

Autoreferat

dr Urszula Guzik
Katedra Biochemii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

Katowice, 2014

1. Imię i nazwisko: Urszula Guzik

2. Wykształcenie, posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2007: Doktor nauk biologicznych, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (14.12.2007). Tytuł rozprawy doktorskiej **„Charakterystyka biochemiczna i genetyczna enzymów z grupy dioksygenaz, uczestniczących w rozkładzie związków aromatycznych, u wybranych szczepów bakterii”**, promotor- prof. dr hab. Sylwia Łabużek, recenzenci- prof. dr hab. Joanna Radziejewska-Lebrecht (Uniwersytet Śląski w Katowicach), prof. dr hab. Jerzy Długoński (Uniwersytet Łódzki)

2003-2007 Słuchacz studiów doktoranckich w zakresie Przyrodniczych Podstaw Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

2003 Magister biologii, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (09.07.2003). Tytuł pracy magisterskiej **„Izolacja i charakterystyka bakterii redukujących żelazo”**, promotor prof. dr hab. Sylwia Łabużek

1998-2003 Studia magisterskie na kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2008-obecnie: Adiunkt, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

2007-2008 Asystent, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

4. Przebieg pracy naukowo badawczej

Pracę naukową rozpoczęłam 1 października 2003 roku w Katedrze Biochemii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, w trakcie studiów na Dziennych Studiach Doktoranckich w zakresie Przyrodniczych Podstaw Ochrony Środowiska. Zainspirowana pomysłem prof. dr hab. Sylwii Łabużek podjęłam badania nad degradacją związków aromatycznych przez mikroorganizmy. W wyniku badań scharakteryzowałam 2,3-dioksygenazę katecholową szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz 1,2-dioksygenazę katecholową szczepu *Pseudomonas putida* N6, enzymy zaangażowane w rozszczepienie pierścienia aromatycznego. Uzyskane wyniki stały się podstawą pracy doktorskiej pt. „Charakterystyka biochemiczna i genetyczna enzymów z grupy dioksygenaz, uczestniczących w rozkładzie związków aromatycznych, u wybranych szczepów bakterii”, napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Sylwii Łabużek, którą obroniłam w 2007 roku i uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych. W pracy tej zwróciłam szczególną uwagę na określenie optymalnych warunków działania badanych enzymów oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych katalizowanych reakcji. Ponadto uzyskałam sekwencje nukleotydowe genów kodujących badane enzymy, co pozwoliło mi określić sekwencje aminokwasowe tych enzymów i opisać struktury przestrzenne badanych enzymów. Wyniki te zostały opublikowane w pracach oryginalnych (**Załącznik 3, Poz. II A 10, 17**) i przeglądowych (**Załącznik 3, Poz. II D 15, 16**).

Po roku 2007 wspólnie z dr Izabelą Greń oraz dr Danutą Wojcieszynską podjęłam badania nad mikrobiologicznym rozkładem związków aromatycznych w warunkach kometabolicznych. W badaniach tych wykazano zdolność szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 do rozkładu 4-chlorofenolu i mononitrofenoli - związków posiadających podstawniki dezaktywujące i odpowiadające za wzrost toksyczności tych związków na organizmy żywe, w obecności fenolowych związków roślinnych będących dla bakterii źródłem węgla i energii. Uzyskane w wyniku tych badań wyniki stały się podstawą prac oryginalnych (**Załącznik 3, Poz. II A 12, 16**) i przeglądowych (**Załącznik 3, Poz. II A 24, II D 9, 13**).

Równocześnie kontynuowałam badania związane z charakterystyką enzymów zaangażowanych w degradację struktury aromatycznej. Za wyróżnienie uznaję przyznanie w roku 2009 grantu wyjazdowego na Forum Młodych Naukowców i 34 Kongres FEBS w Pradze przyznany przez Lokalny Komitet Organizacyjny 9-go Forum Młodych Naukowców. Umożliwił mi on zaprezentowanie na forum międzynarodowym wyników dotyczących charakterystyki 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu *Pseudomonas putida* N6.

Początkowo dalsze prace nad charakterystyką enzymów degradacyjnych były finansowane ze środków JM Rektora na badania własne: „Enzymy zaangażowane

w rozszczenie pierścienia aromatycznego izolowane ze szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2”. Następnie w latach 2009-2011 realizowałam projekt własny finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt: „Enzymy izolowane ze szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, zaangażowane w rozkład związków fenolowych, a ich potencjalne zastosowanie w procesach oczyszczania środowisk zdegradowanych”, obejmujący swym zakresem indukcję, izolację, oczyszczanie oraz badanie właściwości biochemicznych enzymów degradujących związki aromatyczne. W ramach projektu zostały scharakteryzowane: monooksygenaza fenolowa oraz 2,3-dioksygenaza katecholowa szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. Ze względu na niską stabilność w obecności tlenu 2,3-dioksygenazy katecholowej podjęto próbę immobilizacji enzymu w żelu alginianowym i karagenianowym. Wykazano, że immobilizacja jest skuteczną metodą zabezpieczającą enzym przed niekorzystnym wpływem czynników środowiskowych na wyizolowany enzym, co rodzi nadzieję na zastosowanie immobilizowanego enzymu jako biopreparatu stosowanego w bioremediacji i przemyśle. Uzyskane wyniki stały się podstawą prac oryginalnych (**Załącznik 3, Poz. II A 3, 4, 9, 11, 15**) i przeglądowej (**Załącznik 3, Poz. II D 7**).

Ważną formą mojej aktywności naukowej był udział w krajowych i zagranicznych konferencjach, seminariach, zjazdach i sympozjach (**Załącznik 3, Poz. III B**). Prezentowałam podczas nich wyniki swoich badań oraz nawiązałam szereg ciekawych kontaktów naukowych. W roku 2009 zaowocowały one podjęciem współpracy z dr inż. Ewą Kaczorek z Zakładu Chemii Organicznej, Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej w ramach projektu „Wpływ substancji ropopochodnych i związków powierzchniowo czynnych na właściwości powierzchniowe mikroorganizmów środowiskowych uczestniczących w procesach bioremediacyjnych” finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, realizowanego w latach 2009-2011. W ramach tego projektu określiłam zmiany w profilu kwasów tłuszczowych komórek bakteryjnych w zależności od stosowanych surfaktantów wspomagających procesy biodegradacji oleju napędowego. Ponadto zidentyfikowałam szczepy bakteryjne zdolne do rozkładu związków ropopochodnych, a sekwencje nukleotydowe genów 16S rDNA zamieściłam w bazie NCBI. Efektem przeprowadzonych badań były 3 prace oryginalne i jedna przeglądowa (**Załącznik 3, Poz. II A 5-7; Poz, II D 10**). Obecnie dalsza współpraca kontynuowana jest w ramach kolejnego projektu, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, „Określenie modyfikacji komórek bakterii środowiskowych zachodzących w trakcie degradacji związków węglowodorowych z udziałem surfaktantów pochodzenia roślinnego, alkilopoliglikozydów i biosurfaktantów”, którego okres realizacji przewidziany jest na lata 2013-2016.

W roku 2011, w ramach projektu badawczego MNiSW Iuventus Plus pt. „Charakterystyka 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 zaangażowanej

w rozkład ksenobiotycznych związków aromatycznych”, którego byłam kierownikiem, wraz z dr Danutą Wojcieszynską podjęłam badania mające na celu określenie właściwości biochemicznych i genetycznych 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu KB2. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w 3 pracach oryginalnych, które wchodzi w skład osiągnięcia naukowego (**Załącznik 3, Poz. I B 3, 4, 6**). Badania prowadzone w latach 2003-2007 wykazały, że szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 posiada również inną dioksygenazę intradiolową - 1,2-dioksygenazę katecholową, dlatego też równocześnie z projektem Iuventus Plus prowadziłam badania nad charakterystyką biochemiczną tego enzymu. Wyniki tych badań opublikowałam w 2 pracach oryginalnych, które weszły w skład osiągnięcia naukowego (**Załącznik 3, Poz. I B 2, 3, 5**).

W roku 2010 rozpoczęłam współpracę z dr Katarzyną Hupert-Kocurek nad 2,3-dioksygenazą katecholową szczepu gramodatniego *Planococcus* sp. S5. Badania te pozwoliły na określenie wpływu mutacji na aktywność badanego enzymu i identyfikację reszt aminokwasowych ważnych dla jego aktywności katalitycznej. Wyniki badań zostały opublikowane w 3 pracach oryginalnych (**Załącznik 3, Poz. II A 1, 2, 8**). Ponadto w roku 2012 rozpoczęłam współpracę z Głównym Instytutem Górnictwa w Katowicach w ramach projektu “Biomimetic innovative membrane reactors for sustainable production of liquid eco-fuels”, finansowanego przez KIC InnoEnergy. Projekt obejmuje mikrobiologiczną syntezę etanolu z gazu syntezowego.

Dotychczasowe badania wskazują na duży potencjał degradacyjny szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, stąd w nowym nurcie badań podjęłam, wraz z dr Danutą Wojcieszynską i dr Katarzyną Hupert-Kocurek, próbę jego wykorzystania w oczyszczaniu ścieków obciążonych powszechnie dostępnymi i stosowanymi farmaceutykami o strukturze aromatycznej. Badania te są finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu „Rozkład niesteroidowych leków przeciwzapalnych przez wybrane szczepy bakterii”, którego okres realizacji przewidziany jest na lata 2014-2017.

Ze względu na realizowaną tematykę badawczą, wielokrotnie byłam proszona o wykonanie recenzji artykułów z zakresu biochemii, mikrobiologii i biotechnologii środowiska. Dotychczas zrecenzowałam 35 prac dla 20 czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym (**Załącznik 3, Poz. III P**). W roku 2014 zostałam zaproszona również do pracy w radach naukowych redakcji American Journal of Environmental Protection, Advances in Bioscience and Bioengineering oraz American Journal of BioScience. Jako wyróżnienie traktuję zaproszenie do napisania artykułu przeglądowego pt. „Flavin-dependent enzymes in cancer prevention” (**Załącznik 3, Poz. II A 23**) oraz udziału w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych: 2nd International Conference on Resources, Environment, Information and Engineering Innovation 2015 Wuhan – Chiny oraz II Ogólnopolskiego Zjazdu

Młodych Biotechnologów w Katowicach. Jestem członkiem krajowych i międzynarodowych towarzystw naukowych: American Society for Microbiology, Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. W ramach kontaktów zagranicznych odbyłam również staż u profesora Georga Fuchsa z Albert-Ludwigs Universität we Freiburgu w Niemczech w 2010 roku. Uczestniczyłam również w wielu kursach i szkoleniach podnoszących moje kwalifikacje (**Załącznik 3, Poz. III Q**).

Mój dotychczasowy dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 25 oryginalnych prac naukowych (w tym 23 z tzw. listy filadelfijskiej), 20 prac przeglądowych (w tym 7 z tzw. listy filadelfijskiej), 12 sekwencji nukleotydowych opublikowanych w bazie National Center for Biotechnology Information (GenBank), 2 rozdziały w monografiach, 5 prac popularnonaukowych oraz 1 ekspertyzę dla firmy LAKMA. Prace te dotyczą głównie problematyki degradacji związków aromatycznych przez mikroorganizmy. Kolejne prace są aktualnie w recenzji. Poniżej podano dane bibliometryczne odzwierciedlające moją aktywność naukową:

Dane bibliometryczne^a:

1. Sumaryczny impact factor publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR)^b – 42,513
2. Sumaryczna liczba punktów MNiSW^c - 709
3. Liczba cytowań publikacji^c według bazy Web of Science (WoS) - 36
4. Indeks Hirscha^d według bazy Web of Science (WoS) – 5

^aOpis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku 3 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).

^bWartość IF wg JCR dla publikacji sprzed roku 2013 podano zgodnie z rokiem opublikowania. Dla publikacji z lat 2013 i 2014 podano IF_{5-letni}.

^cPunktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z punktacją określoną w wykazie czasopism naukowych obowiązującym na koniec roku kalendarzowego, w którym ukazała się publikacja.

^dDane z dnia 9.06.2014

5. Opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Właściwości wolnych i unieruchomionych dioksygenaz intradiolowych szczepu
Stenotrophomonas maltophilia KB2**

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

(autorzy ^{a,b}, rok wydania, tytuły publikacji, wydawnictwo, tom, strony, IF^c, MNiSW^d, Cyt.: WoS)

^aOpis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku 3 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).

^bOświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 4 (Oświadczenia współautorów).

^cWartość IF wg JCR dla publikacji sprzed roku 2013 podano zgodnie z rokiem opublikowania. Dla publikacji z lat 2013 i 2014 podano IF_{5-letni}.

^dPunktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z punktacją określoną w wykazie czasopism naukowych obowiązującym na koniec roku kalendarzowego 2013.

- 1. Guzik U.,** Hupert-Kocurek K., Wojcieszńska D. **2013.** Intradiol dioxygenases - the key enzymes in xenobiotics degradation (Chapter 7, pages 129-153). In Chamy R., Rosenkranz F. (ed.) Biodegradation of hazardous and special products. InTech Rijeka, Croatia (IF 0,0; MNiSW 5 pkt; Indeks cytowań: 0)
- 2. Guzik U.,** Hupert-Kocurek K., Sitnik M., Wojcieszńska D. **2013.** High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in *cis,cis*-muconic acid production. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 103, 1297-1307. (IF_{5-letni} 2,041; MNiSW 20 pkt; Indeks cytowań 2)
- 3. Guzik U.,** Hupert-Kocurek K., Sałek K., Wojcieszńska D. **2013.** Influence of metal ions on bioremediation activity of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29, 267-273. (IF_{5-letni} 1,551; MNiSW 20 pkt; Indeks cytowań 0)
- 4. Guzik U.,** Hupert-Kocurek K., Sitnik M., Wojcieszńska D. **2014.** Protocatechuate 3,4-dioxygenase - a wide substrate specificity enzyme isolated from *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 as a useful tool in aromatic acid biodegradation. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, doi: 10.1159/000362791. (IF_{5-letni} 2,333; MNiSW 25 pkt; Indeks cytowań 0)
- 5. Guzik U.,** Hupert-Kocurek K., Marchlewicz A., Wojcieszńska D. **2014.** Enhancement of biodegradation potential of catechol 1,2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel. Electronic Journal of Biotechnology, doi: 10.1016/j.ejbt.2014.02.001 (IF_{5-letni} 1,258; MNiSW 15 pkt; Indeks cytowań 0)
- 6. Guzik U.,** Hupert-Kocurek K., Krysiak M., Wojcieszńska D. **2014.** Degradation potential of protocatechuate 3,4-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels and on glyoxyl agarose. BioMed Research International (earlier Journal of Biomedicine and Biotechnology), Article ID 138768, 8 pages, doi: 10.1155/2014/138768. (IF_{5-letni} 2,687; MNiSW 30 pkt; Indeks cytowań 0)

Impact factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Journal Citation Reports: **9,87**

Punktacja MNiSW publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **115**

Liczba cytowań* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Web of Science (WoS) – 2

*Dane z dnia: 09.06.2014

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Rozwój przemysłu przyczynił się do degradacji środowiska naturalnego. W ciągu ostatnich dwudziestu lat, dzięki znacznemu usprawnieniu technologii unieszkodliwiania odpadów, jak również zmniejszaniu emisji toksycznych związków do środowiska odpady przemysłowe stały się mniej uciążliwe. Jednak pomimo tych starań do środowiska naturalnego nadal dostają się znaczne ilości trudnodegradowalnych związków. Wśród związków ksenobiotycznych - wysoce uciążliwych ze względu na dużą toksyczność i trwałość w środowisku, dostających się do środowiska naturalnego w tysiącach ton rocznie, są związki aromatyczne. Podlegają one mikrobiologicznej degradacji, w której kluczowymi etapami są hydroksylacja pierścienia aromatycznego i jego rozszczepienie. Oksygenolityczne rozszczepienie pierścienia aromatycznego katalizują enzymy z grupy dioksygenaz.

Do kolekcji szczepów Katedry Biochemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach należy szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 charakteryzujący się wyjątkowymi zdolnościami do degradacji szerokiej gamy związków aromatycznych. W swojej pracy doktorskiej wykazałam, że szczep ten w zależności od stosowanego induktora syntetyzuje jedną z trzech dioksygenaz rozszczepiających - ekstradiolową 2,3-dioksygenazę katecholową oraz enzymy intradiolowe: 1,2-dioksygenazę katecholową oraz 3,4-dioksygenazę protokatechową. W swojej pracy doktorskiej przeprowadziłam charakterystykę biochemiczną i genetyczną 2,3-dioksygenazy katecholowej oraz zamplifikowałam gen kodujący 1,2-dioksygenazę katecholową tego szczepu. Stąd też celem moich dalszych badań stała się charakterystyka biochemiczna i molekularna 1,2-dioksygenazy katecholowej oraz 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2.

Wyizolowano i opisano wiele dioksygenaz intradiolowych, jednakże w najnowszej literaturze brak było pracy systematyzującej aktualny stan wiedzy na ich temat, zarówno pod kątem molekularnej budowy, mechanizmu działania, jak również ich klasyfikacji. Podjęłam się tego problemu w pracy „Intradiol dioxygenases – the enzymes in xenobiotics degradation” (Guzik i wsp., 2013, Chapter 7, pp. 129-153, InTech Rijeka, **pozycja 1 osiągnięcia naukowego**).

Na podstawie analizy pokrewieństw, jak również specyficzności substratowej, wśród dioksygenaz intradiolowych zostały wydzielone trzy klasy: 1,2-dioksygenazy katecholowe, 3,4-dioksygenazy protokatechowe oraz 1,2-dioksygenazy hydroksychinolowe. Dodatkowo klasa 1,2-dioksygenaz katecholowych została podzielona na kilka podklas w zależności od specyficzności substratowej. Dotychczasowe klasyfikacje tych enzymów wydzielały dioksygenazy o dużej aktywności w stosunku do katecholu i braku aktywności względem chlorokatecholi oraz dioksygenazy chlorokatecholowe o niewielkiej aktywności w stosunku do katecholu, natomiast pomijały grupę enzymów o dużej aktywności względem metylokatecholi.

1,2-dioksygenazy katecholowe są homodimerami zbudowanymi z dwóch podjednostek, których domeny N-terminalne pośredniczą w ich dimeryzacji. W miejscu łączenia się tych

podjednostek tworzy się hydrofobowy tunel z przyłączonymi fosfolipidami. Sugeruje się, że fosfolipidowe łańcuchy modulują aktywność 1,2-dioksygenaz katecholowych poprzez lokalną koncentrację substratu. Ponadto mogą one stanowić cząsteczki efektorowe. Domena łącząca podjednostki zawiera 12 α -helis, z których pięć tworzy N-terminalny łańcuch każdego monomeru, a pozostałe dwie uczestniczą w budowie domeny katalitycznej. Centrum aktywne zawierające jon żelaza(III) jest zlokalizowane pomiędzy domeną łączącą a ośmioniciową β -karką. Dotychczas uważano, że jon metalu koordynowany jest zawsze przez 4 reszty aminokwasowe: dwie histydyny i dwie tyrozyny oraz grupę hydroksylową cząsteczki wody tworząc trygonalną bipiramidę (Guzik i wsp., 2013, Chapter 7, pp. 129-153, InTech Rijeka, **pozycja 1 osiągnięcia naukowego**). W swojej pracy doktorskiej przeprowadziłam porównanie sekwencji aminokwasowej 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 wykazując jej podobieństwo do większości 1,2-dioksygenaz katecholowych. Przeprowadzone wówczas modelowanie i analiza struktury 3D badanego enzymu nie pozwoliły na identyfikację wszystkich czterech ligandów żelaza w centrum aktywnym enzymu. Ponowna dogłębna analiza struktury przestrzennej badanego enzymu wykazała, że w centrum aktywnym żelazo(III) jest skoordynowane z nietypowym ligandem - glutaminą (Gln224). Jest to pierwsze takie doniesienie, które opublikowałam w pracy „High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in *cis,cis*-muconic acid production” (Guzik i wsp., 2013, Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 103, 1297-1307; **pozycja 2 osiągnięcia naukowego**).

Koordynujące jon metalu ligandy biorą bezpośredni udział w cyklu katalitycznym enzymu. W trakcie przyłączania katecholu lub jego pochodnej do centrum aktywnego enzymu następuje dysocjacja jednej z tyrozyn oraz cząsteczki wody. Jedna z grup hydroksylowych substratu wiąże się z aksjalną histydyną, natomiast druga z ekwatorialną tyrozyną. Geometria centrum aktywnego ulega zmianie z trygonalnej bipiramidy do ostrosłupa prawidłowego czworokątnego. Substrat tworzy z jonem metalu niesymetryczny chelat. Związanie tlenu w centrum aktywnym prowadzi do wytworzenia mostka nadotlenkowego pomiędzy żelazem a katecholem. W pierwszym etapie cząsteczka tlenu ulega jednoelektronowej redukcji i w ten sposób powstaje rodnik nadotlenkowy, który reaguje z żelazem(III). W następnym etapie dochodzi do reakcji nadotlenku z rodnikiem katecholanowym. W konsekwencji dochodzi do zmian konformacyjnych, w wyniku których grupa hydroksylowa przekształcana jest do ketonowej. Prawdopodobnie arginina 457 stabilizuje powstały w wyniku ketonizacji karboanion. Przekształcenia te umożliwiają przyłączenie tyrozyny do żelaza(III) w postaci fenolanu, natomiast uwolniony proton przyłącza się do nadotlenku, bądź jest uwalniany z centrum aktywnego. Przyłączenie protonu do nadotlenku przeciwdziała utlenieniu żelaza(III). W rezultacie nadotlenek ulega przegrupowaniu Criegee'a poprzez migrację grupy acylowej do

nadtlenku i rozerwanie mostka tlenowego. Jeśli natomiast proton zostaje uwolniony z miejsca aktywnego enzymu to mostek tlenowy ulega rozszczepieniu do wysoce reaktywnej grupy oksoferylowej oraz rodnika alkoksylowego. Dochodzi wtedy do ataku rodnika alkoksylowego na węgiel grupy karbonylowej. W konsekwencji prowadzi to do utworzenia cyklicznego bezwodnika mukonowego, który ostatecznie ulega hydrolizie do kwasu mukonowego. Podobny cykl katalityczny wykazują 3,4-dioksygenazy protokatechowe, jednak różnią się one elementami budowy. Są to heterodimery o masie molekularnej od 97-700 kDa, zbudowane z równomolowych ilości α i β podjednostek. 3,4-Dioksygenazy protokatechowe w zależności od pochodzenia cechują się różną liczbą protomerów (od dwóch do dwunastu) o cylindrycznym kształcie. Budowa centrum aktywnego jest podobna do centrum katalitycznego 1,2-dioksygenaz katecholowych. Wejście do centrum aktywnego zbudowane jest głównie z zasadowych aminokwasów, w związku z czym region ten naładowany jest dodatnio, co ułatwia wnikanie ujemnie naładowanych substratów. Pełny szczegółowy opis budowy, funkcji oraz zastosowania dioksygenaz intradiolowych w bioremediacji przedstawiono w pracy „Intradiol dioxygenases - the key enzymes in xenobiotics degradation” (Guzik i wsp., 2013, Chapter 7, pp. 129-153, InTech Rijeka, **pozycja 1 osiągnięcia naukowego**).

Charakterystykę molekularną i biochemiczną 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, enzymu o niespotykanej wysokiej aktywności, przedstawiono w pracy „High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in *cis,cis*-muconic acid production” (Guzik i wsp., 2013, Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 103, 1297-1307; **pozycja 2 osiągnięcia naukowego**). Analiza specyficzności substratowej 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu KB2 pozwoliła zakwalifikować go do trzeciej podklasy 1,2-dioksygenaz katecholowych, charakteryzujących się aktywnością w stosunku do katecholu i jego metylowych pochodnych. Cechą charakterystyczną tego enzymu jest duża oporność na działanie inhibitorów kompetycyjnych (związków fenolowych). Wykazuje on natomiast dużą wrażliwość na działanie związków chelatujących, co może wynikać ze słabego związania żelaza(III) w centrum aktywnym enzymu przez nietypowy ligand (Guzik i wsp., 2013, Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 103, 1297-1307; **pozycja 2 osiągnięcia naukowego**). Badania nad aktywnością enzymu w obecności 3 mM jonów metali wykazały, że 1,2-dioksygenaza katecholowa szczepu KB2 jest enzymem o wyjątkowej oporności na działanie dwuwartościowych jonów żelaza, miedzi, cynku, kobaltu i kadmu. Ponadto cechuje się ona niską wrażliwością na działanie trójwartościowych jonów żelaza i glinu oraz manganu na drugim stopniu utlenienia. Jedynie w obecności jonów niklu(II) obserwuje się całkowitą inhibicję badanego enzymu. Prawdopodobnie jest to związane z blokowaniem przez ten kation reszt cysteiny lub histydyny enzymu (Guzik i wsp., 2013, World

Journal of Microbiology and Biotechnology, 29, 267-273; **pozycja 3 osiągnięcia naukowego**). Na uwagę zasługuje również duża oporność enzymu na temperaturę. Wykazuje on aktywność nawet w 50°C, co może mieć duże znaczenie w jego technologicznym wykorzystaniu, między innymi w produkcji kwasu *cis,cis*-mukonowego, pożądanego substratu w wielu syntezach chemicznych (Guzik i wsp., 2013, Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 103, 1297-1307; **pozycja 2 osiągnięcia naukowego**).

Cechą charakterystyczną 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 jest nietypowo szeroka specyficzność substratowa, którą opisałam w pracy „Protocatechuate 3,4-dioxygenase - a wide substrate specificity enzyme isolated from *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 as a useful tool in aromatic acid biodegradation” (Guzik i wsp., 2014, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, doi: 10.1159/000362791; **pozycja 4 osiągnięcia naukowego**). Enzym ten wykazuje aktywność względem kwasu protokatechowego i jego izomerów, jak również w stosunku do kwasu kawowego i 3,4-dihydroksyhydrocynamonowego. Nietypowo szeroka specyficzność substratowa badanego enzymu prawdopodobnie związana jest z odmienną budową okolic centrum aktywnego. W rejonie tym zwykle wykazuje się obecność tryptofanu, argininy, izoleucyny i glutaminy. W charakteryzowanym przeze mnie enzymie w lokalizacji tej występują dwie proliny, asparagina, metionina i leucyna. Obecność odmiennych aminokwasów w tym rejonie wpływa na zmianę konformacji tego regionu, co w konsekwencji uelastycznia strukturę centrum aktywnego. Szeroka specyficzność substratowa 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu KB2 daje możliwość jego wykorzystania w procesach bioremediacji, gdzie pożądaną właściwością jest aktywność enzymu w stosunku do szerokiej gamy ksenobiotyków.

Badanie sekwencji nukleotydowej 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 potwierdziło, że należy ona do dużej rodziny enzymów intradiolowych. Wysoką aktywność tego enzymu obserwuje się w szerokim zakresie pH wynoszącym 7-11 oraz temperaturowym 45-50°C. Badany enzym cechuje się sigmoidalną kinetyką, co znajduje potwierdzenie w wyznaczonym współczynniku Hill'a wynoszącym 4,13. Wartość tej stałej wskazuje na czteropodjednostkową budowę enzymu, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi tej klasy enzymów (Guzik i wsp., 2014, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, doi: 10.1159/000362791; **pozycja 4 osiągnięcia naukowego**).

Badania nad wpływem inhibitorów na aktywność 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu KB2 wykazały nieznaczny wpływ 2,2'-dipirydyli i fenantroliny na aktywność enzymu, natomiast EDTA w stężeniu 3 mM inhibuje badany enzym w ponad 80%. Zastosowanie alkoholi alifatycznych: etanolu, propanolu i butanolu w stężeniach od 100 do 300 mM powoduje nieznaczny (20%) wzrost aktywności. Jedynie obecność metanolu nie wpływa na aktywność

badanego enzymu. Jest to prawdopodobnie spowodowane specyficznymi hydrofobowymi interakcjami pomiędzy alkoholem i cząsteczką enzymu. Analiza struktury przestrzennej enzymu wskazuje na obecność w jego budowie hydrofobowej kieszeni. Prawdopodobnie jest to region oddziaływań z alkoholami (Guzik i wsp., 2014, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, doi: 10.1159/000362791; **pozycja 4 osiągnięcia naukowego**). Badania nad wpływem jonów metali na aktywność 3,4-dioxygenazy protokatechowej wykazały wysoką wrażliwość enzymu na obecność jonów Cu(II) i Fe(III). Obecność jonów Co(II), Cd(II), Al(III), Zn(II) powoduje 30-50% inhibicję enzymu, natomiast w obecności jonów Ni(II), Mn(II) i Fe(II) obserwuje się jedynie nieznaczny spadek aktywności. Wrażliwość enzymu na obecność metali może być związana z interakcją metali przejściowych z grupami tiolowymi enzymu. Ponadto substrat badanego enzymu – kwas protokatechowy, może tworzyć kleszczowe wiązanie z tymi metalami, co zmniejsza jego podatność na rozszczepienie z udziałem 3,4-dioxygenazy protokatechowej (Guzik i wsp., 2013, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 267-273; **pozycja 3 osiągnięcia naukowego**).

Obserwowany brak utraty aktywności 3,4-dioxygenazy protokatechowej lub jej nieznaczne obniżenie w obecności potencjalnych inhibitorów, sugeruje duże możliwości aplikacyjne tego enzymu w oczyszczaniu środowisk skażonych związkami aromatycznymi. Pełną charakterystykę biochemiczną i molekularną 3,4-dioxygenazy protokatechowej zamieszczono w pracy „Protocatechuate 3,4-dioxygenase - a wide substrate specificity enzyme isolated from *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 as a useful tool in aromatic acid biodegradation” (Guzik i wsp., 2014, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, doi: 10.1159/000362791; **pozycja 4 osiągnięcia naukowego**).

Ze względu na problemy z odzyskiwaniem enzymów w bioreaktorach oraz częstą ich niestabilnością wobec zmiennych warunków środowiska podjęłam próbę immobilizacji badanych enzymów w różnych nośnikach, jako prostej i taniej metody zwiększającej możliwość wielokrotnego stosowania biopreparatu. Otrzymane wyniki stały się podstawą prac „Enhancement of biodegradation potential of catechol 1,2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel” (Guzik i wsp., 2014, *Electronic Journal of Biotechnology*, doi: 10.1016/j.ejbt.2014.02.001) oraz „Degradation potential of protocatechuate 3,4-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels and on glyoxyl agarose” (Guzik i wsp., 2014, *BioMed Research International*, Article ID 138768, doi: 10.1155/2014/138768) (**pozycje 5 i 6 osiągnięcia naukowego**).

Immobilizacja 1,2-dioxygenazy katecholowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 w żelu alginianowym poprawia stabilność enzymu, przedłużając jego aktywność w 4°C o dwa tygodnie w stosunku do enzymu wolnego. Immobilizowany enzym charakteryzuje się

również niższym optimum temperaturowym od wolnego enzymu, natomiast profil pH ulega przesunięciu w kierunku bardziej neutralnego. Obniżenie szybkości maksymalnej po immobilizacji może być wynikiem niekowalencyjnych interakcji pomiędzy nośnikiem i enzymem lub częściową dysocjacją enzymu na podjednostki. Natomiast obserwowany wzrost wartości K_m oraz zmiana współczynnika Hill'a może być spowodowana ograniczeniem dostępności substratu do centrum aktywnego, wynikającym z ograniczonej dyfuzji substratu przez nośnik. Z drugiej strony, ograniczenie to powoduje słabszą inhibicję przez substrat, charakterystyczną dla wolnego enzymu. Zmiany konformacyjne spowodowane podczas wiązania nośnika z enzymem doprowadziły również do zmiany specyficzności substratowej enzymu. Związana 1,2-dioksygenaza katecholowa wykazuje aktywność nie tylko względem katecholu i jego metylowych pochodnych, ale również w stosunku do 3- i 4-chlorokatecholu oraz 3,5-dichlorokatecholu. Być może za poszerzenie specyficzności substratowej odpowiada również obniżenie miejscowego stężenia substratu w centrum aktywnym enzymu. Ograniczona dyfuzja substancji do centrum aktywnego enzymu po immobilizacji znalazła odbicie w zmniejszeniu toksyczności inhibitorów kompetycyjnych na badany enzym. Ma to szczególne znaczenie po zastosowaniu inhibitorów posiadających duże podstawniki, zwłaszcza w pozycji *para*, takich jak 4-chlorofenol. Wolna 1,2-dioksygenaza katecholowa jest szczególnie wrażliwa na obecność chelatorów, natomiast po immobilizacji obserwowano ochronne działanie nośnika na ten typ inhibitorów. Całkowitą inhibicję obserwowano jedynie po zastosowaniu 2,2'-dipirydyłu. Pełna charakterystyka immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej została opisana w pracy „Enhancement of biodegradation potential of catechol 1,2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel” (Guzik i wsp., 2014, Electronic Journal of Biotechnology, doi: 10.1016/j.ejbt.2014.02.001; **pozycja 5 osiągnięcia naukowego**).

Dla poprawienia właściwości technologicznych 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 przeprowadziłam również jej immobilizację w dwóch typach nośników: żelu alginianowym oraz glioksal agarozie. Zastosowanie dwóch typów nośników miało na celu wyjaśnienie w jaki sposób różny typ wiązania nośnika ma wpływ na właściwości enzymu. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że zarówno immobilizacja w żelu alginianowym, jak i glioksal agarozie obniża optimum temperaturowe enzymu odpowiednio o 5°C i 10°C. Ponadto pułapkowanie enzymu w żelu agarozowym powoduje przesunięcie optimum pH w kierunku wysoce alkalicznego, podczas gdy kowalencyjne wiązanie enzymu w nośniku agarozowym nie wpływa na profil pH.

Immobilizacja 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu KB2 w obu nośnikach wpływa na zwiększenie aktywności enzymu względem badanych substratów, jednak w różnym stopniu. Prawdopodobnie związane jest to z zastosowaniem nośników o różnej naturze. Enzym zaimmobilizowany w żelu alginianowym związany jest z nośnikiem oddziaływaniami

elektrostatycznymi, natomiast glioksal agarozu łączy się z badanym enzymem wiązaniami kowalencyjnymi. Prawdopodobnie ładunek dodatni reszt aminokwasowych występujących w wejściu do centrum aktywnego enzymu umożliwia elektrostatyczne oddziaływanie z alginianem, modulując aktywność enzymu.

Pułapkowanie enzymu w żelu alginianowym wywołuje ochronny efekt na działanie chelatorów i alkoholi alifatycznych, natomiast immobilizacja w glioksal agarozie podwyższa oporność enzymu na inaktywację przez metale. Prawdopodobnie usztywnienie struktury enzymu w wyniku kowalencyjnego związania z nośnikiem uniemożliwia zamianę metalu w centrum aktywnym przez inny jon o tym samym ładunku, a tym samym uniemożliwia inaktywację enzymu. Ponadto słaba inhibicja przez jony Cu(II) lub Cd(II) jest spowodowana niewielką mobilnością łańcuchów białkowych po immobilizacji. Pełna charakterystyka immobilizowanej 1,2-dioksygenazy katecholowej została opisana w pracy „Degradation potential of protocatechuate 3,4-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels and on glyoxyl agarose” (Guzik i wsp., 2014, BioMed Research International, Article ID 138768, doi: 10.1155/2014/138768; **pozycja 6 osiągnięcia naukowego**).

Wysoka aktywność oraz duża oporność na inhibitory badanych enzymów dają potencjalne możliwości ich szerokiego zastosowania w biotechnologii, jako użytecznych narzędzi zarówno w procesach chemicznych, jak i w bioremediacji.

Badania stanowiące podstawę zaprezentowanego osiągnięcia naukowego mają charakter badań podstawowych o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym w biotechnologiach środowiskowych, na przykład w bioremediacji środowisk skażonych związkami o strukturze aromatycznej, oraz w syntezie chemicznej pożądanych produktów. Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- ✓ usystematyzowanie wiedzy na temat molekularnej budowy, mechanizmu działania, jak również klasyfikacji enzymów intradiolowych oraz wykazanie ich aplikacyjnego znaczenia;
- ✓ opisanie właściwości wysoce aktywnej 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz wykazanie po raz pierwszy obecności w centrum aktywnym dioksygenazy intradiolowej nietypowego liganda Gln224;
- ✓ opisanie właściwości 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 o niespotykanej dotychczas, szerokiej specyficzności substratowej;
- ✓ wykazanie, iż immobilizacja jest skuteczną metodą umożliwiającą poprawienie właściwości 1,2-dioksygenazy katecholowej oraz 3,4-dioksygenazy protokatechowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, co czyni je użytecznymi narzędziami w bioremediacji i przemyśle chemicznym.

6. Omówienie osiągnięć dydaktycznych, popularyzatorskich i organizacyjnych

Swoje zainteresowania naukowe łączę z działalnością dydaktyczną i organizacyjną oraz zajmuję się popularyzacją nauki. W latach 2008-2013 włączyłam się w prace w projektach finansowanych z funduszy strukturalnych: UPGOW, MODLAB, ATRINBIOTECH. W latach 2008 i 2009 pełniłam funkcję sekretarza komisji rekrutacyjnej na studia dzienne I stopnia, kierunku Biotechnologia. W latach 2008-2012 byłam członkiem Wydziałowego Zespołu ds. Systemu Zapewniania i Doskonalenia Jakości Kształcenia, a od roku 2013 jestem sekretarzem pomocniczego Zespołu działającego przy Kierunkowym Zespole Zapewniania i Doskonalenia Jakości Kształcenia dla kierunku Biotechnologia.

Moja aktywność dydaktyczna na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska obejmuje zajęcia dla studentów czterech kierunków studiów: Biologia, Ochrona Środowiska, Biotechnologia oraz Chemia. Prowadzę wykłady, ćwiczenia, pracownie licencjackie i specjalistyczne – magisterskie, na studiach dziennych i zaocznych (**Załącznik 3, Poz. III I1**). Byłam opiekunem 6 prac magisterskich, promotorem 9 prac licencjackich oraz recenzentem 5 prac licencjackich (**Załącznik 3, Poz. III J**). W ramach działalności dydaktycznej opracowałam również programy zajęć i materiały do ćwiczeń (**Załącznik 3, Poz. III I2**) oraz jestem koordynatorem przedmiotów: Enzymy w biotechnologii, Mikrobiologia i biochemia wody i gleby oraz Analiza Środowisk.

W ramach działalności popularyzatorskiej zostałam zaproszona do wygłoszenia wykładu z cyklu „Problemy środowiska i jego ochrony” prowadzonego przez Centrum Studiów nad Człowiekiem i Środowiskiem Uniwersytetu Śląskiego. Jestem autorem opracowań popularnonaukowych (**Załącznik 3, Poz. II D 17-21**). Prowadziłam warsztaty dla nauczycieli „Kształtowanie kompetencji kluczowych w nauczaniu biologii” w ramach programów „Aktywny w szkole, aktywny w życiu” oraz „Partnerzy w nauce”. W ramach tych programów wygłosiłam również wykłady dla uczniów szkół średnich: ZSO nr 1 w Świętochłowicach, ZSTiO Nr 3 w Chorzowie oraz ZS nr 3 w Żorach. W roku 2013 byłam opiekunem naukowym licealistki Pauliny Witoszek podczas wykonywania badań do pracy Olimpijskiej: „Analiza korelacji pomiędzy jakością diety a zawartością cholesterolu w żółtku jaja kury domowej (*Gallus gallus domesticus*)”. Ponadto w roku 2014 pełniłam funkcję sekretarza komitetu organizacyjnego III Ogólnopolskiej Nocy Biologów współorganizowanej przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego, której celem jest popularyzowanie nauk biologicznych wśród dzieci i młodzieży.

Urszula Guzik