

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Mirosław Książek

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

2015 tytuł dr nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków,
Polska

Tytuł rozprawy: Charakterystyka proteazy i serpiny *Tannerella forsythia*.

Rozprawa doktorska oparta na zbiorze 2 publikacji:

- 1) Książek M, Mizgalska D, Enghild JJ, Scavenius C, Thøgersen IB, Potempa J. Miropin, a novel bacterial serpin from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*, inhibits a broad range of proteases by using different peptide bonds within the reactive center loop. *J Biol Chem*. 2015 Jan 2;290(1):658-70.
- 2) Książek M, Karim AY, Bryzek D, Enghild JJ, Thøgersen IB, Koziel J, Potempa J. Mirolase, a novel subtilisin-like serine protease from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*. *Biol Chem*. 2015 Mar;396(3):261-75.

Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa

Data nadania tytułu doktora: 03.03.2015

2009 mgr biotechnologii

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków,
Polska

Tytuł pracy: Ekspresja, oczyszczanie i wstępna charakterystyka mirolizyny oraz miropsyny – dwóch nowych peptydaz kodowanych przez *loci* TF0347 oraz TF2174 *Tannerella forsythia* ATCC 43037

Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa

Data otrzymania tytułu mgr: 22.06.2009

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

- 10.2015- Asystent (pełen etat) w Zakładzie Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Polska
- 12.2016-11.2019 „Visiting Scholar”, University of Louisville School of Dentistry, Louisville, KY, USA (staż podoktorski)
- 09.2015-10.2015 Asystent (częściowy etat) w Zakładzie Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Polska
- 04.2015-09.2015 Asystent (częściowy etat) w Małopolskim Centrum Biotechnologii, Polska
- 11.2013-11.2014 „Visiting Scholar”, University of Louisville School of Dentistry, Louisville, KY, USA (staż przeddoktorski)

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.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Charakterystyka systemu proteolitycznego
ludzkiego periodontopatogenu *Tannerella forsythia*”

4.2. Lista 4 publikacji składających się na osiągnięcie naukowe:

| Publikacja | IF ¹ | Punkty MNiSW ¹ | Liczba Cytowań ² |
|--|-----------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1. Ksiazek M, Mizgalska D, Eick S, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J. KLIKK proteases of <i>Tannerella forsythia</i> : putative virulence factors with | 4,165 | 35 | 25 |

¹ Z roku publikacji.

² Bez autocytowań.

| | | | |
|--|-------|----|----|
| <p>a unique domain structure. Front Microbiol. 2015 Apr 21;6:312.</p> <p>Mój wkład w pracę składał się z:</p> <ul style="list-style-type: none"> • zaplanowanie i wykonanie wszystkich eksperymentów opisanych w pracy, [z wyjątkiem: sekwencjonowania fragmentów genomu <i>T. forsythia</i> (Ryc. 1 i 2 - wykonałam połowę eksperymentów), identyfikacji białek za pomocą sekwencjonowania N-końcowego białka i/lub spektrometrii mas, PCR w czasie rzeczywistym (Ryc. 3) oraz analizy ekspresji proteaz badanych w klinicznych szczepach <i>T. forsythia</i> (Tab. 1)], w tym między innymi: klonowanie i oczyszczanie wszystkich rekombinowanych białek; analiza aktywności oczyszczonych proteaz na różnych substratach, sekwencjonowanie fragmentów genomu <i>T. forsythia</i> (wkład ~50%); • analiza danych, przygotowanie rycin (bez rycin 1 i 2 oraz tabeli 1), napisanie manuskryptu; • zapewnienie finansowania prowadzonych badań; • przygotowanie i złożenie manuskryptu, odpowiedzi na uwagi recenzentów. <p>Mój procentowy udział w tej pracy oceniam na 50%.</p> | | | |
| <p>2. Koneru L, Ksiązek M, Waligorska I, Straczek A, Lukaszuk M, Madej M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J. Mirolysin, a LysargiNase from <i>Tannerella forsythia</i>, proteolytically inactivates the human cathelicidin, LL-37. Biol Chem. 2017 Mar;398(3):395-409.</p> <p>Mój wkład w pracę składał się z:</p> <ul style="list-style-type: none"> • wykonanie doświadczeń, których wyniki przedstawiono na Figurach 4, 5 i 6, i Tabeli 1 (m.in. ekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych, zbadanie wpływu czynników fizykochemicznych na aktywność mirolizyny, analiza hydrolizy różnych białek i peptydów; wpływ mirolizyny na utratę zdolności do neutralizacji LPS przez LL-37); • planowanie doświadczeń i nadzorowanie pracy pozostałych wykonawców; • analiza danych, przygotowanie figur, pisanie manuskryptu; • zapewnienie finansowania prowadzonych badań; • przygotowanie i wysłanie manuskryptu do redakcji czasopisma, odpowiedź na komentarze recenzentów. <p>Mój procentowy udział w tej pracy oceniam na 60%.</p> | 3,022 | 25 | 10 |

| | | | |
|---|-------|-----|---|
| <p>3. Zak KM, Bostock MJ, Waligorska I, Thøgersen IB, Enghild JJ, Popowicz GM, Grudnik P, Potempa J, Ksiazek M. Latency, thermal stability, and identification of an inhibitory compound of mirolysin, a secretory protease of the human periodontopathogen <i>Tannerella forsythia</i>. <i>J Enzyme Inhib Med Chem</i>. 2021 Dec;36(1):1267-1281.</p> <p>Mój wkład w pracę składał się z:</p> <ul style="list-style-type: none"> • wykonanie doświadczeń, których wyniki przedstawiono na Figurach 1, 2, 4, 5, 6, 7 i 8 (m.in. otrzymanie mutantów mirolizyny wykorzystywanych w badaniach; ekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych; wpływ mutacji Cys23 w profragmencie na stabilność i autoaktywację zymogenu promirolizyny; analiza termostabilności mirolizyny; wpływ znalezionych związków (ang. compound, cpd) na aktywację promirolizyny; wyznaczanie parametrów opisujących hamowanie mirolizyny przez cpd 9 i cpd 10: K_D, K_i i IC_{50}; badanie specyficzności cpd 9 i cpd 10); • planowanie doświadczeń; • analiza danych, przygotowanie figur 1, 2, 4, 5, 6, 7 i 8, pisanie manuskryptu; • zapewnienie finansowania prowadzonych badań; • przygotowanie i wysłanie manuskryptu do redakcji czasopisma. <p>Mój procentowy udział w tej pracy oceniam na 54%.</p> | 5,756 | 140 | 1 |
| <p>4. Sochaj-Gregorczyk A, Ksiazek M, Waligorska I, Straczek A, Benedyk M, Mizgalska D, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J. Plasmin inhibition by bacterial serpin: Implications in gum disease. <i>FASEB J</i>. 2020 Jan;34(1):619-630.</p> <p>Mój wkład w pracę składał się z:</p> <ul style="list-style-type: none"> • wykonanie doświadczeń, których wyniki przedstawiono na Figurach 2C, 4AB, 5CDE i 6B (m.in. ekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych; hamowanie degradacji skrzepów fibrynowych, hamowanie aktywności plazminy przez całe komórki (ang. <i>whole cells</i>) pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. <i>outer membrane vesicles</i>, OMVs); potwierdzenie, że miropina jest aktywna w osoczu ludzkim pozbawionym $\alpha 2$-antyplazminy; wyznaczanie stałej asocjacji hamowania plazminy aktywowanej streptokinazą przez miropinę; wykonanie | 5,192 | 140 | 7 |

| | | | |
|---|--|--|--|
| <p>doświadczeń wymaganych przez recenzentów w recenzji);</p> <ul style="list-style-type: none"> • planowanie doświadczeń i nadzorowanie pracy pozostałych wykonawców; • analiza danych, przygotowanie figur, pisanie manuskryptu; • zapewnienie finansowania prowadzonych badań; • przygotowanie i wysłanie manuskryptu do redakcji czasopisma, odpowiedź na komentarze recenzentów. <p>Mój procentowy udział w tej pracy oceniam na 55%.</p> | | | |
|---|--|--|--|

4.3. Opis osiągnięcia naukowego

4.3.1. Wstęp (stan wiedzy w momencie rozpoczęcia badań)

Zapalenie przyzębia (parodontoza) jest prawdopodobnie najbardziej rozpowszechnioną przewlekłą chorobą zapalną wywołaną infekcją u ludzi. Szacuje się, że nawet 15% dorosłych na całym świecie cierpi z powodu ciężkich postaci zapalenia przyzębia [1,2]. W samych Stanach Zjednoczonych na tę chorobę cierpi prawie 47% osób w wieku ≥ 30 lat (około 65 milionów dorosłych) [3]. Postęp parodontozy objawia się krwawieniem dziąseł, ropniem i postępującym zanikiem kości wyrostka zębodołowego, w wyniku którego powstają głębokie kieszonki dziąsłowe. Nieleczona choroba może prowadzić nawet do utraty zębów [4]. Ze względu na swój przewlekły, zapalny i zakaźny charakter, zapalenie przyzębia przyczynia się do rozwoju i/lub postępowi chorób ogólnoustrojowych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, choroby układu krążenia i neurodegeneracyjne, cukrzyca oraz zachłystowe zapalenie płuc [5-7]. *Tannerella forsythia* jest Gram-ujemną asacharolityczną bakterią bytującą w jamie ustnej. Pierwotną niszą tej bakterii jest przestrzeń poddziąsłowa poniżej linii dziąseł, gdzie wraz z różnorodną społecznością mikroorganizmów wchodzi w skład poddziąsłowej płytki bakteryjnej [8]. Płytkę staje się chorobotwórcza, gdy do *T. forsythia* dołączą *Porphyromonas gingivalis* i *Treponema denticola*, zgrupowane w tzw. „czerwony kompleks” bakterii jamy ustnej. Poprzez uwalnianie różnych czynników wirulencji bakterie te zaburzają homeostazę w przyzębiu, prowadząc do trwałej odpowiedzi zapalnej gospodarza, która powoduje erozję tkanek podtrzymujących zęby [9,10].

Wyróżniającą cechą bakterii „czerwonego kompleksu” jest bardzo wysoka zewnątrzkomórkowa aktywność proteolityczna, która uważana jest za kluczowy czynnik wirulencji tych bakterii [11]. Wydzielnicze proteazy *P. gingivalis* i *T. denticola* są bardzo dobrze opisane, zwłaszcza ich rola w rozwoju i progresji zapalenia przyzębia [12,13]. Gingipainy (RgpA, RgpB, Kgp), odpowiedzialne za 85% zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej *P. gingivalis*, biorą udział w pozyskiwaniu składników odżywczych, unikaniu odpowiedzi ze strony układu odpornościowego gospodarza i immunomodulacji [12,14]. Najlepiej scharakteryzowaną proteazą wydzielniczą *T. denticola* jest dentylizyna. Ta proteaza serynowa jest związana z powierzchnią *T. denticola* i odpowiada m.in. za koagregację z *P. gingivalis*, aktywację układu dopełniacza człowieka i degradację interleukiny (IL) -6 i -8, immunoglobulin A i G, fibronektyny, lamininy i kolagen typu IV [13]. Pomimo potencjalnej roli zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej *T. forsythia* w etiologii zapalenia przyzębia, do niedawna nasza wiedza na temat proteaz wydzielniczych *T. forsythia* była bardzo ograniczona [15]. Jedyńm szczegółowo scharakteryzowanym

enzymem proteolitycznym była PrtH, proteaza cysteinowa wykazująca spore podobieństwo do kaspazy. PrtH powoduje oderwanie komórek adherentnych od podłoża i zwiększa ekspresję IL-8 [16,17]. Sytuacja ta uległa dramatycznej zmianie gdy scharakteryzowano dokładniej dwie kolejne wydzielnicze proteazy: karilizynę [18] i mirolazę [19]. Obie proteazy są syntetyzowane jako zymogen i ulegały sekwencyjnej autoproteolizie w celu osiągnięcia aktywności proteolitycznej oraz posiadały podobną wielodomenową domenę: w szczególności, na C-końcu posiadały domenę podobną do domen CTD (ang. C-terminal domain) w białkach *P. gingivalis*, która jest niezbędna do wydzielania białek przez system sekrecji T9SS (ang. type 9 secretion system).

Biorąc pod uwagę fakt, że zsekwencjonowany genom *T. forsythia* zawiera inne domniemane proteazy z domeną CTD oraz zidentyfikowano błędy w sekwencjach karilizyny i mirolazy [18,19], postanowiłem zweryfikować liczbę proteaz z domeną CTD i scharakteryzować je.

Ścisła kontrola proteolizy jest niezbędna do życia, ponieważ hydroliza wiązań peptydowych jest nieodwracalna i może mieć potencjalnie drastyczny wpływ na funkcję trawionych białek. Dlatego proces ten musi być ściśle kontrolowany zarówno w sposób przestrzenny, jak i czasowy, zarówno na poziomie transkrypcji, jak i potranslacyjnie, przy czym ta ostatnia odbywa się za pomocą kilku mechanizmów. Dwie najpowszechniejsze strategie potranslacyjnej kontroli aktywności proteolitycznej to wydzielanie proteaz w postaci nieaktywnych enzymatycznie proform (zymogenów) oraz synteza specyficznych inhibitorów proteaz. Pierwszy mechanizm występuje u prokariotów i eukariotów, w tym w organizmach wielokomórkowych, podczas gdy prokarioty zazwyczaj posiadają niewiele, jeśli w ogóle, inhibitorów proteaz [20]. Jest to nieco uderzające, biorąc pod uwagę, że peptydazy (proteazy) są szeroko rozpowszechnione wśród prokariotów i stanowią ~3% wszystkich przypuszczalnych białek ulegających ekspresji. Jednak liczba genów kodujących peptydazy w genomach prokariotycznych jest bardzo zróżnicowana, od zaledwie kilku w gatunkach bakterii z rodzaju *Mycoplasma* do 179 w *Bacillus cereus* [21]. Rodziną inhibitorów proteaz, których przedstawiciele są znajdowani zarówno u prokariotów jak i organizmach wielokomórkowych, jest rodzina serpin (I4) [22].

Serpiny mają wyjątkowy mechanizm hamowania proteaz. W przeciwieństwie do innych znanych inhibitorów tworzą kowalencyjny, nieodwracalny kompleks z docelowymi proteazami [23]. Mechanizm inhibicji przez serpiny można porównać do działania pułapki na myszy. Co zaskakujące, natywny fałd serpin nie jest ich najbardziej stabilnym stanem. Ta niestabilność jest spowodowana obecnością odsłoniętej pętli reaktywnej, RCL (ang. reactive center loop), będącej swoistą przynętą dla hamowanej proteazy. Hydroliza RCL w miejscu aktywnym przez enzym proteolityczny skutkuje dramatycznymi zmianami w strukturze serpin. Proteaza jest inaktywowana przez mechanizm podobny do działania pułapki na myszy, który przenosi enzym z górnego do dolnego bieguna serpiny z równoczesnym wstawieniem RCL do β -kartki A jako dodatkowej (czwartej) nici beta, co znacznie stabilizuje strukturę cząsteczki serpiny. Proces ten powoduje też częściową denaturację proteazy. Ostatecznie powstaje korzystny energetycznie, nieodwracalny kowalencyjny kompleks serpina-proteaza, który jest wysoce odporny na denaturację chemiczną i termiczną [23,24]. Przez wiele lat uważano, że serpiny hamują jedynie proteazy serynowe. Jednak obecnie wiadomo, że kilka serpin inaktywuje proteazy cysteinowe poprzez tworzenie kowalencyjnego, nieodwracalnego kompleksu [23,25]. Serpiny są obecne we wszystkich dotychczas analizowanych organizmach wielokomórkowych i występują obficie w roślinach (pszenica, ryż), nicieniach, owadach i kręgowcach, zwłaszcza u ssaków [23,26]. Serpiny eukariotyczne pełnią wiele funkcji, takich jak kontrola stanu zapalnego, krzepnięcie, fibrynoliza i aktywacja dopełniacza, efekt cytoprotekcyjny dzięki hamowaniu proteaz lizosomalnych, które przenikają do cytoplazmy i odgrywają rolę w obronie gospodarza

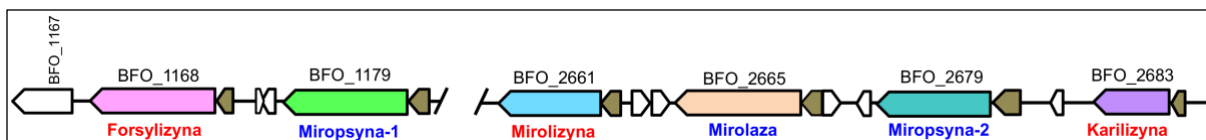
przed infekcją. Ponadto działają jako białka magazynujące (albumina jaja kurzego), molekularne białka opiekuńcze (Hsp47/SERPINH1), białka transportujące hormony (globulina wiążąca kortyzol), źródło bioaktywnych peptydów (angiotensynogen) oraz regulatora upakowania chromatyny (serpina kurza MENT) [23].

W przeciwieństwie do szerokiego rozpowszechnienia serpin wśród eukariontów, serpiny u prokariotów występują tylko sporadycznie. Rzeczywiście, przez wiele lat uważano, że serpiny nie są niezbędne do funkcjonowania organizmów jednokomórkowych, a zatem uznano je za nieobecne u prokariotów. Sekwencjonowanie genomów bakteryjnych na dużą skalę zmieniło to błędne przekonanie, ujawniając obecność otwartych ramek odczytu (ORF, ang. open reading frame) kodujących domniemane serpiny [27,28]. Pierwsza serpina bakteryjna, termopina, została scharakteryzowana w 2003 roku [29]. Postępy w sekwencjonowaniu genomów prokariotycznych ujawniły, że ORF kodujące domniemane serpiny są obecne odpowiednio w 31% i 13% w pełni zsekwencjonowanych genomów *Archaea* i *Bacteria* [20]. Niemniej jednak do tej pory scharakteryzowano funkcjonalnie tylko bardzo ograniczoną liczbę serpin prokariotycznych. Należą do nich serpiny z *Clostridium thermocellum* [30] i *Bifidobacterium Longum* [31], termopina i tengpina z termofilnych bakterii *Thermobifida fusca* [29] i *Thermoanaerobactor tengcondensis* [32], a także aeropina i Tk-serpina z hipertermofilnych archeonów, odpowiednio, *Pyrobaculum aerophilum* [33] i *Thermococcus kodakaraensis* [34]. Należy podkreślić, że strukturalnie scharakteryzowano tylko jedną serpinę bakteryjną, termopinę [29]. Bardziej zastanawiający jest jednak fakt, że żadnej z serpin bakteryjnych nie przypisano określonej funkcji biologicznej.

Serpiny bakteryjne, z wyjątkiem kilku gatunków typu *Bacteroidetes* (*Prevotella buccae*, *Prevotella stercorea*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides uniformis*, *Prevotella oralis*, *Tannerella BU063* i *B. longum*), występują w różnych niszach środowiskowych [20]. Wszystkie te gatunki bakterii z typu *Bacteroidetes* są składnikiem fizjologicznej mikroflory jelita i jamy ustnej człowieka. W tym kontekście niezwykle interesująca jest obecność serpiny, miropiny, w ludzkim patogenie *T. forsythia*. Ponadto miropina w odróżnieniu do praktycznie wszystkich znanych serpin posiada wyjątkową cechę: zdolność hamowania proteaz o zupełnie różnej specyficzności substratowej z wykorzystaniem kilku miejsc aktywnych w obrębie RCL [35]. Biorąc pod uwagę to oraz wydzielniczy charakter serpiny *T. forsythia*, postanowiłem sprawdzić czy miropina hamuje proteazy odpowiedzialne za utrzymanie hemostazy u człowieka.

4.3.2. Wyniki

Prace nad karilizyną i mirolazą i towarzyszące nim sekwencjonowania fragmentów genomu kodujących te dwie proteazy wykazały znaczące różnice z sekwencjami zdeponowanymi w bazach danych: wskutek delecji i/lub insercji został źle określony początek obu genów oraz wiele mutacji punktowych skutkujących zmianami w sekwencji aminokwasowej. Wstępna analiza bioinformatyczna wykazała obecność 6 dodatkowych domniemanych proteaz, które podobnie jak karilizyna i mirolizyna zawierają na C-końcu domenę C-terminalną, CTD (ang. C-terminal domain), która jest sygnałem do sekrecji białek przez IX system sekrecji (T9SS). T9SS jest odpowiedzialny za sekrecję czynników wirulencji u periodontopatogenów takich jak *Porphyromonas gingivalis* czy też *Tannerella forsythia*. Te 8 proteaz *T. forsythia* z CTD były zgrupowane w 3 *loci* w genomie. Wobec tego postanowiono przesekwencjonować te 3 fragmenty genomu. Wyniki pokazały, że w rzeczywistości jest 6 proteaz z domeną CTD: 3 metaloproteazy (karilizyna, forsylizyna, mirolizyna) i 3 proteazy serynowe (mirolaza, miropsyna-1 i miropsyna-2), które są zgrupowane w 2 *loci*. Ponadto analiza wyników wykazała, że każda z proteaz jest w genomie poprzedzona przez gen kodujący domniemaną małą wydzielniczą lipoproteinę (~14 kDa) (Ryc. 1).

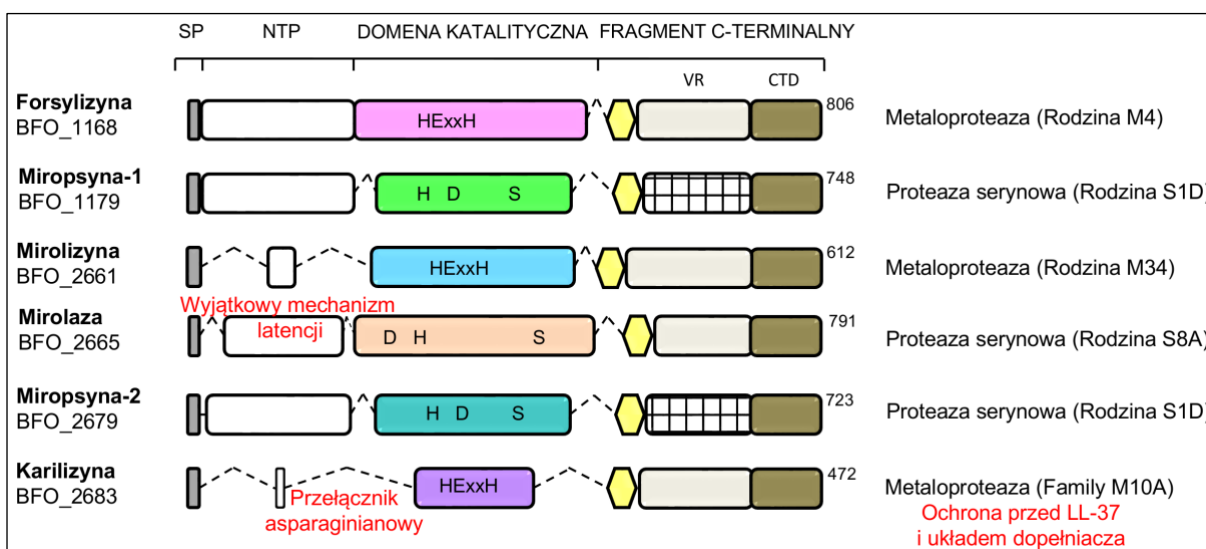


Rycina 1: Narysowane w skali ułożenie genów kodujących proteazy KLIKK.

Czerwoną czcionką zaznaczano metaloproteazy, a niebieską, proteazy serynowe. Geny kodujące proteazy są przedstawione za pomocą strzałek wypełnionych różnymi kolorami, a wypełnionymi na brązowo strzałkami pokazano geny kodujące domniemane małe lipoproteiny.

Dopasowanie sekwencji 6 proteaz z domeną CTD wykazały, że mają one podobną wielodomenową budowę (Ryc. 2). Zaczynając od N-końca składają się one z:

- kanonicznego peptydu sygnałowego, SP (ang. signal peptide) odpowiedzialnego za translokację przez błonę wewnętrzną;
- N-terminalnego profragmentu, NTP (ang. N-terminal profragment) o długości wynoszącej od 8 reszt aminokwasowych (aa) (karilizyna) do 225 aa (forsylizyna i miropsyna-1). Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla karilizyny i mirolazy, NTP jest prawdopodobnie odpowiedzialny za latencję;
- domeny katalitycznej, CD (ang. catalytic domain) zawierającej wszystkie niezbędne w mechanizmie proteolizy reszty aminokwasowe;
- fragmentu C-terminalnego, CTE (ang. C-terminal extension), który jest zmienny pomiędzy proteazami, oprócz miropsyny-1 i miropsyny-2. W CTE region zmienny (VR, ang. variable region) jest otoczony dwoma zakonserwowanymi regionami: 30 aa po CD oraz 86 aa CTD. Co ciekawe, w przeciwieństwie do wszystkich innych białek wydzielanych przez T9SS, CTD tych 6 proteaz jest niemal identyczny.



Rycina 2: Wielodomenowa struktura proteaz KLIKK.

Na podstawie dopasowania proteaz KLIKK oraz wyników charakterystyki mirolazy i karilizyny zaproponowano następującą budowę proteaz KLIKK, zaczynając od N-końca: peptyd sygnałowy (SP), N-terminalny profragment (NTP) prawdopodobnie zapewniający latencję enzymom, domena katalityczna (CD) zawierająca wszystkie aminokwasy zaangażowane w mechanizm proteolizy i fragment C-terminalny (CTE) zawierający region zmienny (VR) flankowany przez dwa konserwatywne regiony, 30 aminokwasów (żółty sześciokąt) i ostatnie 86 aminokwasów, domena C-terminalna (CTD). VR jest podobny tylko w dwóch miropsynach - prostokąty ze wzorem siatki. CTD jest wymagany do wydzielania proteaz KLIKK przez system sekrecyjny typu IX (T9SS). Na czerwono pokazano wiedzę o KLIKK proteazach na początku badań, które stanowiły osiągnięcie naukowe.

Te 6 proteaz z domeną CTD postanowiono nazwać na podstawie 5 ostatnich aminokwasów w CTD: -Lys-Leu-Ile-Lys-Lys-COOH proteazami KLIKK. Wszystkie proteazy KLIKK ulegają ekspresji na poziomie mRNA w szczepie laboratoryjnym *T. forsythia* ATCC 43037. Ponadto transkrypty mRNA dla proteaz KLIKK są obecne w płynie z kieszonek dziąsłowych (ang. gingival crevicular fluid, GCF) pochodzących od pacjentów cierpiących na różne formy paradontozy. W dalszej kolejności otrzymano 6 proteaz w formie rekombinowanej z wykorzystaniem bakteryjnego systemu ekspresyjnego w *Escherichia coli*. Zymografia z 2 substratami: żelatyna i kazeina, pokazała, że tak jak karilizyna i mirolaza, pozostałe proteazy KLIKK występują w kilku aktywnych formach i tym samym będą ulegać sekwencyjnej autoproteolizie (ang. autoprocessing) do formy dojrzałej składającej się z samej CD. Ponadto proteazy te były aktywne przynajmniej względem jednego z komercyjnie dostępnego substratu białkowego: Elastin Congo Red, Azocoll, DQ-gelatin czy też FTC-casein. Porównawcza genomika patogennej *T. forsythia* ATCC 43037 i jej bliskiego niegroźnego krewnego, *Tannerella BU063*, ujawniła w tym ostatnim brak nie tylko proteaz KLIKK, ale też innych wydzielniczych proteaz z domeną CTD. A to sugeruje, że proteazy KLIKK są zaangażowane w wirulencję *T. forsythia*. Przedstawione powyżej wyniki zostały opublikowane w pracy: **Ksiazek M, Mizgalska D, Eick S, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J. KLIKK proteases of *Tannerella forsythia*: putative virulence factors with a unique domain structure. Front Microbiol. 2015 Apr 21;6:312.**

Wstępna charakterystyka proteaz KLIKK pokazała, że zdecydowanie najbardziej aktywnym enzymem jest mirolizyna. Wobec tego w dalszym etapie prac postanowiono scharakteryzować tę metaloproteazę. Na początek próbowano otrzymać promirolizynę pełnej długości, tylko bez domniemanego SP (NTP-CD-CTE), wykorzystując system ekspresji w *E. coli*. Uzyskany z bardzo niską wydajnością zymogen trzymano w 37°C w celu przeprowadzenia sekwencyjnej autoproteolizy (autoprocessing). Jednakże analiza SDS-PAGE uzyskanych próbek nie wykazała praktycznie żadnych zmian w czasie, a pomiary aktywności proteolitycznej z wykorzystaniem Azocoll jako substratu pokazały niewielki wzrost aktywności. Wykonana zymografia uwidoczniała obecność aktywnej formy enzymatycznej o masie molekularnej ~ 31 kDa, co odpowiada wielkości samej CD mirolizyny, która powinna być dojrzałą formą mirolizyny. Co istotne, nieaktywny katalitycznie mutant, w którym kwas glutaminowy biorący udział w mechanizmie proteolizy został zamieniony na alaninę (E225A), nie wykazywał żadnej aktywności proteolitycznej.

W celu zwiększenia wydajności ekspresji, postanowiono otrzymać konstrukt genetyczny kodujący promirolizynę składającą się tylko z NTP i CD (NTP-CD). Dzięki temu rozwiązaniu wydajność ekspresji wzrosła ponad 10-krotnie i możliwe było wykonanie charakterystyki biochemicznej mirolizyny. We wszystkich doświadczeniach jako kontrolę negatywną wykorzystano odpowiedni mutant E225A. Najpierw postanowiono scharakteryzować proces dojrzewania promirolizyny. Oczyszczony zymogen trzymano w buforze Tris, następnie w określonych punktach czasowych pobierano próbki, które charakteryzowano za pomocą SDS-PAGE, zymografii i pomiaru aktywności proteolitycznej z wykorzystaniem Azocoll jako substratu. 35-kDa mirolizyna NTP-CD ulegała sekwencyjnej autoproteolizie do 31-kDa mirolizyny CD w ciągu 1 godz., czemu towarzyszył wzrost aktywności proteolitycznej. Dojrzewanie mirolizyny było osiągnięte w wyniku hydrolizy wiązania peptydowego Ser⁵⁴-Arg⁵⁵. Jednakże dalsza inkubacja białka prowadziła do stopniowej degradacji 31-kDa mirolizyny do mniejszych fragmentów/peptydów, co skutkowało całkowitą utratą aktywności proteolitycznej. W związku z obecnością kationów wapnia w płynach ustrojów człowieka, postanowiono powtórzyć powyższe doświadczenie w obecności 2,5 mM CaCl₂. Dodatek wapnia znacząco skrócił proces aktywacji, z 1 godz. do 15 min., ale również zwiększył stabilność 31-kDa mirolizyny, która zachowywała aktywność proteolityczną nawet

przez 204 godz. Dzięki temu możliwe było wykonanie biochemicznej charakterystyki mirolizyny. Mirolizyna jest aktywna w szerokim zakresie pH (6-9), nie traci aktywności w warunkach redukujących oraz wiąże wapń z stałą dysocjacji (K_D) wynoszącą 0,9 mM, która jest poniżej fizjologicznego stężenia wapnia w płynach ustrojowych wynoszącego ~ 5 mM. Ponadto aktywność mirolizyny jest hamowana przez inhibitory metaloproteaz wiążące jony dwudodatnie (EDTA, 1,10-fenantrolina), a inhibitory proteaz serynowych i cysteinowych nie mają praktycznie żadnego wpływu na aktywność mirolizyny.

W celu określenia specyficzności substratowej, mirolizynę CD inkubowano z białkowymi substratami: wołową kazeiną i ludzką albuminą, fibrynogenem, fibronektyną i składnikami układu dopełniacza: C3, C4 i C5, oraz peptydami: ludzką katelicydyną LL-37 i łańcuchem β insuliny. Mirolizyna hydrolizowała wszystkie badane substraty, za wyjątkiem albuminy. Miejsca hydrolizy badanych substratów określono za pomocą N-terminalnego sekwencjonowania i spektrometrii masowej, a na podstawie otrzymanych wyników uzyskano sekwencję rozpoznawaną i hydrolizowaną (ang. cleavage motif) przez mirolizynę. Mirolizyna jest LizargiNazą, ponieważ hydrolizuje wiązania peptydowe zawierające Arg lub Lys po karbonyłowej stronie ciętego wiązania peptydowego (pozycja P1'). Co sugeruje również, że za wyjątkową specyficzność mirolizyny odpowiada kieszeń S1' w szczelinie katalitycznej mirolizyny.

W celu określenia potencjalnej funkcji biologicznej mirolizyny skupiono się na oddziaływaniu badanej proteazy z LL-37, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy w ludzkim przyzębiu. Aktywność proteolityczna mirolizyny prowadziła do całkowitej utraty aktywności zarówno antybakteryjnej jak i przeciwzapalnej (wiązanie LPS) LL-37. Ponadto dodatek nawet 1 nM mirolizyny całkowicie chronił bakterię *E. coli* przed bakteriobójczym działaniem LL-37. Przedstawione powyżej wyniki zawarte są w pracy:

Koneru L, Ksiazek M, Waligorska I, Straczek A, Lukasik M, Madej M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J. Mirolysin, a LysargiNase from *Tannerella forsythia*, proteolytically inactivates the human cathelicidin, LL-37. Biol Chem. 2017 Mar;398(3):395-409.

Wykonana charakterystyka mirolizyny pozostawiła jedną sporą rozbieżność z wcześniej scharakteryzowanymi dwoma proteazami KLIKK, mirolazą i karilizyną: całkowity brak latencji. Zagadkę tę udało się rozwiązać parę lat później, ponieważ ponowna analiza sekwencji mirolizyny z zaktualizowanym narzędziem przewidującym sekwencje SP ujawniła obecność dwóch możliwych SP: jednego dłuższego (M^1-G^{24}) SP, wykorzystanego w pierwszych badaniach, i drugiego SP krótszego o pięć aminokwasów, M^1-S^{19} . Zatem, NTP mirolizyny mógłby być dłuższy o pięć aminokwasów: $Q^{20}RTCG$. Biorąc pod uwagę, że latencja metaloproteaz jest uzyskiwana przez dwa główne mechanizmy, przełącznika (ang. switch) asparaginianowego i cysteinowego, w którym cynk katalityczny jest chelatowany w zymogenie przez, odpowiednio, Asp lub Cys, wydłużenie NTP mirolizyny o fragment $QRTCG$ zawierający Cys może mieć wpływ na zymogeniczność tej metaloproteazy. W celu zweryfikowania tej niezwykle atrakcyjnej hipotezy postanowiono otrzymać rekombinowaną promirolizynę, proM ($Q^{20}-S^{331}$): dziką (ang. wild-type), wt oraz mutanty: C23A i C23L. Wstępne pomiary aktywności proteolitycznej wykazały, że wszystkie 3 białka proM są praktycznie nieaktywne. Natomiast badanie termostabilności wykazało, że mutanty C23A i C23L mają temperatura przegięcia, T_i (ang. inflection temperature) niższą o 7°C w porównaniu do proM^{wt}. Natomiast zaskakująco, T_i dojrzałej mirolizyny (samo CD) wynosiło 95°C. W celu dalszego zbadania termostabilności mirolizyny, wykazano, że enzym ten osiąga maksymalną aktywność proteolityczną w 65°C. Wobec tego mirolizyna jest enzymem termofilnym. W celu sprawdzenia roli Cys23 w latencji mirolizyny, proM: wt, C23A i C23L trzymano w 37°C, a uzyskane próbki dla odpowiednich punktów czasowych analizowano za

pomocą SDS-PAGE i pomiaru aktywności proteolitycznej względem FTC-casein. proM^{wt} potrzebowało 15 dni do pełnej aktywacji, a mutacja Cys23 skracała ten czas do 5 min. Wyniki te potwierdziły, że latencja mirolizyny jest osiągnięta za pomocą przełącznika cysteinowego. Co istotne wyniki te zostały potwierdzone dodatkowo przez rozwiązanie struktury krystalicznej proM, w której Cys23 chelatuje cynk katalityczny [36].

Znaczące podniesienie wydajności ekspresji i stabilności mirolizyny wykorzystano do otrzymania enzymu znakowanego ¹⁵N, który wykorzystano do przeszukania techniką NMR biblioteki 1500 związków w celu znalezienia potencjalnego inhibitora mirolizyny. W ten sposób znaleziono związek (ang. compound) nr 9, cpd 9, który hamował nie tylko aktywność proteolityczną, ale spowalniał proces dojrzewania promirolizyny. Cpd 9 był odwracalnym kompetencyjnym inhibitorem, hamującym mirolizynę z stałą inhibicji (K_i) wynoszącą 3,2 μM. Oddziaływanie mirolizyny z cpd 9 opisują również inne parametry: K_D (1.1 μM) i IC₅₀ (2.3 μM). Ponadto cpd 9 jest bardzo specyficznym inhibitorem mirolizyny, ponieważ nie hamuje pozostałych proteaz KLIKK oraz innych proteaz rozpoznających i hydrolizujących wiązania peptydowe zawierające Lys i/lub Arg. Należy jednak podkreślić, że jest to pierwszy, wstępny etap opracowywania skutecznego inhibitora mirolizyny, z potencjalnym klinicznym zastosowaniem. Na pewno w dalszych badaniach konieczne jest zwiększenie efektywności hamującej cpd 9 poprzez, np. powiększenie znanego związku o inne fragmenty oddziaływujące z cząsteczką mirolizyny.

Ponadto udało się rozwiązać strukturę krystaliczną kompleksu mirolizyna-cpd 9, która rzuciła światło na mechanizm specyficzności tej proteazy, która jest LizargiNazą. Cpd 9 wiąże się do kieszeni S1' mirolizyny, a kluczowym oddziaływaniem jest wiązanie wodorowe poprzez cząsteczkę wody pomiędzy grupą aminową cpd 9 a Asp289 znajdującym się na dnie kieszeni S1'. A to tłumaczy powinowactwo kieszeni S1' do Lys i Arg. Warto podkreślić, że wyniki te zostały potwierdzone poprzez rozwiązanie struktury krystalicznej dojrzałej mirolizyny związanej z peptydem posiadającym Lys na N-końcu [36]. Opisane powyżej wyniki zawarte są w artykule: **Zak KM, Bostock MJ, Waligorska I, Thøgersen IB, Enghild JJ, Popowicz GM, Grudnik P, Potempa J, Książek M. Latency, thermal stability, and identification of an inhibitory compound of mirolysin, a secretory protease of the human periodontopathogen *Tannerella forsythia*. J Enzyme Inhib Med Chem. 2021 Dec;36(1):1267-1281.**

Dotychczasowe prace pokazały, że miropina, inhibitor z superrodziny serpin produkowany przez *T. forsythia*, posiada wyjątkową zdolność do hamowania proteaz należących do różnych klas katalitycznych o zupełnie różnej specyficzności substratowej. Jest to możliwe dzięki obecności w miropinie 3 równocennych pod względem wydajności hamowania miejsc aktywnych (Val*Lys*Thr*Ser) w obrębie RCL [37]. Hamowanie trypsyny z wykorzystaniem miejsca aktywnego Lys-Thr skłoniło nas do sprawdzenia, czy miropina hamuje trombinę i plazminę, dwie kluczowe proteazy w procesach, odpowiednio, krzepnięcia krwi i fibrynolizy. Miropina hamowała plazminę, a nie miała żadnego wpływu na aktywność trombiny. Miropina nie hamuje również innych czynników krzepnięcia, ponieważ nawet przy stężeniu 10 μM nie miała żadnego wpływu na dwa czasy krzepnięcia krwi: czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) i czas protrombinowy (PT). Co sugeruje, że miropina jest specyficznym inhibitorem proteaz odpowiedzialnych za fibrymolizę, hydrolizujących wiązanie peptydowe Lys-Xaa.

Miropina hamuje plazminę z stechiometrią inhibicji (SI) wynoszącą 3,8 i stałą asocjacji (k_{ass}) wynoszącą $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Hamowanie odbywało się poprzez utworzenie kowalencyjnych kompleksów wywołane przez hydrolizę miejsca aktywnego Lys³⁶⁸-Thr³⁶⁹ w obrębie RCL. Miropina hamuje również aktywność fibrynolityczną plazminy wobec skrzepów wytworzonych w roztworze fibrynogenu czy też ludzkim osoczu. Co istotne, hamowanie to odbywa się z podobną wydajnością jak główny inhibitor plazminy w ludzkim

osoczu, α_2 -antyplazmina (α_2 AP). Ponadto, miropina jest w stanie w pełni zastąpić α_2 AP w ludzkim osoczu. Ponadto mutant miropiny (K368A) nie miał żadnego wpływu na aktywność plazminy w wykonanych doświadczeniach, co wyklucza jakieś niespecyficzne, inne niż hamowanie plazminy, oddziaływanie miropiny z czynnikami zaangażowanymi w hemostazę. Ponadto zarówno przepłukane całe komórki (ang. whole cells, WCs) jak i pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. outer membrane vesicles, OMVs) hamowały w zależności od ilości plazminę z wytworzeniem kowalencyjnych kompleksów. Frakcje otrzymane z hodowli mutantu *T. forsythia* pozbawionego miropiny (Δ miropin) nie miały praktycznie żadnego wpływu na aktywność plazminy. Dzięki swojemu wydzielniczemu charakterowi miropina chroniła przez atakiem proteolitycznym białka znajdujące się w otoczce komórkowej (ang. cell envelope, CE) *T. forsythia*.

W celu wykluczenia możliwości blokowania aktywności miropiny przez jakiegokolwiek białko osocza, pokazano, że miropina zależnie od stężenia i poprzez tworzenie kowalencyjnych kompleksów hamuje aktywność plazminy w osoczu ludzkim, w którym plazminogen został konwertowany do plazminy za pomocą streptokinazy. Ostatecznie, miropina zmniejszyła utratę krwi u myszy.

Wobec tego badania te doprowadziły do opisanego pierwszego białkowego inhibitora plazminy produkowanego przez prokarioty. Opisane wyniki zebrane są w pracy: **Sochaj-Gregorczyk A, Ksiązek M, Waligorska I, Straczek A, Benedyk M, Mizgalska D, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J. Plasmin inhibition by bacterial serpin: Implications in gum disease. FASEB J. 2020 Jan;34(1):619-630.**

4.3.3. Znaczenie i możliwe praktyczne wykorzystanie uzyskanych wyników

Uzyskane wyniki składające się na przedstawione powyżej osiągnięcie naukowe z całą pewnością poszerzyły naszą wiedzę nad systemem proteolitycznym ludzkiego periodontopatogenu, *T. forsythia*. Po pierwsze, zsekwencjonowano fragmenty genomu *T. forsythia* i tym samym znacząco poprawiono jakość zdeponowanych w bazach danych sekwencji genomu tej bakterii, które wciąż zawierają mnóstwo błędów. Przy okazji odkryto i nazwano całkiem nową rodzinę enzymów proteolitycznych nazwanych proteazami KLIKK, które posiadają wyjątkową wielodomenową budowę. Po drugie, opracowano metodę oczyszczania kolejnej proteazy KLIKK, mirolizyny. Badania nad tą proteazą wykazały m. in., że posiada unikalną specyficzność substratową – jest LizargiNazą, ma właściwości termofilne, może przyczyniać się do wirulencji *T. forsythia* poprzez inaktywację funkcji biologicznych LL-37 oraz latencja zymogenu jest osiągana za pomocą przełącznika cysteinowego. Ostatecznie, wykazano, że inhibitor proteaz z rodziny serpin, miropina hamuje ludzką plazminę z niemal taką samą wydajnością jak fizjologiczny inhibitor tego enzymu fibrynolitycznego, α_2 -antyplazmina. Warto podkreślić, że miropina jest pierwszym opisanym białkowym inhibitorem plazminy pochodzenia prokariotycznego.

Wykonane badania podstawowe z całą pewnością przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy w takich dziedzinach jak mikrobiologia czy też biochemia oraz w przyszłości mogą przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów powstawania i rozwoju chorób przyzębia, które nie są do końca poznane.

Oprócz samego poznawczego aspektu, uzyskane wyniki mają również potencjalne praktyczne zastosowanie. Uzyskane wyniki doprowadziły m. in. do znalezienia drobnocząsteczkowego związku, cpd 9, który hamuje aktywność proteolityczną mirolizyny. Dalsze prace nad tą tematyką, m. in. rozbudowa cpd 9 w celu zwiększenia powinowactwa do mirolizyny, mogą doprowadzić do opisanego związku, który może znaleźć zastosowanie w leczeniu (hamowanie mirolizyny) czy też diagnostyce (wykrywanie mirolizyny jako znakowana sonda) parodontozy.

Jednakże najbardziej praktyczne zastosowanie mają wyniki uzyskane dla miropiny. Wystarczy wspomnieć, że opublikowane jak i nieopublikowane wyniki uzyskane dla miropiny (m. in. hamowanie plazminy, posiadanie 3 równocennych miejsc aktywnych w RCL, ogromna plastyczność umożliwiająca uzyskanie hamowania praktycznie każdej proteazy serynowej i cysteinowej czy też kilku wybranych proteaz zaangażowanych wspólnie w wirulencję innych ludzkich patogenów) posłużyły do przygotowania w ramach współpracy pomiędzy Uniwersytetem Jagiellońskim a University of Louisville (Louisville, KY, USA) międzynarodowego wniosku patentowego zatytułowanego: „Rekombinowana miropina” (ang. Recombinant miropin) o numerach: PCT/US2022/071178 (International Application Number) i WO 2022/226451 A1 (International Publication Number). Obecnie oczekujemy na decyzję o uzyskaniu ochrony patentowej. Wniosek patentowy ma 4 autorów, a mój procentowy udział w zgłaszanych wynikach wynosi 34%.

4.3.4. Bibliografia

1. Fox, C.H. (1992) New considerations in the prevalence of periodontal disease. *Curr Opin Dent.* **2**, 5-11.
2. Hugoson, A., Sjödin, B., and Norderyd, O. (2008) Trends over 30 years, 1973-2003, in the prevalence and severity of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* **35**, 405-414.
3. Eke, P.I., Dye, B.A., Wei, L., Slade, G.D., Thornton-Evans, G.O., Borgnakke, W.S., Taylor, G.W., Page, R.C., Beck, J.D., and Genco, R.J. (2015) Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol.* **86**, 611-22.
4. Armitage, G.C. (2004) Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* **34**, 9-21.
5. Otomo-Corgel, J., Pucher, J.J., Rethman, M.P., and Reynolds, M.A. (2012) State of the science: Chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pract.* **12**, 20-28.
6. Benedyk, M., Mydel, P.M., Delaleu, N., Płaza, K., Gawron, K., Milewska, A., Maresz, K., Koziel, J., Pyrc, K., and Potempa, J. (2016) Gingipains: Critical factors in the development of aspiration pneumonia caused by *Porphyromonas gingivalis*. *J Innate Immun.* **8**, 185-198.
7. Dominy, S.S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L.J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M.I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., Walker, G.D., Reynolds, E.C., Faull, R.L.M., Curtis, M.A., Dragunow, M., and Potempa, J. (2019) *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* **5**, eaau3333.
8. Colombo, A.P., Boches, S.K., Cotton, S.L., Goodson, J.M., Kent, R., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Hasturk, H., Van Dyke, T.E., Dewhirst, F., and Paster, B.J. (2009) Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol.* **80**, 1421-1432.
9. Schenkein, H.A. (2006) Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000.* **40**, 77-93.
10. Hajishengallis, G., and Lamont, R.J. (2012) Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* **27**, 409-419.
11. Holt, S.C., and Ebersole, J.L. (2005) *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: The “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* **38**, 72–112.
12. Guo, Y., Nguyen, K. A., and Potempa, J. (2010) Dichotomy of gingipains action as virulence factors: From cleaving substrates with the precision of a surgeon’s knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol 2000.* **54**, 15–44.
13. Ishihara, K. (2010) Virulence factors of *Treponema denticola*. *Periodontol. 2000* **54**, 117–135.
14. Potempa, J., and Pike, R.N. (2009) Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immun.* **1**, 70–87.

15. Sharma, A. (2010) Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontol 2000*. **54**, 106-116.
16. Nakajima, T., Tomi, N., Fukuyo, Y., Ishikura, H., Ohno, Y., Arvind, R., Arai, T., Ishikawa, I., and Arakawa, S. (2006) Isolation and identification of a cytopathic activity in *Tannerella forsythia*. *Biochem Biophys Res Commun*. **351**, 133-139.
17. Pei, J., and Grishin, N.V. (2009) Prediction of a caspase-like fold in *Tannerella forsythia* virulence factor PrtH. *Cell Cycle*. **8**, 1453-1455.
18. Karim, A.Y., Kulczycka, M., Kantyka, T., Dubin, G., Jabaiah, A., Daugherty, P.S., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J., Nguyen, K.A., and Potempa, J. (2010) A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem*. **391**, 105-17.
19. Ksiazek, M., Karim, A.Y., Bryzek, D., Enghild, J.J., Thøgersen, I.B., Koziel, J., and Potempa, J. (2015) Mirolase, a novel subtilisin-like serine protease from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*. *Biol Chem*. **396**, 261-75.
20. Kantyka, T., Rawlings, N.D., and Potempa, J. (2010) Prokaryote-derived protein inhibitors of peptidases: A sketchy occurrence and mostly unknown function. *Biochimie*. **92**, 1644-56.
21. Potempa, J., and Pike, R.N. (2005) Bacterial peptidases. *Contrib Microbiol*. **12**, 132-180.
22. Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A. and Finn, R.D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res* **46**, D624-D632.
23. Gettins, P.G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*. **102**, 4751-804.
24. Huntington, J.A., Read, R.J., and Carrell, R.W. (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. **407**, 923-6.
25. Kantyka, T., Plaza, K., Koziel, J., Florczyk, D., Stennicke, H.R., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J., Silverman, G.A., Pak, S.C., and Potempa, J. (2011) Inhibition of *Staphylococcus aureus* cysteine proteases by human serpin potentially limits staphylococcal virulence. *Biol Chem*. **392**, 483-9.
26. Silverman, G.A., Whisstock, J.C., Bottomley, S.P., Huntington, J.A., Kaiserman, D., Luke, C.J., Pak, S.C., Reichhart, J.M., and Bird, P.I. (2010) Serpins flex their muscle: I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *J Biol Chem*. **285**:24299-305.
27. Irving, J.A., Steenbakkers, P.J., Lesk, A.M., Op den Camp, H.J., Pike, R.N., and Whisstock, J.C. (2002) Serpins in prokaryotes. *Mol Biol Evol*. **19**, 1881-90.
28. Roberts, T.H., Hejgaard, J., Saunders, N.F., Cavicchioli, R., and Curmi, P.M. (2004) Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution. *J Mol Evol*. **59**, 437-47.
29. Irving, J.A., Cabrita, L.D., Rossjohn, J., Pike, R.N., Bottomley, S.P., and Whisstock, J.C. (2003) The 1.5 Å crystal structure of a prokaryote serpin: controlling conformational change in a heated environment. *Structure*. **11**, 387-97.
30. Kang, S., Barak, Y., Lamed, R., Bayer, E.A., and Morrison, M. (2006) The functional repertoire of prokaryote cellulosomes includes the serpin superfamily of serine proteinase inhibitors. *Mol Microbiol*. **60**, 1344-54.
31. Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delley, M., Fisseha, M., Blum-Sperisen, S., Kochhar, S., and Arigoni, F. (2006) A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J Biol Chem*. **281**, 17246-52
32. Zhang, Q., Buckle, A.M., Law, R.H., Pearce, M.C., Cabrita, L.D., Lloyd, G.J., Irving, J.A., Smith, A.I., Ruzyla, K., Rossjohn, J., Bottomley, S.P., and Whisstock, J.C. (2007) The N terminus of the serpin, tengpin, functions to trap the metastable native state. *EMBO Rep*. **8**, 658-63.
33. Cabrita, L.D., Irving, J.A., Pearce, M.C., Whisstock, J.C., and Bottomley, S.P. (2007) Aeropin from the extremophile *Pyrobaculum aerophilum* bypasses the serpin misfolding trap. *J Biol Chem*. **282**, 26802-9.
34. Tanaka, S., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2011) Inhibition of chymotrypsin- and subtilisin-like serine proteases with Tk-serpin from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Biochim Biophys Acta*. **1814**, 299-307.
35. Ksiazek, M., Mizgalska, D., Enghild, J.J., Scavenius, C., Thøgersen, I.B., and Potempa, J. (2015) Miropin, a novel bacterial serpin from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*, inhibits a broad range of proteases by using different peptide bonds within the reactive center loop. *J Biol Chem*. **290**, 658-70.

36. Guevara, T., Rodriguez-Banqueri, A., Ksiazek, M., Potempa, J., and Gomis-Rüth, F.X. (2020) Structure-based mechanism of cysteine-switch latency and of catalysis by pappalysin-family metalloproteases. *IUCrJ*. **7**, 18-29.
37. Goulas T, Ksiazek M, Garcia-Ferrer I, Sochaj-Gregorczyk AM, Waligorska I, Wasylewski M, Potempa J, Gomis-Rüth FX. A structure-derived snap-trap mechanism of a multispecific serpin from the dysbiotic human oral microbiome. *J Biol Chem*. 2017 Jun 30;292(26):10883-10898.

4.4. Inne opublikowane osiągnięcia naukowe z moim istotnym wkładem

Przed uzyskaniem tytułu doktora:

- charakterystyka pierwszej serpiny, miropiny z ludzkiego patogenu bakteryjnego. Opisanie unikalnych właściwości serpiny *T. forsythia*: hamowanie proteaz o zupełnie różnej specyficzności substratowej z wykorzystaniem co najmniej kilku miejsc aktywnych w obrębie RCL;

Ksiazek M, Mizgalska D, Enghild JJ, Scavenius C, Thøgersen IB, Potempa J. Miropin, a novel bacterial serpin from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*, inhibits a broad range of proteases by using different peptide bonds within the reactive center loop. *J Biol Chem*. 2015 Jan 2;290(1):658-70. doi: 10.1074/jbc.M114.601716.

- biochemiczna charakterystyka wydzielniczej proteazy *T. forsythia*, mirolazy. Opisanie unikalnego mechanizmu latencji dla proteaz z rodziny subtylizyn: po odcięciu NTP mirolazy nie jest natychmiast degradowany, ale tworzy z CD stabilny niekowalencyjny kompleks;

Ksiazek M, Karim AY, Bryzek D, Enghild JJ, Thøgersen IB, Koziel J, Potempa J. Mirolase, a novel subtilisin-like serine protease from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*. *Biol Chem*. 2015 Mar;396(3):261-75. doi: 10.1515/hsz-2014-0256.

Po uzyskaniu tytułu doktora:

- wykazanie, że małe lipoproteiny poprzedzające w genomie *T. forsythia* proteazy KLIKK są w rzeczywistości ich specyficznymi inhibitorami (Ryc. 1). Badania te doprowadziły do opisania zupełnie nowej rodziny inhibitorów nazwanych zbiorczo Potempinami;

Książek M, Goulas T, Mizgalska D, Rodríguez-Banqueri A, Eckhard U, Veillard F, Waligórska I, Benedyk-Machaczka M, Sochaj-Gregorczyk AM, Madej M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Cuppari A, Arolas JL, de Diego I, López-Pelegrín M, Garcia-Ferrer I, Guevara T, Dive V, Zani ML, Moreau T, Potempa J, Gomis-Rüth FX. A unique network of attack, defence and competence on the outer membrane of the periodontitis pathogen *Tannerella forsythia*. *Chem Sci*. 2022 Dec 12;14(4):869-888.

- pokazanie, że miropina posiada w pętli reaktywnej 3 równocenne, pod względem wydajności hamowania, miejsca aktywne oraz wyjaśnienie na poziomie strukturalnym tego zjawiska;

Goulas T, Ksiazek M, Garcia-Ferrer I, Sochaj-Gregorczyk AM, Waligorska I, Wasylewski M, Potempa J, Gomis-Rüth FX. A structure-derived snap-trap mechanism of a multispecific serpin from the dysbiotic human oral microbiome. *J Biol Chem*. 2017 Jun 30;292(26):10883-10898.

- rozwiązanie struktury przestrzennej domeny CTD, będącej sygnałem do wydzielania białek przez T9SS u *P. gingivalis*, oraz biochemiczne i funkcjonalne badania nad pętlą, w której zachodzi hydroliza skutkująca odcięciem CTD po zakończonej translokacji przez błonę zewnętrzną;

de Diego I, Ksiazek M, Mizgalska D, Koneru L, Golik P, Szmigielski B, Nowak M, Nowakowska Z, Potempa B, Houston JA, Enghild JJ, Thøgersen IB, Gao J, Kwan AH, Trehella J, Dubin G, Gomis-Rüth FX, Nguyen KA, Potempa J. The outer-membrane export signal of Porphyromonas gingivalis type IX secretion system (T9SS) is a conserved C-terminal β -sandwich domain. *Sci Rep.* 2016 Mar 23;6:23123.

- Charakterystyka proteazy tiolowej, Tpr z *P. gingivalis*.

Staniec D, Ksiazek M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Sroka A, Bryzek D, Bogyo M, Abrahamson M, Potempa J. Calcium Regulates the Activity and Structural Stability of Tpr, a Bacterial Calpain-like Peptidase. *J Biol Chem.* 2015 Nov 6;290(45):27248-27260.

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

Swoją aktywność naukową realizowałem również w jednostce zagranicznej: School of Dentistry, University of Louisville, Louisville, KY, USA, gdzie spędziłem w sumie 4 lata na stażach naukowych: 1 rok w trakcie studiów doktoranckich oraz 3 lata już po uzyskaniu tytułu naukowego doktora. W czasie tego okresu prowadziłem badania naukowe, których efektem są liczne publikacje. Ponadto zdobyte doświadczenie naukowe wykorzystuję nadal po powrocie do Polski. W czasie pobytu w USA sprawowałem również nadzór merytoryczny w laboratorium nad studentami przygotowującymi wyniki do prac magisterskich czy też doktorskich. Uczestniczyłem również aktywnie w życiu jednostki poprzez m.in. prezentowanie wyników na wewnętrznych seminariach naukowych czy też międzynarodowych konferencjach oraz przygotowanie wniosku patentowego na uzyskane wyniki, we współpracy z Uniwersytetem Jagiellońskim. Warto wspomnieć, że jednostka dbała też o mój rozwój, ponieważ opłaciła moje uczestnictwo w kilkudniowym praktycznym i teoretycznym kursie z mikroskopii konfokalnej.

Publikacje powstałe w wyniku prowadzenia badań w więcej niż jednej jednostce naukowej:

1. Veillard F, Potempa B, Guo Y, Ksiazek M, Sztukowska MN, Houston JA, Koneru L, Nguyen KA, Potempa J. Purification and characterisation of recombinant His-tagged RgpB gingipain from Porphyromonas gingivalis. *Biol Chem.* 2015 Apr;396(4):377-84.
2. de Diego I, Ksiazek M, Mizgalska D, Koneru L, Golik P, Szmigielski B, Nowak M, Nowakowska Z, Potempa B, Houston JA, Enghild JJ, Thøgersen IB, Gao J, Kwan AH, Trehella J, Dubin G, Gomis-Rüth FX, Nguyen KA, Potempa J. The outer-membrane export signal of Porphyromonas gingivalis type IX secretion system

- (T9SS) is a conserved C-terminal β -sandwich domain. *Sci Rep.* 2016 Mar 23;6:23123.
- Goulas T, Ksiazek M, Garcia-Ferrer I, Sochaj-Gregorczyk AM, Waligorska I, Wasylewski M, Potempa J, Gomis-Rüth FX. A structure-derived snap-trap mechanism of a multispecific serpin from the dysbiotic human oral microbiome. *J Biol Chem.* 2017 Jun 30;292(26):10883-10898.
 - Guevara T, Rodriguez-Banqueri A, Ksiazek M, Potempa J, Gomis-Rüth FX. Structure-based mechanism of cysteine-switch latency and of catalysis by pappalysin-family metallopeptidases. *IUCrJ.* 2020 Jan 1;7(Pt 1):18-29.
 - Sochaj-Gregorczyk A, Ksiazek M, Waligorska I, Straczek A, Benedyk M, Mizgalska D, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J. Plasmin inhibition by bacterial serpin: Implications in gum disease. *FASEB J.* 2020 Jan;34(1):619-630.
 - Zak KM, Bostock MJ, Waligorska I, Thøgersen IB, Enghild JJ, Popowicz GM, Grudnik P, Potempa J, Ksiazek M. Latency, thermal stability, and identification of an inhibitory compound of mirolysin, a secretory protease of the human periodontopathogen *Tannerella forsythia*. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2021 Dec;36(1):1267-1281.
 - Książek M, Goulas T, Mizgalska D, Rodríguez-Banqueri A, Eckhard U, Veillard F, Waligórska I, Benedyk-Machaczka M, Sochaj-Gregorczyk AM, Madej M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Cuppari A, Arolas JL, de Diego I, López-Pelegrín M, Garcia-Ferrer I, Guevara T, Dive V, Zani ML, Moreau T, Potempa J, Gomis-Rüth FX. A unique network of attack, defence and competence on the outer membrane of the periodontitis pathogen *Tannerella forsythia*. *Chem Sci.* 2022 Dec 12;14(4):869-888.

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

Działalność dydaktyczna:

- 1) prowadzenie zajęć dydaktycznych na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii:
 - ćwiczenia: Biochemia i fizjologia mikroorganizmów (WBT-BCH351), Mikrobiologia dla kierunku biotechnologia (WBT-BT126), Genetyka molekularna bakterii (WBT-BT117), Praktikum z genetyki molekularnej bakterii (WBT-BCH333), Mikrobiologia A - laboratorium (WCh-OLo-C202L-12), Pracownia specjalistyczna II dla II stopnia biochemii - Metodyka 2: Biologia molekularna, biochemia komórki, biochemia organizmów (WBT-BCH415-2);
 - pojedyncze wykłady w ramach kursów: Mikrobiologia - kurs dla II roku biochemii (WBT-BCH361), Biologia molekularna prokariotów (WBT-BCH381);
 - przygotowanie i opracowanie protokołów do ćwiczeń dla kursu Biochemia i fizjologia mikroorganizmów;
- 2) Opieka nad studentami w laboratorium:
 - szkolenie, nadzorowanie pracy i pomoc w pisaniu prac licencjackich, magisterskich i doktorskich w Polsce (Uniwersytet Jagielloński) i w USA (University of Louisville);

- realizacja projektu „Wgląd w biochemię, strukturę, ewolucję i biologię bakteryjnych serpin na przykładzie miropiny z ludzkiego patogenu *Tannerella forsythia*.” (UMO-2015/17/B/NZ1/00666), którego byłem kierownikiem, doprowadziła do przygotowania pracy mgr zatytułowanej „Hamowanie gingipainy K (Kgp) przez serpinę *Tannerella forsythia*, miropinę” a następnie uzyskania tytułu mgr przez Annę Magdalenę Strączek;
 - Opieka merytoryczna i pomoc w przygotowaniu 3 studentów do udziału w Research!Louisville, konkursu promującego badania w dziedzinie nauk o zdrowiu (University of Louisville);
- 3) Promotor pomocniczy w przewodach doktorskich:
- mgr Irena Waligórska: tytuł pracy dr: „Charakterystyka bakteryjnych proteaz PepO z ludzkich periodontopatogenów *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythia*” (ang. „Characterization of bacterial PepO proteases from human periodontopathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*”). Przewidywana data obrony: X.2023 (wpłynęły pozytywne recenzje; komisja dopuściła do obrony)
 - mgr inż. Natalia Stechnij: Szkoła doktorska rozpoczęta 08.2022. W ramach tzw. rekrutacji grantowej do projektu Sonata Bis pt. „Struktura, biochemia, fizjologia i ewolucja bakteryjnych α 2-makroglobulin z ludzkich periodontopatogenów *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythia*” (ang. „The structures, biochemistry, physiology, and evolution of bacterial α 2-macroglobulins from the human periodontopathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*”) (UMO-2021/42/E/NZ1/00083, NCN), którego jestem kierownikiem.

Działalność popularyzująca naukę:

- prowadzenie warsztatów w ramach wydarzenia „Lifescience dla licealistów” organizowanego z ramienia Koła Naukowego Studentów Biotechnologii Mygen działającego przy Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (2022).

Działalność organizacyjna:

- adaptacja dwóch pustych pomieszczeń na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii do standardów laboratorium badawczego (planowanie instalacji elektrycznych, rozmieszczenia sprzętów i mebli, a następnie ich zakup), uzyskanie odpowiednich pozwoleń formalnych na pracę z mikroorganizmami genetycznie zmodyfikowanymi (GMM) w przygotowanych pomieszczeniach.

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

Projekty badawcze – kierownik

Przed uzyskaniem tytułu doktora:

2012-2014 Preludium-2 (Narodowe Centrum Nauki, Polska)
Tytuł projektu: „Tannerella forsythia: regulacja wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej w mechanizmie patogenności.”
Numer projektu: UMO- 2011/03/N/NZ1/00586

Po uzyskaniu tytułu doktora:

2022- SONATA_BIS (Narodowe Centrum Nauki, Polska)
Tytuł projektu: „Struktura, biochemia, fizjologia i ewolucja bakteryjnych α 2-makroglobulin z ludzkich periodontopatogenów Porphyromonas gingivalis i Tannerella forsythia”
Numer projektu: UMO-2021/42/E/NZ1/00083

2020- OPUS-18 (Narodowe Centrum Nauki, Polska)
Tytuł projektu: „Proteazy KLIKK ludzkiego patogenu Tannerella forsythia: potencjalne czynniki wirulencji o wyjątkowych właściwościach biochemicznych i strukturalnych”
Numer projektu: UMO-2019/35/B/NZ1/03118

2016-2019 OPUS-9 (Narodowe Centrum Nauki, Polska)
Tytuł projektu: „Wgląd w biochemię, strukturę, ewolucję i biologię bakteryjnych serpin na przykładzie miropiny z ludzkiego patogenu Tannerella forsythia.”
Numer projektu: UMO- 2015/17/B/NZ1/00666

Stypendia, nagrody

2016-2019 stypendium dla wybitnych młodych naukowców przyznane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

2015-2019 stypendium (“Mobilność Plus”) z Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

2013-2014 stypendium (“Etiuda”) z Narodowego Centrum Nauki dla najlepszych doktorantów

.....
(podpis wnioskodawcy)