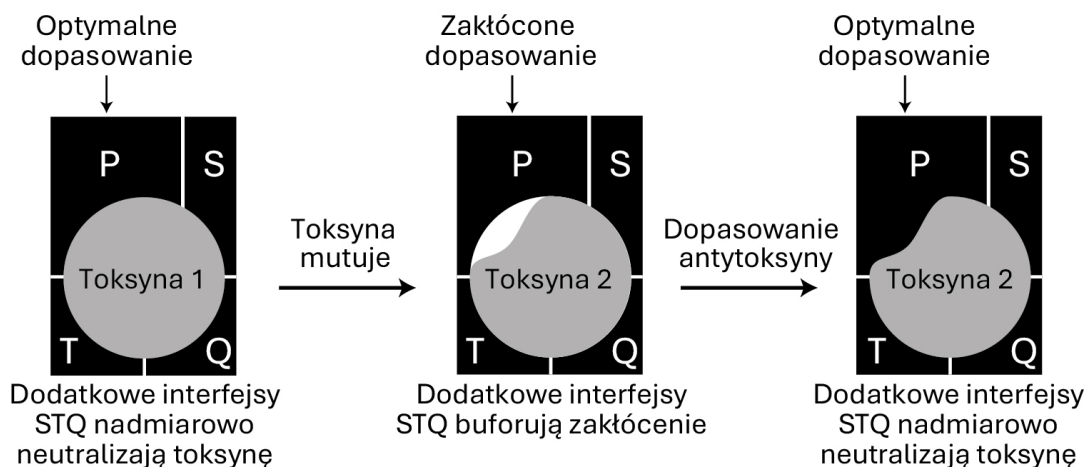
wiązanie substratu tRNA. Poza zaburzeniem miejsca TBS, zauważono, że wszystkie trzy antytoksyny zawierały w helisie $\alpha 4$ reszty lizyny, których łańcuchy boczne skierowane były w stronę kieszeni ACP. Jednak, nieznaczne zmniejszenie neutralizacji przez warianty TacA^{ND,Lys/Ala}, w których lizyna została wymieniona na alaninę, wskazywało, że to zaburzenie TBS jest dominującym mechanizmem neutralizacji TacAND.

Paralogiczne toksyny TacT1-3 różniły się wcześniej już zidentyfikowaną C-końcową helisą α^T , która występuje w TacT2 i TacT3, a której brak w TacT1²³. Usunięcie helisy α^T w TacT3 nie wyeliminowało toksyczności, co sugeruje, że jej obecność nie wpływa znacząco na funkcję toksyny. Co istotne, w strukturze kompleksu TacT3 z TacA3ND, helisa α^T tworzy lokalny interfejs z antytoksyną TacA3, stanowiący znaczną część całego interfejsu TacA3ND-TacT3. Sugeruje to, że ten C-końcowy element może stanowić tak zwany interfejsowy dodatek (ang. interface add-on) determinującym specyficzność oddziaływania z antytoksyną⁴⁰. Usunięcie helisy α^T istotnie wpłynęło na neutralizację przez TacA3, jednocześnie nie umożliwiając neutralizacji krzyżowej

przez paralogiczne antytoksyny, co sugeruje, że jest to **determinanta specyficzności oddziaływania TacA3-TacT3**.

Biorąc pod uwagę, że domena ND w antytoksynach TacA jest kluczowa dla neutralizacji i zarazem determinuje specyficzność oddziaływania z toksyną, istnieje ryzyko, że podczas ewolucji nowej specyficzności mogłoby dojść do uwolnienia toksyny prowadzącego do zatrucia komórki. W związku z tym zbadano czy ewolucja nowej specyficzności w paralogicznych systemach TA jest wspierana przez dodatkowe mechanizmy. W tym celu pomocne okazało się zbadanie struktury heksamerycznego kompleksu TacA2-TacT2, w którym stosunek antytoksyny do toksyny wynosił 2:1 i był dwukrotnie większy od tego zaobserwowanego dla struktur kompleksów toksyn z samymi domenami ND antytoksyn (TacA1ND-TacT1 i TacA3ND-TacT3). Zidentyfikowano w nim **dwa dimery antytoksyny TacA2** utworzone przez ich N-końcowe domeny DBD. Każda z czterech cząsteczek antytoksyny TacA2 kontaktowała się z dwiema cząsteczkami toksyny TacT2. Antytoksyny pokrywały łącznie 38% całkowitej powierzchni TacT2. Było to możliwe dzięki istnieniu **dodatkowych interfejsów** (poza tym tworzonym przez główny fragment ND), z których **każdy był formowany przez oddzielną cząsteczkę antytoksyny**. Oprócz interfejsu głównego nazwanego **P**, który zawierał w sobie interfejs tworzony przez domenę ND zaobserwowany w kompleksach TacT-TacAND, zidentyfikowano dodatkowe interfejsy **S**, **T** oraz **Q**. Większe interfejsy P i S były formowane przez regiony C-końcowe oddzielnych cząsteczek TacA2. Zaskakująca była obserwacja, że mniejsze interfejsy T i Q, były utworzone przez helisę $\alpha 1$ N-końcowej domeny DBD, regionu za pomocą którego antytoksyna wiąże się do DNA. Spośród wszystkich interfejsów, P wykazywał największą zmienność sekwencji, gdy porównano homologiczne fragmenty trzech antytoksyn TacA1-3. Ponadto, **pozycja interfejsów S, T i Q sugeruje, że zapewniają one dodatkową neutralizację**, poza tą gwarantowaną przez interfejs P. Funkcjonalnie, S i T dodatkowo przyczyniły się do zaburzenia regionu TBS, podczas gdy Q blokował resztę acetylową z kofaktora Ac-CoA. Co więcej, interfejs S zakłócał dimeryzację toksyny TacT2, stanu niezbędnego dla aktywności toksyn acetylotransferazowych^{22,23,41,43,44}. Za pomocą techniki sączenia molekularnego połączonego z wielokątym rozpraszaniem światła (ang. SEC-MALS) stwierdzono, że stan heksameryczny jest wspólnym dla wszystkich trzech kompleksów TacA1-TacT1, TacA2-TacT2 oraz TacA3-TacT3, co sugerowało, że dodatkowe interfejsy S, T, oraz Q są również obecne w kompleksach TacA1-T1 oraz TacA3-A3. Ponadto, stan z dodatkowymi interfejsami został zaobserwowany w późniejszym czasie w strukturze spokrewnionego systemu acetylotransferazowego, AtaR2-AtaT2, przez niezależną grupę badawczą⁴⁵. **Zidentyfikowana różnorodność interfejsów ujawniła, że antytoksyny TacA są elastycznymi białkami mogącymi przybierać różne konformacje, które redundantnie neutralizują toksyny TacT na praktycznie wszystkich możliwych poziomach**. W związku z tym postawiono hipotezę, że dodatkowe interfejsy S, T i Q wspomagają ewolucję nowej specyficzności w systemach TA. Biorąc pod uwagę, że interfejs P, posiadający najbardziej zmienną sekwencję aminokwasową, jest głównym czynnikiem warunkującym specyficzność oddziaływania, zaproponowano, że dodatkowe interfejsy S, T i Q pełnią rolę buforu neutralizacyjnego podczas ewolucji nowej specyficzności, której może towarzyszyć częściowe lub znaczne zakłócenie funkcjonowania

interfejsu P. Hipotezę tę zweryfikowano tworząc **chimeryczną antytoksynę TacA¹⁻³**, w której część regionu antytoksyny TacA1 tworzącego interfejs P zamieniono na odpowiednik z TacA3. Chimera TacA¹⁻³ w znacznym stopniu neutralizowała zarówno toksyny TacT1 oraz TacT3, lecz nie TacT2. Podstawienie zaangażowanej wyłącznie w interfejs S konserwowanej reszty kwasu asparaginowego (Asp) resztą lizyny (Asp-Lys) miało pomijalny wpływ na neutralizację toksyny w kontekście natywnego interfejsu P (TacA1^{Asp-Lys}-TacT1 oraz TacA3^{Asp-Lys}-TacT3). **Jednak w chimerze TacA¹⁻³ z zakłóconym interfejsem P to samo podstawienie (TacA^{1-3, Asp-Lys}) znacząco zmniejszyło efektywność neutralizacji obu toksyn, potwierdzając, że interfejs S działa jako bufor neutralizacyjny, gdy główny interfejs P jest zaburzony.** Podobne wyniki uzyskano dla mutacji w interfejsach T i Q, co potwierdziło ich rolę we wspieraniu neutralizacji częściowo zaburzonego interfejsu P (Ryc. 3).



Rycina 3. Dodatkowe interfejsy wspierają ewolucję specyficzności systemów TA

Interfejs P funkcjonuje jako główne miejsce neutralizacji toksyn, przy czym interfejsy S, T i Q zapewniają nadmiarową (redundantną) neutralizację. W miarę akumulacji mutacji w interfejsie P toksyny, dodatkowe interfejsy S, T i Q, zapewniają jej neutralizację i utrzymanie kompleksu toksyna-antytoksyna. Z czasem funkcjonalny interfejs P zostaje przywrócony na drodze ko-ewolucyjnego dopasowania z antytoksyną. Zmodyfikowano z artykułu naukowego nr 2.

Podsumowanie

Zidentyfikowano główne mechanizmy neutralizacji toksyn acetylotransferazowych przez antytoksyny, które polegają na zaburzeniu funkcji kluczowych dla działania toksyny: (1) wiązanie substratu tRNA (TBS), (2) wiązanie kofaktora Ac-CoA (ACP) oraz (3) stanu dimeryczny toksyny.

Odkryto, że antytoksyny oddziałują z toksynami acetylotransferazowymi za pomocą wielu interfejsów, co umożliwia nadmiarową (redundantną) neutralizację. **Wykazano, że dodatkowe interfejsy służą jako elementy wspomagające neutralizację, umożliwiając różnicowanie (dywergencję) głównego interfejsu bez konieczności uwalniania toksyny i w konsekwencji**

zatrucia komórki. Mechanizm „nadmiarowej neutralizacji” oparty o wielość interfejsów mógłby umożliwić szybszą ewolucję specyficzności paralogicznych systemów TA. Takie przyspieszenie ewolucji nie byłoby możliwe w przypadku systemów TA opartych na pojedynczym interfejsie.

Omawiana praca została skomentowana przez Anastazję Liuzzi oraz Ditleva Brodersena w „**Evolving complex insulation**” (doi.org/10.1038/s41589-021-00873-9)⁴⁶ oraz na stronie Science in Boston w sekcji „**Publications of the week**” (<https://scienceinboston.com/wp-content/uploads/sites/6/2021/11/Volume-3.41-min.pdf>).

Artykuł naukowy nr 3

Grabe G.J.*, Giorgio R., Wieczór M., Gollan B., Sargen M., Orozco M., Hare S., Helaine S.*; *Molecular Stripping Underpins Derepression of a Toxin-Antitoxin System.*⁴⁷ **Nature structural and molecular biology** (2024) doi.org/10.1038/s41594-024-01253-2

*Autorzy korespondencyjni

Wprowadzenie

Bakteryjne represory kontrolują aktywność genów, wiążąc się z sekwencjami DNA zwanymi operatorami, które pokrywają się z regionami promotorów. Wiązanie represora z operatorem blokuje dostęp polimerazy RNA do promotora, uniemożliwiając inicjację transkrypcji⁴⁸. W takim przypadku wydajna transkrypcja zależy od etapu derepresji, podczas którego represor odłącza się od operatora w wyniku rearanżacji strukturalnej wywołanej wiązaniem lub uwalnianiem cząsteczki induktora^{49,50}. Poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za uwalnianie represora z kompleksu represor-operator jest trudne ze względu na dynamikę tego procesu.

Bakteryjne systemy TA typu II stanowią dogodny model w badaniach molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za derepresję. Systemy TA II to bicystronowe operony kodujące dwa białka: toksynę, która zakłóca kluczowe procesy komórkowe, oraz mniej stabilną antytoksynę, która wiąże i neutralizuje toksynę. Oprócz inhibicji toksyny, antytoksyna wiąże się również z operatorem zlokalizowanym w obrębie promotora TA, umożliwiając autoregulację transkrypcyjną operonu¹³. W wielu systemach stosunek białek toksyna/antytoksyna (T:A) znacząco wpływa na tę regulację. Przy niskim stosunku T:A toksyna współpracuje z antytoksyną w represji, natomiast przy wysokim stosunku T:A toksyna działa jako derepresor i aktywator transkrypcji. To zależne od stosunku T:A zachowanie toksyny określane jest jako **warunkowa kooperatywność** (ang. conditional cooperativity)^{51,52}. Co istotne, w czasie realizacji tej pracy nie opisano zmian konformacyjnych warunkujących derepresję w systemach TA.

Chromosom bakterii STm zawiera trzy moduły TA *tacAT1-3*, które kodują toksyny acetylotransferazowe TacT1-3 modyfikujące naładowane tRNA, oraz antytoksyny TacA1-3. Antytoksyny posiadają N-końcową domenę DBD wiążącą DNA oraz C-końcową domenę ND neutralizującą toksynę. Homologiczne systemy acetylotransferazowe, *kacAT* i *ataRT*, opisano w

bakteriach *Klebsiella*⁴⁰ i *Escherichia*⁴¹, gdzie **heksameryczne kompleksy w stosunku 2T:4A** specyficznie wiązały operator i regulowały własną ekspresję z wykorzystaniem mechanizmu derepresji promotora. Jednak molekularne mechanizmy leżące u podstaw procesu derepresji nie zostały scharakteryzowane.

Cel badań

Celem badań było wyjaśnienie, jak system *tacAT3* reguluje swoją transkrypcję, ze szczególnym uwzględnieniem molekularnych podstaw represji promotora oraz zmian konformacyjnych wymaganych do jego derepresji.

Główne wyniki

Badania regulacji operonu *tacAT3* w *Salmonella* z użyciem fuzji transkrypcyjnych oraz cytometrii przepływowej potwierdziły autoregulację tego systemu. Promotor *tacAT3* zawierał dwa potencjalne operatory, OP1 i OP2. Potwierdzono, że OP1 był odpowiedzialnym za kontrolę ekspresji modułu *tacAT3*, gdyż jedynie mutacja OP1 eliminowała represję w komórkach *Salmonella* dzikiego typu. Wykazano również, że kompleks TacA3-TacT3 specyficznie wiąże operator (OP1), ale nie jego zmutowaną formę.

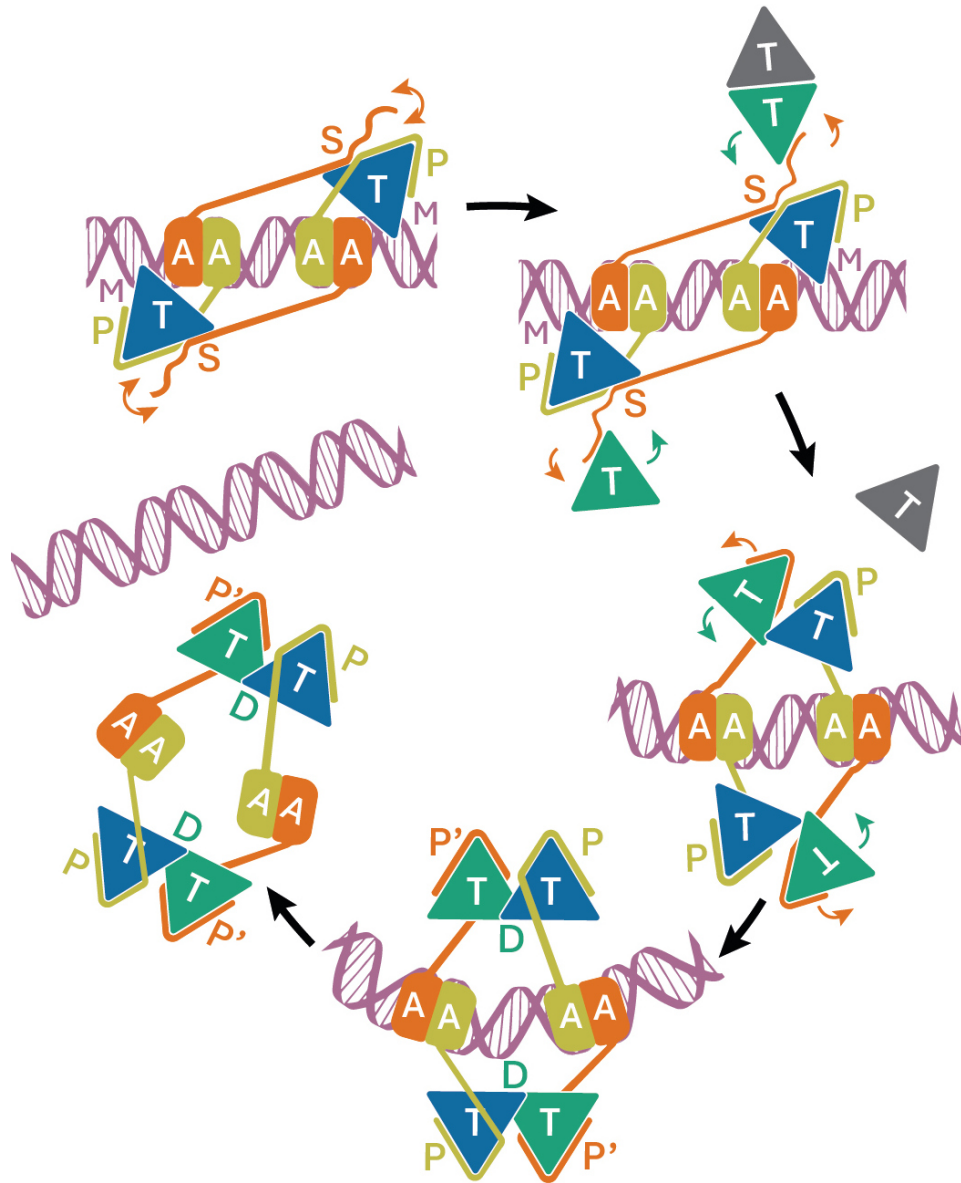
Toksyny współpracują z antytoksynami, wzmacniając represję poprzez łącznie dimerów antytoksyn. Badania wykazały, że zarówno TacA3, jak i TacT3 są niezbędne do silnej represji i wiązania operatora. Modelowanie strukturalne **heksamerycznego kompleksu 4A:2T TacA3-TacT3 związanego z operatorem** ujawniło dwa dimery TacA3 wiążące główne rowki w DNA, angażując reszty aminokwasowe miejsca wiązania DNA. Mutacja jednej z tych reszt zniósła wiązanie DNA i represję, potwierdzając kluczową rolę tego regionu w regulacji promotora *tacAT3*. Zaobserwowano również, że toksyny TacT3 łączyły dwa dimery antytoksyn poprzez interfejsy **P** oraz **S** (Ryc. 4). Połączenie to sugerowało, że toksyna prawdopodobnie zwiększa siłę wiązania antytoksyny z DNA poprzez awidność, efekt opisany poprzednio dla innych systemów TA⁵³. Ponadto zauważono, że toksyna kieruje swoją dodatnio naładowaną powierzchnią w stronę mniejszych rowków operatora. Region ten nazwano **miejscem M** i potwierdzono doświadczalnie jego znaczenie dla wiązania DNA oraz represji promotora. Zatem poza efektem awidności, toksyna sama w sobie za pomocą dodatnio naładowanej powierzchni przyczynia się do represji promotora.

Chociaż toksyna wspiera antytoksynę w represji promotora przy niskim stosunku T:A, jej zwiększona ilość może destabilizować kompleks i prowadzić do derepresji. W doświadczeniach wiązania DNA przy niskim stosunku T:A zaobserwowano współpracę w wiązaniu operatora między TacT3 i TacA3, natomiast nadmiar TacT3 zakłócał wiązanie operatora. Co istotne, zakłóceniu temu towarzyszyło formowanie kompleksu o zwiększonej masie cząsteczkowej, który mógłby inicjować dysocjację od operatora. Jest to zgodne z obserwacją, że nadekspresja *tacA3-tacT3* prowadzi do derepresji promotora w części populacji bakterii będących w fazie stacjonarnej, co może wynikać z nadmiaru toksyny TacT3 w stosunku

do mniej stabilnej antytoksyny TacA3. Aby zrozumieć molekularne podstawy procesu derepresji i uwalniania kompleksu TacA3-TacT3 od operatora, określiłem strukturę krystaliczną kompleksu TacA3-TacT3 z operatorem w obecności dodatkowej toksyny TacT3 skutkującej powstaniem wcześniej zaobserwowanego kompleksu o zwiększonej masie cząsteczkowej. W uzyskanej strukturze krystalicznej otrzymałem **oktameryczny kompleks TacA3-TacT3 związany z operatorem w stechiometrii 4A:4T**. Zaobserwowano, że w przeciwieństwie do heksamerycznego kompleksu, gdzie każda cząsteczka toksyny wiąże dwie cząsteczki antytoksyny poprzez miejsca P oraz S, w kompleksie oktamerycznym każda cząsteczka toksyny wiązała tylko jedną cząsteczkę antytoksyny poprzez interfejs **P lub P'** (Ryc. 4). Niemniej jednak połączenie między dimerami TacA3 było utrzymane poprzez dimery toksyn tworzące interfejs **D** (Ryc. 4). Dimer toksyny TacT3 tworzący interfejs D w oktamerycznej strukturze opierał się głównie (43% powierzchni) o **element pętli**, co znacząco odróżniało go od wcześniej uzyskanego dimeru toksyny (PDB ID: 6G96), gdzie ta sama pętla była eksponowana na powierzchni i brała udział w wiązaniu substratu tRNA.

Aby zweryfikować znaczenie stanu oktamerycznego w regulacji promotora *tacAT3*, stworzono wariant **TacT3^{Loop}** z podstawieniami w obrębie pętli w rejonie krytycznym dla interfejsu dimeryzacji D utrzymującego kompleks oktameryczny. Co ważne, pętla ta nie brała udziału w tworzeniu heksamerycznego kompleksu TacA3-TacT3 związanego z operatorem. Zgodnie z tymi obserwacjami kompleks TacA3-TacT3^{Loop} nadal tworzył heksamer wiążący operator. Potwierdzono również, że wariant TacT3^{Loop} współpracował z antytoksyną TacA3 w wiązaniu do operatora, podobnie jak TacT3. Jednak, w przeciwieństwie do TacT3, nadmiar toksyny TacT3^{Loop} nie inicjował dysocjacji kompleksu TacA3-TacT3^{Loop} związanego z operatorem. Co więcej, w komórkach znajdujących się w fazie stacjonarnej nadekspresja *tacA3-tacT3^{Loop}* skutkowałą silniejszą represją i, co istotne, brakiem derepresji promotora, co kontrastowało z wynikami otrzymanymi dla *tacA3-tacT3*. **Wyniki te są zgodne z hipotezą, że przejście od kompleksu heksamerycznego do oktamerycznego jest kluczowym etapem dla indukowanej przez toksynę derepresji promotora.**

Szukając wyjaśnienia, dlaczego oktamer jest wymagany do derepresji promotora *tacAT3*, porównano heksameryczne i oktameryczne kompleksy i zaobserwowano pomiędzy nimi kilka istotnych różnic. Dodatkowe dwie cząsteczki toksyny w oktamerze doprowadziły do szeregu znaczących zmian konformacyjnych. Interfejs **S**, tworzony między pierwotną toksyną a antytoksyną w heksamerze, został zastąpiony dimerycznym interfejsem **D** utworzonym przez dwie cząsteczki toksyn, pierwotną i dodatkową. Antytoksyna, która została wyparta z interfejsu S z pierwotną toksyną, w oktamerze utworzyła interfejs **P'**, łączący ją z dodatkową cząsteczką toksyny (Ryc. 4). Zauważono, że w porównaniu do heksameru, interfejs P tworzony przez antytoksynę w oktamerze przemieścił się, co poskutkowało oddaleniem cząsteczki toksyny od miejsca M, które w heksamerze wzmacniało represję. Co więcej, po nałożeniu obu modeli na jeden z dimerów TacA3 zaobserwowano przesunięcie drugiego dimeru antytoksyny. Zbiegało się to ze zwiększeniem kąta zgięcia DNA operatora. Ponadto względne wartości czynnika temperaturowego B w rejonie operatora oraz związanych z nim N-końcowych regionów



Rycina 4. Model derepresji systemu *tacAT3*.

Heksameryczny kompleks TacA3–TacT3 blokuje promotor poprzez wiązanie operatora. W wyniku zaburzenia stosunku T:A indukowanego stresem, nadmierowe cząsteczki toksyny (kolor zielony) wykorzystując dostępne C-końcowe fragmenty antytoksyn (pomarańczowy), zmieniają stopień oligomeryzacji kompleksu na oktameryczny. Kaskady zmian konformacyjnych podczas tej reorganizacji prowadzą do dysocjacji represora - derepresji, umożliwiającą transkrypcję operonu. A – antytoksyna; T – toksyna; P, P' oraz S – interfejsy toksyna-antytoksyna; M – miejsce zbliżenia toksyny do małego rowka operatora; D – interfejs dimeru toksyny utrzymywany przez toksynowe pętle. Wzięte z artykułu naukowego nr 3.

antytoksyn w porównaniu do reszty modelu były znacznie większe niż w homologicznym systemie z heksamerycznym KacA-KacT (4A:2T), co sugeruje, że operator w oktamerycznym kompleksie TacA3-TacT3 był bardziej dynamiczny. Przeprowadzono również liczne symulacje

dynamiki molekularnej, w których zidentyfikowano powstawanie lokalnego załamania w centralnym regionie operatora. Otrzymane wyniki pozwoliły na zaproponowanie modelu derepresji systemu *tacAT3* (Ryc. 4).

Podsumowanie

W pracy tej wyjaśniono molekularny mechanizmu regulacji promotora *tacAT3*. Wykazano, że przy wysokim stosunku T:A derepresja zależy od powstania przejściowego stanu oktamerycznego, podczas którego kaskada zmian konformacyjnych prowadzi do osłabienia oddziaływania z DNA, umożliwiając derepresję (Ryc. 4). Kluczowym elementem okazało się wytworzenie interfejsu D, który zastępuje interfejs S obecny w heksamerycznym kompleksie i prowadzi do wytworzenia interfejsu P'. Głównym elementem umożliwiającym powstanie interfejsu D jest pętla toksyny. Znamiennym jest fakt, że ta sama pętla odpowiada za wiązanie substratowego tRNA pod nieobecność antytoksyny³⁰, co ukazuje funkcjonalną plastyczność tego elementu.

4.3.3 Podsumowanie i plany na przyszłość

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk skupiłem się na analizie regulacji systemów odpowiedzi na stres toksyna-antytoksyna (TA), które wspierają przeżycie bakterii *Salmonella* podczas ekspozycji na antybiotyki. Moje badania koncentrowały się na systemach TA kodujących toksyny acetylotransferazowe, które modyfikują cząsteczki naładowanego tRNA. Moja praca w dziedzinie biologii strukturalnej zaowocowała uzyskaniem sześciu struktur krystalicznych, ukazujących różne stany tych systemów:

- **Toksyna** – acetylotransferaza TacT3 (PDB ID: 6G96)
- **Antytoksyna** – antytoksyna TacA1 (PDB ID: 7ZG6)
- **Kompleksy toksyna-antytoksyna** – TacA1ND-TacT1 (PDB ID: 7AK8), TacA2-TacT2 (PDB ID: 7AK7), TacA3ND-TacT3 (PDB ID: 7AK9)
- **Kompleks toksyna-antytoksyna związany z operatorem** – TacA3-TacT3-DNA (PDB ID: 7ZG5)

Struktury te, w połączeniu z wynikami doświadczeń biochemicznych i komórkowych, pogłębiły naszą wiedzę o funkcjonowaniu i różnorodności toksyn TacT. Analiza kompleksu TA ujawniła wiele interfejsów toksyna-antytoksyna w obrębie pojedynczej toksyny, które zapewniają jej wielopoziomą i nadmiarową neutralizację. Wykazaliśmy, że obecność dodatkowych interfejsów toksyn wspiera ewolucję specyficzności paralogicznych systemów TA, które spełniają funkcję buforu utrzymującego oddziaływanie toksyna-antytoksyna w trakcie ewolucyjnych zmian zachodzących w głównym interfejsie. Z kolei oktameryczny kompleks TA związany z operatorem okazał się kluczowy dla zrozumienia funkcjonowania molekularnego przekaźnika odpowiedzialnego za aktywację transkrypcji tego systemu. Unikalna pętla toksyny

okazała się niezbędna dla formowania stanu oktamerycznego, a jej mutacja pozwoliła na stworzenie „super-represorowych” kompleksów, niewrażliwych na stosunek T:A, podkreślając rolę oktameru w regulacji transkrypcji.

Moje obecne badania, wspierane przez granty POLONEZ BIS, EMBO Installation Grant oraz OPUS, koncentrują się na analizie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za odpowiedź na stres oraz wirulencję *Salmonella*. Rozszerzamy nasze badania nad systemami toksyna-antytoksyna (TA) o układy z odwróconą organizacją operonu, w których gen toksyny poprzedza gen antytoksyny. Zgłębiaamy także ewolucję specyficzności oddziaływań toksyn z antytoksynami. Badamy, czy systemy TA, poza autoregulacją, wpływają na ekspresję innych genów kluczowych dla fizjologii bakterii. Ponadto analizujemy kontrolę innych czynników transkrypcyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem regulatorów wirulencji. Poznanie tych mechanizmów może znaleźć zastosowanie w biotechnologii, np. w projektowaniu małych cząsteczek terapeutycznych zakłócających procesy istotne dla przeżycia i patogeniczności *Salmonella*.

Oprócz systemów TA moje badania obejmują białka efektorowe *Salmonella*, które wstrzykiwane do komórek eukariotycznych poprzez system T3SS (system sekrecji typu trzeciego) manipulują procesami komórkowymi gospodarza, w tym systemem ubikwityna-proteasom (UPS), kluczowym dla proteostazy komórek. Wyniki tych badań mogą umożliwić rozwój strategii biotechnologicznych zakłócających wirulencję *Salmonella* oraz przyczynić się do projektowania terapii regulujących funkcjonowanie systemu UPS w chorobach ludzkich.

4.4. Inne osiągnięcia od uzyskania stopnia doktora

Podczas moich badań podoktorskich w grupie badawczej profesor Sophie Helaine opublikowaliśmy pracę przeglądową, która omawiała stan literatury wykazującej związek między nawracającymi infekcjami a komórkami przetrwałymi tolerującymi antybiotyki. Praca ta prześledziła historię i rozwój badań nad komórkami przetrwałymi, oceniła ich stan aktualny (na tamten czas) oraz nakreśliła przyszłe kierunki badań. Podsumowano istniejącą literaturę dotyczącą powstawania komórek przetrwałych, ich przeżycia i ponownego wzrostu oraz strategii stosowanych w ich zwalczaniu. W pracy analizowano również powiązania między tolerancją bakterii na antybiotyki a antybiotykoopornością.

- Gollan B.*, **Grabe G.***, Michaux C.*, Helaine S., *Bacterial persisters and infection: past, present, and progressing. Annual Review of Microbiology* (2019)
doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115650

*Równy udział w pracy

Wskaźnik cytowań czasopisma (wg Journal Citation Reports 2023): **8,5**

Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki: **200**

Oprócz mojej pracy nad systemami acetylotransferazowymi TA, zaangażowałam się we współpracę z grupą badawczą doktor Anny Barnard (Imperial College London, Wielka Brytania), badającą bakteryjny system TA typu II Phd-Doc. W tym systemie toksyna Doc to kinaza, która

fosforyluje czynnik elongacyjny EF-Tu prowadząc to zahamowania translacji, natomiast Phd to antytoksyna, która wiąże i neutralizuje Doc. Oceniono różne peptydy w oparciu o sekwencję Phd pod kątem ich zdolności do hamowania aktywności kinazy Doc *in vitro*, określono ich powinowactwa, oraz zdolność do przeciwdziałania toksycznego efektu Doc w komórkach bakteryjnych. Badania te zaowocowały dwiema publikacjami naukowymi.

- de Castro G.V., Worm D.J., **Grabe G.J.**, Rowan F.C., Haggerty L., de la Lastra A.L., Popescu O., Helaine S., and Barnard A., *Characterization of the Key Determinants of Phd Antitoxin Mediated Doc Toxin Inactivation in Salmonella*. **ACS Chemical Biology** (2022) doi.org/10.1021/acscchembio.2c00276
Wskaźnik cytowań czasopisma (wg Journal Citation Reports 2023): **3,5**
Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki: **100**
- Worm D.J., **Grabe G.J.**, de Castro G.V., Rabinovich S., Warm I., Isherwood K., Helaine S., and Barnard A., *Stapled Phd Peptides Inhibit Doc Toxin Induced Growth Arrest in Salmonella*. **ACS Chemical Biology** (2023)
doi.org/10.1021/acscchembio.3c00411
Wskaźnik cytowań czasopisma (wg Journal Citation Reports 2023): **3,5**
Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki: **100**

Podczas mojego pobytu w Bostonie, współpracowałem z doktorem Benjaminem Springsteinem z laboratorium pod kierownictwem profesor Ann Hochschild przy projekcie wykorzystującym bakteryjny system dwuhybrydowy (B2H) do mapowania wewnątrz-wirusowego interaktomu szesnastu białek SARS-CoV-2. Wykryte interakcje były zależne od mutacji zakłócających, co potwierdziło przydatność systemu B2H w analizie oddziałujących par białek wirusowych. Ponadto modyfikacja tej platformy umożliwiła wykrycie interakcji zależnych od wiązań dwusiarczkowych.

- Springstein B.L., Deighan P., **Grabe G.J.**, Hochschild A., *A bacterial cell-based assay to study SARS-CoV2 protein-protein interactions*. **mBio** (2021)
doi.org/10.1128/mBio.02936-21
Wskaźnik cytowań czasopisma (wg Journal Citation Reports 2023): **5,1**
Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki: **140**

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

Od początku mojej kariery poszukiwałem okazji do zdobycia międzynarodowego doświadczenia naukowego. Już w wieku siedemnastu lat uczestniczyłem w letniej szkole badawczej organizowanej przez Uniwersytet w Uppsali (Szwecja). Po ukończeniu studiów licencjackich na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii (MWB) w Gdańsku odbyłem roczny staż w grupie badawczej doktora Jana van der Wolfa w Plant Research International na

Uniwersytecie w Wageningen (Holandia), gdzie zajmowałem się badaniem bakteryjnych patogenów roślin. Praca ta przyczyniła się do powstania trzech publikacji naukowych⁵⁴⁻⁵⁶.

Mój projekt podczas drugiego roku studiów magisterskich na MWB wykonałem w laboratorium pod kierownictwem profesora Shoheia Koide na Uniwersytecie w Chicago (USA) w ramach współpracy naukowej (obecnie odbywającej się w ramach Fundacji Fulbrighta). Tam nauczyłem się oczyszczania, charakteryzacji i krystalizacji białek oraz techniki „phage display”. Umożliwiło mi to wygenerowanie białek wiążących (ang. monobodies) specyficznych dla domeny SH2 kinazy tyrozynowej Bcr-Abl, będącej czynnikiem sprawczym przewlekłej białaczki szpikowej. Moja praca zaowocowała publikacją wykazującą hamowanie aktywności kinazy Bcr-Abl przez białka wiążące zarówno *in vitro*, jak i w komórkach, wskazując interfejs SH2-kinaza jako potencjalny cel farmaceutyczny⁵⁷.

Po uzyskaniu tytułu magistra otrzymałem prestiżowe stypendium **Wellcome Trust Molecular and Cellular Basis of Infection** na połączone studia magisterskie (MRes) i doktoranckie, które realizowałem na Imperial College London (Wielka Brytania). Podczas studiów MRes uczestniczyłem w trzech rotacjach laboratoryjnych, z których jedna, przeprowadzona w grupie profesora Steve’a Matthews’a, dotycząca bakteryjnych systemów włókien „curl”, zaowocowała autorstwem w publikacji naukowej⁵⁸. Moje badania doktorskie, prowadzone w laboratorium profesora królewskiego Davida Holdena, koncentrowały się na determinantach patogenezы *Salmonella*, takich jak T3SS i białko efektorowe SpvD⁵⁹⁻⁶¹. Część tej pracy realizowana była we współpracy z grupą badawczą Davida Komandera w Laboratory of Molecular Biology w Cambridge (Wielka Brytania) i doprowadziła do opublikowania artykułu badawczego⁶². Dodatkowo nawiązałem wieloletnią współpracę naukową między grupą a Pracownią Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki w Warszawie (Polska), która poskutkowała kilkoma publikacjami^{61,63,64}.

W ramach szkolenia podoktorskiego na Imperial College London (Wielka Brytania) i Harvard Medical School (USA) dołączyłem do laboratorium kierowanego przez profesor Sophie Helaine, koncentrując się na modułach TA *tacAT1-3* w bakterii *Salmonella enterica*. Badania te przyczyniły się do zrozumienia: (i) wkładu systemów *tacAT1-3* w przeżycie bakterii na ekspozycję antybiotykową²³, (ii) mechanizmów neutralizacji i ewolucji specyficzności tych systemów³⁰, oraz (iii) regulacji transkrypcyjnej systemu *tacAT3*⁴⁷. Podczas badania regulacji transkrypcyjnej systemu *tacAT3* zainicjowałem współpracę z doktorami Modesto Orozco i Miłoszem Wieczorem z Institute for Research in Biomedicine w Barcelonie (Hiszpania), która poprzez zastosowanie symulacji molekularnych przyczyniła się do wyjaśnienia i zobrazowania mechanizmu derepresji tego systemu TA⁴⁷. Współpracowałem także z doktor Anną Barnard z Imperial College London (Wielka Brytania), gdzie badaliśmy neutralizację toksyny kinazowej Doc należącej do systemu TA Phd-Doc, co zaowocowało dwiema publikacjami naukowymi^{65,66}.

W 2023 roku wykorzystałem zdobyte międzynarodowe doświadczenie, uzyskując grant **POLONEZ BIS** [„Dynamika i ewolucja specyficzności kompleksów toksyna-antytoksyna”; budżet 1 130 821 PLN], skierowany do polskich naukowców za granicą na powrót do kraju. Umożliwił mi on realizację pierwszego samodzielnego projektu badawczego, dotyczącego

dynamiki systemów TA, na wydziale MWB – miejscu, gdzie kiedyś stawiałem pierwsze kroki w nauce. Rok później otrzymałem grant **OPUS** [„*Badanie wpływu bakterii Salmonella na system ubikwityna-proteasom*”; budżet 3 818 680 PLN] na badanie interakcji bakterii *Salmonella* z eukariotycznym systemem ubikwityna-proteasom. W 2025 roku zostałem beneficjentem grantu instalacyjnego **EMBO** [„*Investigation of Salmonella pathogenicity and survival*”; budżet 50 000 EURO rocznie], który wspiera założenie niezależnej grupy badawczej. Środki uzyskane w ciągu ostatnich dwóch lat skutecznie umożliwiają mi poszukiwanie odpowiedzi na złożone pytania z zakresu nauki podstawowej. Habilitacja otworzy mi drogę do pełnej niezależności naukowej, umożliwiając opiekę nad doktorantami i kierowanie ich rozwojem. Co więcej, jestem zmotywowany chęcią przyczynienia się do rozwoju MWB i umocnienia jego pozycji jako uznanego ośrodka badawczego.

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

W 2024 roku wygłosiłem dwa publiczne wykłady: „*Salmonella enterica* – patogeneza i przeżycie” (20 marca 2024) dla uczniów szkół średnich uczestniczących w konkursie wiedzy „Podstawy onkogenezy” oraz „Walka z bakterią weselną – mechanizmy patogenezy *Salmonella* i współczesne wyzwania terapii antybiotykowej” (18 grudnia 2024) w ramach serii seminariów Uniwersytetu Trzeciego Wieku w Gdańsku. Podczas mojego pobytu w Imperial College London uczestniczyłem w Imperial Open Days, wydarzeniu którego celem było popularyzowanie nauki wśród społeczeństwa oraz przedstawienie projektów naukowych realizowanych w różnych grupach badawczych. Co więcej, w 2019 roku brałem udział w organizacji warsztatów EMBO „Systemy toksyna-antytoksyna” w Windsorze w Anglii.

W trakcie mojej kariery doktorskiej i podoktorskiej w Imperial College London oraz Harvard Medical School opiekowałem się łącznie dziesięcioma studentami w ramach studiów magisterskich oraz doktoranckich (na etapie rotacji), z których kilkoro zdecydowało się kontynuować badania w reprezentowanej przeze mnie grupie badawczej. Przez ostatnie półtora roku kierowałem pracą asystenta badawczego w projekcie POLONEZ BIS. Ponadto nawiązałem współpracę naukową z grupami badawczymi doktor Charlotte Michaux (Uniwersytet Rennes, Francja), profesora Wojciecha Bala (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Polska) oraz firmą biotechnologiczną Acteryon (Gdańsk, Polska). Obecnie kieruję dynamicznym zespołem składającym się z dwóch postdoków, jednego doktoranta oraz jednego asystenta badawczego w ramach Zakładu Biologii Strukturalnej.

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

W maju 2025 roku wziąłem udział w trzydniowym szkoleniu dla liderów grup organizowanym przez EMBO (ang. Lab Leadership for Group Leaders Course), który poruszał wyzwania oraz dobre praktyki w kierowaniu grupą badawczą.

7.1. Przyznane granty badawcze wraz z tytułem projektu oraz podmiotem realizującym

- 2025 **EMBO Installation Grant**
Tytuł: *“Investigation of Salmonella pathogenicity and survival”*
Budżet: 150 000 – 250 000 EUR
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny
- 2024 **NCN OPUS26**
Tytuł: *“Badanie wpływu bakterii Salmonella na system ubikwityna-proteasom”*
Budżet: 3 818 680 PLN
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny
- 2023 **NCN & UE (Horizon 2020) POLONEZ BIS 2**
Tytuł: *“Dynamika i ewolucja specyficzności kompleksów toksyna-antytoksyna”*
Budżet: 1 130 821 PLN
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny

7.2. Przyznane nagrody oraz stypendia

- 2022 **Nagroda za plakat naukowy (poster)** - *Boston Bacterial Meeting*, Boston, USA
- 2018 **Nagroda za plakat naukowy (poster)** - *EMBO Workshop: Bacterial persistence and antimicrobial therapy*. Ascona, Szwajcaria
- 2011 **Outstanding Wellcome Trust MRes Student Award** - wyróżnienie dla wybitnego studenta MRes w programie „Molecular and Cellular Basis of Infection” Imperial College London, Wielka Brytania
- 2010 **Stypendium naukowe Wellcome Trust** – studia magisterskie oraz doktoranckie w ramach programu „Molecular and Cellular Basis of Infection” Imperial College London, Wielka Brytania

Oświadczam, że nie ubiegałem się wcześniej o stopień doktora habilitowanego.

.....
(podpis wnioskodawcy)

Bibliografia

1. O'Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. *AMR review* [https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf) (2016).
2. Levin-Reisman, I. *et al.* Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science (80-.)*. **355**, 826–830 (2017).
3. Windels, E. M. *et al.* Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. *ISME J.* **13**, 1239–1251 (2019).
4. Gollan, B., Grabe, G., Michaux, C. & Helaine, S. Bacterial persisters and infection: Past, present, and progressing. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**, (2019).
5. Lewis, K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 357–372 (2010).
6. Hobby, G. L., Meyer, K. & Chaffee, E. Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. *Exp. Biol. Med.* **50**, 281–285 (1942).
7. Bigger, J. W. Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin By Intermittent Sterilisation. *Lancet* **244**, 497–500 (1944).
8. Moyed, H. S. & Bertrand, K. P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* **155**, 768–775 (1983).
9. Ogura, T. & Hiraga, S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4784–4788 (1983).
10. Gerdes, K., Rasmussen, P. B. & Molin, S. Unique type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 3116–3120 (1986).
11. Korch, S. B. & Hill, T. M. Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: Effects on macromolecular synthesis and persister formation. *J. Bacteriol.* **188**, 3826–3836 (2006).
12. Correia, F. F. *et al.* Kinase activity of overexpressed *HipA* is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 8360–8367 (2006).
13. Jurėnas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F. & Van Melderen, L. Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 335–350 (2022).
14. Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N. & Gerdes, K. Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin–Antitoxin Biology. *Mol. Cell* **70**, 768–784 (2018).
15. Leroux, M. & Laub, M. T. Toxin–Antitoxin Systems as Phage Defense Elements. *Annu. Rev. Microbiol.* **76**, 21–43 (2022).
16. Stanaway, J. D. *et al.* The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 1312–1324 (2019).
17. Popoff, M. Y., Bockemühl, J. & Brenner, F. W. Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann–White scheme. *Res. Microbiol.* **151**, 63–65 (2000).
18. Park, S. E. *et al.* The genomic epidemiology of multi-drug resistant invasive non-typhoidal *Salmonella* in selected sub-Saharan African countries. *BMJ Glob. Heal.* **6**, 1–14 (2021).
19. Haraga, A., Ohlson, M. B. & Miller, S. I. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 53–66 (2008).
20. Jennings, E., Thurston, T. L. M. & Holden, D. W. *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion System Effectors: Molecular Mechanisms And Physiological Consequences. *Cell Host Microbe* **22**, 217–231 (2017).
21. Helaine, S. *et al.* Internalization of salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science (80-.)*. **343**, 204–208 (2014).
22. Cheverton, A. M. *et al.* A *Salmonella* Toxin Promotes Persister Formation through Acetylation of tRNA. *Mol. Cell* **63**, 86–96 (2016).
23. Rycroft, J. A. *et al.* Activity of acetyltransferase toxins involved in *Salmonella* persister

- formation during macrophage infection. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
24. Gilchrist, J. J. & MacLennan, C. A. Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease in Africa. *EcoSal Plus* **8**, (2019).
 25. Pietsch, M. *et al.* Third generation cephalosporin resistance in clinical non-typhoidal Salmonella enterica in Germany and emergence of blaCTX-M-harbouring pESI plasmids. *Microb. Genomics* **7**, (2021).
 26. Tack, B., Vanaenrode, J., Verbakel, J. Y., Toelen, J. & Jacobs, J. Invasive non-typhoidal Salmonella infections in sub-Saharan Africa: A systematic review on antimicrobial resistance and treatment. *BMC Med.* **18**, 1–22 (2020).
 27. Okoro, C. K. *et al.* High-resolution single nucleotide polymorphism analysis distinguishes recrudescence and reinfection in recurrent invasive nontyphoidal salmonella typhimurium disease. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 955–963 (2012).
 28. Helaine, S. *et al.* Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters. *Science (80-.)*. **343**, 204–208 (2014).
 29. Jurenas, D. *et al.* AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA^{fMet}. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 640–646 (2017).
 30. Grabe, G. J. *et al.* Auxiliary interfaces support the evolution of specific toxin–antitoxin pairing. *Nat. Chem. Biol.* **17**, 1296–1304 (2021).
 31. Huang, C. Y., Gonzalez-Lopez, C., Henry, C., Mijakovic, I. & Ryan, K. R. hipBA toxin-antitoxin systems mediate persistence in *Caulobacter crescentus*. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
 32. Goulard, C., Langrand, S., Carniel, E. & Chauvaux, S. The *Yersinia pestis* Chromosome Encodes Active Addiction Toxins. *J. Bacteriol.* **192**, 3669–3677 (2010).
 33. Wilbaux, M., Mine, N., Guérout, A. M., Mazel, D. & Van Melderen, L. Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the ccd family in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **189**, 2712–2719 (2007).
 34. Aakre, C. D. *et al.* Evolving New Protein-Protein Interaction Specificity through Promiscuous Intermediates. *Cell* **163**, 594–606 (2015).
 35. Fiebig, A., Castro Rojas, C. M., Siegal-Gaskins, D. & Crosson, S. Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. *Mol. Microbiol.* **77**, 236–251 (2010).
 36. Ramage, H. R., Connolly, L. E. & Cox, J. S. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: Implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. *PLoS Genet.* **5**, (2009).
 37. Hallez, R. *et al.* New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **76**, 719–732 (2010).
 38. Iqbal, N., Guérout, A. M., Krin, E., Le Roux, F. & Mazel, D. Comprehensive functional analysis of the 18 *Vibrio cholerae* N16961 toxin-antitoxin systems substantiates their role in stabilizing the superintegron. *J. Bacteriol.* **197**, 2150–2159 (2015).
 39. Walling, L. R. & Butler, J. S. Structural determinants for antitoxin identity and insulation of cross talk between homologous toxin-antitoxin systems. *J. Bacteriol.* **198**, 3287–3295 (2016).
 40. Qian, H. *et al.* Toxin-antitoxin operon *kacAT* of *Klebsiella pneumoniae* is regulated by conditional cooperativity via a W-shaped KacA-KacT complex. *Nucleic Acids Res.* **47**, 7690–7702 (2019).
 41. Jurėnas, D., Van Melderen, L. & Garcia-Pino, A. Mechanism of regulation and neutralization of the AtaR–AtaT toxin–antitoxin system. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 285–294 (2019).
 42. Plach, M. G. *et al.* Evolutionary diversification of protein–protein interactions by interface add-ons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E8333–E8342 (2017).
 43. Qian, H. *et al.* Identification and characterization of acetyltransferase-type toxin-antitoxin locus in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **108**, 336–349 (2018).
 44. Yashiro, Y., Yamashita, S. & Tomita, K. Crystal Structure of the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* AtaT–AtaR Toxin–Antitoxin Complex. *Structure* **27**, 476–484.e3 (2019).

45. Yashiro, Y., Zhang, C., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. & Tomita, K. Molecular basis of glycyl-tRNA^{Gly} acetylation by TacT from *Salmonella* Typhimurium. *Cell Rep.* **37**, 110130 (2021).
46. Liuzzi, A. & Brodersen, D. E. Evolving complex insulation. *Nat. Chem. Biol.* **17**, 1216–1217 (2021).
47. Grabe, G. J. *et al.* Molecular stripping underpins derepression of a toxin–antitoxin system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **31**, 1050–1060 (2024).
48. Rojo, F. Repression of Transcription Initiation in Bacteria. *J. Bacteriol.* **181**, 2987 (1999).
49. Zhang, R. G. *et al.* The crystal structure of trp aporepressor at 1.8 Å shows how binding tryptophan enhances DNA affinity. *Nature* **327**, 591–597 (1987).
50. Lewis, M. *et al.* Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* **271**, 1247–1254 (1996).
51. Magnuson, R. & Yarmolinsky, M. B. Corepression of the P1 addiction operon by Phd and Doc. *J. Bacteriol.* **180**, 6342–6351 (1998).
52. Overgaard, M., Borch, J., Jørgensen, M. G. & Gerdes, K. Messenger RNA interferase RelE controls relBE transcription by conditional cooperativity. *Mol. Microbiol.* **69**, 841–857 (2008).
53. Loris, R. & Garcia-Pino, A. Disorder- and dynamics-based regulatory mechanisms in toxin-antitoxin modules. *Chem. Rev.* **114**, 6933–6947 (2014).
54. Stawiak, M. *et al.* Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **125**, 245–261 (2009).
55. Czajkowski, R., Grabe, G. J. & van der Wolf, J. M. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur. J. Plant Pathol.* **125**, 263–275 (2009).
56. Tsrur, L. *et al.* Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.* **123**, 311–320 (2009).
57. Wojcik, J. *et al.* Allosteric inhibition of Bcr-Abl kinase by high affinity monobody inhibitors directed to the Src homology 2 (SH2)-kinase interface. *J. Biol. Chem.* **291**, 8836–8847 (2016).
58. Taylor, J. D. *et al.* Atomic resolution insights into curli fiber biogenesis. *Structure* **19**, (2011).
59. Yu, X. J., Grabe, G. J., Liu, M., Mota, L. J. & Holden, D. W. SsaV interacts with SsaL to control the translocon-to-effector switch in the salmonella SPI-2 type three secretion system. *MBio* **9**, (2018).
60. Matthews-Palmer, T. R. S. *et al.* Structure of the cytoplasmic domain of SctV (SsaV) from the *Salmonella* SPI-2 injectisome and implications for a pH sensing mechanism. *J. Struct. Biol.* **213**, 107729 (2021).
61. Rolhion, N. *et al.* Inhibition of Nuclear Transport of NF-κB p65 by the *Salmonella* Type III Secretion System Effector SpvD. *PLoS Pathog.* **12**, e1005653 (2016).
62. Grabe, G. J. *et al.* The *Salmonella* Effector SpvD Is a Cysteine Hydrolase with a Serovar-specific Polymorphism Influencing Catalytic Activity, Suppression of Immune Responses, and Bacterial Virulence. *J. Biol. Chem.* **291**, 25853–25863 (2016).
63. Cerny, O. *et al.* CD97 stabilises the immunological synapse between dendritic cells and T cells and is targeted for degradation by the *Salmonella* effector SteD. *PLoS Pathog.* **17**, 1–28 (2021).
64. Alix, E. *et al.* The Tumour Suppressor TMEM127 Is a Nedd4-Family E3 Ligase Adaptor Required by *Salmonella* SteD to Ubiquitinate and Degrade MHC Class II Molecules. *Cell Host Microbe* **28**, 54-68.e7 (2020).
65. Worm, D. J. *et al.* Stapled Phd Peptides Inhibit Doc Toxin Induced Growth Arrest in *Salmonella*. *ACS Chem. Biol.* **18**, 2485–2494 (2023).
66. De Castro, G. V. *et al.* Characterization of the Key Determinants of Phd Antitoxin Mediated Doc Toxin Inactivation in *Salmonella*. *ACS Chem. Biol.* **17**, 1598–1606 (2022).