



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie

**AUTOREFERAT**

**dr Tomasz Prajsnar**

**Zakład Immunologii Ewolucyjnej**

**Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych**

**Wydział Biologii**

**Uniwersytet Jagielloński**

Kraków, 2023 r.

### 1. **Imię i Nazwisko:**

Tomasz Prajsnar (ORCID: 0000-0001-6562-8630)

### 2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

– **Stopień naukowy doktora (PhD)** uzyskany na Wydziale Medycyny, Stomatologii oraz Zdrowia (Faculty of Medicine, Dentistry & Health) Uniwersytetu w Sheffield (University of Sheffield), Wielka Brytania dnia 17 marca 2010 na podstawie pracy doktorskiej pod tytułem „Development, characterisation and validation of a novel model of *Staphylococcus aureus* infection in zebrafish embryos”.

Promotor: Prof. Stephen Renshaw

Promotorzy pomocniczy (co-supervisors): Prof. Simon Foster, Dr Vincent Cunliffe.

Recenzent zewnętrzny (External examiner): Dr Astrid van der Sar (Amsterdam University Medical Center)

Recenzent wewnętrzny (Internal Examiner): Dr Mark Thomas (University of Sheffield)

– **Tytuł naukowy Magistra** Biotechnologii uzyskany na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego dnia 20 czerwca 2006 na podstawie pracy magisterskiej pod tytułem „Ekspresja i oczyszczanie rekombinantowego białka EcfA”.

Promotor: Prof. dr hab. Jan Potempa

Recenzent: Prof. dr hab. Zygmunt Wasylewski

### 3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

**od X.2020:** Adiunkt badawczy (75% etatu) oraz Adiunkt badawczo-dydaktyczny (25% etatu) zatrudniony w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

**XII.2019-XII.2020:** Adiunkt badawczy zatrudniony w Zakładzie Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

**V.2017-XI.2019:** Asystent (Post-doctoral research associate) zatrudniony w Department of Infection, Immunity and Cardiovascular Disease, University of Sheffield (Wielka Brytania)

**II.2015-V.2017:** Laureat programu stypendialnego Marii Skłodowskiej-Curie (Marie Curie Individual Fellowship Framework Programme 7) zatrudniony w Institute of Biology Leiden, Leiden University (Holandia)

**III.2010-II.2015:** Asystent (Post-doctoral research associate) zatrudniony w Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield (Wielka Brytania)

#### **4. Omówienie osiągnięć o których mowa w art. 129, ust.1. pkt 2 Ustawy:**

Tytuł osiągnięcia naukowego

**Badanie interakcji gospodarz-patogen w zakażeniach bakteryjnych przy użyciu modelu danio przegowanego**

Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl powiązanych tematycznie, pięciu oryginalnych artykułów naukowych w czasopismach posiadających wysoki współczynnik wpływu (Impact Factor, IF). Wszystkie te prace, opublikowane w latach 2012-2022, zostały przygotowane i opublikowane po uzyskaniu przeze mnie doktoratu w marcu 2010 roku. Autorstwa korespondencyjne habilitanta oznaczono #.

**P01. Prajsnar TK**, Hamilton R, Garcia-Lara J, McVicker G, Williams A, Boots M, Foster SJ, Renshaw SA (2012) A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *Staphylococcus aureus* in a zebrafish model. *Cell. Microbiol.* 14, 1600-19.

(IF<sub>2012</sub> = 5,36; Punkty ministerialne<sub>2023</sub> = 140)

**P02. McVicker G, Prajsnar TK**, Williams A, Wagner NL, Boots M, Renshaw SA, Foster SJ (2014). Clonal expansion during *Staphylococcus aureus* infection dynamics reveals the effect of antibiotic intervention. *PLoS Pathog.* 10(2):e1003959.

(IF<sub>2014</sub> = 8,06; Punkty ministerialne<sub>2023</sub> = 140)

**P03. Prajsnar TK**, Serba JJ, Dekker BM, Gibson JF, Masud S, Fleming A, Johnston SA, Renshaw SA, Meijer AH (2021) The autophagic response to *Staphylococcus aureus* provides an intracellular niche in neutrophils. *Autophagy* 17(4):888-902

(IF<sub>2021</sub> = 13,39; Punkty ministerialne<sub>2023</sub> = 200)

**P04. Prajsnar TK<sup>#</sup>**, Renshaw SA, Ogryzko NV, Foster SJ, Serror P, Mesnage S (2013). Zebrafish larvae as a novel vertebrate model to dissect enterococcal disease progression. *Infect. Immun.* 81, 4271-9.

(IF<sub>2013</sub> = 4,64; Punkty ministerialne<sub>2023</sub> = 100)

**P05. Prajsnar TK<sup>#</sup>**, Michno B, Pooranachandran N, Fenton AK, Mitchell TJ, Dockrell DH, Renshaw SA (2022) Phagosomal acidification is required to kill *Streptococcus pneumoniae* in a zebrafish model. *Cell. Microbiol.*, vol. 2022, Article ID 9429516.

(IF<sub>2022</sub> = 3,40; Punkty ministerialne<sub>2023</sub> = 140)

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **34,85**

Suma punktów ministerialnych MEiN (2023 r.): **720**

Sumaryczna liczba cytowań (Scopus, stan na dzień: 14.09.2023 r.): **209**

## Zwięzłe omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

### **4.1 Wstęp**

Choroby zakaźne stanowią poważne globalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt czego najwydatniejszym przykładem z ostatnich lat jest pandemia COVID-19 wywołana wirusem SARS-CoV2. Pomimo znaczących sukcesów medycyny w drugiej połowie XX w., związanych przede wszystkim z wprowadzeniem antybiotyków i szczepionek, zakażenia bakteryjne wciąż pozostają istotną przyczyną zgonów na świecie (Ikuta et al., 2022). Z powodu rosnącej oporności bakterii, stosowane obecnie antybiotyki stają się nieskuteczne, pozbawiając nas głównego oręża w walce z bakteriami chorobotwórczymi. Ponadto, skuteczność stosowanych szczepionek jest ograniczona lub w przypadku niektórych groźnych bakterii, takich jak gronkowiec złocisty, nie udało się jak dotąd opracować szczepionki (Clegg et al., 2021). Podczas pracy nad swoim osiągnięciem habilitacyjnym

zajmowałem się badaniem przebiegu zakażenia trzema gatunkami bakterii Gram-dodatnich: gronkowcem złocistym (*Staphylococcus aureus*), paciorkowcem kałowym (*Enterococcus faecalis*) oraz dwoinką zapalenia płuc (*Streptococcus pneumoniae*).

Gronkowiec złocisty jest bakterią występującą jako komensal na skórze oraz jamie nosowej u około 30% populacji ludzkiej na świecie (Thammavongsa et al., 2015). Jednakże, jest to bakteria patogenna, często wywołująca zakażenia oportunistyczne. Posiada liczne czynniki wirulencji, które ułatwiają jej przekraczanie bariery skórnej i dostęp do głębiej położonych tkanek. Gronkowiec złocisty powoduje szerokie spektrum chorób szpitalnych i pozaszpitalnych, od miejscowych zakażeń skóry i tkanek miękkich do ciężkich stanów o wysokiej śmiertelności, takich jak zapalenie kości i szpiku, infekcyjne zapalenie wsierdzia czy sepsa (Tong et al., 2015).

Z kolei, paciorkowiec kałowy jest również komensalną bakterią, która kolonizuje przewód pokarmowy człowieka i zwierząt. Niestety, bakteria ta jest także odpowiedzialna za szeroki zakres zakażeń, głównie szpitalnych, w tym zagrażającą życiu bakteriemię, infekcyjne zapalenie wsierdzia oraz zakażenia ran i dróg moczowych (Arias & Murray, 2012). Choroby wywołane przez *E. faecalis* mogą być bardzo trudne do leczenia, ze względu na wysoką oporność tego organizmu na antybiotyki. Ponadto, enterokoki stanowią rezerwuuar genów nadających antybiotykooporność, które mogą przekazywać innym bakteriom. Przykładowo, gronkowiec złocisty uzyskał oporność na wankomycynę poprzez horyzontalny transfer genów właśnie od enterokoków (Palmer et al., 2010).

Ostatnią groźną bakterią, zakażenia którą badałem, jest dwoinka zapalenia płuc. Bakteria ta jest fakultatywnie beztlenowym patogenem oportunistycznym. Kolonizuje przede wszystkim śluzówkę górnych dróg oddechowych. Występuje u blisko 10 % dorosłych, natomiast w przypadku dzieci wskaźnik kolonizacji osiąga nawet 30% (Yahiaoui et al., 2016). Bakteria ta wywołuje także szereg ciężkich stanów chorobowych gdzie śmiertelność może sięgać 30%, w tym pozaszpitalne zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowych, a także sepsę (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013).

Powszechne stosowanie terapii przeciwdrobnoustrojowych przyczyniło się do powstania oporności pneumokoków, natomiast zmienność ich serotypów stanowi wyzwanie dla skuteczności opracowanych szczepionek (van der Poll & Opal, 2009).

Badane przeze mnie bakterie znajdują się na liście priorytetowych patogenów WHO dla badań i rozwoju nowych antybiotyków (<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of->

bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed). Stanowią one zatem poważny problem w światowej opiece zdrowotnej i wobec tego niezbędne są badania, które pozwolą lepiej zrozumieć proces infekcji, odpowiedź immunologiczną na nie oraz opracować nowe sposoby leczenia.

Przebieg zakażeń bakteryjnych jest najczęściej badany eksperymentalnie przy wykorzystaniu hodowli komórkowych oraz modeli zwierzęcych. Obydwa te podejścia stanowią obecnie podstawowe narzędzia w badaniach biomedycznych. Jednakże, to modele zwierzęce dają wyjątkową okazję do zbadania funkcji konkretnych genów, szlaków sygnałowych oraz mechanizmów działania leków *in vivo*. Do badania przebiegu infekcji wykorzystywany jest szereg modeli zwierzęcych, od prostych bezkręgowców po ssaki. W ostatnich latach, coraz więcej badań interakcji gospodarz-patogen prowadzi się z wykorzystaniem organizmu modelowego jakim jest danio pręgwaney (łac. *Danio rerio*, ang. zebrafish) (Stream & Madigan, 2022). Jest to niewielka słodkowodna ryba z rodziny karpowatych. Przezroczystość stadiów embrionalnych oraz larwalnych danio pręgowanego umożliwia obrazowanie przyżyciowe oraz analizę wielu procesów fizjologicznych w czasie rzeczywistym (Torraca et al., 2014). Podatność tego organizmu modelowego na modyfikacje genetyczne daje możliwość wyciszenia wybranych genów w początkowych stadiach rozwoju (ang. knock-down), dzięki użyciu antynensownych oligonukleotydów zwanych morpholino, a także ich wyłączenia (ang. knock-out) przy użyciu technologii CRISPR (Liu et al., 2019). Ponadto, model danio pręgowanego umożliwia generowanie szerokiej gamy linii transgenicznych posiadających wyznakowane za pomocą białek fluorescencyjnych komórki lub ich komponenty (Masud et al., 2017). Zastosowanie tej technologii, w optycznie przezroczystym stadium larwalnym danio pręgowanego, umożliwia unikalną nieinwazyjną analizę mikroskopową prowadzoną w żywym organizmie kręgowca, także umożliwiając obserwację interakcji gospodarz-patogen *in vivo*.

Jako organizm należący do zuchwowców, dorosłe osobniki danio pręgowanego posiadają zarówno wrodzony jak i nabyty układ odporności, homologiczny do ssaczego. Cechą charakterystyczną modelu larwalnego danio pręgowanego jest natomiast brak odporności nabytej, co umożliwia badanie roli układu wrodzonego bez interferencji ze strony odporności swoistej. Danio pręgowany sprawdził się już w badaniach patogenezy chorób zakaźnych. Przykładowo, model ten miał kluczowe znaczenie w zrozumieniu procesów formowania się ziarniniaków podczas rozwoju gruźlicy (Stream & Madigan, 2022).

Celem prac wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia naukowego była analiza przebiegu zakażeń bakteryjnych, interakcji gospodarz-patogen, mechanizmów wrodzonej odpowiedzi przeciwbakteryjnej oraz roli czynników wirulencji w zakażeniach bakteryjnych z wykorzystaniem modelu badawczego danio pręgowanego.

#### **4.2 Badanie zakażenia gronkowcem złocistym przy użyciu modelu danio pręgowanego**

Jak wspomniano wcześniej, *Staphylococcus aureus* stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, powodując zagrażające życiu inwazyjne zakażenia, takie jak zapalenie wsierdza, zapalenie kości, a także sepsę (Tong et al., 2015). Jednakże mechanizmy, dzięki którym dochodzi do infekcji, tworzenia ropni oraz bakteriemii nie są dobrze zdefiniowane (Cheng et al., 2011). Pomimo iż wykazano, że profesjonalne fagocyty takie jak neutrofile i makrofagi odgrywają rolę ochronną w zakażeniu *S. aureus* (Verdrengh & Tarkowski, 1997, 2000), gronkowce są w stanie przetrwać wewnątrzkomórkowo w obrębie fagocytów a następnie mogą doprowadzić do ich lizy (Gresham et al., 2000; Kubica et al., 2008). Ponadto, fagocyty odgrywają ważną rolę w rozprzestrzenianiu się zakażenia gronkowcowego do odległych tkanek (Pollitt et al., 2018; Thwaites & Gant, 2011). Procesy, dzięki którym gronkowiec złocisty unika odpowiedzi ze strony układu odpornościowego gospodarza pozostają jednak słabo poznane.

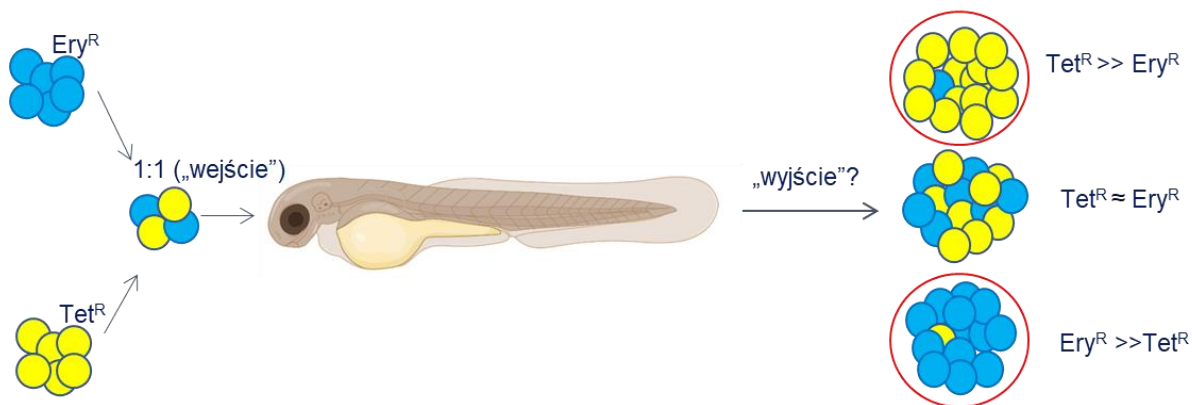
Z tego powodu, po uzyskaniu stopnia doktora, skoncentrowałem się na badaniach przebiegu zakażenia gronkowcem złocistym ze szczególnym naciskiem na interakcję tej bakterii z fagocytami. W tym celu wykorzystałem model zakażenia danio pręgowanego, który ustanowiłem podczas doktoratu (Prajsnar et al., 2008). W pracy tej ustaliliśmy, że przeżycie gospodarza jest zależne od komórek fagocytarnych oraz, że podobnie jak w innych modelach zwierzęcych, do wywołania śmiertelnego zakażenia wymagana jest relatywnie wysoka dawka infekcyjna bakterii (inokulum, wynoszące ok. 1500 CFU), a śmiertelne zakażenie skutkuje pojawieniem się ognisk przypominających ropnie oraz wzrostem liczby bakterii do około  $10^6$  CFU.

Z kolei celem mojej pierwszej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego (Prajsnar et al., 2012, **P01**) było zbadanie przebiegu infekcji gronkowcem złocistym skupiając się na dynamice wzrostu populacji bakterii w organizmie gospodarza, a także na wpływie fagocytów na rozwój zakażenia.

Przed rozpoczęciem badań postawiono sobie pytania czy podczas infekcji prowadzącej do śmierci gospodarza dawka infekcyjna bakterii podlega równomiernemu wzrostowi w organizmie gospodarza czy tylko niewielka frakcja podanego inokulum ulega klonalnej ekspansji. Badanie dynamiki populacji polegało na zastosowaniu metody mieszanego inokulum w stosunku 1:1, składającego się z dwóch izogenicznych szczepów gronkowca wyznakowanych genami oporności na dwa różne antybiotyki – tetracyklinę oraz erytromycynę. Dzięki temu, byliśmy w stanie podczas zakażenia oznaczyć nie tylko bezpośrednią liczbę bakterii w organizmie gospodarza (CFU counts), ale także ocenić czy dochodzi do odstępstw od wyjściowej proporcji (50:50) podanych szczepów.

Jak pokazano na Rycinie 1, larwom danio pręgowanego podano po około 750 CFU każdego szczepu bakterii, a następnie, ze śmiertelnie zainfekowanych larw wyizolowano bakterie i oznaczono liczbę bakterii należących do danego szczepu. Jak się spodziewano całkowita liczba bakterii w śmiertelnie zainfekowanych larwach wynosiła około  $10^6$  CFU, co wykazaliśmy we wcześniejszej publikacji (Prajnsnar et al., 2008). Jednakże analiza proporcji dwóch szczepów bakteryjnych wykazała, że w wielu larwach końcowa populacja bakterii była asymetrycznie rozłożona, czasami z bardzo zdecydowaną dominacją jednego lub drugiego ze szczepów. Przyjęto zatem hipotezę, że taka nieoczekiwana nadreprezentacja skrajnych proporcji szczepów może powstać w wyniku klonalnej ekspansji pojedynczych bakterii, co skutkuje powstaniem ognisk infekcji z jednego typu bakterii.

Mieszane inokulum (1:1 Tet<sup>R</sup>/Ery<sup>R</sup>; 750 CFU każdy)



Rycina 1. Schemat badania dynamiki populacji bakteryjnej podczas zakażenia *in vivo*. Tet<sup>R</sup> – szczep oporny na tetracyklinę, Ery<sup>R</sup> – szczep oporny na erytromycynę.

W celu weryfikacji powyższej hipotezy wykorzystano przezroczystość larw danio pręgowanego, która umożliwiła nam bezpośrednią obserwację tego zjawiska *in vivo* przy użyciu białek fluorescencyjnych: zielononiebieskiego białka fluorescencyjnego (Cyan Fluorescent Protein) i



żółtego białka fluorescencyjnego (Yellow Fluorescent Protein) (Veening et al., 2004). Stworzyliśmy zatem plazmidy, dzięki którym byliśmy w stanie wyznaczyć dwa użyte wcześniej szczepy przy pomocy wspomnianych dwóch różnych znaczników fluorescencyjnych. Zaobserwowano, że zdecydowana większość ognisk bakteryjnych została utworzona wyłącznie przez bakterie z pojedynczym białkiem fluorescencyjnym, co potwierdziło nasze wcześniejsze obserwacje związane z klonalną ekspansją bardzo niewielkiej liczby bakterii z początkowego inokulum. Przyjęliśmy zatem, że ogniska chorobowe są prawdopodobnie inicjowane przez jedną bakterię (lub bardzo niewielką ilość bakterii), ponieważ większa liczba „inicjatorów” byłaby odzwierciedlona w ogniskach mieszanych - zawierających 2 szczepy bakterii/dwa znaczniki fluorescencyjne.

Następnie wykazaliśmy, że zaobserwowane zjawisko klonalnej ekspansji jest zależne od fagocytów, ponieważ genetyczne usunięcie makrofagów oraz neutrofilii przy pomocy antysensownych oligonukleotydów (morpholinos) przeciw *pu.1* (stanowiącego czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za różnicowanie fagocytów) spowodowało kompletny zanik ekspansji klonalnej i wszystkie śmiertelnie zakażone larwy wykazywały obecność 2 typów bakterii w równych proporcjach.

Wykonany przez moją współpracownicę (Ruth Hamilton), matematyczny model progresji choroby potwierdził naszą hipotezę, że tylko kilka fagocytów, spośród około 150 obecnych w larwach w tym stadium rozwoju, jest odpowiedzialnych za „selekcję” klonów bakteryjnych i późniejszą inicjację letalnego zakażenia.

Następnie podjęliśmy próbę ustalenia, który z typów fagocytów, makrofagi czy neutrofile, jest odpowiedzialny za zjawisko selekcji wspomnianej bardzo niewielkiej ilości bakterii prowadzącej do ich klonalnej ekspansji. W tym celu, dokonaliśmy specyficznej ablacji makrofagów lub neutrofilii przy wykorzystaniu transgenicznych linii ryb wykazujących w określonych typach komórek żernych ekspresję nitroreduktazy, oraz metronidazolu, który ulega konwersji do cytotoksycznej substancji w komórkach zawierających nitroreduktazę. Dzięki tej metodzie uzyskaliśmy specyficzną ablację danego typu fagocytu na poziomie nieznacznie przekraczającym 50%. Zgodnie ze wspomnianymi danymi literaturowymi (Verdrengh & Tarkowski, 1997, 2000) wykazaliśmy, że zarówno makrofagi, jak i neutrofile odgrywają protekcyjną rolę w zapobieganiu zakażeniu gronkowcem złocistym, ponieważ larwy poddane ablacji były znacznie bardziej podatne na zakażenie w porównaniu z larwami kontrolnymi. Jednakże, nawet częściowa utrata neutrofilii prowadziła do istotnie

statystycznego zmniejszenia zjawiska klonalnej selekcji w porównaniu do larw poddanych ablacji makrofagów, co sugeruje, że to neutrofile stanowią wewnątrzkomórkowy rezerwuar (niszę) bakterii, co w efekcie prowadzi do późniejszej śmiertelnej infekcji.

W końcowej części pracy, dzięki danym uzyskanym na modelu danio pręgowanego, podjęliśmy się wstępnej analizy systemowego zakażenia gronkowcem złocistym na modelu mysim. Myszy, którym podano dożylnie mieszane inokulum w równych proporcjach (znakowane genami oporności na tetracyklinę oraz erytromycynę) po około tygodniu poddano eutanazji, a następnie wyizolowano nerki, w których lokalizują się bakterie w postaci ropni (Cheng et al., 2011). Okazało się, że każde z ognisk zakażenia (ropni nerek), również zawiera tylko jeden szczep bakterii. A zatem (podobnie jak u danio pręgowanego) każdy z ropni jest najprawdopodobniej zainicjowany przez pojedynczą komórkę bakteryjną.

Rezultaty tej pracy podkreślają translacyjną wartość modelu danio pręgowanego, gdzie wyniki uzyskane na modelu rybim zostały potwierdzone na modelu ssaczym. Wspierają także wcześniejsze argumenty, że strategie terapeutyczne wobec gronkowca złocistego powinny uwzględniać zarówno zewnątrzkomórkowe jak i wewnątrzkomórkowe (wewnątrzfagocytarne) aspekty zakażenia.

Kontynuacją publikacji **P01** stanowi praca McVicker et al. (2014) - **P02**, w której wraz z Dr. Gareth McVicker udoskonaliliśmy metody badania dynamiki infekcji na modelach infekcyjnych danio pręgowanego oraz myszy, a następnie ustaliliśmy wpływ niskich dawek antybiotyku na populację bakterii *in vivo*.

Pierwsza część pracy polegała na udoskonaleniu badań dynamiki infekcji do zbadania progresji choroby zarówno u larw danio pręgowanego, jak i u myszy. W tym celu, skonstruowano zestaw trzech odpornych na różne antybiotyki szczepów bakterii w tym samym tle genetycznym. W pierwszej kolejności zweryfikowano działanie nowo skonstruowanych szczepów na modelu larw danio pręgowanego. Zgodnie z wcześniejszymi wynikami z dwoma szczepami (Prajsnar et al., 2012), podanie mieszaniny trzech szczepów bakterii larwom danio pręgowanego wykazało ich klonalną ekspansję gdzie jeden lub dwa szczepy dominowały po izolacji bakterii ze śmiertelnie zakażonych larw. Zatem, zastosowanie trzech szczepów bakterii okazało się odpowiednią i wiarygodną metodą badania dynamiki zakażenia *in vivo* i potwierdziło istnienie ekspansji klonalnej

gdzie bardzo niewielka ilość komórek bakteryjnych rozpoczyna proliferację prowadząc do śmiertelnej infekcji gospodarza.

Następnie, inokulum składające się z trzech szczepów bakterii wykorzystano do badania dynamiki rozwoju uogólnionego zakażenia gronkowcem złocistym myszy. Zwierzęta zostały zakażone dożylnie mieszanym inokulum 3 szczepów bakterii. Następnie, w kolejnych punktach czasowych po zakażeniu myszy poddawano eutanazji, a ich narządy (nerki, wątroba, śledziona, serce i płuca) były pobierane w celu oznaczenia liczby oraz proporcji szczepów bakterii. Wykazano, że w ciągu pierwszych kilku godzin zakażenia, znaczna część inokulum bakteryjnego trafiła do wątroby i śledziony. Na tym etapie infekcji nie obserwowano ani ogólnego wzrostu liczby bakterii ani skrajnej klonalności co sugeruje, że proliferacja drobnoustrojów była niewielka. W miarę postępu infekcji, liczba bakterii w wątrobie oraz śledzionie spadała, natomiast bakterie występowały w coraz większych ilościach w nerkach (osiągając szczytowe wartości w 2-3 dniu po zakażeniu). W przeciwieństwie do wątroby i śledziony, bakterie w nerkach wykazywały wysoki stopień klonalnej ekspansji, w większości przypadków reprezentując tylko jeden lub dwa szczepy z trzech podanych podczas iniekcji. Zatem każdy z ropni w nerkach, które tworzą się w późniejszych stadiach infekcji, prawdopodobnie pochodzi od jednej bakterii tzw. „założyciela”. Podsumowując, analiza populacji bakterii podczas zakażenia uogólnionego myszy wykazała, że zjawisko ekspansji klonalnej nie występuje we wszystkich badanych organach i następuje na późniejszych etapach zakażenia.

W dalszej części pracy postanowiliśmy zbadać czy zaobserwowana przez nas ekspansja klonalna bakterii może mieć implikacje w przebiegu zakażeń mieszanych, zwłaszcza gdy mutant oporny na leki jest obecny wśród populacji wrażliwych mikroorganizmów. Postawiliśmy hipotezę, że niska dawka antybiotyku, tj. taka, która nie wywołuje żadnego efektu terapeutycznego u gospodarza zakażonego szczepem bakterii wrażliwym na antybiotyk, może nadal dawać przewagę bakteriom opornym, co zostało wcześniej zaobserwowane *in vitro* (Gullberg et al., 2011).

Dzięki stworzonym przez nas modelom badania dynamiki infekcji, zbadaliśmy wpływ niskich (subterapeutycznych) dawek antybiotyków na selekcję szczepów gronkowca złocistego *in vivo*. Najpierw ustaliliśmy niską dawkę tetracykliny, która nie była w stanie wpłynąć na śmiertelność larw danio przegowanego zakażonych szczepem bakterii wrażliwych na ten antybiotyk, ani nie owocowała obniżoną obecnością wrażliwych bakterii w momencie śmierci gospodarza (2,5 µg/ml). Następnie, mieszaninę szczepów bakterii opornych oraz wrażliwych na tetracyklinę podaliśmy

larwom danio pręgowanego, a zakażone osobniki były umieszczone w roztworze zawierających wcześniej ustaloną subterapeutyczną dawkę tetracykliny. Wykazaliśmy, że w obecności niskiej dawki tetracykliny, bakterie odporne na ten antybiotyk przeważały w śmiertelnie zakażonych larwach, dając tym bakteriom przewagę podczas zakażenia *in vivo*. Co ciekawe, genetyczne usunięcie fagocytów całkowicie zniósło efekt selekcji klonów antybiotykoopornych przy nawet 4-krotnie wyższej dawce tetracykliny (10 µg/ml), wskazując na istotną rolę fagocytów, nie tylko w procesie ekspansji klonalnej (Prajsnar et al., 2012), ale także selekcji klonów opornych na antybiotyki.

W kolejnych eksperymentach, zaobserwowaliśmy także, że selekcja opornych klonów bakterii *in vivo* występuje także wśród innych szczepów gronkowca, a także innych rodzajów bakterii oraz klas antybiotyków. Wykazaliśmy także, że selekcja antybiotykoopornych klonów bakterii *in vivo* w obecności subterapeutycznych dawek antybiotyku zachodzi u również u myszy.

Reasumując, w pracy tej ustaliliśmy, że możliwe jest uzyskanie przewagi przez szczep bakterii odpornych na antybiotyki, nawet przy poziomach antybiotyków, które nie wpływają na tempo wzrostu szczepu bakterii wrażliwych na antybiotyki lub jego zdolność do wywołania śmiertelnej infekcji. Wyniki tej publikacji mogą mieć istotne znaczenie przy ustalaniu właściwej strategii antybiotykoterapii (odpowiedniej dawki oraz czasu leczenia), a także wpływu terapii na lekooporność patogenów bakteryjnych.

Kontynuację pracy opisanej w publikacji **P01** stanowiła także publikacją Prajsnar et al. (2021) – **P03**. Jej celem było zdefiniowanie potencjalnej niszy wewnątrzkomórkowej, która umożliwia przeżycie gronkowców, a także rozprzestrzenianie się zakażenia, co było postulowane we wcześniejszych badaniach, także w **P01**. W publikacji skupiliśmy się na mechanizmach autofagii w odpowiedzi na zakażenie gronkowcem ze szczególnym uwzględnieniem neutrofili, które w **P01** wstępnie wytypowałem jako odpowiedzialne za rozwój infekcji.

Autofagia jest to ewolucyjnie konserwatywny proces komórkowy polegający na degradacji różnych składników cytoplazmy przy pomocy lizosomów (Ohsumi, 2014). W ostatnich latach wykazano, że mechanizm ten stanowi także ważny element autonomicznej obrony komórki przed drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi (Deretic, 2011). Jeden z rodzajów tej przeciwbakteryjnej autofagii, zwany ksenofagią, polega na selektywnej degradacji bakterii, które uszkodziły bądź uciekły z fagosomów.

Proces ten wymaga użycia receptorów ubikwityny, takich jak SQSTM1/p62, a następnie powstania autofagosomu zawierającego białko LC3. Innym procesem zależnym od składników autofagii oraz reaktywnych form tlenu (ROS) jest tak zwana fagocytoza związana z LC3 (ang. LC3-associated phagocytosis - LAP) gdzie białko LC3 jest rekrutowane do błony fagosomu co prowadzi do powstania tzw. LAPosomu (Muñoz-Sánchez et al., 2020).

Wcześniejsze dane literaturowe powstałe w wyniku badań autofagii na nieprofesjonalnych fagocytach zakażonych gronkowcem złocistym dostarczały sprzecznych wyników. Jedna publikacja postulowała szkodliwą rolę autofagii dla komórek gospodarza (Schnaith et al., 2007). Natomiast w innej pracy autofagia okazała się korzystna w zwalczaniu wewnątrzkomórkowych zakażeń gronkowcem (Neumann et al., 2016). Ponadto, dokładny mechanizm przebiegu autofagii w profesjonalnych fagocytach oraz jej rola w patogenezie pozostawały wówczas nieznane.

Wobec tego, w pierwszej części pracy, wykorzystując model danio pręgowanego, podjęliśmy się charakteryzacji odpowiedzi autofagicznej na zakażenie gronkowcem złocistym wewnątrz makrofagów oraz neutrofilów. Przy użyciu różnych linii transgenicznego danio pręgowanego gdzie białko Lc3 poddano fuzji z GFP umożliwiając wizualizację autofagosomów lub LAPosomów, ustaliliśmy, że w obydwu typach komórek fagocytarnych dochodzi do dekoracji pęcherzyków zawierających gronkowce przez białko Lc3 wskazując na obecność odpowiedzi autofagicznej. Natomiast, kinetyka tej odpowiedzi była różna dla danego typu fagocytu. Liczba zakażonych makrofagów zawierających pęcherzyki Lc3-dodatnie spadała w ciągu 6 godzin po zakażeniu, natomiast liczba neutrofilów z pęcherzykami Lc3-dodatnimi pozostawała na niezmiennie wysokim poziomie przez przynajmniej 6 godzin. Wynik ten sugeruje potencjalne hamowanie przepływu autofagicznego w neutrofilach zakażonych gronkowcem złocistym. Ponadto, przy pomocy barwników fluorescencyjnych zależnych od pH zaobserwowaliśmy, że w neutrofilach Lc3-dodatnie pęcherzyki zawierające gronkowce nie ulegały zakwaszeniu.

Ustaliliśmy, że zaobserwowana odpowiedź autofagiczna w makrofagach oraz neutrofilach jest zależna od występującej w fagocytach oksydazy NADPH. Zarówno chemiczna jak i genetyczna inhibicja tego enzymu, odpowiedzialnego za produkcję ROS, konkretnie anionu ponadtlenkowego, hamowały dekorowanie białkiem Lc3, sugerując, że obserwowana odpowiedź to LAP, która jest zależna od ROS. Zahamowanie oksydazy NADPH doprowadziło natomiast do zakwaszenia pęcherzyków zawierających gronkowce w neutrofilach, co następnie skutkowało zwiększeniem

odporności gospodarza na zakażenie. Zatem, to odpowiedź typu LAP w neutrofilach, zależna od aktywności oksydazy NADPH i obecności wolnych rodników tlenowych, okazała się sprzyjająca rozwojowi zakażenia gronkowcem złocistym. Natomiast, LAPosomy wewnątrz neutrofilów mogą stanowić, postulowaną wcześniej, wewnątrzkomórkową niszę sprzyjającą patogenezie gronkowca.

W dalszej części pracy, wykazaliśmy, że wewnątrz neutrofilów, do pęcherzyków zawierających gronkowca rekrutowane jest także białko Sqstm1/p62, które jest receptorem selektywnej autofagii. Zatem, oprócz odpowiedzi typu LAP, także ksenofagia może zachodzić w zakażonych neutrofilach. Co ciekawe, zablokowanie tworzenia LAPosomów, przez inhibicję oksydazy NADPH, doprowadziło do znacznego zmniejszenia liczby neutrofilów zawierających pęcherzyki Sqstm1/p62-pozytywne. Odkrycie to rzuciło światło na kolejność tych odpowiedzi w zakażonych neutrofilach. Uzналиśmy, że w pierwszej kolejności następuje odpowiedź typu LAP, a później, najprawdopodobniej po uszkodzeniu LAPosomów przez bakterie, uruchamiana jest odpowiedź typu ksenofagia. Co istotne, inokulacja bakteriami inaktywowanymi termicznie prowadziła do istotnego zmniejszenia liczby zakażonych neutrofilów zawierających pęcherzyki Sqstm1/p62-pozytywne. Wynik ten wspiera powyższą hipotezę, że to aktywne bakterie są odpowiedzialne za uszkodzanie LAPosomów, co z kolei, przy udziale białek receptorowych typu Sqstm1/p62, aktywuje ksenofagię.

Podsumowując, w pracy tej udało się zidentyfikować nową formę niekanonicznej autofagii wewnątrz profesjonalnych fagocytów w odpowiedzi na zakażenie gronkowcem złocistym, zwaną LAP. Uzyskane wyniki potwierdzają istotną rolę neutrofilów w rozwoju zakażenia gronkowcem złocistym, w nich bowiem zlokalizowaliśmy niszę, w której „ukrywały się” bakterie. Była ona zależna od LAP i prowadziła do rozprzestrzeniania się zakażenia. Ponadto, zaobserwowana w tej pracy antagonistyczna rola maszynerii autofagicznej (odpowiedź za pośrednictwem LAP vs. Sqstm1/p62) w neutrofilach może wyjaśniać opublikowane wcześniej sprzeczne doniesienia na temat roli autofagii wobec gronkowca złocistego. Wyniki tej pracy dostarczają nowych informacji na temat strategii terapeutycznych przeciwko gronkowcom w leczeniu systemowej infekcji i sepsy.

#### **4.3 Badanie przebiegu zakażenia paciorkowcem kałowym przy użyciu modelu danio pręgowanego**

Kontynuując badania zakażeń bakteryjnych przy użyciu modelu danio pręgowanego, postanowiłem opracować model infekcji larw danio pręgowanego inną bakterią Gram-dodatnią - paciorkowcem

kałowym (*Enterococcus faecalis*). W pracy tej (P04) wykorzystałem swoje szerokie doświadczenie oraz opracowaną przeze mnie metodologię z użyciem modelu larwalnego danio pręgowanego. Ustanowienie nowego modelu umożliwiło później szereg dalszych odkryć opisanych w pracach oryginalnych z moim udziałem, choć nie wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

W pierwszej części pracy, w celu ustanowienia nowego modelu zakażenia, użyłem trzech różnych szczepów *E. faecalis*: OG1RF, V583 oraz JH2-2. Szczepy OG1RF i V583 to izolaty kliniczne szeroko stosowane do badania patogenezy *E. faecalis*, natomiast JH2-2 to niewirulentny szczep laboratoryjny wykorzystywany głównie do badań genetycznych. Szczepy te zostały podane dożylnie larwom danio pręgowanego w różnych dawkach wg wcześniej opracowanej metody mikroiniekcji (Prajnsar et al., 2008, 2012), a następnie przeprowadzono analizę przeżywalności zakażonych larw, pomiar wzrostu bakterii *in vivo* oraz wykonano obrazowanie mikroskopowe (przy pomocy szczepów bakterii wyznakowanych białkiem GFP).

Badane szczepy bakterii wykazały się zupełnie odmiennymi właściwościami wirulencji. Ustaliliśmy, że szczep JH2-2 jest awirulentny nawet przy bardzo wysokich dawkach rzędu 10000 CFU, natomiast szczep OG1RF jest zdolny do wywołania 50% śmiertelności już przy dawce około 1500 CFU. Szczep V585 charakteryzował się pośrednim fenotypem i potrzebował około 12000 CFU do wywołania 50% śmiertelności zakażonych larw. Do dalszych badań użyliśmy zatem dwóch szczepów *E. faecalis*: awirulentnego JH2-2 oraz wysoce patogenego OG1RF. Badanie kinetyki poziomu bakterii tych dwóch szczepów wykazało, że patogeny szczep OG1RF gwałtownie namnażał się wewnątrz zakażonych larw osiągając wartość  $10^6$  CFU na larwę, natomiast ilość niepatogennych bakterii JH2-2 pozostawała na stałym poziomie przez przynajmniej 2 dni po infekcji. Badanie mikroskopowe zakażonych przez obydwie szczepy bakterii znakowane GFP potwierdziły wcześniejsze wyniki - larwy zakażone OG1RF rozwinęły zmiany przypominające martwicę tkanek w miejscach wzrostu bakterii, także poza układem krwionośnym. Natomiast larwy zakażone fluorescencyjnym szczepem JH2-2 pozostały nienaruszone morfologicznie, a występowanie fluorescencyjnych bakterii było ograniczone do niewielkich ognisk pozostających w układzie krwionośnym.

Korzystając z przezroczystości larw oraz dostępnych linii transgenicznych danio pręgowanego, następnie zbadano odpowiedź komórek wrodzonego układu odporności. Wykazaliśmy, że u larw danio pręgowanego zakażonych 1500 CFU fluorescencyjnego *E. faecalis* OG1RF, duża część

bakterii fluorescencyjnych była zdolna do unikania fagocytozy i pozostawała wolna w krwioobiegu. Natomiast enterokoki szczepu JH2-2, choć podane w znacznie wyższej dawce (10 000 CFU), były szybko internalizowane przez makrofagi. Co ciekawe, usunięcie komórek wrodzonego układu odporności, prowadziło do gwałtownej śmierci larw zakażonych szczepem OG1RF, natomiast szczep JH2-2 pomimo, że był zdolny do intensywnej proliferacji wewnątrz gospodarza pozbawionego fagocytów, nie był w stanie wywołać objawów chorobowych w postaci uszkodzenia tkanek, co obserwowano w zakażeniach szczepem OG1RF.

Stworzony w tej pracy model zakażenia pozwolił także na ustalenie roli niektórych czynników wirulencji *E. faecalis* w przebiegu uogólnionego zakażenia. Dzięki zastosowaniu mutantów szczepu OG1RF, zidentyfikowaliśmy dwa kluczowe etapy zakażenia systemowego tj. 1 - unikanie fagocytozy przez makrofagi, w czym pośredniczył ramnopolisacharyd Epa (ang. enterococcal polysaccharide antigen) znajdujący na powierzchni bakterii, a następnie 2 - uszkodzenie tkanek za pośrednictwem proteaz bakteryjnych kontrolowanych przez system quorum sensing Fsr paciorkowca. Wykazaliśmy także, że heterologiczna ekspresja operonu *fsr* szczepu OG1RF w szczepie JH2-2 przywraca jego wirulencję oraz zdolność do uszkodzania tkanek w larwach pozbawionych fagocytów.

Podsumowując, publikacja ta pokazała, że danio pręgowany jest użytecznym modelem do badania patogenezы paciorkowca kałowego, umożliwiającym zbadanie mechanizmów wirulencji enterokokowej. Nowy model umożliwił poznanie złożonych mechanizmów infekcji *E. faecalis in vivo* w czasie i przestrzeni, od początkowej interakcji z wrodzonym układem odpornościowym gospodarza, poprzez działanie bakteryjnego quorum sensing *in vivo*, następnie degradacji tkanek gospodarza prowadzącej do jego śmierci. Nasze badania wykazały, że larwy danio pręgowanego stanowią atrakcyjny alternatywny system modelowy do badania interakcji gospodarz-patogen podczas infekcji *E. faecalis*, umożliwiając identyfikację wchodzących w tą interakcję składników odporności gospodarza jak i czynników wirulencji patogenu. Ponadto, ustanowiony przeze mnie w tej pracy model został wykorzystany w kolejnych badaniach opublikowanych w następnych pracach, w których jestem współautorem opisujących kolejne czynniki wirulencji paciorkowca kałowego oraz ich interakcję z układem odporności gospodarza (Salamaga et al., 2017; Smith et al., 2019).



#### **4.4 Badanie roli fagocytów oraz mechanizmów wewnątrzkomórkowej degradacji bakterii dwoinki zapalenia płuc przy użyciu modelu danio pręgowanego.**

Jak wcześniej wspomniano, dwoinka zapalenia płuc (pneumokok) jest głównym ludzkim patogenem powodującym inwazyjne i zagrażające życiu stany chorobowe i pozostaje poważną przyczyną globalnej śmiertelności w zakażeniach bakteryjnych. Zrozumienie roli fagocytów w neutralizacji bakterii jest nadal ograniczone, zwłaszcza *in vivo*, ponieważ większość badań zakażenia pneumokiem wykonano przy pomocy metod *in vitro*. Z tego powodu, celem mojej piątej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego (P05) było stworzenie modelu *in vivo* zakażenia pneumokiem, a następnie zbadania interakcji pomiędzy pneumokokami a profesjonalnymi fagocytami, takimi jak makrofagi i neutrofile. W dalszej kolejności postanowiono także zbadać mechanizmy zabijania pneumokoki przez komórki odpornościowe.

W celu ustanowienia modelu zakażenia pneumokiem, wykonaliśmy iniekcje dożylnie różnymi dawkami dwóch szczepów bakterii: typem dzikim D39 zawierającym otoczkę polisacharydową (capsule) oraz jego izogenicznym mutantem pozbawionym otoczki - D39  $\Delta cps$ . W początkowej fazie badań, potwierdziliśmy kluczową rolę otoczki w promowaniu wirulencji pneumokoków poprzez hamowanie fagocytozy przez komórki żerne gospodarza. Zaobserwowaliśmy, że pneumokoki pozbawione otoczki (D39  $\Delta cps$ ) są szybko internalizowane przez makrofagi, co prowadzi do przeżycia zakażonego gospodarza nawet jeśli został zakażony wysokimi dawkami bakterii rzędu 3000 CFU. Ponadto wykazaliśmy, że bakterie pozbawione otoczki nie są w stanie proliferować wewnątrz gospodarza i są neutralizowane w ciągu jednego dnia od zakażenia. Natomiast, niskie dawki pneumokoków dzikiego typu D39 spowodowały 100% śmiertelność zakażonych larw w ciągu 48 godzin po zakażeniu, a bakterie namnażały się do poziomu przekraczającego  $10^5$  CFU w momencie śmierci gospodarza.

Szczegółowa analiza mikroskopowa interakcji bakterii z komórkami fagocytarnymi gospodarza (makrofagami oraz neutrofilami) wykazała znaczącą rolę makrofagów w gwałtownej internalizacji pneumokoków pozbawionych otoczki. Zdecydowana większość podanego inokulum szczepu D39  $\Delta cps$  została sfagocytowana przez makrofagi już w ciągu 1 godziny od zakażenia. Natomiast, aktywność neutrofile w internalizacji bezotoczkowych pneumokoków była bardzo niewielka. W przypadku typu dzikiego pneumokoków (D39), makrofagi były w stanie internalizować tylko około

25% pneumokoków w ciągu 4 godzin od zakażenia, przy minimalnej aktywności fagocytarnej neutrofilii.

Wykorzystując genetycznie indukowaną deplecję makrofagów, potwierdziliśmy kluczową rolę makrofagów w usuwaniu bakterii. Larwy danio pręgowanego, które zostały pozbawione makrofagów umożliwiły pneumokokom D39  $\Delta cps$  (które są awirulentne dla dzikich larw) gwałtowną proliferację *in vivo* co prowadziło do 100% śmiertelności. W następnej części pracy, przy pomocy barwników fluorescencyjnych zależnych od pH (Prajsnar et al., 2021), zaobserwowaliśmy, że po internalizacji pneumokoków przez makrofagi, fagosomy zawierające bakterie ulegają szybkiemu zakwaszeniu. W celu ustalenia roli zaobserwowanego zakwaszania, zastosowaliśmy genetyczną i chemiczną inhibicję wakuolarną ATPazy (v-ATPazy), odpowiedzialnej za pompowanie protonów do wnętrza pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. Zaobserwowaliśmy, że larwy z zahamowaną genetycznie lub chemicznie aktywnością v-ATPazy nie zakwaszają obecnych w makrofagach fagosomów zawierających pneumokoki. Ponadto, inhibicja ta zapobiegała wewnątrzkomórkowemu zabijaniu bakterii, a następnie prowadziła do niekontrolowanej proliferacji pneumokoków i następnie śmierć gospodarza. Obserwacja ta wskazała na kluczową rolę zakwaszenia fagosomów w odporności na inwazję pneumokoków. W pracy tej wykazaliśmy także, że ustanowiony przez nas model zakażenia może być wykorzystany do badania skuteczności środków przeciwdrobnoustrojowych przeciwko pneumokokom *in vivo*.

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy potwierdzają, że larwy danio pręgowanego są przydatne do badania mechanizmów zabijania podczas infekcji pneumokokowej *in vivo* i podkreślają kluczową rolę zakwaszania fagosomalnego w makrofagach w neutralizacji pneumokoków.

#### **4.5 Podsumowanie**

Podsumowując omówiony powyżej cykl publikacji, za najważniejsze swoje osiągnięcia uważam:

Odkrycie zjawiska klonalnej ekspansji bakterii w rozwoju zakażenia gronkowca złocistego u danio pręgowanego, późniejsze potwierdzenie tego odkrycia u ssaków, a następnie ustalenie wpływu tego procesu w selekcji antybiotykoopornych szczepów bakterii *in vivo* (**P01, P02**)

Zdefiniowanie roli autofagii w odpowiedzi profesjonalnych fagocytów na zakażenie gronkowcem złocistym przy użyciu modelu danio pręgowanego oraz wyjaśnienie sprzecznych danych literaturowych na temat odpowiedzi autofagicznej na zakażenie gronkowcem złocistym (**P03**)

Stworzenie nowych modeli infekcji *Enterococcus faecalis* oraz *Streptococcus pneumoniae* przy użyciu larw danio pręgowanego, zdefiniowanie roli czynników bakteryjnych oraz wrodzonego układu odporności w przebiegu infekcji systemowej wywołanej przez te patogeny (**P04, P05**)

## 4.6 Literatura

- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(4), 266–278. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2761>
- Cheng, A. G., DeDent, A. C., Schneewind, O., & Missiakas, D. (2011). A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation. *Trends in Microbiology*, 19(5), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.007>
- Clegg, J., Soldaini, E., McLoughlin, R. M., Rittenhouse, S., Bagnoli, F., & Phogat, S. (2021). Staphylococcus aureus Vaccine Research and Development: The Past, Present and Future, Including Novel Therapeutic Strategies. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Front Immunol. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705360>
- Deretic, V. (2011). Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. In *Immunological Reviews* (Vol. 240, Issue 1, pp. 92–104). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00995.x>
- Gresham, H. D., Lowrance, J. H., Caver, T. E., Wilson, B. S., Cheung, A. L., & Lindberg, F. P. (2000). Survival of Staphylococcus aureus Inside Neutrophils Contributes to Infection. *The Journal of Immunology*, 164(7), 3713–3722. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3713>
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Henriques-Normark, B., & Tuomanen, E. I. (2013). The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010215>
- Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Robles Aguilar, G., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P., Davis Weaver, N., Wool, E. E., Han, C., Gershberg Hayoon, A., Aali, A., Abate, S. M., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abd-Elsalam, S., Abebe, G., Abedi, A., Abhari, A. P., Abidi, H., ... Naghavi, M. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221–2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)
- Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., Golda, A., Maciag-Gudowska, A., Brix, K., Shaw, L., Foster, T., & Potempa, J. (2008). A potential new pathway for Staphylococcus aureus dissemination: The silent survival of S. aureus phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 3(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001409>
- Liu, K., Petree, C., Requena, T., Varshney, P., & Varshney, G. K. (2019). Expanding the CRISPR toolbox in zebrafish for studying development and disease. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 7, Issue MAR). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00013>
- Masud, S., Torraca, V., & Meijer, A. H. (2017). Modeling Infectious Diseases in the Context of a Developing Immune System. *Current Topics in Developmental Biology*, 124, 277–329. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2016.10.006>

- Muñoz-Sánchez, S., van der Vaart, M., & Meijer, A. H. (2020). Autophagy and Lc3-Associated Phagocytosis in Zebrafish Models of Bacterial Infections. In *Cells* (Vol. 9, Issue 11, p. 2372). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/cells9112372>
- Neumann, Y., Bruns, S. A., Rohde, M., Prajsnar, T. K., Foster, S. J., & Schmitz, I. (2016). Intracellular *Staphylococcus aureus* eludes selective autophagy by activating a host cell kinase. *Autophagy*, *12*(11), 2069–2084. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1226732>
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. In *Cell Research* (Vol. 24, Issue 1, pp. 9–23). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.169>
- Palmer, K. L., Kos, V. N., & Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(5), 632–639. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2010.08.004>
- Pollitt, E. J. G., Szkuta, P. T., Burns, N., & Foster, S. J. (2018). *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLOS Pathogens*, *14*(6), e1007112. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007112>
- Prajsnar, T. K., Cunliffe, V. T., Foster, S. J., & Renshaw, S. a. (2008). A novel vertebrate model of *Staphylococcus aureus* infection reveals phagocyte-dependent resistance of zebrafish to non-host specialized pathogens. *Cellular Microbiology*, *10*(11), 2312–2325. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01213.x>
- Prajsnar, T. K., Hamilton, R., Garcia-Lara, J., McVicker, G., Williams, A., Boots, M., Foster, S. J., & Renshaw, S. A. (2012). A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *Staphylococcus aureus* in a zebrafish model. *Cellular Microbiology*, *14*(10), 1600–1619. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x>
- Prajsnar, T. K., Serba, J. J., Dekker, B. M., Gibson, J. F., Masud, S., Fleming, A., Johnston, S. A., Renshaw, S. A., & Meijer, A. H. (2021). The autophagic response to *Staphylococcus aureus* provides an intracellular niche in neutrophils. *Autophagy*, *17*(4), 888–902. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1739443>
- Salamaga, B., Prajsnar, T. K., Jareño-Martinez, A., Willemsse, J., Bewley, M. A., Chau, F., Ben Belkacem, T., Meijer, A. H., Dockrell, D. H., Renshaw, S. A., & Mesnage, S. (2017). Bacterial size matters: Multiple mechanisms controlling septum cleavage and diplococcus formation are critical for the virulence of the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis*. *PLoS Pathogens*, *13*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006526>
- Schnaith, A., Kashkar, H., Leggio, S. A., Addicks, K., Krönke, M., & Krut, O. (2007). *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(4), 2695–2706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609784200>
- Smith, R. E., Salamaga, B., Szkuta, P., Hajdamowicz, N., Prajsnar, T. K., Bulmer, G. S., Fontaine, T., Kołodziejczyk, J., Herry, J. M., Hounslow, A. M., Williamson, M. P., Serror, P., & Mesnage, S. (2019). Decoration of the enterococcal polysaccharide antigen EPA is essential for virulence, cell surface charge and interaction with effectors of the innate immune system. *PLoS Pathogens*, *15*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007730>
- Stream, A., & Madigan, C. A. (2022). Zebrafish: an underutilized tool for discovery in host–microbe interactions. In *Trends in Immunology* (Vol. 43, Issue 6, pp. 426–437). Trends Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.03.011>
- Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 9, pp. 529–543). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3521>
- Thwaites, G. E., & Gant, V. (2011). Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? *Nature Reviews Microbiology*, *9*(3), 215–222. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2508>
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

- Torraca, V., Masud, S., Spaink, H. P., & Meijer, A. H. (2014). Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: New therapeutic insights from the zebrafish host model. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 7(7), 785–797. <https://doi.org/10.1242/DMM.015594/-/DC1>
- van der Poll, T., & Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. In *The Lancet* (Vol. 374, Issue 9700, pp. 1543–1556). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61114-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61114-4)
- Veening, J. W., Smits, W. K., Hamoen, L. W., Jongbloed, J. D. H., & Kuipers, O. P. (2004). Visualization of differential gene expression by improved cyan fluorescent protein and yellow fluorescent protein production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6809–6815. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6809-6815.2004>
- Verdrengh, M., & Tarkowski, A. (1997). Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 65(7), 2517–2521.
- Verdrengh, M., & Tarkowski, A. (2000). Role of macrophages in *Staphylococcus aureus*-induced arthritis and sepsis. *Arthritis & Rheumatism*, 43(10), 2276–2282. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200010\)43:10<2276::AID-ANR15>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200010)43:10<2276::AID-ANR15>3.0.CO;2-C)
- Yahiaoui, R. Y., Den Heijer, C. D. J., Van Bijnen, E. M. E., John Paget, W., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C. A., Schellevis, F. G., & Stobberingh, E. E. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries. *Future Microbiology*, 11(6), 737–744. <https://doi.org/10.2217/fmb-2015-0011>

**5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.** Liczby w nawiasach (P01-P29) odnoszą się do moich publikacji wymienionych w punktach I.2, II.1 i II.2 załącznika 3.

Swoją dotychczasową pracę naukową realizowałem na 3 uniwersytetach (w tym 2 zagranicznych):

1. Uniwersytet Jagielloński w okresach 2004-2006 (**1a**) oraz od 2019 (**1b**)
2. University of Sheffield (Wielka Brytania) w okresach 2006-2015 (**2a**) oraz 2017-2019 (**2b**)
3. Leiden University (Holandia) w okresie 2015-2017 (**3**).

**Ad 1a.** Za początek swojej aktywności naukowej uważam pracę magisterską, badania do której wykonywałem w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką prof. dr hab. Jana Potempy. Podjąłem się wówczas udanej próby heterologicznej nadekspresji, a następnie oczyszczenia i wstępnej biochemicznej analizy rekombinantowego białka, które później zostało scharakteryzowane jako alternatywna podjednostka sigma ( $\sigma$ S) gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Uzyskane przeze mnie wyniki badań zostały opisane w mojej pracy magisterskiej, którą obroniłem w czerwcu 2006 r. oraz weszły w skład oryginalnej pracy (**P08**), w której jestem współautorem.

**Ad 2a.** Następnie we wrześniu 2006 r. wyjechałem do Wielkiej Brytanii, gdzie rozpocząłem swój projekt doktorski realizowany na Wydziale Medycznym Uniwersytetu w Sheffield pod opieką prof. Stephena Renshawa, oraz prof. Simona Fostera i Dr Vincenta Cunliffe w charakterze ko-promotorów. W ramach swojego doktoratu, podjąłem się ambitnego i wówczas bardzo nowatorskiego projektu opracowania nowego modelu zakażenia gronkowcem złocistym w larwach danio przęgwanego – w tamtym czasie intensywnie rozwijanego modelu w badaniach biomedycznych. Udało mi się stworzyć platformę i narzędzia przydatne do badania interakcji gospodarz-patogen w czasie rzeczywistym przy użyciu najnowocześniejszych technologii, takich jak mikroskopia konfokalna, a także wykorzystanie fluorescencyjnych reporterów bakteryjnych oraz transgenicznych linii danio przęgwanego. Wykorzystałem techniki biologii molekularnej i komórkowej, aby zdefiniować znaczenie czynników zarówno gospodarza, jak i patogenu jakie mają znaczenie dla przebiegu choroby wywołanej gronkowcem złocistym. Ten udany projekt doktorski zaowocował moją pierwszą publikacją jako wiodący autor w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania – *Cellular Microbiology* (**P09**). Ta wysoce cytowana praca (150 cytowań wg Scopus, stan na 14.09.2023) jest moim głównym osiągnięciem przed doktoratem i stanowiła podstawę mojej pracy doktorskiej obronionej w 2010 roku. W niniejszej publikacji opisałem utworzenie, charakteryzację i walidację nowatorskiego modelu infekcji systemowej wywołanej przez gronkowca złocistego w larwach danio przęgwanego. Stworzenie tej platformy badawczej umożliwiło szereg późniejszych odkryć, zarówno moich (opisanych w osiągnięciu habilitacyjnym oraz pozostałych osiągnięciach po doktoracie), jak i innych naukowców.

**Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora**, pozostałem w Sheffield gdzie zostałem zatrudniony na stanowisku typu ‘post-doc’ w laboratorium prof. Simona Fostera w Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield. Na tym stanowisku pracowałem do stycznia 2015 uzyskując w tym czasie także roczne indywidualne stypendium badawcze (Research Fellowship) od British Infection Association. Wyniki uzyskane podczas tego zatrudnienia zostały opublikowane w szeregu artykułów i dotyczyły następujących zagadnień:

**Badanie interakcji gospodarz – gronkowiec złocisty *in vivo*.** Oprócz 2 prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego (**P01**, **P02**, opisanych szczegółowo w punkcie 4.2) brałem udział w powstawaniu kilku artykułów (**P12**, **P17**, **P22**, **P24**, **P26**) w których użyliśmy modelu danio przęgwanego w infekcji gronkowcem złocistym. Jestem także autorem 2 rozdziałów książki (**P06**,

**P07)** dotyczących metodologii badań zakażeń gronkowcem złocistym *in vivo* (w modelu danio pręgowanego oraz myszy). Ponadto, w ramach współpracy z grupą profesora Andres Floto z University of Cambridge podjąłem się zbadania roli neurotrofiny - czynnika wzrostu nerwów  $\beta$  (NGF $\beta$ ) i jego receptora o wysokim powinowactwie (TRKA) we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Dokonaliśmy odkrycia, że NGF $\beta$ , odgrywa nieoczekiwaną rolę, podobną do zewnątrzkomórkowego białka Spaetzle aktywującego ścieżkę sygnałową Toll u bezkręgowców, w odporności na zakażenie gronkowcem złocistym u kręgowców. Moja rola polegała na wykorzystaniu modelu *in vivo* infekcji bakteryjnych w celu potwierdzenia uprzednich obserwacji na modelach *in vitro* wykonanych w Cambridge. Przy pomocy technologii morpholino, wyciszyłem gen *trkA* danio pręgowanego i wykazałem protekcyjny wpływ TrkA na odpowiedź immunologiczną wobec gronkowca złocistego, gdzie osobniki w wyciszonym genem *trkA* były bardziej podatne na zakażenie gronkowcem, a także w mniejszym stopniu na enterokoki, niż osobniki kontrolne. Ten fenotyp infekcyjny byliśmy w stanie odwrócić przez jednoczesne wstrzyknięcie mRNA kodującego *trkA*, a także w linii transgenicznej danio pręgowanego z specyficzną ekspresją *trkA* w makrofagach, którą stworzyliśmy w naszym laboratorium. Nasze odkrycie, które ujawniło plejotropowe działanie szlaku NGF $\beta$ -TRKA, może się przyczynić do powstania nowych strategii terapeutycznych, szczególnie w przypadku zakażeń lekoopornymi szczepami bakterii. Praca ta została opublikowana w bardzo prestiżowym czasopiśmie *Science*, w której jestem współwiodącym autorem (**P11**).

**Badanie interakcji gospodarz - patogen z rodzaju *Enterococcus* oraz gatunku *Porphyromonas gingivalis* na modelach *in vivo*.** Oprócz artykułu **P04** wchodzącego do osiągnięcia naukowego, szczegółowo opisanego w punkcie 4.3, zaangażowany byłem w kilka projektów dotyczących badania zakażeniami bakteriami z rodzaju *Enterococcus* (**P10, P15, P16, P19**) oraz bakterii gram-ujemnej wywołującą choroby przyzębia - *Porphyromonas gingivalis* (**P13**). Podobnie jak w przypadku modelu zakażenia gronkowca złocistego, ustanowione modele zakażenia *Enterococcus faecalis* oraz *Porphyromonas gingivalis* stały się istotnym narzędziem w dalszych badaniach infekcji tymi patogenami.

**Ad 3.** Od lutego 2015 pracowałem na Uniwersytecie w Leiden (Holandia) gdzie do maja 2017 realizowałem uzyskane przeze mnie indywidualne stypendium Marii Skłodowskiej-Curie (Marie Curie Individual Fellowship). W tym czasie zainteresowałem się **tematyką roli autofagii podczas zakażeń bakteryjnych** i owocem mojej pracy w Leiden (a także później w Sheffield) jest praca

wchodząca w skład mojego osiągnięcia naukowego (**P03**, opisana w punkcie 4.2) oraz szereg artykułów w tej tematyce (**P14, P18, P21, P23, P25, P29**). W pracach tych uczestniczyłem w badaniach m. in. procesów autofagii selektywnej oraz fagocytozy związanej z LC3 podczas zakażeń bakterią gram-ujemną *Salmonella enterica* oraz gronkowcem złocistym. Tematyka ta stała się jednym z moich głównych tematów badawczych w obecnie realizowanych projektach (NCN Sonata Bis 9 oraz NAWA Polskie Powroty 2019).

**Ad 2b.** Od maja 2017 zostałem ponownie zatrudniony na Uniwersytecie w Sheffield, tym razem na Wydziale Medycznym w laboratorium swojego byłego promotora profesora Stephena Renshawa. W Sheffield zatrudniony byłem do listopada 2019. Wynikiem tego zatrudnienia są publikacje, w których utworzyliśmy nową linię transgeniczną danio pręgowanego do wizualizacji mieloperoksydazy w neutrofilach (**P20**) oraz stworzyliśmy model wrodzonego niedoboru odporności typu APDS (ang. Activated PI3K Delta Syndrome) u danio pręgowanego (**P28**). Ponadto, w tym okresie rozpocząłem pracę nad publikacją (**P05**, opisana szczegółowo w punkcie 4.4) wchodzącą w skład osiągnięcia naukowego, którą dokończyłem podczas swojego bieżącego zatrudnienia na Uniwersytecie Jagiellońskim.

**Ad 1b.** Od grudnia 2019, jestem zatrudniony na swojej Alma Mater – Uniwersytecie Jagiellońskim, na który powróciłem po 13 latach spędzonych na zagranicznych uczelniach. Do tej pory owocem mojej pracy na UJ jest publikacja (**P27**), w której zbadaliśmy przebieg zakażenia wirusem TiLV (ang. Tilapia Lake Virus) przy użyciu modelu danio pręgowanego. Podczas mojego bieżącego zatrudnienia kontynuowałem i zakończyłem także wspomnianą wcześniej pracę **P05**.

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

### Osiągnięcia dydaktyczne

Podczas dotychczasowej pracy na Uniwersytecie Jagiellońskim byłem promotorem 2 prac magisterskich obronionych w lipcu 2022 oraz lipcu 2023 oraz jednej pracy licencjackiej (praca złożona 14.09.23 r., planowana obrona - koniec września 2023). Obecnie jestem promotorem dwóch studentów Biologii (II stopnia), których obrony prac magisterskich zostały zaplanowane na czerwiec/lipiec 2024. Ponadto, jestem obecnie promotorem pomocniczym doktoranta zatrudnionego w projekcie Sonata BIS, którego jestem kierownikiem (planowana obrona – październik 2026).



W trakcie swojego zatrudnienia w Leiden University (2015-2017) byłem promotorem pomocniczym (co-promotor) 1 pracy doktorskiej (wraz z Prof. Annemarie Meijer, Leiden). Ponadto, byłem opiekunem naukowym (co-supervisor) 2 prac magisterskich (wraz z Prof. Annemarie Meijer) oraz opiekunem naukowym (co-supervisor) 1 pracy licencjackiej (wraz z Prof. Annemarie Meijer).

We wrześniu 2015, podczas pracy w Leiden, wygłosiłem wykład na zaproszenie dla studentów na Uniwersytecie Technicznym w Delft (Holandia) dotyczący zastosowania modelu danio pręgowanego do badań naukowych. Ponadto, prowadziłem wykłady na Leiden University dotyczące użycia danio pręgowanego jako zwierzęcia laboratoryjnego i doświadczalnego podczas szkoleń dla osób planujących, wykonujących i uśmiercających zwierzęta (2 wykłady: marzec i maj 2016).

Po zatrudnieniu na Uniwersytecie Jagiellońskim w grudniu 2019 r. prowadziłem najpierw pojedyncze wykłady oraz ćwiczenia w ramach kursów: „Bakteryjne choroby infekcyjne” WBT-BCH330 – semestr letni 2019/20 (wykład - maj 2020) oraz „Techniki immunobiologiczne” WBNZ-676 – semestr zimowy 2020/21 (wykład oraz prowadzenie ćwiczeń - październik-listopad 2020).

Od początku 2021 r. jestem pracownikiem badawczo-dydaktycznym (25% pełnego wymiaru godzinowego – 53 godziny pensum). Oprócz wykładu na kursie „Techniki immunobiologiczne” prowadzę konwersatoria w ramach przedmiotów „Immunobiologia porównawcza” oraz „Evolutionary Aspects of Comparative Immunology” (w języku angielskim).

Jestem także współautorem nowego kursu „Wprowadzenie do mikrobiologii i wirusologii” gdzie prowadzę cykl wykładów dla studentów pierwszego roku Biologii UJ.

Byłem także zaproszonym prelegentem na 3 warsztatach organizowanych przez Polskie Towarzystwo „Zebrafish” (PTZ) dla młodych naukowców w Polsce zainteresowanych użyciem danio pręgowanego w badaniach naukowych.

### Osiągnięcia organizacyjne

Od 2021 r. jestem redaktorem-współpracownikiem (associate editor) w czasopiśmie „*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*” (IF<sub>2022</sub> = 5,7). Ponadto w latach 2021-2022 byłem współredaktorem gościnnym (guest co-editor) wydania specjalnego „Fishing for Health: Zebrafish models of Human Disease” w czasopiśmie *Cells* (IF<sub>2022</sub> = 6,0), w którym opublikowano 10 artykułów.

Wykonałem ponad 20 recenzji prac dla czasopism naukowych takich jak m.in. *Nature Communications, Autophagy, Cellular Microbiology, Frontiers in Immunology, Infection and Immunity, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Microbial Pathogenesis* oraz *Journal of Visualized Experiments*.

Od marca 2018 jestem członkiem-założycielem Polskiego Towarzystwa „Zebrafish” (PTZ). Głównym zadaniem PTZ jest promowanie współpracy wśród osób prowadzących badania z użyciem danio pręgowanego w Polsce i za granicą. Poza współpracą naukową, PTZ zajmuje się edukacją naukową, popularyzacją i promocją tego organizmu modelowego wśród ogółu społeczeństwa. Od października 2021 zostałem wybrany na stanowisko Członka Zarządu PTZ. Ponadto, współorganizowałem Warsztaty PTZ, które odbyły się w Olsztynie (Wrzesień 2018), Wrocławiu (Luty 2019) oraz Lublinie (Lipiec 2022). Byłem także recenzentem wniosków w ramach PTZ Travel grant.

Brałem udział w ewaluacji wniosków projektów badawczych dla Narodowego Centrum Nauki jako recenzent w konkursach MINIATURA 5, 6 oraz 7 (w sumie 24 projekty) oraz jednego projektu PRELUDIUM 10. Ponadto, zrecenzowałem jeden grant wewnętrzny w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (IDUB)” na Uniwersytecie Wrocławskim.

#### Osiągnięcia popularyzujące naukę

W ramach swojej aktywności akademickiej angażowałem się w popularyzację nauki poprzez prowadzenie zajęć praktycznych dla młodzieży podczas „British Science Week” w roku marcu 2017 w Sheffield.

Ponadto, jestem współautorem artykułu popularnonaukowego w czasopiśmie *Wszechświat* pt. „Znaczenie Danio pręgowanego w badaniach procesów epileptogenezy oraz badaniach przesiewowych substancji przeciwdrgawkowych” opublikowanym w czasopiśmie *Wszechświat*, t. 121, nr 10–12/2020 (Kinga Gaweł, Tomasz K Prajsnar, Marta Marszałek-Grabska, Waldemar A Turski, Camila V Esguerra). Jestem także współautorem krótkiego artykułu w *Projektor Jagielloński*, który w bardzo zwięzły sposób opisuje co badają naukowcy na UJ pt. „Danio pręgowany: mała rybka o wielkim potencjale” *Projektor Jagielloński* '21 nr 3 (Krzysztof Rakus, Tomasz Prajsnar, Magdalena Widziołek, Magdalena Chadzińska).

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

W trakcie swojej dotychczasowej kariery byłem/jestem kierownikiem projektów badawczych finansowanych przez różne instytucje wspierające naukę na 3 różnych uniwersytetach oraz państwach:

- British Infection Association research fellowship (University of Sheffield, Wielka Brytania), 2014-2015
- Marie Curie Intraeuropean Fellowship (Leiden University, Holandia), 2015-2017
- NAWA Polskie Powroty 2019 (Uniwersytet Jagielloński), 2020-2024
- NCN SONATA BIS 9 (Uniwersytet Jagielloński), 2020-2025

**Sumaryczne zestawienie całego dorobku naukowego:**

Mój dorobek naukowy wraz z jednotematycznym cyklem publikacji obejmuje współautorstwo w **29** publikacjach (**27** artykułach oryginalnych oraz **2** rozdziałów książki). **2** z tych prac zostały opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora, a **27** po jego uzyskaniu.

Całkowita liczba cytowań moich prac (stan na 14.09.2023 r., wg Scopus): **1954**

Sumaryczny Impact Factor zgodny z rokiem ukazania się prac: **220,70**

Indeks Hirscha moich prac (stan na 14.09.2023, wg Scopus): **18**

.....

(podpis wnioskodawcy)