

Autoreferat

dr Katarzyna Hupert- Kocurek
Katedra Biochemii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

Katowice, 2014

1. Imię i nazwisko: Katarzyna Hupert-Kocurek

2. Wykształcenie, posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 2000:** Doktor nauk biologicznych, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (25.10.2000). Tytuł rozprawy doktorskiej „**Plazmidy szczepów *Acinetobacter* sp. i *Planococcus* sp. zdolnych do degradacji wybranych związków aromatycznych**”, promotor- prof. dr hab. Sylwia Łabużek, recenzenci- prof. dr hab. Joanna Radziejewska-Lebrecht (Uniwersytet Śląski w Katowicach), prof. dr hab. Andrzej Leonowicz (UMCS w Lublinie)
- 1995-2000** Słuchacz studiów doktoranckich w zakresie Przyrodniczych Podstaw Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- 1995** Magister biologii, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (15.07.1995). Tytuł pracy magisterskiej "**Porównanie zdolności biodegradacji fenoli u różnych szczepów bakterii**", promotor prof. dr hab. Sylwia Łabużek
- 1990-1995** Studia magisterskie na kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2001-obecnie:** Adiunkt, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- 2002-2004** Visiting Research Associate, Michigan State University, Department of Biochemistry and Molecular Biology, East Lansing, USA
- 1999-2001** Asystent, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

4. 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:

Czynniki determinujące aktywność bakteryjnych 2,3-dioksygenaz katecholowych - kluczowych enzymów w degradacji związków o strukturze aromatycznej

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

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

^aOpis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku 3 (Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych).

^bOświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego znajdują się w Załączniku 5 (Oświadczenia współautorów).

^cWartość IF wg JCR dla publikacji z roku 2012 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, w którym ukazała się publikacja.

4.1 Hupert-Kocurek K., Guzik U., Wojcieszńska D. 2012. Characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. strain S5 induced by high initial phenol concentration. *Acta Biochimica Polonica*, 59, 345-351. (IF₂₀₁₂ 1.185; MNiSW 20 pkt; Indeks cytowań: WoS 1, Scopus 2)

4.2 Wojcieszńska D., Hupert-Kocurek K., Guzik U. 2013. Factors affecting activity of catechol 2,3-dioxygenase from 2-chlorophenol-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2. *Biocatalysis and Biotransformation*, 31, 141-147. (IF_{5-letni} 1.051; MNiSW 15 pkt; Indeks cytowań: WoS 0, Scopus 1)

4.3 Hupert-Kocurek K., Saczyńska A., Piotrowska-Seget Z. 2013. Cadmium increases catechol 2,3-dioxygenase activity in *Variovorax* sp. 12S, a metal-tolerant and phenol-degrading strain. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104, 845-853. (IF_{5-letni} 2.118; MNiSW 20 pkt; Indeks cytowań: WoS 0, Scopus 0)

4.4 Wojcieszńska D., Hupert-Kocurek K., Guzik U. 2013. Influence of the entrapment of catechol 2,3-dioxygenase in κ -carrageenan on its properties. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22, 1219-1225. (IF_{5-letni} 0.808; MNiSW 15 pkt; Indeks cytowań: WoS 0, Scopus 0)

4.5 Hupert-Kocurek K., Stawicka A., Wojcieszńska D., Guzik U. 2013. Cloning and mutagenesis of catechol 2,3-dioxygenase gene from the gram-positive *Planococcus* sp. strain S5. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 23, 381-390. (IF_{5-letni} 2.505; MNiSW 25 pkt; Indeks cytowań: WoS 0, Scopus 0)

4.6 Hupert-Kocurek K., Wojcieszńska D., Guzik U. 2014. Activity of a carboxyl-terminal truncated form of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. S5. *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 598518, doi:10.1155/2014/598518 (IF_{5-letni} 1.603; MNiSW 30 pkt; Indeks cytowań: WoS 0, Scopus 0)

Impact factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Journal Citation Reports: **9.270**

Liczba cytowań* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: wg bazy Web of Science (WoS) –1/ wg bazy Scopus –3

*Dane z dnia: 17 luty 2014

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

Pierścień benzenowy jest drugą, po reszcie glukozyłowej, najbardziej rozpowszechnioną strukturą chemiczną w przyrodzie. Związki o strukturze aromatycznej dostają się do środowiska zarówno w wyniku naturalnych przemian resztek roślinnych i zwierzęcych, jak również są produkowane i uwalniane do środowiska w wyniku przemysłowej i rolniczej działalności człowieka [1]. Gwałtowny rozwój przemysłu, nieodpowiednia gospodarka odpadami i co za tym idzie wzrastające zanieczyszczenie środowiska naturalnego tymi toksycznymi, mutagennymi i zarazem odpornymi na degradację ksenobiotykami skłania do poszukiwań jak najbardziej skutecznych metod ich utylizacji. Główną drogą mineralizacji związków o strukturze aromatycznej w środowisku jest ich degradacja przez oksygenazy, enzymy syntetyzowane przez liczne bakterie, niektóre grzyby i cyjanobakterie [2-5]. Wśród oksygenaz na szczególną uwagę zasługują dioksygenazy, które katalizują rozszczepienie pierścienia aromatycznego poprzez wbudowanie do niego dwóch atomów tlenu. Enzymy te wykazują zróżnicowaną specyficzność substratową i często determinują specyficzność całego szlaku przemian, w których biorą udział [6,7]. Ze względu na możliwość potencjalnego zastosowania dioksygenaz w procesach bioremediacji terenów skażonych związkami o strukturze aromatycznej istnieje konieczność poszukiwania nowych enzymów tego typu oraz prowadzenia różnorodnych badań nad ich stabilnością, specyficznością substratową czy mechanizmem katalizy. Wyniki takich badań pozwalają na wyselekcjonowanie enzymów o właściwościach zapewniających efektywne usuwanie chemicznych zanieczyszczeń ze środowiska.

Prezentowany cykl publikacji jest dokumentacją badań, które prowadziłam w celu określenia wpływu wybranych czynników środowiskowych na aktywność 2,3-dioksygenaz katecholowych szczepów *Planococcus* sp. S5 i *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (pozycje **4.1 - 4.2** osiągnięcia naukowego) wyizolowanych ze środowisk skażonych związkami o strukturze aromatycznej, charakteryzujących się wysokim potencjałem degradacyjnym. Do czynników, które często działają hamująco na aktywność enzymów zaangażowanych w degradację związków aromatycznych należą jony metali. Równoczesne zanieczyszczenie środowiska związkami o strukturze aromatycznej i jonami metali ciężkich, zainspirowało mnie do poszukiwania enzymów degradacyjnych niewrażliwych na tego rodzaju jony. W kolejnej pracy (pozycja **4.3** osiągnięcia naukowego) przedstawiłam wyniki badań nad izolacją i wpływem jonów kadmu na aktywność 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Variovorax* sp. 12S

Załącznik 2 - Autoreferat

wyzolowanego z gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi i zdolnego do degradacji fenolu. Ze względu na to, że immobilizacja jest czynnikiem zwiększającym stabilność enzymów, jak również chroni enzymy przed niekorzystnym wpływem czynników środowiskowych, co umożliwia wykorzystanie ich jako biopreparatów w bioremediacji i przemyśle, badałam wpływ unieruchomienia 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu KB2 w żelu karagenianowym na właściwości tego enzymu (pozycja 4.4 osiągnięcia naukowego). Ponieważ aktywność katalityczna enzymów może także zmieniać się w wyniku zamiany nawet jednego aminokwasu w sekwencji tych białek, kolejnym celem prowadzonych przeze mnie badań było opracowanie metody selekcji aktywnych mutantów 2,3-dioksygenazy katecholowej gramodatniego szczepu *Planococcus* sp. S5, która umożliwiłaby zbadanie wpływu mutacji na właściwości tego enzymu, a równocześnie na identyfikację reszt aminokwasowych istotnych dla jego aktywności (pozycje 4.5 i 4.6 osiągnięcia naukowego).

Bakteryjne dioksygenazy ekstradiolowe przeprowadzają reakcję rozszczepienia pierścienia aromatycznego substratu w pozycji *meta*, pomiędzy hydroksylovanym a niehydroksylovanym atomem węgla. W centrum aktywnym tych enzymów wykazano obecność motywu 2-His-1-karbosylowego związanego, wraz z dwiema cząsteczkami wody, z jonem dwuwartościowego metalu, najczęściej żelaza Fe(II) [7].

Ekstradiolowe rozszczepienie pierścienia aromatycznego przez dioksygenazy rozpoczyna się od usunięcia z centrum aktywnego enzymu 2 cząsteczek wody i związania jonu żelaza z substratem przez dwie grupy hydroksylowe substratu. Substrat początkowo łączy się z żelazem, jako monoanion, jedną deprotonowaną grupą hydroksylową. W miejscu aktywnym występują konserwatywne reszty Tyr i His. Deprotonowana grupa substratu oddziałuje poprzez wiązanie wodorowe z resztą Tyr, co stabilizuje połączenie enzym-substrat. Druga grupa hydroksylowa substratu oddziałuje z resztą His wykazującą silnie zasadowy charakter, dzięki czemu dochodzi do deprotonacji drugiej grupy hydroksylowej substratu. Związanie substratu z żelazem aktywuje żelazo i umożliwia przyłączenie tlenu. W kolejnym etapie dochodzi do połączenia cząsteczki tlenu z Fe²⁺ i jej ataku na węgiel (C2) substratu. Powstaje semichinonowy intermediat nadtlenku żelaza. Dalej tlen jest protonowany przez proton pochodzący z His, następuje rozszczepienie wiązania O-O i powstaje nienasycony lakton. Ostatnim etapem prowadzącym do powstania produktu końcowego jest hydroliza laktonu [6,8].

Do grupy dioksygenaz ekstradiolowych typu I należą 2,3-dioksygenazy katecholowe (C230) zaangażowane w rozkład węglowodorów jednopierścieniowych. Obecność tego typu enzymów stwierdzono u wielu gramujemnych szczepów z rodzaju *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, jak również u niektórych bakterii gramodatnich [5,9]. Do tej grupy enzymów zaliczono także C230 szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 [10] oraz C230 szczepu *Planococcus* sp. S5 (pozycja 4.5 osiągnięcia naukowego). 2,3-dioksygenazy katecholowe

są oligomerami złożonymi z identycznych podjednostek. W każdej podjednostce można wyróżnić dwie domeny: domenę N-terminalną i katalityczną domenę C-terminalną zawierającą dwuwartościowy jon metalu koordynowany przez aminokwasy tworzące, wspomniany wcześniej, motyw 2-His-1-karboksyłowy [7,10]. Jak wykazują badania, większość z opisanych do tej pory 2,3-dioksygenaz katecholowych jest filogenetycznie spokrewniona, a geny je kodujące mogą być zlokalizowane w chromosomie bakteryjnym lub w plazmidach [3,10, pozycja 4.1 osiągnięcia naukowego]. Mechanizm rozszczepienia pierścienia aromatycznego przez 2,3-dioksygenazy katecholowe jest podobny do reakcji katalizowanych przez wszystkie typy dioksygenaz ekstradiolowych.

Czynnikami wpływającymi na aktywność dioksygenaz katecholowych i w konsekwencji na szybkość eliminacji związków o strukturze aromatycznej ze środowiska są przede wszystkim pH, temperatura, stężenie i budowa substratu oraz obecność w środowisku reakcji związków o charakterze inhibitorów bądź aktywatorów.

pH środowiska może wpływać na aktywność enzymów poprzez zmianę ładunku reszt aminokwasowych biorących udział w przyłączaniu substratu lub w katalizie. Na skutek zmian pH, zmianom może ulegać także konformacja enzymów. Zmiana ładunku elektrycznego grup znacznie oddalonych od miejsca aktywnego enzymu, ale niezbędnych dla utrzymania aktywnej struktury trzecio- i czwartorzędowej może prowadzić do rozluźnienia bądź dysocjacji enzymu na podjednostki, co powoduje obniżenie lub utratę jego aktywności. Większość ekstradiolowych dioksygenaz wykazuje najwyższą aktywność w pH neutralnym, chociaż zidentyfikowano również enzymy aktywne w środowisku o pH 9.0 -11.0 [9]. Badane enzymy: 2,3- dioksygenaza katecholowa szczepu *Planococcus* sp. S5 jak i enzym szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 charakteryzował podobny profil pH. Oba enzymy wykazywały najwyższą aktywność w pH 8.0 i traciły około 80% aktywności w pH 6.0. Jednak w przeciwieństwie do C230 szczepu KB2, enzym gramodatniego szczepu z rodzaju *Planococcus* był mniej wrażliwy na wzrost pH środowiska i zachowywał około 30% aktywności w środowisku alkalicznym (pH 10.0) (pozycje 4.1 i 4.4 osiągnięcia naukowego). Niska wrażliwość na zmiany pH środowiska stanowi pożądaną cechę enzymów stosowanych w bioremediacji lub procesach przemysłowych.

Kolejnym podstawowym czynnikiem modulującym aktywność wszystkich enzymów jest temperatura. Wyniki badań (pozycja 4.1 osiągnięcia naukowego) wykazały, że dioksygenaza 2,3-katecholowa szczepu *Planococcus* charakteryzowała się najwyższą aktywnością w temperaturze 60°C. W temperaturze tej enzym był jednak niestabilny i tracił aktywność po około 10 min. Niska stabilność w wysokiej temperaturze była najprawdopodobniej związana z podjednostkową budową enzymu. Zachowywał on około 70% swojej aktywności po 20 min inkubacji w temperaturze 50°C i blisko 10% aktywności po 60 min inkubacji w 40°C. Wzrost temperatury powodował również wzrost aktywności C230 pochodzącej z komórek szczepu

Stenotrophomonas maltophilia KB2, jednak profil temperaturowy tego enzymu znacznie różnił się od profilu C230 szczepu z rodzaju *Planococcus*. Najwyższą aktywność enzym ten wykazywał w 25°C. Dalszy wzrost temperatury prowadził do stopniowego obniżania jego aktywności (pozycja 4.4 osiągnięcia naukowego). Należy zwrócić uwagę, że wysoka aktywność właściwa enzymu szczepu KB2 w niskich temperaturach, sięgająca 400 mU/ min/mg białka w temperaturze od 5°C do 20°C, zapewnia skuteczną degradację pierścienia aromatycznego w warunkach panujących w środowisku naturalnym.

Dioksygenazy katecholowe wykazują zróżnicowaną specyficzność substratową i często determinują specyficzność całego szlaku przemian związków o strukturze aromatycznej, w których biorą udział. Ich substratem mogą być zarówno katechol jak i jego pochodne zawierające podstawniki metylowe, etylowe bądź chlorowe [6,7]. Większość tego typu enzymów rozszczepia katechol z większą wydajnością niż jego podstawione pochodne ponieważ ekstradiolowe rozszczepienie niektórych metylowych i chlorowych związków aromatycznych może prowadzić do powstawania toksycznych acylohalogenków lub metylomukonolaktonów, które powodują ich inaktywację [12,13]. Ponadto, niższa wydajność procesu rozszczepienia chlorowych pochodnych katecholu jest spowodowana tym, że chlor jest podstawnikiem silnie elektroujemnym, dezaktywującym pierścień aromatyczny. Kolejny etap badań obejmował zatem określenie wpływu budowy i właściwości substratu na aktywność 2,3-dioksygenazy katecholowej. Badania aktywności właściwej dioksygenaz katecholowych względem katecholu i jego pochodnych: 3- i 4-metylokatecholu oraz 4-chlorokatecholu wykazały, że obecność grupy metylowej w pozycji *meta* pierścienia aromatycznego substratu powodowała znaczne obniżenie aktywności badanych enzymów. Względem 3-metylokatecholu aktywność tych enzymów stanowiła jedynie 10% ich aktywności względem katecholu. Obecność grupy metylowej w pozycji *para* pierścienia aromatycznego substratu nie wpływała na aktywność C230 szczepu *Planococcus* sp. Nieznacznie niższą aktywność względem tego substratu wykazywała C230 szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (pozycje 4.1 i 4.2 osiągnięcia naukowego). C230 tego szczepu, wykazująca najwyższą aktywność względem katecholu jako substratu, jest zatem typową dioksygenazą katecholową. Interesujące wyniki otrzymano badając aktywność 2,3-dioksygenaz względem 4-chlorokatecholu. Obecność atomu chloru w pierścieniu aromatycznym substratu wpływała hamująco na aktywność C230 szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, podczas gdy enzym szczepu *Planococcus* sp. S5 wykazywał względem tego substratu aromatycznego aktywność dwukrotnie wyższą w porównaniu z jego aktywnością względem katecholu (pozycje 4.1 i 4.2 osiągnięcia naukowego). Wyższa aktywność 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu S5 względem 4-chlorokatecholu w porównaniu z katecholem wyróżnia ten enzym spośród poznanych dotąd dioksygenaz zarówno bakterii gramododatnich, jak i gramujemnych i może sugerować obecność mechanizmów warunkujących reaktywację tego

enzymu w komórkach szczepu *Planococcus* sp. Czyni to badany enzym i szczep bakteryjny użytecznymi w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych szczególnie uciążliwymi i trudnymi do usunięcia chlorowymi związkami aromatycznymi.

W środowisku, oprócz związków stanowiących substraty dioksygenaz katecholowych, bardzo często obecne są związki chemiczne, które mogą być inhibitorami, jak i aktywatorami tych enzymów. Do tego typu związków należą pochodne fenolowe, które swoją budową przypominają katechole i przez to uważane są za kompetycyjne inhibitory dioksygenaz katecholowych [13]. Badania prowadzone w ramach prezentowanej rozprawy habilitacyjnej (pozycja 4.2 osiągnięcia naukowego) jednoznacznie wykazały hamujący wpływ tego typu związków na aktywność C230 szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. W obecności wszystkich badanych stężeń 2- i 3- metylofenolu oraz 2- i 4- chlorofenolu obserwowano spadek aktywności właściwej enzymu. Warto jednak podkreślić, że w obecności tych związków enzym nadal wykazywał około 60-70% swojej aktywności. Aktywność ta zmniejszała się znacznie w obecności 2,4- dichlorofenolu. Mogło to być związane z faktem, iż dioksygenazy katecholowe wykazują większe powinowactwo do substratów zawierających grupy elektronoakceptorowe w pierścieniu benzenowym. Hamujący wpływ na aktywność C230 wykazywały również alkohole alifatyczne. Spadek aktywności C230 (średnio o około 35%) obserwowano w obecności etanolu i butanolu we wszystkich badanych stężeniach oraz metanolu w stężeniu 500 i 1000 μM . Metanol w niższym stężeniu (100 μM) działał aktywująco na enzym, najprawdopodobniej poprzez zwiększenie jego stabilności.

Ze względu na obecność jonów żelaza (II) w centrum aktywnym, dioksygenazy katecholowe są wrażliwe na działanie czynników oksydacyjnych i związków chelatujących [14]. Prowadzone badania (pozycja 4.2 osiągnięcia naukowego) wykazały, że H_2O_2 w stężeniu 10 μM powodował obniżenie aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej pochodzącej ze szczepu KB2 o około 80% i całkowitą utratę aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu z rodzaju *Planococcus* (pozycja 4.1 osiągnięcia naukowego). Obserwowany w badaniach hamujący wpływ nadtlenu wodoru był związany z inaktywującym enzymy utlenianiem jonów żelaza (II) do jonów żelaza (III). Natomiast, spośród testowanych związków chelatujących, hamujący wpływ na aktywność 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu KB2 wywierała jedynie 8-hydroksychinolina w stężeniu 10 μM . W obecności wyższych stężeń tego związku, jak również w obecności innych chelatorów (EDTA i fenantrolina) we wszystkich badanych stężeniach nie obserwowano hamowania, ale wzrost aktywności badanego enzymu (pozycja 4.2 osiągnięcia naukowego).

Badania nad 2,3-dioksygenazą katecholową szczepu KB2, wykazały wyjątkowo wysoką aktywność degradacyjną enzymu [10, pozycja 4.2 osiągnięcia naukowego], ale równocześnie jego wrażliwość na różne czynniki środowiskowe (pozycja 4.2 osiągnięcia naukowego, IF),

co znacznie ogranicza możliwość potencjalnego zastosowania tego enzymu w procesach bioremediacji. Czynnikiem, który może stabilizować i wydłużać żywotność biokatalizatora, jak również chronić enzym przed negatywnym wpływem środowiska jest jego unieruchomienie na nośniku. Jedną z często stosowanych, przebiegającą w łagodnych warunkach, prostą i taną metodą immobilizacji enzymów jest ich pułapkowanie w żelach, najczęściej alginianie wapnia i charakteryzującym się wyższą odpornością na stres mechaniczny κ -karagenianie [15,16]. Ponieważ unieruchomienie 2,3- dioksygenazy katecholowej szczepu KB2 w żelu alginianowym nie spowodowało istotnych zmian jej wrażliwości na hamujące działanie związków fenolowych, a jedynie w nieznacznym stopniu chroniło enzym przed działaniem alkoholi alifatycznych [17], podjęłam próbę immobilizacji badanego enzymu w κ -karagenianie (pozycja 4.4 osiągnięcia naukowego). Zastosowanie tego nośnika spowodowało wprawdzie częściową utratę aktywności właściwej enzymu, najprawdopodobniej w wyniku wypłukiwania go z porów żelu, ale równocześnie zwiększyło jego stabilność. Immobilizowany enzym wykazywał aktywność w 14 dniu po izolacji, podczas gdy wolny enzym tracił 99,95% swojej aktywności w czasie 24 godzin. Immobilizacja nie wpłynęła na zmianę optimum pH enzymu, ale obniżyła jego optimum temperaturowe o 10°C, jak również zwiększyła powinowactwo badanej 2,3-dioksygenazy do substratu. Ponadto, po zastosowaniu karagenianu jako nośnika, zaobserwowano znaczne obniżenie wrażliwości enzymu na działanie inhibitorów, takich jak chlorofenole, azydek sodu i siarczany miedzi. Słabszy ochronny efekt immobilizacji obserwowano natomiast w obecności alkoholi alifatycznych i metylofenoli. Uzyskane wyniki wykazały, że immobilizacja 2,3-dioksygenazy katecholowej w żelu karagenianowym skutecznie zabezpiecza badany enzym przed niekorzystnym wpływem czynników środowiskowych, szczególnie przed silnie toksycznymi chloropochodnymi fenolu, które często towarzyszą w środowisku związkom stanowiącym substraty dla dioksygenaz katecholowych. Rodzi to nadzieję na zastosowanie immobilizowanego enzymu jako biopreparatu w procesach bioremediacji.

Zanieczyszczeniu środowiska związkami o strukturze aromatycznej bardzo często towarzyszą zanieczyszczenia metalami, takimi jak miedź, cynk, kadm, mangan, żelazo [18]. Dlatego też coraz częściej poszukuje się szczepów bakterii zdolnych do degradacji związków o strukturze aromatycznej i opornych na metale, jak również enzymów degradacyjnych niewrażliwych na jony metali. Metale mogą działać jako inhibitory enzymów, w tym enzymów warunkujących degradację związków aromatycznych, blokując ich ważne grupy funkcyjne, wypierając jony z ich centrum aktywnego, bądź zmieniając ich konformację w wyniku reagowania jonu metalu z grupami sulfhydrylowymi aminokwasów siarkowych [19,20]. Obecność Fe^{2+} lub Fe^{3+} w środowisku reakcji powodowała, w zależności od stężenia wprowadzanego jonu, spadek aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 o 30% - 40% podczas gdy w obecności Mn^{2+} w stężeniu 1 μM

Załącznik 2 - Autoreferat

aktywność enzymu była zredukowana o około 60% (pozycja 4.2 osiągnięcia naukowego). Niezwykle cenne wyniki uzyskano badając wpływ jonów kadmu na aktywność C230 izolowanej z komórek szczepu *Variovorax* sp. 12S (pozycja 4.3 osiągnięcia naukowego). Ten, wyizolowany z gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi szczep nie tylko wykazywał oporność na jony metali ciężkich, w tym kadm, ale również był zdolny do degradacji fenolu jako jedyne źródła węgla i energii w obecności 0,1 mM tego metalu. Ponadto, aktywność 2,3-dioksygenazy katecholowej tego szczepu, izolowanej z hodowli prowadzonej z dodatkiem kadmu była o 20% wyższa od aktywności enzymu izolowanego z hodowli kontrolnej bez metalu. Co więcej, wprowadzenie kadmu w stężeniu 1 mM do mieszaniny reakcyjnej hamowało enzym izolowany z hodowli kontrolnej, podczas gdy aktywność C230 izolowanej z komórek hodowanych w obecności tego metalu wzrastała. Ponieważ kadm indukuje ekspresję wielu różnych genów kodujących, między innymi, białka zaangażowane w odpowiedź komórki na stres oksydacyjny, białka odpowiedzialne za naprawę DNA, czy transport metali [21], co powoduje wzrost zapotrzebowania energetycznego komórki, wyższa aktywność C230 w obecności tego metalu mogła wynikać ze zwiększonej syntezy enzymu niezbędnego w uzyskiwaniu energii z fenolu, jako jedyne źródła węgla. Wyizolowany szczep *Variovorax* sp. 12S degradujący fenol w obecności kadmu, jak również 2,3-dioksygenaza katecholowa tego szczepu wykazująca wysoką aktywność degradacyjną w obecności tego metalu wydają się być dobrymi kandydatami w procesach bioremediacji środowisk zdegradowanych.

Właściwości katalityczne enzymów mogą zmieniać się w wyniku mutacji polegających na zamianie nawet jednego aminokwasu w sekwencji tych białek. Interesującym wydawało się zatem zbadanie wpływu mutacji na aktywność C230. Ze względu na fakt, że w literaturze opisano niewiele dioksygenaz katecholowych pochodzących z bakterii gramdodatnich i nie opisano żadnej dioksygenazy z bakterii rodzaju *Planococcus*, do badań wybrano enzym szczepu *Planococcus* sp. S5 (pozycja 4.5 osiągnięcia naukowego).

Prowadząc badania nad dioksygenazą 2,3-katecholową szczepu *Planococcus* sp. S5 (pozycja 4.1 osiągnięcia naukowego) zlokalizowano gen kodujący ten enzym w plazmidzie szczepu S5 i określono jego sekwencję nukleotydową (GenBank ID: HQ223337.2). Sekwencja nukleotydowa tego genu wykazała wysoki procent homologii z sekwencjami nukleotydowymi genów kodujących C230 w komórkach szczepów z rodzaju *Pseudomonas*, co może wskazywać na wspólne pochodzenie tych enzymów i/lub możliwość transferu genów kodujących 2,3-dioksygenazę katecholową pomiędzy odległymi filogenetycznie szczepami bakteryjnymi (pozycja 4.1 osiągnięcia naukowego). Analiza sekwencji aminokwasowej badanej dioksygenazy pozwoliła na zaklasyfikowanie jej do podrodziny 2A w nadrodzinie I dioksygenaz katecholowych (pozycja 4.5 osiągnięcia naukowego) oraz utworzenie modelu struktury przestrzennej tego enzymu. Zaproponowany model zakłada obecność 6 zewnątrznie

Załącznik 2 - Autoreferat

umiejscowionych helis α ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) oraz 17 struktur o charakterze β -harmonijki zlokalizowanych wewnątrz cząsteczki (pozycja 4.6 osiągnięcia naukowego). Podobnie jak w strukturze 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Pseudomonas putida* mt-2, która stanowiła matrycę w modelowaniu struktury badanego białka, w centralnej części C-terminalnej domeny znajduje się zagłębienie, na końcu którego zlokalizowane jest miejsce wiązania jonów Fe(II). Katechol i tlen wchodzi do centrum aktywnego enzymu przez kanał składający się głównie z hydrofobowych reszt aminokwasowych (pozycja 4.6 osiągnięcia naukowego).

Badania nad wpływem mutacji na właściwości 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Planococcus* sp. S5 wymagały, poza wyborem metody mutagenyzy, opracowania metody klonowania i selekcji uzyskanych mutantów. Ponieważ mutacje zachodzące w środowisku są zjawiskiem losowym, do wprowadzania zmian w obrębie genu kodującego 2,3-dioksygenazę katecholową zastosowano metodę error-prone PCR (error-prone PCR, podatna na błędy reakcja PCR). W metodzie tej polimeraza o niskiej wierności kopiowania wstawia nieprawidłowe nukleotydy, co skutkuje powstaniem nowych, przypadkowo zmutowanych produktów. Poziom uzyskiwanych mutacji może być odpowiednio dostosowany, w wyniku czego, w obrębie badanego genu wprowadzane są średnio 1-2 mutacje. Metoda ta jest powszechnie stosowana i umożliwia identyfikację reszt aminokwasowych krytycznych dla aktywności wielu białek, jak również na uzyskanie enzymów o zwiększonej termostabilności czy specyficzności substratowej.

W wyniku przeprowadzonej mutagenyzy genu kodującego 2,3-dioksygenazę katecholową u szczepu *Planococcus* sp. S5 i klonowania tego genu uzyskano bibliotekę mutantów, które poddałam selekcji w celu wyodrębnienia mutantów niosących aktywną formę enzymu. Analiza i porównanie sekwencji DNA genu *c23o* kodującego dziką formę C230 z sekwencjami genów kodujących mutowane formy białka wykazała, że większość z ponad 250 aktywnych mutantów niosła mutacje typu „silent”. Jedynie u ośmiu z nich stwierdzono obecność co najmniej jednej mutacji wywołującej zmianę aminokwasu w sekwencji badanego białka. Ponieważ za aktywność 2,3- dioksygenaz katecholowych odpowiedzialna jest domena C-terminalna, w obrębie której zlokalizowane są reszty aminokwasowe tworzące centrum aktywne enzymu, w tym reszty wiążące jon Fe(II), do dalszych badań wybrano formy białka zawierające zmiany aminokwasowe w obrębie domeny C-terminalnej (forma C230B65), jak i w C- i N-terminalnej domenie białka (C230B58, C230B81). Oznaczenia aktywności właściwej zmutowanych form enzymu wykazały, że największy wpływ na właściwości i aktywność enzymu miało zastąpienie reszty argininy glutaminą w pozycji 296 badanego białka (R296Q). Forma C230B65 enzymu wykazywała przesunięcie optimum pH w kierunku pH kwaśnego. Jej aktywność w pH 5,0 i pH 4,0 względem aktywności w pH 7,0 wynosiła odpowiednio 144,7% i 124%. Obecność glutaminy w pozycji 296 2,3- dioksygenazy

katecholowej wpłynęła również na zwiększenie aktywności enzymu względem katecholu i na wzrost jego powinowactwa do substratu (K_m zmutowanej formy białka była 2,5 razy niższa niż K_m dzikiej formy enzymu). Reszta aminokwasowa w pozycji 296 2,3-dioksygenazy katecholowej nie uczestniczy bezpośrednio w formowaniu kieszeni wiążącej substrat, ale oddziałuje z leucyną w pozycji 298, resztą aminokwasową zaangażowaną w formowanie kanału, poprzez który katechol dostaje się do miejsca aktywnego enzymu. Zastąpienie reszty argininy glutaminą, aminokwasem mniejszym, o nieco wyższym indeksie hydropatycznym niż arginina, prawdopodobnie ułatwiało substratowi dostęp do centrum aktywnego enzymu. Na udział reszty aminokwasowej w pozycji 296 2,3-dioksygenazy katecholowej w przyłączaniu substratu wskazuje również fakt hamowania aktywności zmutowanej formy enzymu w obecności niższych stężeń katecholu niż dla enzymu dzikiego typu. Dla aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Planococcus* sp. krytyczne okazały się również reszty fenyloalaniny w pozycji 168 i 212 tego enzymu. Substytucja hydrofobowej reszty fenyloalaniny resztą seryny, aminokwasu biorącego udział w formowaniu wiązań wodorowych, wpłynęła na obniżenie aktywności zmutowanych form C230B58 i 230B81 względem katecholu o odpowiednio 60% i 40% w porównaniu z aktywnością dzikiej formy enzymu, z drugiej strony jednak zwiększyła powinowactwo enzymu do substratu.

Cennych informacji dostarczyły również wyniki badań nad formą białka pozbawioną, w wyniku mutacji typu nonsens w pozycji 289, ostatnich 19 reszt aminokwasowych (pozycja 4.6 osiągnięcia naukowego). Skrócona forma enzymu wykazywała 1,5 do 1,8 razy wyższą aktywność względem odpowiednio 4-metylokatecholu i 4-chlorokatecholu niż dzika forma białka. Ponadto, pomimo niższej aktywności mutanta względem katecholu (spadek aktywności wynosił około 20%) wykazywał on wyższe powinowactwo do tego substratu aromatycznego. Obserwowane zmiany specyficzności substratowej były najprawdopodobniej wynikiem zmian struktury przestrzennej enzymu. Porównanie modelu przestrzennego zmutowanej i dzikiej formy C230 szczepu *Planococcus* sp. S5 wykazało, że usunięcie końcowych aminokwasów doprowadziło do odchylenia α_5 -helisy i usunięcia α_6 -helisy stanowiącej rodzaj „przykrywki” ograniczającej dostęp do centrum aktywnego enzymu. Dzięki tym zmianom wejście do centrum aktywnego enzymu uległo poszerzeniu, co z kolei ułatwiło dostęp i umożliwiło optymalne dla przebiegu reakcji ułożenie substratów z podstawnikami chlorowymi i metylowymi. Uzyskane wyniki wskazujące na możliwość modulowania aktywności 2,3- dioksygenaz katecholowych w wyniku usuwania reszt aminokwasowych ograniczających wejście do centrum aktywnego enzymu wydają się mieć bardzo duże znaczenie w projektowaniu enzymów o wyższej aktywności i szerszej specyficzności substratowej.

Badania zaprezentowanego osiągnięcia naukowego mają charakter badań podstawowych o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym w biotechnologiach środowiskowych,

Załącznik 2 - Autoreferat

na przykład w bioremediacji środowisk skażonych związkami o strukturze aromatycznej i metalami ciężkimi, jak również w projektowaniu i konstruowaniu enzymów o udoskonalonych właściwościach katalitycznych. Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- (1) pozyskanie 2,3- dioksygenazy katecholowej gramodatniego szczepu *Planococcus* sp. S5 o niskiej wrażliwości na wzrost pH środowiska, wykazującej aktywność w wysokich temperaturach i charakteryzującej się wysoką aktywnością degradacyjną względem 4-chlorofenolu
- (2) wyizolowanie metaloopornego szczepu *Variovorax* sp S12 zdolnego do degradacji fenolu w obecności jonów kadmu i produkującego 2,3- dioksygenazę katecholową wykazującą wysoką aktywność degradacyjną w obecności 0,1 mM tego metalu
- (3) wykazanie, że immobilizacja w κ -karagenianie zwiększa stabilność oraz skutecznie chroni 2,3- dioksygenazę katecholową szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 przed niekorzystnym wpływem czynników środowiskowych
- (4) identyfikację genu kodującego 2,3- dioksygenazę katecholową szczepu S5, utworzenie modelu struktury przestrzennej oraz opracowanie metody umożliwiającej zbadanie wpływu mutacji na aktywność tego enzymu i lokalizację reszt aminokwasowych ważnych dla jego aktywności katalitycznej
- (5) identyfikację, w strukturze 2,3- dioksygenazy katecholowej, reszt aminokwasowych (R296, F168 i F212) istotnych dla aktywności enzymu oraz wykazanie roli C-końcowego fragmentu białka w specyficzności substratowej tej dioksygenazy
- (6) pozyskanie zmutowanej formy 2,3- dioksygenazy katecholowej o wysokiej aktywności w niskim pH środowiska (pH 5.0) i zwiększonym powinowactwie do katecholu

Piśmiennictwo

1. Wojcieszńska D., Guzik U., **Hupert-Kocurek K.**, Marszałek J. 2010. Biochemiczne i fizjologiczne skutki oddziaływania związków fenolowych na organizm człowieka. *Medycyna środowiskowa*, 14, 105-111
2. Łabuźek S., **Hupert-Kocurek K.**, Skurnik M. 2003. Isolation and characterization of new *Planococcus* sp. strain able for aromatic hydrocarbons degradation. *Acta Microbiologica Polonica*, 52, 395-404
3. Guzik U., Greń I., **Hupert-Kocurek K.**, Wojcieszńska D. 2011. Catechol 1,2-dioxygenase from the new aromatic compounds - degrading *Pseudomonas putida* strain N6. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65, 504-512
4. Greń I., Wojcieszńska D., Guzik U., Perkosz M., **Hupert-Kocurek K.** 2010. Enhanced biotransformation of mononitrophenols by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 in the presence of aromatic compounds of plant origin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 289-295
5. Michałowicz J., Duda W. 2007. Phenols transformations in the environment and living organisms. *Current Topics in Biophysics*, 30, 24-36
6. Bugg T.D.H., Ramaswamy R. 2008. Non-heme iron-dependent dioxygenases: unraveling catalytic mechanisms for complex enzymatic oxidations. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 134-140

7. Kita A., Kita S., Fujisawa I., Inaka K., Ishida T., Horiike K., Nozaki M., Miki K. 1999. An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure*, 7, 25–34
8. Deeth R.J., Bugg T.D.H. 2003. A density functional investigation of the extradiol cleavage mechanism in non-heme iron catechol dioxygenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8, 409-418
9. Djokic L., Narancic T., Nikodinovic-Runic J., Bajkic S., Vasiljevic B. 2011. Four *Bacillus* sp. soil isolates capable of degrading phenol, toluene, biphenyl, naphthalene, and other aromatic compounds exhibit different aromatic catabolic potentials. *Archives Biological Science*, 63, 1057–1067
10. Wojcieszynska D., **Hupert-Kocurek K.**, Greń I., Guzik U. 2011. High activity catechol 2,3-dioxygenase from the cresols-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65, 853-858
11. Klečka G.M., Gibson D.T. 1981. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 1159–1165
12. Wojcieszynska D., Guzik U., **Hupert-Kocurek K.**, Siupka P. 2011. Mikrobiologiczny rozkład chlorofenoli, uciążliwych odpadów przemysłu chemicznego. *Przemysł Chemiczny*, 90/8, 1515-1519
13. Bertini I., Briganti F., Scozzafava A. 1994. Aliphatic and aromatic inhibitors binding to the active site of C230 from *Pseudomonas putida* mt-2. *FEBS Letters*, 343, 56–60
14. Kaschabek S.R., Kasberg T., Muller D., Mars A.E., Janssen D.B., Reineke W. 1998. Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chloroC230 of *Pseudomonas putida* GJ31. *J of Bacteriology*, 180, 296–302
15. Wojcieszynska D., Guzik U., Nowak A., **Hupert-Kocurek K.** 2011. Immobilizowane enzymy w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych arenami. *Ekologia i technika*, 19, 53-61
16. Górecka E., Jastrzębska M. 2011. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*, 75, 65-86
17. Wojcieszynska D., **Hupert-Kocurek K.**, Jankowska A., Guzik U. 2012. Properties of catechol 2,3-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels. *Biochemical Engineering Journal*, 66, 1-7
18. Xiao J., Guo L., Wang S., Lu Y. 2010. Comparative impact of cadmium on two phenanthrene-degrading bacteria isolated from cadmium and phenanthrene co-contaminated soil in China. *Journal of Hazardous Materials*, 174, 818–823
19. Guzik U., Wojcieszynska D., Greń I., **Hupert-Kocurek K.** 2010. Badania aktywności dioksygenaz katecholowych w obecności jonów wybranych metali ciężkich w aspekcie bioremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami aromatycznymi. *Ochrona Środowiska*, 32, 9-13
20. Helbig K., Grosse C., Nies D.H. 2008. Cadmium toxicity in glutathione mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190, 5439–5454
21. Binet M.R., Pool R.K. 2000. Cd(II), Pb(II), and Zn(II) ions regulate expression of the metal transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 473, 67–70

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo badawczych

Pracę naukową rozpocząłam 1 października 1995 roku w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, jako słuchacz Dziennego Studium Doktoranckiego w zakresie Przyrodniczych Podstaw Ochrony Środowiska. Moje zainteresowania naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora koncentrowały się wokół problemu degradacji związków o strukturze aromatycznej przez drobnoustroje, a zwłaszcza

Załącznik 2 - Autoreferat

podłożem genetycznym tych procesów. W związku z tym, że u wielu szczepów bakterii informacja genetyczna o syntezie enzymów katalizujących rozkład danego związku aromatycznego kodowana jest plazmidowo, celem prowadzonych przeze mnie w tym okresie badań było uzyskanie, z mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego, plazmidowych szczepów bakterii, zdolnych do degradacji wybranych związków aromatycznych. Porównywałam aktywność degradacyjną szczepów gramdodatnich i gramujemnych, badałam wpływ grupy funkcyjnej w pierścieniu aromatycznym na szybkość procesów degradacyjnych, oraz podjęłam próbę wyjaśnienia wpływu zastosowanego substratu aromatycznego na rodzaj wykorzystywanego szlaku metabolicznego i udziału plazmidów w tych procesach. Wyniki uzyskanych badań były prezentowane na zjazdach Polskiego Towarzystwa Naukowego (**Zał. 4, pkt. B, poz. 22-27**) W czasie studiów doktoranckich uczestniczyłam w kursach i szkoleniach, podczas których zapoznałam się z podstawowymi metodami i technikami biologii molekularnej, inżynierii genetycznej oraz identyfikacją mikroorganizmów metodą analizy 16S rDNA (**Zał. 4, pkt. R, poz. 7-11**). W 1997 i 1999 roku, w celu poszerzenia mojego warsztatu naukowego, odbyłam staż naukowy na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku i w Department of Medical Biochemistry, University of Turku, Finlandia (**Zał. 4, pkt. L, poz. 3 i 4**).

25 października 2000 roku obroniłam pracę doktorską pt. „Plazmidy szczepów *Acinetobacter* sp. i *Planococcus* sp. zdolnych do degradacji wybranych związków aromatycznych”, której promotorem jest prof. dr hab. Sylwia Łabużek i uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych. W pracy tej wykazałam zdolność dwóch nowych szczepów bakterii, zaklasyfikowanych metodą amplifikacji i sekwencjonowania fragmentu genu 16S rDNA do rodzaju *Acinetobacter* i *Planococcus*, do degradacji salicylanu sodu, benzoesu sodu i fenolu oraz określiłam szlaki degradacji tych substratów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że obecność w pierścieniu aromatycznym substratu grupy karboksylowej, obniżającej toksyczność oraz zwiększającej rozpuszczalność w wodzie, ułatwia procesy degradacji. Przede wszystkim jednak, w komórkach obu badanych szczepów wykazałam obecność plazmidów, określiłam ich liczbę, wielkość i podjęłam próbę ich analizy molekularnej. W pracy opisałam również zależność między szlakiem degradacji substratu aromatycznego a obecnością plazmidów w komórkach szczepów z rodzaju *Acinetobacter* i *Planococcus* i zlokalizowałam gen kodujący 2,3- dioksygenazę katecholową w plazmidach badanych szczepów. Podjęłam także próby przeniesienia plazmidowego DNA, izolowanego z badanych szczepów bakterii do bezplazmidowych, niezdolnych do degradacji substratów aromatycznych szczepów *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus epidermidis*, które wykazały możliwość przenoszenia plazmidów między bakteriami gramujemnymi i gramdodatnimi. Moja rozprawa doktorska została wyróżniona Nagrodą indywidualną II

stopnia JM Rektora (**Zał. 3, pkt. L, poz. 1**), a uzyskane wyniki stały się podstawą pracy pt. „Isolation and characterization of new *Planococcus* sp. strain able for aromatic hydrocarbons degradation” (**Zał. 3, pkt. IIA, poz. 11**).

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania nad możliwością przenoszenia, wyizolowanych i opisanych podczas prowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań, plazmidów degradacyjnych szczepu *Acinetobacter* sp. S2. Równocześnie, w ramach badań statutowych Katedry Biochemii, rozpoczęłam prace nad identyfikacją i klonowaniem genów kodujących enzymy szlaków degradacji struktury aromatycznej u szczepu *Planococcus* sp. S5 (**Zał. 4, pkt. P, poz. 1-3**). Poznanie organizacji operonów degradacyjnych tego szczepu bakterii umożliwiłoby w przyszłości zastosowanie go jako potencjalnego źródła genów w konstruowaniu genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów charakteryzujących się wysoką wydajnością rozkładu związków aromatycznych. Wstępne wyniki powyższych badań były prezentowane podczas XXXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (**Zał. 4, pkt. B, poz. 18, 19**).

Poza prowadzonymi badaniami współuczestniczyłam w opracowaniu i pisaniu wydanego przez Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, w języku polskim i angielskim, skryptu obejmującego wybrane zagadnienia z biotechnologii mikroorganizmów (**Zał. 3, pkt. E, poz. 1, 2**). Dużym wyróżnieniem było zaproszenie mnie do wygłoszenia referatu w ramach TEMPUS-JEP workshop on Risk and Assessment of GMO- Environmental and Breeding Approach, organizowanego na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, z udziałem przedstawicieli zagranicznych ośrodków naukowych współpracujących z Wydziałem (**Zał. 3, pkt. Ł, poz. 1**).

W 2002 roku otrzymałam propozycję udziału w projekcie badawczym pt: „Mechanism of regulation of DNA replication in *Escherichia coli*” (**Zał. 3, pkt. J, poz. 3**) prowadzonym w Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University w Michigan, USA pod kierunkiem prof. Jona M. Kaguni, światowego eksperta w zakresie genetyki bakterii. W ramach realizowanego projektu byłam odpowiedzialna za opracowanie metody umożliwiającej uzyskanie kolekcji zmutowanych, aktywnych form białka DnaC będącego jednym z inicjatorów procesu replikacji DNA w komórkach bakterii. Uzyskane zmutowane formy tego białka i ich charakterystyka biochemiczna pozwalają na poznanie mechanizmów działania DnaC na poziomie molekularnym, a w przyszłości na projektowanie leków specyficznym hamujących wzrost bakterii chorobotwórczych. Dodatkowo, w ramach innego, prowadzonego w laboratorium prof. Kaguni projektu zostałam zaangażowana do prac nad konstrukcją plazmidu oriC - pCM959-Cm^R. Plazmid ten był niezbędny w badaniach nad rolą oligomeryzacji białka DnaA w inicjacji replikacji chromosomu bakteryjnego (Hupert-Kocurek i Kaguni dane niepublikowane, patrz: Simmons L.A., Felczak M., Kaguni J.M. 2003. DnaA protein of *Escherichia coli*: oligomerization at the *E. coli* chromosomal origin is required for initiation and involves

specific N-terminal amino acids. *Molecular Microbiology*, 49, 849–858). Oprócz pracy badawczej w laboratorium prof. Kaguni, sprawowałam opiekę merytoryczną nad eksperymentami naukowymi prowadzonymi przez studentów przygotowujących swoje prace licencjackie i magisterskie. Uczestniczyłam także aktywnie w seminariach katedralnych oraz spotkaniach naukowych, na których prezentowałam wyniki swoich badań. Mój pobyt w Department of Biochemistry and Molecular Biology zaowocował opracowaniem nowej, genetycznej metody umożliwiającej badanie białek zaangażowanych w podstawowe procesy życiowe bakterii i uzyskaniem kolekcji ponad 1500 aktywnych mutantów białka DnaC. Metoda oraz charakterystyka kilku z uzyskanych przeze mnie mutantów są przedmiotem opublikowanej w *Applied and Environmental Microbiology* pracy (**Zał. 3, pkt. IIA, poz. 10**). Ponadto, zdobyte doświadczenie oraz poznanie nowych metod pozwoliło na opracowanie i wprowadzenie nowych technik badawczych do ćwiczeń z biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, na uruchamianym w 2004 roku, na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego, kierunku studiów- Biotechnologia. Wielkim wyróżnieniem było zaproszenie mnie, przez profesora Jona Kaguni w 2010, do wspólnego opracowania i napisania rozdziału w książce: *Computational Biology and Applied Bioinformatics* (**Zał. 3, pkt. D, poz. 1**).

Po powrocie ze stażu dołączyłam do zespołu prowadzącego badania nad kometabolicznym rozkładem silnie toksycznych i wyjątkowo opornych na procesy biodegradacji chloro- i nitrofenoli, które obejmowały swym zakresem wybór fenolowych związków roślinnych (FZR) do kometabolicznego rozkładu pochodnych fenolowych, badanie dynamik rozkładu wybranych związków roślinnych oraz ich wpływu na rozkład nitrofenoli i chlorofenoli przez szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że fenolowe związki roślinne, takie jak: kwas benzoesowy, 4-hydroksybenzoesowy, protokatechowy, waniliowy i katechol stanowiły jedyne źródło węgla i energii dla badanego szczepu bakterii. Obecność tego typu związków warunkowała całkowity rozkład 4-chlorofenolu, podczas gdy transformacja 3-chlorofenolu w obecności wymienionych FZR była połączona z akumulacją metabolitu przejściowego. Stwierdzono również, że poszczególne FZR indukowały syntezę różnych dioksygenaz, zarówno ekstradiolowych, jak i intradiolowych w komórkach szczepu KB2. Owoce tych badań były prace doświadczalne (**Zał. 3, pkt. IIA, poz. 6,9**) i przeglądowe (**Zał. 3, pkt. IIA, poz. 15; Zał. 3, pkt. D, poz. 8**). Przedmiotem powyższych badań była także ocena toksyczności 4-chlorofenolu w obecności dodatkowego źródła węgla, jak również próba określenia czy i w jakim stopniu struktura ściany komórkowej bakterii wpływa na toksyczność tego związku aromatycznego. Do badań, poza gramujemnym szczepem *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 wykorzystano gramodatni szczep *Planococcus* sp. S5, zdolny do rozkładu takich FZR, jak kwas benzoesowy, 4-hydroksybenzoesowy i protokatechowy. Wykazano, że toksyczność 4-chlorofenolu dla szczepu

Załącznik 2 - Autoreferat

KB2 obniżały fenol, benzoesan i glukoza, natomiast kwas benzoesowy i jego hydroksylowane pochodne obniżały toksyczny efekt tego związku na szczep *Planococcus* sp. S5. Stwierdzono także większą wrażliwość gramdodatniego szczepu z rodzaju *Planococcus* na toksyczne działanie 4-chlorofenolu. Wyniki tych badań stanowią podstawę pracy pt. „Toxicity of 4-chlorophenol under cometabolic conditions depending on the bacterial cell wall structure?”

(Zał. 3, pkt. pkt. D, poz. 3)

W 2007 roku razem z dr Urszulą Guzik i dr Danutą Wojcieszynską rozpoczęłam cykl badań nad enzymami zaangażowanymi w rozkład związków o strukturze aromatycznej, których celem było określenie budowy i właściwości biochemicznych enzymów degradacyjnych oraz zbadanie wpływu czynników środowiskowych na ich aktywność. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano i scharakteryzowano między innymi wyizolowane z komórek szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2: (1) monooksygenazę fenolową należącą do grupy monooksygenaz cytochromu P450, enzym o masie molekularnej 34 kDa, wysokiej aktywności i niskiej wrażliwości na działanie typowych inhibitorów cytochromu P-450 i metimazolu; (2) 1,2- dioksygenazę katecholową o masie 34,5 kDa o wysokiej aktywności względem katecholu i jego metylowych pochodnych i niskiej wrażliwości względem pochodnych fenolowych; (3) 3,4- dioksygenazę protokatechową charakteryzującą się szeroką specyficznością substratową i niską wrażliwością na działanie chelatorów i jonów Ni²⁺, Mn²⁺ i Fe²⁺; (4) 2,3-dioksygenazę katecholową o niezwykle wysokiej aktywności względem katecholu oraz wyizolowaną z komórek gramdodatniego szczepu *Planococcus* sp. S5 2,3-dioksygenazę katecholową i 1,2- dioksygenazę katecholową szczepu *Pseudomonas putida* N6. Uzyskane w rezultacie kilkuletnich badań wyniki stały się podstawą szeregu prac doświadczalnych (**Zał. 3, pkt. IIA, poz. 1-5 i 7**), przeglądowych (**Zał. 3, pkt. D, poz. 6,7**), rozdziału w książce (**Zał. 3, pkt. D, poz. 2**), jak również prac doświadczalnych wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej (**Zał. 3, pkt. IB, poz. 1,2,4**).

W 2008 roku podjęłam współpracę naukową z Panią prof. dr hab. Zofią Piotrowską-Seget, kierownikiem Katedry Mikrobiologii macierzystego Wydziału oraz Panią prof. dr hab. Urszulą Kurzik-Dumke z Institute of Medical Microbiology and Hygiene w Mainz, Niemcy, co zaowocowało pozyskaniem przez nas środków z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na realizację, w latach 2009-2011, projektu pt: „Izolacja, identyfikacja i charakterystyka plazmidów warunkujących oporność bakterii glebowych na jony kadmu” (**Zał. 3, pkt. J, poz. 2**). Realizowany projekt obejmował swym zakresem izolację i identyfikację plazmidowych szczepów bakterii opornych na Cd²⁺, identyfikację mechanizmów warunkujących oporność badanych szczepów na jony metali oraz izolację i molekularną analizę ich plazmidów.

W wyniku przeprowadzonych badań, z silnie skażonych metalami ciężkimi gleb wyizolowano 34 szczepy bakterii zdolne do wzrostu w obecności jonów kadmu w stężeniu 1 lub 2 mM Cd(II), jak również różnych stężeń Cu(II), Zn(II) i Ni(II). Szczepy te zaklasyfikowano,

Załącznik 2 - Autoreferat

na podstawie profilu komórkowych metylowanych estrów kwasów tłuszczowych, z wykorzystaniem metody MIDI-MIS, oraz metodą amplifikacji i sekwencjonowania fragmentu genu 16S rDNA do rodzajów: *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Cedecea*, *Variovorax*, *Alcaligenes*, *Microbacterium*, *Enterobacter* i *Ralstonia*. Obecność plazmidów, które, jak wykazały badania nad ich eliminacją z komórek gospodarza, warunkowały oporność bakterii na jony metali ciężkich, stwierdzono w komórkach szczepów z rodzaju *Arthrobacter*, *Streptomyces* i *Variovorax*. W ramach projektu wykorzystano możliwość zsekwencjonowania plazmidu wyizolowanego z komórek *Streptomyces* sp. w systemie GS Junior (454/Roche). Metoda ta pozwoliła uzyskać 104 439 sekwencji o średniej długości 455 pz. Analiza tych sekwencji umożliwiła złożenie 92765 z nich w 1738 kontigów o długości ≥ 500 pz. Przeprowadzone badania oraz analizy z wykorzystaniem programu BLASTX potwierdziły, że analizowane sekwencje plazmidu pochodzą z bakterii *Streptomyces* sp., a co szczególnie istotne wykazały, że 11 ze zidentyfikowanych kontigów koduje białka związane bezpośrednio z metabolizmem jonów metali, m.in. kadmu, cynku, manganu, kobaltu i miedzi, a kolejnych 5 kontigów koduje metalozależne białka regulatorowe i metalo-beta-laktamazy.

W ramach prowadzonego grantu podjęłam również badania mające na celu wyselekcjonowanie spośród wyizolowanych szczepów takich, które będą zdolne do degradacji fenolu. Jednoczesna oporność bakterii na metale i zdolność do metabolizowania związków o strukturze aromatycznej, czyni je przydatnymi w bioremediacji terenów skażonych równocześnie tymi dwoma typami zanieczyszczeń. Spośród przebadanych szczepów jedynie *Variovorax* sp. 12S wykazywał zdolność do rozkładu fenolu w obecności kadmu. Wyniki badań nad degradacją tego substratu aromatycznego i aktywnością 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu z rodzaju *Variovorax* zostały opublikowane w *Antonie van Leeuwenhoek* i zostały włączone do cyklu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe (**Zał. 3, pkt. IB, poz. 3**).

W ramach działalności statutowej Katedry Biochemii, jako główny wykonawca, realizowałam, w latach 2011-2012, projekt badawczy pt. „Właściwości 2,3- dioksygenazy katecholowej gramodatniego szczepu *Planococcus* sp. S5”, obejmujący swoim zakresem klonowanie i mutagenezę genu kodującego badany enzym oraz charakterystykę zmutowanych form C230 w celu identyfikacji reszt aminokwasowych determinujących jej właściwości katalityczne. Wyniki badań prowadzonych w ramach tego projektu stały się podstawą prac opublikowanych w *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* i *The Scientific World Journal*, włączonych do cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe (**Zał. 3, pkt. IB, poz. 5 i 6**).

Wśród uzyskanych w wyniku przeprowadzonej mutagenezy form 2,3-dioksygenazy katecholowej, zidentyfikowano również takie formy enzymu, których aktywność uległa zmianie w wyniku zamiany reszt aminokwasowych zlokalizowanych w znacznej odległości od centrum

Załącznik 2 - Autoreferat

aktywnego enzymu, w obrębie katalitycznie nieaktywnej N-końcowej domeny. Wyjaśnienie wpływu tych mutacji na właściwości katalityczne enzymu wymaga zastosowania zaawansowanych metod i analiz obejmujących wyznaczenie struktury kompleksów enzym-substrat oraz symulację dynamiki molekularnej w polach siłowych. W związku z tym, w 2013 roku nawiązałam współpracę z dr hab. Tomaszem Borowskim, prof. IKiFP PAN z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, specjalistą w zakresie badania mechanizmów reakcji katalizowanych przez metaloenzymy (w tym dioksygenazy) metodami teoretycznymi z użyciem odpowiedniego, zaawansowanego oprogramowania komputerowego. Wyniki przeprowadzonych przez profesora Borowskiego symulacji oraz obliczenia energii wiązania substratu przez enzym i własności elektronowych wraz z wynikami przeprowadzonych przeze mnie badań biochemicznych stanowią podstawę przygotowywanej przez nas obecnie pracy wyjaśniającej rolę metioniny w pozycji 65 sekwencji aminokwasowej 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Planococcus* sp. S5 w procesie katalizy.

W ostatnich latach duży problem stanowi rosnące zanieczyszczenie środowiska powszechnie dostępnymi i stosowanymi na szeroką skalę niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ). Źródłem tego typu związków w środowisku są źle utylizowane, przeterminowane lub niez użyte farmaceutyki, które w czystej postaci trafiają do oczyszczalni ścieków lub na wysypiska, skąd mogą przedostawać się do gleby i wód gruntowych. Związki te dostają się do środowiska również, w formie niezmięnionej lub nieznacznie zmienionej, w wyniku wydalania przez organizmy żywe. NLPZ są substancjami biologicznie aktywnymi, modyfikującymi procesy biochemiczne zachodzące w organizmach ludzkich i zwierzęcych, a ich negatywne, często toksyczne działanie przejawia się szczególnie podczas długotrwałego kontaktu organizmu z tego typu lekami bądź ich metabolitami. Obecność w budowie niesteroidowych leków przeciwzapalnych struktur aromatycznych oraz duży potencjał degradacyjny szczepów *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 i *Planococcus* sp. S5 zrodził pomysł ich wykorzystania w oczyszczaniu ścieków obciążonych związkami z grupy NPLZ. Badania nad degradacją tego typu farmaceutyków przez bakterie, nad izolacją enzymów uczestniczących w ich rozkładzie, jak również szlakami degradacyjnymi będą prowadzone w ramach projektu pt: „Rozkład niesteroidowych leków przeciwzapalnych przez wybrane szczepy bakterii”, który uzyskał finansowanie Narodowego Centrum Nauki w listopadzie 2013 roku (**Zał. 3, pkt. J, poz. 1**). Zagadnienia związane z zagrożeniami wynikającymi z obecności niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku oraz procesami ich biotransformacji są tematem pracy przeglądowej pt: „Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku” (**Zał. 3, pkt. D, poz. 4**).

Ważną formą mojej aktywności naukowej był także udział w licznych krajowych i zagranicznych konferencjach, seminariach, zjazdach i sympozjach (**Zał. 4, pkt. B, poz. 1-21**)

Załącznik 2 - Autoreferat

podczas których nie tylko prezentowałam wyniki swoich badań, ale również nawiązałam szereg ciekawych kontaktów naukowych. Jestem recenzentem trzech prac naukowych (**Zał. 4, pkt. P, poz. 1-3**). Od 1997 roku należę do Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a od 2012 roku jestem członkiem American Society for Microbiology (**Zał. 4, pkt. H, poz. 1,2**).

Podsumowując, na mój dorobek naukowy, po uzyskaniu stopnia doktora, składa się 18 publikacji doświadczalnych (w tym 17 z listy filadelfijskiej), 14 publikacji przeglądowych (w tym 5 z listy filadelfijskiej), 5 publikacji popularnonaukowych, 2 rozdziały w książkach (w języku angielskim) i 2 w opracowaniach zbiorowych (1 w języku polskim i 1 w języku angielskim), 3 publikacje pełnotekstowe w materiałach zjazdowych oraz 6 sekwencji nukleotydowych opublikowanych w bazie National Center for Biotechnology Information (GenBank).

Dane bibliometryczne:

1. Sumaryczny impact factor publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR)^a – 32.501
2. Sumaryczna liczba punktów MNiSW^b - 507
3. Liczba cytowań publikacji^c według bazy Web of Science – 62(28), według bazy Scopus – 71(58)
4. Indeks Hirscha^d według bazy Web of Science (WoS) – 5, według bazy Scopus – 5.

^aWartość IF wg JCR dla publikacji opublikowanych przed 2013 rokiem podano zgodnie z rokiem ich opublikowania. Dla publikacji opublikowanych w 2013 i 2014 roku podano IF^{5-letni}

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

^{c,d}Dane z dnia: 17 luty 2014. (Liczba cytowań bez autocytacji)

6. Omówienie osiągnięć dydaktycznych, popularyzatorskich i organizacyjnych

Moja aktywność dydaktyczna na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska obejmuje prowadzenie zajęć dla studentów trzech kierunków studiów: Biotechnologia, Biologia, Ochrona Środowiska, a także studiów podyplomowych. W ramach pracy dydaktycznej prowadzę ćwiczenia z biochemii, genetyki molekularnej, inżynierii genetycznej, biotechnologii w ochronie środowiska, biotechnologii mikroorganizmów, pracownie licencjackie, specjalizacyjne i magisterskie oraz wykłady z przedmiotu enzymy w biotechnologii (**Zał. 4, pkt. I, poz. 1**). Moje zaangażowanie w prowadzenie i przygotowanie do zajęć zostało docenione przez studentów, głosami których zajęłam II (w 2006 i 2007 roku), I (w 2008 roku) i III (w 2010 roku) miejsce w Wydziałowym konkursie na Najlepszego pracownika prowadzącego ćwiczenia (**Zał. 4, pkt. D, poz. 2-5**).

W latach 2005-2013 byłam promotorem 16 i recenzentem 12 prac licencjackich, a w latach 2001-2013 bezpośrednim opiekunem naukowym 10 prac magisterskich. W ramach studiów zamawianych Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia (ATRINBIOTECH) realizowanych na naszym Wydziale, opracowałam i prowadziłam wykłady z przedmiotu „GMO

Załącznik 2 - Autoreferat

w biotechnologii środowiska” oraz ćwiczenia z przedmiotu „Metody oceny potencjału biodegradacyjnego mikroorganizmów”. Pełniłam również funkcję konsultanta naukowego przedmiotu „English in Biotechnology”. W 2012 i 2013 roku byłam koordynatorem oraz prowadzącym wykłady i ćwiczenia z przedmiotu „Przyroda – podstawy chemiczne” prowadzonego w ramach Studiów podyplomowych dla nauczycieli, kwalifikujących do nauczania przedmiotu „Przyroda w szkole podstawowej” (**Zał. 4, pkt. J, poz. 1-3; Zał.4, pkt I, poz. 2,3 i-5-7**).

Swoje zamiłowania dydaktyczne i chęć popularyzacji nauki wśród młodzieży realizuję również poprzez zajęcia i działania prowadzone dla uczniów szkół średnich. W roku 2005 i 2009 byłam recenzentem prac w Ogólnopolskim Konkursie „Chemia a Środowisko” organizowanym przez Zakład Dydaktyki Chemii Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego i Pałac Młodzieży w Katowicach (**Zał.4, pkt. C, poz. 1-2**). W latach 2008 i 2009, jako przedstawiciel Katedry Biochemii, prowadziłam ćwiczenia dla młodzieży podczas Dni Otwartych Wydziału. W 2008 roku, w ramach projektu EFS Szkoła Szans prowadziłam zajęcia dla uczniów LO im. C.K. Norwida w Tychach. Opracowałam i prowadziłam zajęcia dla uczniów tego liceum również w latach 2011 i 2012, w ramach prowadzonego tam projektu EFS Szkoła Przyszłości. Mój wkład w popularyzację nauki to także wykłady dla nauczycieli wygłoszone podczas warsztatów metodycznych organizowanych przez Wydawnictwo Pedagogiczne OPERON w 2010 roku (**Zał. 4, pkt. I, poz. 4 i 8-11**).

Swoje zainteresowania naukowe i dydaktyczne łączę także z działalnością organizacyjną. W 2011 roku byłam członkiem Komitetu Naukowego I Ogólnopolskiego Zjazdu Młodych Biotechnologów odpowiedzialnym za recenzję nadsyłanych zgłoszeń i ocenę wystąpień uczestników Zjazdu, a w 2013 roku aktywnie uczestniczyłam w organizacji II Ogólnopolskiego Zjazdu Młodych Biotechnologów (**Zał.4, pkt. C, poz. 1-2**). W ramach pracy organizacyjnej trzykrotnie (w latach 2006, 2007, 2010) pełniłam funkcję wiceprzewodniczącej Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej na Studia I Stopnia kierunku Biotechnologia. Dwukrotnie, w latach 2008 i 2009, uczestniczyłam w organizacji Dni Otwartych Wydziału. W latach 2008-2010 pełniłam funkcję Opiekuna Naukowego Koła Mikrobiologiczno-Biochemicznego, a w latach 2006 – 2009 i 2008 – 2011 byłam odpowiednio Opiekunem Roku studentów kierunku Biotechnologia - studia zaoczne i Opiekunem Roku studentów kierunku Biotechnologia - studia dzienne. Od 2005 roku jestem osobą odpowiedzialną za przygotowywanie wniosków o wydanie zgody na zamknięte użycie GMO oraz realizację planowanego zamkniętego użycia GMO w Katedrze Biochemii. Od 2008 roku uczestniczę w pracach Wydziałowej Komisji ds. Nagród. W kadencji 2013 – 2017 pełnię funkcję przedstawiciela nauczycieli akademickich do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego (**Zał.4, pkt. Q, poz. 1-10**).

K. Hupert-Kocurek