

Prof. dr hab. Jacek Wojciorowski
Emerytowany prof. Genetyki Medycznej



Lublin, dn. 14. 07. 2022 r.

Recenzja osiągnięcia naukowego stanowiącego cykl habilitacyjny, innych osiągnięć naukowych, osiągnięć dydaktycznych i popularyzujących naukę, oraz kariery zawodowej Pani dr nauk biologicznych
Anny Henriques dos Santos de Sepulveda.

Rececja dotyczy postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauki o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

A. Przebieg kariery zawodowej dr. Anny Henriques dos Santos de Sepulveda.

W latach 2000 - 2006 Pani Anna Grabowska (nazwisko panięskie Pani Anny Henriques dos Santos de Sepulveda) studiowała na Wydziale Biologii i na Wydziale Psychologii Uniwersytetu Warszawskiego w ramach MISMaP (Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno - Przyrodniczych). Uzyskała tytuł magistra biologii w 2005 r. i magistra psychologii w 2006 r..

W latach 2005 -2010 była doktorantką Studium Medycyny Molekularnej przy WAM. Projekt realizowała w Zakładzie Genetyki Bakterii na Wydziale Biologii UW.

W 2010 r. obroniła pracę na stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii molekularnej na Wydziale Biologii UW. Tytuł rozprawy doktorskiej: "Sieć oddziaływań białek szlaku utlenienia Dsb w komórkach *Campylobacter jejuni*".

W latach 2010 -2011 pracowała jako specjalistka w programie MOSAR w Narodowym Instytucie Leków (NIL), Warszawa.

W latach 2011 - 2015 pracowała jako podoktorski pracownik naukowy w Instytucie Farmakologii i biologii strukturalnej (IPBS) w Tuluzie, we Francji.

W roku 2013 pełniła rolę wizytującego pracownika naukowego (*visiting research fellow*) na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

W latach 2015 - 2019 pracowała jako podoktorski pracownik naukowy (*ang. post-doctoral research fellow*) w Londyńskiej Szkole Higieny i Medycyny Tropikalnej w Anglii.

Od 2019 roku do chwili obecnej jest adiunktem badawczo-dydaktycznym Zakładu Biofizyki, Fizjologii i Patofizjologii, WAM, Warszawa.

B. Recenzja osiągnięć naukowych, które stanowią cykl habilitacyjny pod tytułem: "Regulacja procesów metabolicznych mykobakterii warunkujących ich wirulencję i stanowiących potencjalny cel ukierunkowanej terapii".

Prezentowany cykl habilitacyjny składa się z trzech prac doświadczalnych i jednej pracy poglądowej. Dr Anna de Sepulveda sugeruje także przeprowadzenie wspólnej oceny dodatkowej czwartej pracy doświadczalnej, której pozostaje czwartym autorem. Praca ta pozostaje jednak w bardzo ścisłym związku tematycznym z całym cyklem habilitacyjnym.

Przyczyną podjęcia badań było stwierdzenie istnienia unikalnych dla mykobakterii mechanizmów translacji bezliderowych, licznych systemów toksyna - antytoksyna i innych mechanizmów pozwalających na przetrwanie bakterii przez wiele lat w warunkach stresu i w niekorzystnych warunkach w organizmie człowieka, głównie w for-

nie przewlekłego zakażenia uśpionego. Dokładniejsze badania tych mechanizmów mogłoby stworzyć możliwości terapii zakażenia *Mycobacterium tuberculosis*, zwłaszcza w stanie jego uśpienia metabolicznego.

Na szczególne podkreślenie zasługuje waga podjętego tematu badań. Gruźlica nadal pozostaje jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych. W Polsce w 2019 roku zanotowano 5321 nowych zakażeń a 519 osób zmarło z powodu tej choroby. Gruźlica utajona dotyczy ponad 25% populacji a ryzyko rozwoju choroby w ciągu życia ocenia się na 5% do 15%. W Polsce nowe zachorowania dotyczą głównie ludzi dorosłych a epidemie grypy typu Covid19 mogą jeszcze zwiększyć tą częstość zachorowań. Podobnie masowe migracje ludzi mogą zwiększać liczbę zachorowań w populacji.

Praca 1: Translational regulation in mycobacteria and its implications for pathogenicity. Sawyer E, Grabowska AD, Cortes T. Nucleic Acids Research, 2018, 46(14), 6950 - 6961.

Jest to praca poglądowa, która stanowi teoretyczną podstawę dla planowanych badań. Opisano znane różnice w maszynierii translacyjnej bakterii i eukariontów, ze szczególnym uwzględnieniem różnic w strukturze rybosomów, roli translacji bezliderowej (niekanonicznej) w powstawaniu infekcji bezobjawowej oraz roli systemów toksyna - antytoksyna szczególnie licznych u bakterii *Mycobacterium tuberculosis* i grających rolę w ich adaptacji do niekorzystnych warunków środowiska (hipoksja lub niedobory substancji odżywczych).

Szeroko omawiany był stan latentnej infekcji makrofagów płucnych i tworzenie ziarninów zależne od bloku bakteryjnej syntezy białka, selektywnej degradacji białek, regulacji transkrypcji i zahamowanie fuzji fagosomu z lizosomem. Szeroko mówione zostały dwa typy mechanizmów inicjacji translacji - zależnej od sekwencji Shine - Dalgarno i od inicjacji translacji bezliderowej z tworzeniem szczególnego typu 70S rybosomów, które nie zawierają mRNA. Taka translacja obserwowana jest także u *E. coli* dla niewielu mRNA i można ją wykazać po zablokowaniu translacji zależnej od sekwencji Shine - Dalgarno przez antybiotyk kasugamycynę. Translacja wymaga też obecności specyficznych rybosomów (bez białek bS1 i bS21).

U *Mycobacterium tuberculosis* istnieje aż 20% bezliderowych mRNA, istnieją też specyficzne rybosomy ze zmienioną strukturą białek (brak białka bS21). U 20% rybosomów mykobakterii nie ma "mostka B9" - sekwencji około 100 rybonukleotydów w obrębie 23S rRNA, struktury która uniemożliwia tworzenie 70S rybosomów bez obecności mRNA.

Autorzy szczególnie wiele uwagi poświęcili systemom regulacji translacji w warunkach stresu (u *E. coli* i *Mycobacterium tuberculosis*). Modyfikacje rybosomów są obserwowane w hibernacji komórek w warunkach stresu. U *E. coli* w stanie uśpienia metabolicznego tworzą się 100S dimery rybosomów. U *Mycobacterium tuberculosis* w stanie hipoksji do tych rybosomów przyłącza się białko RafH, które powoduje powstanie rybosomów 70S (nie zawierających mRNA). Natomiast w głodzeniu do rybosomów wiąże się białko RafS uniemożliwiając łączenie podjednostek rybosomów. W hipoksji obserwuje się też modyfikację tRNA treoninowego - urydyna w antykodonie UGU ulega zmianie na urydyno 5 - oksyocytan.

Ważnymi systemami reakcji bakterii na stres są systemy toksyna - antytoksyna (TA). U *E. coli* toksyny MazF odcinają 5' koniec mRNA, a także tną 3' koniec 16S rRNA (z sekwencją anty SD). Dodatkowo przecinają 23S rRNA i pewne sekwencje tRNA. W braku stresu toksyna jest blokowana przez mało stabilną antytoksynę. Brak antytoksyny w stresie prowadzi do kompletnego bloku replikacji DNA, syntezy błony komórkowej i translacji a nawet do śmierci komórki. *M. tuberculosis* ma szczególnie wiele systemów TA, są one odpowiedzialne za przystosowanie bakterii do różnego typu stresu.

Autorzy rozważają też możliwość wykorzystania omówionych własności *M. tuberculosis* do terapii choroby, w szczególności w stanie uśpienia metabolicznego zakażenia.

Praca ma wysoki impact factor (IF = 11,147). Pani Grabowska (nazwisko panieńskie Pani Henriques dos Santos de Sepulveda) brała udział w zbieraniu literatury, opracowaniu tekstu i pisanu manuskryptu.

Praca 2: Molecular Basis for Extender Unit Specificity of Mycobacterial Polyketide Synthases. Grabowska AD, Brison Y, Maveyraud L, Gavalda S, Faille A, Nahoum V, Bon C, Guilhot C, Pedelacq J, Chalut C, Mourney L. ACS Chemical Biology, 2020, 15(12), 3206 - 3216.

Praca doświadczalna poświęcona badaniu specyficzności enzymów typu syntetaz poliketydów - glikolipidów fenolowych (PGL), kwasów mykolowych i dimykokerosatów ftiocerolu (DIM), które znajdują się w lipidach błon komórkowych mykobakterii. Te składniki błon komórkowych odgrywają poważną rolę w tworzeniu wirulencji bakterii *M. tuberculosis*, *M. leprae* i *M. ulcerans*. Syntetazy poliketydów (PKS) są nadzwyczaj liczną grupą enzymów o skomplikowanej wielopodjednostkowej strukturze. Dla prawidłowej funkcji enzymu ważna jest zwłaszcza domena acyltransferazy (typu cis-AT i trans-AT).

Bakteria *M. tuberculosis* zawiera około 20 genów kodujących różne syntetazy poliketydów. Autorzy badali krystaliczną strukturę fragmentów zawierających domenę AT enzymów Pks13, Mas, PpsA i PpsC i badali wpływ

różnych mutacji na podjednostkę wydłużającą enzymu. Trudno mi ocenić wyniki badań rozpraszania promieni X (*small-angle X-ray scattering* SAXS) przez oczyszczone białka, gdyż nigdy nie prowadziłem takich badań.

W zakresie badań sekwencji aminokwasowej domeny acyltransferazy AT enzymu Mas są odmienne od domen enzymów Pks13, PpsA i PpsC ale pozostają typowe dla struktury acyltransferaz AT. Ustalono sekwencję, strukturę i topografię centrów aktywnych badanych enzymów. Autorzy opisali trzy nowe struktury krystaliczne domeny AT mykobakteryjnych PKS i badali reszty aminokwasowe, które wpływają na specyficzność reakcji. Ma to praktyczne znaczenie dla przewidywania specyficzności substratowej różnych syntetaz poliketdów.

Impact faktor omawianej pracy wynosi 5,100. Pani Henriquez dos Santos de Sepulveda stworzyła koncepcję badań, zaplanowała stosowane w badaniach szczepy bakteryjne, brała także udział w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów genetycznych i biochemicznych, w analizowaniu i interpretacji wyników a także w opracowaniu manuskryptu.

Praca 3: Multi-Stress Induction of the Mycobacterium tuberculosis MbcTA Bactericidal Toxin-Antitoxin System. Ariyachakun K, Grabowska A, Gutierrez C, Neyrolles O., Toxins, 2020, 12(5), 1 - 14.

Bakteryjny system toksyna (T) - antytoksyna (A) stanowi bardzo ważny mechanizm adaptacji bakterii do różnych typów stresu. Toksyna hamuje ważne procesy bakteryjne, antytoksyna blokuje działanie toksyny, jest stabilna tylko w korzystnych dla życia warunkach ale staje się niestabilna w stresie. Znanych jest 6 rodzin systemów TA (zależy to od typu antytoksyny). *M. tuberculosis* ma aż 80 różnych systemów TA. Jeden z nich (MbcTA) koduje toksynę NAD⁺ fosforylazę (T) i antytoksynę (A).

Dla badania ekspresji toksyny (T) autorzy użyli wektor integrujący się do chromosomu bakterii *M. smegmatis* mc²155 (która nie ma endogennego operonu mbcAT) w glnV tRNA genie. Ekspresja genu toksyny jest pod kontrolą promotorów indukowanych anhydrotetracykliną. Promotor P606 (P1) silnie redukuje poziom NAD⁺ (do 2% normy) ale jeszcze nie zabija bakterii.

Skonstruowano pomysłowy system informacyjny monitorujący ekspresję genów bakterii zawierający reporter konstytutywny (kodujący białko fluoryzujące pod kontrolą promotora P1), reporter operonu mbcAT (kodujący inne białko fluoryzujące pod kontrolą promotora/operatora operonu mbcAT) i gen kodujący dowolne białko (regulator ekspresji promotora mbcA). Udało się wykazać, że silna ekspresja genu mbcA hamuje transkrypcję z promotora genu mbcAT niezależnie od obecności toksyny (autorepresja).

Badano funkcje promotora/operatora mbcAT. Jest on zlokalizowany w sekwencji 261 nukleotydów w regionie poprzedzającym otwartą ramę odczytu genu mbcA. Miejsce wiązania rybosomu (RBS) znajduje się na 16 nukleotydów przed ramą odczytu mbcA. Mutacja w sekwencji 10 nukleotydów poprzedzających początek translacji o 54 nukleotydy całkowicie znosi ekspresję genu mbcA. Promotor genu mbcA ma dwa powtórzenia związane przez białko represora. Mutacje boksu ATA poniżej RBS obniża ekspresję antytoksyny z promotora mbcA i mbcAT

Wpływ stresu - w dzikim szczepie Mtb H37Rv ekspresja z P_{mbcA} w warunkach głodzenia, traktowania H₂O₂ i w obecności NO zwiększała się. Rola systemów TA *M. tuberculosis* w tworzeniu stanu przetrwania w zakażonych makrofagach płucnych nie jest jasna, ale wyhamowanie produkcji antytoksyny mogłoby prowadzić do śmierci bakterii i do wyleczenia stanu utajonego zakażenia.

Praca zawiera wiele ważnych osiągnięć metodycznych i wyników badań doświadczalnych. Zaliczyć do nich można opracowanie i konstrukcja integracyjnego plazmidu kodującego konstytutywny reporter i fluoryzujący reporter indukowany pod kontrolą systemu TA. Również badania doświadczalne skoncentrowane na regulacjach ekspresji genu antytoksyny (autoregulacja i ekspresja w warunkach stresu) są ważne z punktu widzenia terapii zakażenia w stanie uśpienia metabolicznego.

Praca jest oceniona na 4,546 punktów IF. Dr Anna de Sepulveda jest współautorką projektu badań, opracowania metod, przeprowadzenia eksperymentów, interpretacji wyników i napisania manuskryptu pracy.

Praca 4. Translation of a Leaderless Reporter Is Robust During Exponential Growth and well sustained During Stress Conditions in Mycobacterium tuberculosis. Grabowska AD, Andreu N, Cortes T., Frontiers in Microbiology, 2021, 12(745320), 1 - 14.

Adaptacja *M. tuberculosis* do stresu w dużym stopniu zależy od zmian w transkrypcji mRNA i jego translacji. U bakterii (ale nie u eukariontów) stwierdzono istnienie mRNA pozbawionego sekwencji liderowej. Translacja tego mRNA odbywa się przez wiązanie dwujednostkowych rybosomów (70S) do AUG kodonu start mRNA. Translacja bezliderowego mRNA jest szczególnie charakterystyczna dla mykobakterii gdzie aż 25% mRNA jest bezliderowe. Interesujące jest spostrzeżenie, że u mykobakterii synteza białek stresu systemu toksyna - antytoksyna jest kodowana przez bezliderowe mRNA.

Autorzy badali różnice między bezliderową a zależną od sekwencji Shine Dalgarno translacją w różnych warunkach stresu i infekcji makrofagów płucnych. Użyto w tym celu złożonego wektora ekspresji pMV306 zawierającego

gen lucyferazy. Reporter translacji zależnej od SD był tworzony przez połączenie promotora desA1 genu (albo desA2 genu) z 5' UTR i 6 N-terminalnych kodonów desA1 genu. Reporter translacji bezliderowej był tworzony przez połączenie regionów promotora desA2 genu (lub desA1 genu) bez sekwencji 5' UTR i 6 N-terminalnych kodonów desA2 genu.

Różnice ekspresji zależnej od SD i bezliderowych mRNA zależały od translacji a nie od transkrypcji. Reporter bezliderowy jest translatowany także w fazie wzrostu ekspotencjalnego. Ekspresja bezliderowych reporterów jest niewiele zmniejszona w głodzeniu, w stresie spowodowanym przez NO i we wczesnych fazach infekcji makrofagów. Wśród bezliderowych genów są głównie geny stresu a także geny cyklu kwasu cytrynowego i gen ϵ -aminotransferazy lizyny.

Wyniki badań potwierdziły przypuszczenie, że bezliderowa translacja stanowi korzyść adaptacyjną w stresie związanym z infekcją. Zahamowanie tej translacji może mieć znaczenie w terapii przypadków utajonej gruźlicy.

Impact factor pracy wynosi 5,640. Pani dr Anna de Sepulveda stworzyła ogólną koncepcję pracy, wygenerowała szczepy reporterowe, przeprowadziła główne eksperymenty, interpretację wyników i opracowała manuskrypt pracy.

Praca dodatkowa (poza cyklem prac habilitacyjnych): An NAD⁺ Phosphorylase Toxin Triggers Mycobacterium tuberculosis Cell Deth. Freire D, Gutierrez C, Garza-Garcia A, Grabowska A, Sala A et al. Molecular Cell, 2019, 73(6), 1282 - 1291.

Jest to praca wykonana przez trzy ośrodki naukowe i przez wielką liczbę autorów. Jest pierwszą pracą z cyklu badań nowego systemu odpowiedzi na stres u *E. coli* (systemu RES - Xre). Autorzy stwierdzili, że krystaliczna struktura toksyny MbcT przypomina strukturę krystaliczną zależnej od NAD⁺ egzotoksyny *Corynebacterium diphtherie* powodującą degradację komórkowego NAD⁺. Udowodniono też, że MbcT jest NAD⁺ fosforylaza katalizowana przez nieorganiczny fosforan.

Trzy geny kodujące antytoksyny *M. tuberculosis* są ważne dla życia bakterii w tym Rv1990c kodujący MbcA. Autorzy badali wpływ ektopicznej kopii genu Rv1989c (kodującego MbcT) na dziki typ *M. tuberculosis* i na bakterie kompletnie pozbawione operonu Rv1989c - Rv1990c. W pierwszym przypadku nie obserwowano wpływu toksyny na wzrost bakterii (zwiększała się produkcja endogennej antytoksyny), w drugim przypadku wzrost bakterii został kompletnie zahamowany. Mutanty R27E genu toksyny MbcT traciły aktywność fosforylaza.

Praca ma duże znaczenie teoretyczne - odkryto nową klasę bakteryjnych wewnątrzkomórkowych toksyn, które należą do systemów AT i praktyczne - obniżenie aktywności antytoksyny MbcA zwiększa efekty antybiotykowej terapii zakażenia *M. tuberculosis* (u myszy).

Impact factor pracy jest bardzo wysoki i wynosi 15,584 (200 punktów MEiN). Pani dr Anna Henriquez dos Santos de Sepulveda jest czwartym autorem wielozespołowej pracy i dlatego praca formalnie nie została zaliczona do cyklu habilitacyjnego. Tematycznie praca jest jednak silnie związana z omawianym cyklem habilitacyjnym a wkład doktor de Sepulvedy był znaczny: projekt badań, opracowanie metod i przeprowadzenie części eksperymentów. Dlatego omawiam wyniki pracy razem z omówieniem cyklu habilitacyjnego.

Ogólna ocena cyklu prac habilitacyjnych dr Anny Henriquez dos Santos de Sepulveda z uwzględnieniem pracy publikowanej w Molecular Cell, 2019.

Wszystkie publikacje cyklu poświęcone były unikalnym cechom metabolizmu *Mycobacterium tuberculosis*, zwłaszcza tym, które stwarzają szanse na zastosowanie w terapii, zwłaszcza w stanie zakażenia uśpionego. Badania dotyczyły głównie typowej dla *Mycobacterium tuberculosis* translacji bezliderowej, syntezy poliketydów, składników komórkowych błon bakterii i jednej z licznych, specyficznych dla mykobakterii par endogenna toksyna MbcT - endogenna antytoksyna MbcA.

Równie interesujące były osiągnięcia metodologiczne - tworzenie systemów reporterowych ekspresji białek, konstrukcja plazmidów jak i metody hodowli i zakażanie płucnych makrofagów człowieka i myszy.

Całkowity współczynnik oddziaływania prac cyklu habilitacyjnego wynosi IF 26,433, punktacja MEiN - 340 Łącznie z publikacją w Molecular Cell (praca poza cyklem) IF wynosi 42,017 a punktacja MEiN - 540,

C. Ocena pozostałych osiągnięć naukowych dr Anny Henriquez dos Santos de Sepulveda.

Pozostałe publikacje dr de Sepulveda obejmują 6 prac oryginalnych, 2 prace przeglądowe i jeden list do redakcji. Publikacje mogą być zaliczone do trzech bloków tematycznych:

- publikacje dotyczące etiologii zespołu chronicznego zmęczenia (CSF),
- publikacje dotyczące wirulencji pałeczki jelitowej *Campylobacter jejuni*,
- publikacje dotyczące badań nietypowych β -laktamaz pałeczek gram ujemnych.

a. Publikacje dotyczące etiologii zespołu chronicznego zmęczenia (CFS).

CFS jest chorobą cywilizacyjną dotyczącą 0,4 ludzkiej populacji spowodowaną prawdopodobnie czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Etiologia choroby nie jest wyjaśniona a specyficzne markery diagnostyczne nie zostały opisane. Ten cykl obejmuje cztery publikacje:

1. **Herpesviruses Serology Distinguishes Different Subgroups of Patients From the United Kingdom Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome Biobank.** Domingues T, Grabowska A, et al. *Frontiers in medicine*, 2021, 8, 1-11.

Praca eksperymentalna. Autorzy podzielili badanych pacjentów z CFS na cztery grupy etiologiczne. Wszystkie osoby o nieznanym lub niepotwierdzonym czynniku infekcyjnym CFS były seronegatywne wobec wirusów EBV, VZV i CMV.

2. **The SARS-CoV-2 receptor angiotensins-converting enzyme 2 (ACE2) in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: a meta-analysis of public DNA methylation and gene expression data.** Malato J, Sotzny F, Bauer S, Freitag H, Fonseca A, Grabowska A, et al, *Helyon*, 2021, 7(8), 1-11.

Jest to metaanaliza badań serologicznych i genetycznych podatności osób z CFS na zakażenia wirusowe. W CSF ekspresja genu ACE2 (receptora wirusa SARS-CoV-2) ale nie genu ACE w mononuklearach krwi jest obniżona. Wynika z tego, że pacjenci z CSF mają większe ryzyko ciężkiego przebiegu COVID-19 i szczególnie powinni być objęci profilaktyką.

3. **Review of the Quality Control Checks Performed by Current Genome-Wide and Targeted-Genome Association Studies of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome.** Grabowska A, Lacerda E, Nacul L, Sepulveda N. *Frontiers in Pediatrics*, 2020, 8, 1-4.

Praca przeglądowa wyników badań identyfikujących genetyczne czynniki powodujące CFS - asocjacyjnych badań całego genomu i ukierunkowanych badań asocjacji genomowych. Wyniki tych badań są niejednoznaczne i według autorów wymagają przeprowadzenia adekwatnych testów kontroli jakości i wystandaryzowanej metodologii statystycznej.

4. **A potential antigenic mimicry between viral and human proteins linking Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CSF) with zutoimmunity: The case of HPV immunization.** Phelan J, Grabowska A, Sepulveda N. *Autoimmunity Reviews*, 2020, 19(4), 1-5.

List do redakcji. Autorzy rozważali hipotezę, że molekularna mimikra antygenów wirusowych i epitopów białek ludzkich może powodować CFS. Taka molekularna mimikra antygenów stosowanych w szczepionkach przeciw wirusowi grypy (H1N1) lub wirusowi HPV może powodować choroby autoalergiczne.

Autorzy stwierdzili, że białka HPV L1 są podobne antygenowo do ludzkich białek ANKDR16. W rozwoju CSF mogą mieć znaczenie limfocyty T regulatorowe, których liczba u chorych jest podwyższona.

b. Publikacje dotyczące wirulencji pałeczki jelitowej *Campylobacter jejuni*:

C. jejuni powoduje częste zatrucia pokarmowe i stany zapalne żołądka i jelit. Badania prowadzone w tym cyklu były poświęcone regulacji ekspresji genów bakterii i regulacji tworzenia zewnątrzkomórkowych pęcherzyków bakterii *Campylobacter jejuni*. Cykl obejmuje 3 publikacje i pracę doktorską:

1. **Sodium Taurocholate Stimulates *Campylobacter jejuni* Outer Membrane Vesicle Production via Down - Regulation of the Maintenance of Lipid Asymmetry Pathway.** Davies C, Taylor A, Elmi A, Winter J, Liaw J, Grabowska A et al. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9, 1-12.

C. jejuni produkuje liczne toksyny i proteazy, ale ich dostarczenie do komórek gospodarza odbywa się głównie przez tworzenie zewnątrz błonowych pęcherzyków (OMV). Tworzenie tych OMV zależy od czynników organizmu gospodarza i od czynników bakterii (od szlaku utrzymania asymetrii lipidowej - MLA). Autorzy oceniali produkcję OMV przez zliczanie cząstek OMV metodą analizy nanocząsteczek.

Mutacja genu *mlaA* zwiększała produkcję cząstek OMV. Obecność 0.2% taurocholanu sodu zwiększała tworzenie OMV w dzikim szczepie *C. jejuni* ale nie w mutantach genu *mlaA*. Obecność taurocholanu sodu zmniejsza ekspresję genów *mlaA* i *mlaC* dzikich szczepów *C. jejuni*.

2. Functional and bioinformatics analysis of two *Campylobacter jejuni* homologs of the thiol-disulphide oxidoreductase, DsbA. Grabowska A, Wywiał E, et al., PLoS ONE, 2014, 9(9). 1-16.

Autorzy badali dwa homologu DsbA *E. coli* w *C. jejuni*. DsbA1 jest ważna w procesie tworzenia fenotypu autoaglutynacji, ruchliwości i aktywności alkalicznej fosfatazy a DsbA2 dla aktywności arylosulfotransferazy bakterii *C. jejuni* i ścisłej współpracy z enzymem DsbB.

3. *Campylobacter jejuni* dsb gene expression is regulated by iron in a Fur-dependent manner and by a translational coupling mechanism. Grabowska A, Wandel M. et al. BMC Microbiology, 2011, 11, 1-16.

Praca doświadczalna poświęcona regulacji ekspresji genów Dsb u *C. jejuni*. Autorzy odkryli trzy jednostki transkrypcyjne genów szlaku dsb w *C. jejuni*. Ekspresja tych genów zależy od obecności unikalnego promotora genu dsbA1 regulowanego przez obecność żelaza i białka Fur. Poziom białek pozacytoplazmatycznych bakterii zależy od obecności jonów żelaza w środowisku.

Praca doktorska Wydz. Biologii UW, 2010: Sieć oddziaływań białek szlaku utleniania Dsb w komórkach *Campylobacter jejuni*.

Praca doktorska stanowi zapoczątkowanie cyklu badań.

c. Cykl badań nietypowych β -laktamaz pałeczek gram ujemnych z zakażeń szpitalnych w Europie.

W tym cyklu badano β -laktamazy *E. coli* i *Klebsielli*. Enzymy mają pewne znaczenie w procesach nabywania odporności bakterii na leki. Rezultatem badań były dwie publikacje:

1. Characterization of two new CTX-M-25-group extended-spectrum β -lactamase variants identified in *Escherichia coli* isolates from Israel. Vervoort J, Baraniak A, Gazin M, Sabirova J, Lammens C, Kazma M, Grabowska A, et al. PLoS ONE, 2012, 7(9), 1-7.

Enzymy β -laktamazy hydrolizują antybiotyki β -laktamowe i powodują oporność bakterii na te antybiotyki. Geny bla_{CTX-M} kodujące te laktamazy są kodowane przez plazmidy i są dość zmienne genetycznie. Warianty enzymów CTX-M-94 i CTX-M-100 mają mutacje V77A w stosunku do CTX-M-25 i D240G w stosunku do znanego wariantu CTX-M-39. Autorzy scharakteryzowali nowe warianty β -laktamaz pod względem położenia ich genów na plazmidach i ich zdolności do tworzenia odporności na cefalosporyny.

2. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R, et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(12), 5493-5499.

KPC (karbopenemazy *K. pneumoniae*) hydrolizują antybiotyki laktamowe z grupy karbapenemów. Autorzy zbadali 119 izolatów enterobakterii z zakażeń szpitalnych, Wśród nich aż 114 szczepów stanowiły *Klebsiella pneumoniae*. Badano heterogenność tych izolatów (podtypy PFGE, podtypy plazmidowe, wzory β -laktamaz). Wyniki wskazują na istnienie horyzontalnego transferu plazmidów niosących geny odporności na antybiotyki β -laktamowe.

D. Ogólna ocena osiągnięć dr Anny Henriquez dos Santos de Sepulveda.

Dorobek naukowy przed osiągnięciem stopnia doktora nauk biologicznych składa się z 5 publikacji o IF = 3. 57 oraz z 6 prac plakatowych na zjazdach krajowych i zagranicznych (w Japonii, Grecji, Holandii). Punktacja MEiN wynosi 64 punkty).

Dorobek naukowy dr n. biol. Anny Henriquez dos Santos de Sepulveda składa się z 19 publikacji o skumulowanym impakt faktor IF = 73,070 i 1034 punktów MEiN (11 prac doświadczalnych, 7 prac poglądowych i 1 list do redakcji). Liczba cytowań z wyłączeniem autocytowań według bazy Scopus 212, współczynnik Hirsta według bazy Scopus wynosi 9.

Autorka prezentowała prace na 14 zjazdach (w tym na 13 międzynarodowych w Wielkiej Brytanii, Hiszpanii, Rosji, Kanadzie, Francji i we Włoszech).

Prace prowadzone przez dr Annę de Sepulveda miały istotne odniesienia kliniczne i terapeutyczne:

- wpływ zakażeń EBV, VZV, SARS-CoV-2 na powstanie zespołu chronicznego zmęczenia CSF,
- występowanie mimikry molekularnej pomiędzy białkami wirusowymi i ludzkimi jako przyczyna CSF,
- mutacje genów szlaku MLA a wytwarzanie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków w zakażeniach *C. jejuni*,

- badanie systemu enzymów Dsb w zakażeniach *C. jejuni*,
- wykrycie nowych podtypów β -laktamaz w plazmidach *E. coli* i tworzenie odporności bakterii na antybiotyki,
- badanie wariantów genetycznych karbapenemaz w bakteriiach *Klebsiella* a ich odporność na antybiotyki laktamowe,
- znaczenie ekspresji z bezliderowych promotorów w reakcji na stres środowiskowy u *M. tuberculosis*,
- badanie lipidowych osłon komórek mykobakterii warunkujących ich wirulencję,
- badanie systemów toksyna - antytoksyna mykobakterii i ich możliwe znaczenie w terapii.

W opublikowanych badaniach stosowano interesujące metody jak:

- badanie metylacji DNA i ekspresji genów w określonych frakcjach komórkowych,
- badania bioinformatyczne molekularnej mimikry białek wirusowych w szczepionkach i białek ludzkich,
- zliczanie generowanych zewnątrzblonowych pęcherzyków analizą śledzenia nanocząstek,
- metoda opóźniania migracji w żelu (EMSA),
- zastosowanie starej ale obecnie mało używanej metody PFGE do badania heterogenności sekwencji DNA,
- konstrukcja fluorescencyjnych i luminescencyjnych plzmidów reporterowych w badaniu ekspresji genów,
- tworzenie liderowych i bezliderowych promotorów genów,
- badanie z wysoką rozdzielczością struktur kompleksów białkowych metodami rozpraszania światła i SAXS.

Do osiągnięć naukowych należy także zaliczyć realizowane projekty naukowe, nagrody i wyróżnienia, współpracę z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi oraz kursy i staże międzynarodowe.

Autorka brała udział w realizacji wielu projektów naukowych:

- 2006 do 2010 roku granty MNiSW i Uniwersytetu Warszawskiego,
- 2010 do 2011 Europejski Zintegrowany Projekt MOSAR koordynowany przez Inserm (Francja),
- 2011 do 2012 grant ANR (Francja),
- 2013 do 2015 grant FRM (Francja), jako kierownik projektu.
- 2025 do 2019 projekt Europejskiej Rady Naukowej ERC .

Nagrody i wyróżnienia:

- stypendium FEMS (Zjazd EMBO 2016 rok)
- 1-sza Nagroda PTM im. Prof. Mikulaszka, 2012 r
- stypendium IUBMB/FEBS (Zjazd FEBS, Hiszpania 2012),
- Mazowieckie Stypendium Doktoranckie 2009 rok,
- nagroda YSA (2009 rok - XV zjazd CHRO, Niigata, Japonia),
- stypendium PTM (zjazd w Szczecinie 2008 rok),
- stypendium FEMS na odbycie stażu w laboratorium UMR w Marsylii, 2008 r.
- nagroda MENiS (MISMaP na UW - 2005 r).

Ośrodki z którymi współpracuje dr. Anna de Sepulveda:

- Lab. Metabolizmu Mykobakterii i Badania Antybiotyków, Francis Crick Inst. Londyn.
- Lab. Oddziaływań Gospodarcz-Patogen w Gruzlicy, Francis Crick Inst. Londyn.
- EMBL Hamburg, Niemcy.
- Inst. Farmakologii i Biologii Strukturalnej IPBS, Tuluza, Francja.
- IPBS, Grupa Jądrowego Rezonansu Magnetycznego i Interakcji Białek Błonowych, Tuluza, Francja.
- IPBS, Grupa Otoczki Mykobakteryjnej, Tuluza, Francja.
- IIMCB, Lab. Bioinformatyki i Inżynierii Białek, Warszawa, Polska.
- IBB PAN, Środowiskowe Lab. Spektroskopii Mas, Warszawa, Polska.
- Uniwersytet w Utrechcie, Utrecht, Holandia.
- Universite de la Mediterranee, Mwrsylia, Francja.

F. Działalność dydaktyczna dr Anny de Sapulveda.

W latach 2006 - 2009 (przed uzyskaniem stopnia doktora) Autorka prowadziła:

- warsztaty z nowoczesnych metod molekularnych w ramach Warszawskiego Festiwalu Nauki (WFN), Uniwersytetu Warszawskiego (UW),
- wykłady z podstaw molekularnych patogenez bakterijnej w ramach WFN,
- ćwiczenia z podstaw molekularnych patogenez bakterijnej na Wydziale Biologii UW,

- opieka nad 2-letnimi stażami dla czterech magistrantów Wydziału Biologii UW,
- opieka nad 1-rocznym stażem dla magistranta Wydziału Biologii UW.
- opieka nad 1-rocznym stażem dla pięciu licencjatów Wydziału Biologii UW.

W 2010 roku (rok uzyskania stopnia doktora):

- opieka nad trzema magistrantami (staże z Mikrobiologii Molekularnej) w Narodowym Instytucie Leków.

W latach 2011 - 2015:

- opieka nad czterema magistrantami (staże z Mikrobiologii Molekularnej, Biochemii i Biologii Komórki w IPBS Tuluza, Francja).

W latach 2015 - 2019:

- opieka nad trzema magistrantami (staże z Biologii Molekularnej i Komórkowej) w LSHTM Londyn, Anglia).

Od 2019 roku:

- wykłady, seminaria i ćwiczenia z Biofizyki dla Wydziału Lekarskiego WUM, Warszawa,
- wykłady, seminaria i ćwiczenia z Fizjologii i Patofizjologii dla Kierunku Położnictwa WUM, Warszawa,
- wykłady, seminaria i ćwiczenia z Fizjologii z elementami Biofizyki dla Kierunku Pielęgniarstwa i Ratownictwa Medycznego, WUM, Warszawa,
- wykłady, seminaria i ćwiczenia z Nauki o Człowieku dla Kierunku Zdrowia Publicznego, WUM, Warszawa.

Podsumowanie:

Dorobek naukowy Dr Anny Henriques dos Santos de Sepulveda w szczególności zawarty w cyklu prac habilitacyjnych wnosi istotny wkład w naszą wiedzę o mechanizmach powstawania odporności bakterii na terapię i na powstawanie stanu przewlekłego uśpienia metabolicznego w zakażeniu człowieka przez *M. tuberculosis*. Prace te mają wielkie znaczenie dla terapii przewlekłych zakażeń. Dodatkowo interesujące są osiągnięcia metodyczne jak konstrukcja złożonych reporterów transkrypcji i badanie wpływu mutacji promotora/operatora genu *mbcAT* na ekspresję transkrypcji. Habilitantka ma ponadto duże doświadczenie jako pedagog i znakomite kontakty międzynarodowe.

W moim przekonaniu Pani dr Anna Henriques dos Santos de Sepulveda spełnia ustawowe wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego zgodnie z artykułem 179 punkt 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2018 r. pozycja 1669) oraz z artykułem 27 punkt 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. pozycja 1789). Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję o nadanie Pani dr Annie Henriques dos Santos de Sepulveda stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

prof. dr hab. Jacek Wojcieszowski
Genetyka Kliniczna