



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



**UCZELNIA
BADAWCZA**
INICJATYWA OŚWIATOWA

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii

data 01.03.2024 r.

dr hab. Beata Zalewska-Piątek, prof. uczelni

Recenzja

Osiągnięcia naukowego pt. „**Charakterystyka systemu proteolitycznego ludzkiego periodontopatogenu *Tannerella forsythia***”

oraz

aktywności naukowej, dorobku dydaktycznego, organizacyjnego i popularyzatorskiego,
doktora Mirosława Książek

Poniższa recenzja została wykonana w odpowiedzi na decyzję Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, powołującej mnie do komisji habilitacyjnej w roli recenzenta, na podstawie następujących dokumentów dołączonych do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne:

- 1) dane wnioskodawcy;
- 2) kopia dokumentu potwierdzającego posiadanie stopnia doktora;
- 3) autoreferat przedstawiający opis kariery zawodowej oraz istotnej aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej;
- 4) wykaz osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny;
- 5) kopie artykułów naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z oświadczeniami Habilitanta i współautorów, wskazujących na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy;
- 6) kopie artykułów i dokumentów potwierdzających pozostałe osiągnięcia;
- 7) kopie dokumentów potwierdzających odbyte staże naukowe, otrzymane stypendia i projekty naukowe
- 8) pełna dokumentacja w wersji elektronicznej i papierowej.

Otrzymane przeze mnie dokumenty (w języku polskim i angielskim) są kompletne pod względem formalnym i merytorycznym biorąc pod uwagę karierę zawodową, osiągnięcia naukowe, pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze, działalność dydaktyczną, organizatorską i popularyzatorską oraz współpracę naukową podjętą przez Pana dr Mirosława Książka. Zapoznanie się z zaprezentowaną mi dokumentacją pozwoliło na dokonanie oceny złożonego wniosku i przygotowanie poniższej recenzji.

1. Sylwetka naukowa i zawodowa dr Mirosława Książka

Pan dr Mirosław Książek uzyskał tytuł magistra biotechnologii w 2009 roku na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (UJ) w Krakowie. Promotorem jego pracy magisterskiej był Pan prof. dr hab. Jan Potempa. Tematyka pracy była związana z ekspresją, oczyszczaniem i wstępną charakterystyką mirolizyny oraz miropsyny – dwóch nowych peptydaz kodowanych przez *loci* TF0347 oraz TF2174 *Tannerella forsythia* ATCC 43037. Kolejnym etapem w rozwoju naukowym Habilitanta było uzyskanie w marcu 2015 roku stopienia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Charakterystyka proteazy i serpiny *Tannerella forsythia*”. Promotorem w przewodzie doktorskim był ponownie Pan prof. dr hab. Jan Potempa.

W 2015 roku, w okresie kwiecień-wrzesień Pan dr Mirosław Książek został zatrudniony na częściowym etacie jako asystent w Małopolskim Centrum Biotechnologii, a w okresie wrzesień-październik tegoż roku ponownie na częściowym etacie asystenta w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. W październiku 2015 roku Habilitant został ponownie zatrudniony na etacie asystenta (cały etat) w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii (UJ). W latach 2013-2014 i 2016-2019 odbył dwa staże podoktorskie, w University of Louisville School of Dentistry, Louisville, KY, USA.

2. Ocena osiągnięcia naukowego

2.1. Charakterystyka osiągnięcia naukowego

Na osiągnięcie naukowe reprezentowane pod wspólnym tytułem. „**Charakterystyka systemu proteolitycznego ludzkiego periodontopatogenu *Tannerella forsythia***” składa się cykl czterech powiązanych ze sobą tematycznie artykułów naukowo-badawczych (prac eksperymentatorskich), opublikowanych w latach 2015 (kwiecień)-2021 (grudzień). Powyższe publikacje ukazały się w następujących czasopismach z bazy JCR (Journal Citation Reports): *Frontiers of Microbiology* (pub. 1, 2015 r.), *Biological Chemistry* (pub. 2, 2017 r.), *FASEB Journal* (pub. 3, 2019 r.), *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (pub. 4, 2021 r.). W pierwszej publikacji (*Front. Microbiol.*, 2015 r.) Pan dr Mirosław Książek jest zarówno **pierwszym**, jak i **korespondencyjnym autorem** (przy zaznaczeniu obecności trzech autorów korespondencyjnych w tej pracy wraz z Habilitantem). Należy nadmienić, że w pracy

Biol. Chem. (pub. 2, 2017 r.) Habilitant jest **autorem równorzędnym z pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym**. W trzecim artykule *FASEB J.* (2019 r.) Pan dr Mirosław Książek jest **drugim i korespondencyjnym autorem**. Natomiast w artykule z 2021 r. (*J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*) Habilitant jest **autorem korespondencyjnym**. Prace mają charakter współautorski ze zmienną liczbą autorów towarzyszących, w zależności od publikacji (od 5 do 8). Oświadczenia współautorów są wyczerpujące. Udział Pana dr Mirosława Książka w powstaniu ww. prac był znaczący i reprezentowany na poziomie 50-60% (zgodnie z przedłożonymi oświadczeniami). Zakres działań Habilitanta obejmował kluczowe etapy niezbędne do powstania powyższego dorobku naukowego i obejmował opracowanie koncepcji badań i zastosowanej metodyki, przygotowanie planu doświadczeń i prowadzenie znacznej ilości prac eksperymentatorskich, nadzorowanie pracy pozostałych wykonawców, analizę uzyskanych wyników, zapewnienie finansowania prowadzonych badań, przygotowanie manuskryptu, opracowanie odpowiedzi na recenzje oraz wykonanie korekt wydawniczych. Sumaryczny współczynnik oddziaływania powyższych publikacji, IF (Impact Factor) zgodnie z rokiem ich opublikowania wynosił **18,135**. Sumaryczna liczba punktów wg wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zgodnie z rokiem ich wydania wynosiła **340**. Całkowita liczba cytowań (bez autocytowań) dla powyższych publikacji określona na podstawie bazy Web of Science wynosiła w dniu 09.02.2024 – 62. Najwięcej cytowań, bo aż 35 uzyskała publikacja *Front. Microbiol.* (pub. 1, 2015 r.). Liczba cytowań jest adekwatna do roku opublikowania powyższych artykułów (lata 2015-2021) i okresu dostępności ww. publikacji w bazach danych dla naukowców.

2.2 Ocena merytoryczna osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę habilitacji

Zaprezentowane przez Pana dr Mirosława Książka osiągnięcie naukowe ściśle dotyczy systemu proteolitycznego ludzkiego periodontopatogenu *Tannerella forsythia*, stanowiącego Gram-ujemną asacharolityczną bakterię bytującą w jamie ustnej człowieka. Bakteria ta jest znajdowana w przestrzeni pomiędzy powierzchnią zębów a dziąsłami, gdzie wraz z wieloma innymi gatunkami bakterii tzw. „czerwonego kompleksu” tworzy poddziąsłową płytkę nazębną. Do niedawna wiedza na temat proteaz wydzielniczych *T. forsythia*, istotnych w zapaleniu przyzębia, była znacznie ograniczona. Zważywszy na to, że zsekwencjonowany genom tej bakterii koduje inne domniemane proteazy z domeną CTD (ang.C-terminal domain) oraz błędy w sekwencjach nukleotydowych kodujących karilizynę i mirolazę, prace badawcze podjęte przez Habilitanta są w pełni zasadne. Proces proteolizy jest ściśle regulowany zarówno na poziomie transkrypcji, jak i potranslacyjnie. Pierwsza strategia obejmuje syntezę proteaz w postaci nieaktywnej enzymatycznie, a druga jest związana z syntezą inhibitorów proteaz, których przykładem jest rodzina serpin.

Serpiny wykazują niezwykley mechanizm działania, który można porównać do „pułapki na myszy”. W porównaniu do innych znanych inhibitorów proteaz, białka te tworzą kowalencyjny, nieodwracalny kompleks z docelowymi proteazami. Serpiny są szeroko rozpowszechnione wśród organizmów eukariotycznych, natomiast wśród prokariotów ich występowanie jest wyraźnie

ograniczone. Przez wiele lat panował również pogląd, że serpiny są zbędne do funkcjonowania organizmów jednokomórkowych. Dopiero sekwencjonowanie genomów bakteryjnych rozwiązało te wątpliwości, identyfikując przy tym otwarte ramki odczytu (ORF-y), kodujące domniemane serpiny. Pomimo tego, tylko bardzo ograniczona liczba serpin prokariotycznych została scharakteryzowana funkcjonalnie. W związku z powyższym badania dotyczące serpiny czy miropiny, kodowanej przez genom *T. forsythia*, odpowiedzialnej za utrzymanie homeostazy u człowieka są istotne pod kątem analizy parodontozy, jako przewlekłej choroby zapalnej u ludzi.

Podejście eksperymentalne wykorzystane przez Habilitanta, do realizacji zamierzonego celu, jest jak najbardziej przemyślane. Pan dr Mirosław Książek rozpoczął swoje badania (pub. 1, *Front. Microbiol.*, 2015 r.) od zsekwencjonowania fragmentów genomu *T. forsythia*, co pozwoliło na identyfikację 6-ciu dodatkowych domniemanych proteaz (tj. karilizyny, forsylizyny, mirolizyny należących do metaloproteaz oraz mirolazy, miropsyny-1 i -2 stanowiących proteazy serynowe), zawierających na C-końcu domenę C-terminalną (CTD) oraz błędów/różnic w sekwencjach karilizyny i mirolazy w porównaniu do sekwencji już zdeponowanych w bazach danych. Na podstawie dopasowania sekwencji ww. proteaz z domeną CTD zaproponowano wielodomenową strukturę tych białek i objęto je wspólną nazwą jako proteazy KLIKK (na podstawie 5 reszt aminokwasowych: -Lys-Leu-Ile-Lys-Lys-COOH, w domenie CTD). W kolejnym etapie prowadzonych badań Habilitant otrzymał 6 proteaz – białek rekombinowanych w bakteryjnym systemie ekspresyjnym (*E. coli*). Na podstawie wykonanych analiz wykazał, że ww. proteazy mają aktywność w stosunku do przynajmniej jednego komercyjnie dostępnego substratu białkowego, występują w kilku aktywnych formach i mogą ulegać sekwencyjnej autoproteolizie do formy dojrzałej w postaci domeny katalitycznej (CD), zawierającej wszystkie niezbędne w mechanizmie proteolizy reszty aminokwasowe. Ponadto, Pan dr Mirosław Książek wykazał brak proteaz KLIKK i in. proteaz wydzielniczych z domeną CTD w przypadku nitkowatej Gram-ujemnej beztlenowej bakterii jamy ustnej *Tannerella BU063*, niezwiązanej z procesem chorobowym, ale blisko spokrewnionej z patogenem przyzębia *T. forsythia*. To może zdecydowanie wskazywać na udział powyższych białek proteolitycznych w wirulencji *T. forsythia*.

Kolejny etap badań, opisany w pracy nr 2 (*Biol. Chem.*) pochodzącej z 2017 r., pozwolił Panu dr Mirosławowi Książek na dokonanie charakterystyki biochemicznej mirolizyny w oparciu o różne formy białka rekombinowanego (złożonego z N-terminalnego profragmentu NPT, domeny katalitycznej CD i fragmentu C-terminalnego CTE: NTP-CD-CTE lub tylko z N-terminalnego profragmentu i domeny katalitycznej: NTP-CD) bez domniemanego peptydu sygnałowego (SP, ang. signal peptide), otrzymanego w systemie ekspresyjnym bakterii *E. coli*. W przypadku konstruktu NTP-CD Habilitant uzyskał ponad 10-krotny wzrost wydajności nadprodukcji białka. Mirolizyna jest syntetyzowana jako zymogen (nieaktywna enzymatycznie forma białka), który ulega autoaktywacji do dojrzałej proteazy. W związku z tym, oczyszczona mirolizyna NTD-CD (o masie cząsteczkowej 35 kDa) podlegała sekwencyjnej autoproteolizie do mirolizyny-CD (31 kDa) w czasie 1 godziny, przy wzroście jej aktywności proteolitycznej. Dodatek jonów wapnia zdecydowanie skrócił czas aktywacji do 15 minut, przy zwiększeniu stabilności 31-kDa mirolizyny, równocześnie z zachowaniem aktywności proteolitycznej tegoż białka aż do 204 godzin. Na podstawie przeprowadzonych analiz eksperymentalnych wykazano aktywność

mirolizyny w szerokim zakresie pH (6-9), brak utraty aktywności w warunkach fizjologicznych, wiązanie wapnia ze stałą dysocjacji K_D (0.9 mM) poniżej fizjologicznego stężenia tych jonów w płynach ustrojowych (5 mM), brak hamowania aktywności białka przez inhibitory proteaz serynowych i cysteinowych, a także zdolność do hydrolizy szerokiego spektrum substratów z wyjątkiem albuminy (miejsca ich hydrolizy zostały określone za pomocą N-terminalnego sekwencjonowania i spektrometrii masowej) przez ww. białko. Badania te pozwoliły na stwierdzenie, że badane białko prezentuje unikalną specyficzność substratową i jest LizargiNazą ze zdolnością do hydrolizy wiązania peptydowego, zawierającego resztę aminokwasową Arg lub Lys (po stronie karbonylowej hydrolizowanego wiązania). Za najważniejsze osiągnięcie naukowe powyższych badań Habilitanta uważam stwierdzenie, że mirolizyna (poprzez aktywność proteolityczną) jest w stanie doprowadzić do całkowitej utraty aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwzapalnej peptydu przeciwdrobnoustrojowego LL-37 (ludzkiej katelicydyny), który odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy w ludzkim przyzębiu.

W następnym etapie badań, opisanym w pracy (*J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*) z 2021 r. pan dr Mirosław Książek podjął się dalszej charakterystyki wydzielniczej proteazy ludzkiego periodontopatogenu *T. forsythia* – mirolizyny, z uwzględnieniem latencji, stabilności termicznej i identyfikacji związku hamującego tę proteazę. Habilitant uzyskał rekombinowaną promirolizynę (proM, Q²⁰-S³³¹) dzikiego typu oraz mutanty C23A i C23L do weryfikacji hipotezy zakładającej, że wydłużenie N-terminalnego profragmentu mirolizyny o fragment (QRTCG) zawierający resztę aminokwasową cysteiny będzie mieć wpływ na zymogeniczność badanego białka. Wyniki uzyskanych badań (dodatkowo potwierdzone przez rozwiązanie struktury krystalicznej proM) potwierdziły, że latencja mirolizyny jest determinowana przez obecność przełącznika cysteinowego. Dodatkowo, Pan dr Mirosław Książek wykazał, że mirolizyna jest enzymem termofilnym. Do identyfikacji potencjalnego inhibitora mirolizyny, posłużył się techniką NMR (przeszukiwanie bibliotek 1500 związków). Wykonane badania doprowadziły do znalezienia drobnocząsteczkowego związku cpd9 (odwracalny kompetencyjny inhibitor), hamującego specyficznie aktywność proteolityczną i spowalniającego dojrzewanie promirolizyny, co podkreśla aspekt poznawczy tych analiz. Poza tym, udało się również rozwiązać strukturę krystaliczną kompleksu złożonego z mirolizyny i cpd9. W tym miejscu należy podkreślić fakt, że jest to etap wstępny, który ostatecznie może prowadzić do otrzymania efektywnego inhibitora ww. proteazy o potencjale klinicznym. Natomiast dalsze prace mające na celu zwiększenie powinowactwa cpd9 (poprzez jego rozbudowę) do mirolizyny mogą być wykorzystane zarówno w leczeniu, jak i diagnostyce parodontozy.

W ostatnim etapie badań opisanym w pracy z roku 2020 (*FASEB J.*), Habilitant skoncentrował się na miropinie, stanowiącej inhibitor z rodziny serpin, który hamuje aktywność proteaz z różnych klas katalitycznych (o różnej specyficzności substratowej). Prowadzone działania eksperymentalne miały na celu określenie czy miropina hamuje aktywność trombiny i plazminy, proteaz kluczowych w procesach odpowiednio, krzepnięcia krwi i fibrylizy. Habilitant wykazał, że miropina jest pierwszym specyficznym białkowym inhibitorem plazminy, produkowanym przez organizm prokariotyczny, bez jej żadnego wpływu na aktywność trombiny.

Ponadto, ww. inhibitor hamował także aktywność fibrynolityczną plazmizny w odniesieniu do skrzepów w roztworze fibrynogenu i ludzkim osoczu. Z kolei, mutant Δ miropin *T. forsythia* nie wpływał na aktywność plazminy, co potwierdza specyficzne działanie miropiny. Poza tym, miropina wykazywała działanie podobne do α 2-antyplazminy w ludzkim osoczu. Warty zauważenia jest również fakt, że wyniki uzyskane przez Habilitanta pozwoliły na przygotowanie, **w ramach współpracy międzynarodowej, pomiędzy Uniwersytetem Jagiellońskim, a University of Louisville (USA) wniosku patentowego „Rekombinowana miropina”** (nr PCT/US2022/071178, International Application Number i WO 2022/226451 A1, International Publication Number, International Publication Date 27.10.2022 r.). W ramach ww. wniosku patentowego (4 autorów tj. Potempa Jan S., **Książek Mirosław**, Mizgalska Danuta M., Benedyk-Machaczka Małgorzata L.) udział Habilitant został oszacowany na 34%.

Wyniki uzyskanych badań stanowiące osiągnięcie naukowe Pana dr Mirosława Książka, na które składa się cykl 4-spójnych tematycznie publikacji, oceniam wysoko. Podkreślam także ich oryginalność i profesjonalne podejście do wielu aspektów realizowanych zadań badawczych. Niektóre z uzyskanych wyników oprócz aspektu poznawczego, mogą mieć również znaczenie praktyczne (znalezienie drobnocząsteczkowego związku cpd9 i jego dalsza modyfikacja w przyszłości), w odniesieniu do leczenia (hamowanie mirolizyny) i diagnostyki paradontozy (wykrywanie mirolizyny). Uzyskane dane w ramach badań podstawowych mogą również przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów wirulencji *T. forsythia* oraz powstawania i rozwoju chorób przyzębia, indukowanych przez tego patogena bakteryjnego.

2.3. Podsumowanie oceny osiągnięcia naukowego

Po gruntownej analizie dorobku naukowego Pana dr Mirosława Książka stwierdzam, że spełnia on pod względem merytorycznym i bibliometrycznym wymagania ustawowe. W związku z powyższym nie mam zastrzeżeń odnośnie do wyboru publikacji, składających się na osiągnięcie naukowe Habilitanta. Jednocześnie oświadczam, że zaprezentowany dorobek jest spójny tematycznie i z całą pewnością może przyczynić się do rozwoju dyscypliny nauk biologicznych.

3. Ocena istotnej aktywności realizowanej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

Pan dr Mirosław Książek w toku realizowanych badań składających się na osiągnięcie naukowe wykazał się także umiejętnościami nawiązywania szeroko zakrojonej współpracy i prowadzenia działań naukowo-badawczych z różnymi naukowcami, pochodzącymi z ośrodków krajowych i zagranicznych, wzbogacając w ten sposób swoje umiejętności i warsztat naukowy o nowe techniki i metody. Potwierdzeniem prowadzonej współpracy w więcej niż jednej uczelni, szczególnie zagranicznej jest 7 publikacji z lat 2015-2022 (po uzyskaniu stopnia doktora).

Poza polskimi jednostkami naukowymi (np. Małopolskie Centrum Biotechnologii, UJ) Habilitant realizował swoją działalność naukową w jednostce zagranicznej tj. School of Dentistry, University of Louisville w USA, w ramach 4-letnich staży naukowych. Okres ten obejmuje 1 rok w trakcie studiów doktoranckich (11.2013-11.2014) oraz 3 lata po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (12.2016-11.2019). W czasie tego okresu Pan dr Mirosław Książek prowadził badania naukowe, których efektem są udokumentowane publikacje, a także sprawował nadzór merytoryczny w laboratorium nad studentami przygotowującymi wyniki do prac magisterskich czy też doktorskich, prezentował wyniki swoich eksperymentów na wewnętrznych seminariach naukowych oraz konferencjach międzynarodowych. Brał również udział w kilkudniowym praktycznym i teoretycznym kursie z mikroskopii konfokalnej. Ponadto, efektem jego pracy w USA było wspólne przygotowanie wniosku patentowego, we współpracy z Uniwersytetem Jagiellońskim.

Podsumowując, na podstawie przedłożonych publikacji można wywnioskować, że Habilitant prowadził lub prowadzi aktualnie współpracę naukową z wieloma jednostkami naukowo-badawczymi, np.:

- 1) Małopolskie Centrum Biotechnologii, UJ, Kraków,
- 2) Department of Oral Immunology and Infectious Diseases, University of Louisville School of Dentistry, Louisville, KY, USA,
- 3) Department of Molecular Biology and Genetics and Interdisciplinary Nanoscience Center, Aarhus University, Aarhus, Denmark
- 4) Faculty of Dentistry, University of Sydney, Sydney, Australia,
- 5) Institute of Dental Research, Westmead Centre for Oral Health and Westmead Institute for Medical Research, Sydney, Australia,
- 6) Proteolysis Laboratory, Department of Structural Biology, Molecular Biology Institute of Barcelona, CSIC, Barcelona.

4. Ocena pozostałego dorobku naukowego

Przedstawiony przez Pana dr Mirosława Książek dorobek naukowy jest jednorodny i generalnie dotyczy różnych białek, proteaz i ich inhibitorów (np. serpina, miropina, mirolaza, lipoproteiny), produkowanych przez ludzkiego patogena bakteryjnego *T. forsythia*, stanowiącego czynnik etiologiczny chorób przyzębia oraz *Porphyromonas gingivalis*, głównego periopatogenu, związanego z etiologią przewlekłego zapalenia przyzębia (np. proteaza tiolowa). W tym kontekście wyróżnić można 18 prac naukowych (po wyłączeniu 4 publikacji składających się na osiągnięcie naukowe), z okresu 2015-2023, po uzyskaniu stopnia doktora oraz 10 prac naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora (2010-2015).

W ramach powyższej tematyki, po uzyskaniu stopnia doktora można wyodrębnić kilka zasadniczych nurtów badawczych, takich jak np.:

1) Wykazanie, że małe lipoproteiny poprzedzające w genomie *T. forsythia* proteazy KLIKK są w rzeczywistości ich specyficznymi inhibitorami i opisanie zupełnie nowej rodziny inhibitorów nazwanych zbiorczo Potempinami.

Przykład realizacji ww. tematyki badawczej może stanowić następująca publikacja:

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; 14(4):869-888.

2) Pokazanie, że miropina posiada w pętli reaktywnej 3 równocenne, pod względem wydajności hamowania, miejsca aktywne oraz wyjaśnienie na poziomie strukturalnym tego zjawiska.

W powyższym zakresie badawczym mieści się również jedna z publikacji stanowiącej osiągnięcie naukowe Pana dr Mirosława Książek (FASEB J., 2020).

Przykład tej tematyki może stanowić praca:

Goulas T, **Książek 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; 292(26):10883-10898.

3) Rozwiązanie struktury przestrzennej domeny CTD, stanowiącej sygnał do wydzielania białek przez system sekrecji typu T9SS u *P. gingivalis* oraz biochemiczne i funkcjonalne badania nad pętlą, w której zachodzi hydroliza skutkująca odcięciem CTD po zakończonej translokacji przez błonę zewnętrzną.

W tej tematyce można wyróżnić następujące prace:

de Diego I, **Książek 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, Trewhella 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; 6:23123.

4) Charakterystyka proteazy tiolowej, Tpr z *P. gingivalis*.

Tematyka ta jest reprezentowana przez poniższą pracę:

Staniec D, **Książek 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; 290(45):27248-27260.

Przed uzyskaniem stopnia doktora zakres realizowanej tematyki jest bardzo zbliżony i obejmuje:

- 1) **Charakterystykę 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;**
- 2) **Biochemiczną charakterystykę wydzielniczej proteazy *T. forsythia*, mirolazy oraz opisanie unikalnego mechanizmu latencji dla proteaz z rodziny subtylizyn.**

W tych nurtach badawczych można wyróżnić następujące prace:

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; 290(1):658-70. doi: 10.1074/jbc.M114.601716.

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; 396(3):261-75. doi: 10.1515/hsz-2014-0256.

W trakcie całej swojej kariery zawodowej Habilitant brał również udział **w zagranicznych konferencjach naukowych**. Uczestnictwo w tych wydarzeniach naukowych miało charakter wystąpień ustnych, jak i prezentacji posterowych. Łącznie można wykazać 9 aktywności konferencyjnych, w tym 2 w formie prezentacji posterowych i 1 wystąpienia ustnego przed uzyskaniem stopnia doktora i 4 prezentacji posterowych i 2 wystąpień ustnych (w tym 1 wykład na zaproszenie jako „invited speaker”) po uzyskaniu stopnia doktora.

Po uzyskaniu stopnia doktora, Habilitant był także recenzentem 16 prac naukowych, wysłanych do publikacji w czasopismach anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym (tj. *Biochimie*, *World Journal of Gastroenterology*, *European Journal of Inflammation*, *Future Microbiology*, *Enzyme and Microbial Technology*, *PeerJ*, *Analytical Biochemistry*, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *Scientific Reports*, *Frontiers in Microbiology*, *Frontiers in Medicine*). Pełnił również funkcję Review edytora w czasopiśmie *Infectious Agents and Diseases*, w sekcji *Frontiers in Microbiology*. W roku 2017 i 2023 był również członkiem zespołów oceniających wnioski o finansowanie badań tj. Narodowe Centrum Nauki, NCN (2023 r., członek zespołu ekspertów w konkursie Miniatura 7); Aix-Marseille Université INITIATIVE D'EXCELLENCE AIX MARSEILLE UNIVERSITE (Amidex, 2017 r.), Central Europe Leuven Strategic Alliance Research Fund (2023 r) – po jednym wniosku grantowym.

Pan dr Mirosław Książek był także **kierownikiem 4 projektów badawczych**, co wymaga wyróżnienia tej formy działalności naukowej. Mianowicie, przed uzyskaniem stopnia doktora Habilitant był kierownikiem projektu NCN Preludium- 2 (w okresie 2012-2014). W latach 2016-2019 **badania Habilitanta były współfinansowane ze środków ogólnopolskich** w ramach

projektu OPUS-9, którego był kierownikiem. Od 2020 r. do chwili obecnej Pan dr Mirosław Książek realizuje swoją działalność naukową w ramach 2 projektów NCN, OPUS-18 i SONATA_BIS. Należy przy tym zaznaczyć, że są to projekty, na których realizację przyznano środki w wysokościach milionowych, od 1.2 do 3.9 mln złotych. Wskazuje to na **bardzo dużą i skuteczną aktywność Habilitanta** w pozyskiwaniu środków finansowych na realizację własnych badań naukowych.

Uwieńczeniem bardzo dużych osiągnięć naukowych Pana dr Mirosława Książka są **3 stypendia**, przyznane na okres 2013-2014 przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, MNiSW (stypendium dla wybitnych młodych naukowców, przed uzyskaniem stopnia doktora), 2016-2019 (stypendium „Mobilność Plus”) i 2015-2019 (stypendium „Etiuda” dla najlepszych doktorantów), przyznane odpowiednio przez MNiSW i NCN. Dwa ostatnie stypendia „Etiuda” i „Mobilność Plus” poza gratyfikacją dla Stypendysty, były przeznaczone na pokrycie kosztów stażu (i kosztów podróży) w zagranicznym ośrodku naukowym (tj. Department of Oral Immunology and Infectious Diseases, University of Louisville School of Dentistry, USA).

W ramach osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych i technologicznych należy wskazać udział Pana dr Mirosława Książek (poprzez realizację swoich badań), w przygotowanie **wniosku patentowego** (Potempa Jan S., **Książek Mirosław**, Mizgalska Danuta M., Benedyk-Machaczka Małgorzata L.) pt. „Rekombinowana miropina” (nr PCT/US2022/071178, International Application Number i WO 2022/226451 A1, International Publication Number, International Publication Date 27.10.2022 r.) **w efekcie współpracy międzynarodowej, pomiędzy Uniwersytetem Jagiellońskim, a University of Louisville (USA)**. Habilitant jako jego współtwórca oszacował swój udział procentowy na poziomie 34%.

Podsumowując dorobek naukowy Pana dr Mirosława Książek stwierdzam, że całościowo jest on znaczący i uległ istotnemu powiększeniu od czasu uzyskania stopnia doktora (22 publikacje z lat 2015-2023, w tym 4 prace składające się na osiągnięcie naukowe). Na całkowity dorobek Habilitanta składają się **32 prace naukowe** (w tym **10 prac przed uzyskaniem stopnia doktora**) o łącznym współczynniku oddziaływania IF (zgodnie z rokiem opublikowania): **160,401** (w tym **125,12 dla 22 prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora**), a sumaryczna liczba punktów wg listy rankingowej czasopism naukowych MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **2270** (w tym **320 punktów przed uzyskaniem stopnia doktora**). Liczba cytowań prac Habilitanta (bez autocytowań) z dnia 16.05.2023 wg bazy Web of Science wynosi **594** (w tym **244 przed uzyskaniem stopnia doktora**). Habilitant posiada indeks Hirscha wg Web of Science równy **14**. Jednoznacznie stwierdzam, że dorobek naukowy Pana dr Mirosława Książka w każdym z ocenianych aspektów spełnia pod względem formalnym i merytorycznym wymagania stawiane w ustawie o stopniach i tytule naukowym.

5. Ocena dorobku dydaktycznego, organizacyjnego oraz popularyzującego naukę

Pan dr Mirosław Książek posiada doświadczenie w prowadzeniu ćwiczeń, pracowni specjalistycznych i wykładów dla studentów na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii (Biochemia i fizjologia mikroorganizmów, WBT-BCH351 włącznie z przygotowaniem i opracowaniem protokołów; 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).

Habilitant brał również udział w szkoleniu, nadzorowaniu pracy i pomocy w pisaniu prac licencjackich, dyplomów magisterskich i doktorskich w Polsce (Uniwersytet Jagielloński) i w USA (University of Louisville). Na uwagę zasługuje także realizacja projektu pt. „Wgląd w biochemię, strukturę, ewolucję i biologię bakteryjnych serpin na przykładzie miropiny z ludzkiego patogenu *Tannerella forsythia*” (UMO-2015/17/B/NZ1/00666), którego Pan dr Mirosław Książek był kierownikiem. Prace wykonane w ramach tego projektu doprowadziły do przygotowania pracy mgr pt. „Hamowanie gingipainy K (Kgp) przez serpinę *Tannerella forsythia*, miropinę”. Ponadto, Habilitant sprawował również opiekę merytoryczną i pomoc w przygotowaniu 3 studentów do udziału w Research Louisville, konkursu promującego badania w dziedzinie nauk o zdrowiu (University of Louisville).

Pan dr Mirosław Książek pełnił również funkcję promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej pani mgr Ireny Waligórskiej („Charakterystyka bakteryjnych proteaz PepO z ludzkich periodontopatogenów *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythia*”, obrona 03.11.2023 r.) i pani mgr inż. Natalii Stechnij 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*” (kierownictwo Habilitanta, UMO-2021/42/E/NZ1/00083, NCN).

W ramach działalności popularyzatorskiej Habilitant w 2022 r. uczestniczył w prowadzeniu warsztatów w ramach wydarzenia Koła Naukowego Studentów Biotechnologii Mygen działającego przy Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Pan dr Mirosław Książek brał również udział w adaptacji dwóch pustych pomieszczeń na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii i przystosowaniu ich do standardów laboratorium badawczego (planowanie instalacji elektrycznych, rozmieszczenia sprzętów i mebli, a następnie ich zakup). Ponadto, uzyskał odpowiednie pozwolenia formalne na pracę z mikroorganizmami genetycznie modyfikowanymi (GMM) w przygotowanych pomieszczeniach.

Podsumowując stwierdzam, że wykazany dorobek dydaktyczny, popularyzatorski oraz organizacyjny Pana dr Mirosława Książek spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

6. Podsumowanie i wniosek końcowy

Jednoznacznie stwierdzam, że zestaw 4 publikacji, stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawione przez Pana dr Mirosława Książek, jest merytorycznie wartościowy i spełnia wymogi związane z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego. Wyżej wymienione prace zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy JCR o międzynarodowym zakresie dostępności. Ponadto, przedstawiony dorobek został znacząco poszerzony pod względem dorobku naukowego, jak i warsztatu badawczego po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Pozostały dorobek Habilitanta jest także bogaty. Wyniki uzyskanych badań były prezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych. Pan dr Mirosław Książek wypracował własny model prowadzenia badań doświadczalnych, który systematycznie udoskonalał w ramach odbytych 4-letnich staży naukowych oraz w efekcie nawiązywania współpracy z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi. Wyniki badań prezentował na różnych konferencjach zagranicznych. Wykazał się również odpowiednim dorobkiem dydaktycznym oraz osiągnięciami w zakresie działalności organizacyjnej i popularyzującej naukę.

Ostatecznie oświadczam, że osiągnięcie naukowe Pana dr Mirosława Książek ubiegającego się o nadanie stopnia doktora habilitowanego **spełnia** wszelkie wymagania określone w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (t.j. Dz.U.2023 poz. 742). W związku z powyższym **pozytywnie opiniuję wniosek Pana dr Mirosława Książek o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.**

dr hab. Beata Zalewska-Piątek, prof. uczelni

Gdańsk, 01.03.2024 r.