

AUTOREFERAT

dr Grzegorz Janusz

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin 2018

Spis treści

I.	Imię i nazwisko	3
II.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
III.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
IV.	Wskazanie 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):	3
	A) Tytuł osiągnięcia:.....	3
	B) Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:	4
	D) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
	Cel naukowy wybranych prac:.....	5
	Wprowadzenie – przedmiot badań	5
	Omówienie wyników badań składających się na osiągnięcie naukowe prezentowane w postępowaniu habilitacyjnym:	7
	Literatura:.....	15
	Podsumowanie:	15
V.	Omówienie innych prac naukowo badawczych niewliczanych do osiągnięcia naukowego stanowiącego monotematyczny cykl publikacji	16
	A) Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora.....	16
	B) Przebieg mojej pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora oraz realizowane aktualnie zadania badawcze	18
VI.	Plany naukowe.....	23
VII.	Podsumowanie aktywności naukowej.....	23

I. Imię i nazwisko**dr Grzegorz Janusz**

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

gjanusz@poczta.umcs.lublin.pl

tel.+48 81 537-55-21, fax +48 81 537-56-65

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2000	Magister biologii Praca magisterska pt.: "Optymalizacja hodowli i oczyszczanie dekstranazy z <i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 11797" Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
2001	Master en Management Europeen EDHEC School of Management Lille
2005	Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii Rozprawa doktorska pt.: "Badania porównawcze lakaz grzybowych" Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.12.2000 - 01.09.2003	V Ramowy Program Unii Europejskiej [grant ICA2-CT-2000-10050-EURCURR 12-38] realizowany w Zakładzie Biochemii UMCS - wykonawca
01.11.2003 - 01.01.2007	Asystent w Zakładzie Biochemii UMCS
Od 01.02.2007	Adiunkt w Zakładzie Biochemii UMCS

IV. Wskazanie 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**A) Tytuł osiągnięcia:**

*Znaczenie lakazy z grzyba białej zgnilizny *Cerrena unicolor* w adaptacji tego organizmu do zmiennych warunków środowiska i rozkładu różnych gatunków drewna*

Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl 5 prac oryginalnych i 2 prac przeglądowych opublikowanych w latach 2012–2017.

B) Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:**5 oryginalnych prac eksperymentalnych:**

1. **Janusz G.**, Mazur A., Chęcińska A.*, Małek W., Rogalski J., Ohga S. (2012) Cloning and characterization of a laccase gene from biotechnologically important basidiomycete *Cerrena unicolor*. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 57(1):41-49
IF₂₀₁₁: 0,212 MNiSW: 20
2. Kucharzyk K.H., **Janusz G.**, Kaczmarczyk I. *, Rogalski J. (2012) Chemical modifications of laccase from white-rot basidiomycete *Cerrena unicolor*. *Appl Biochem Biotechnol* 168(7):1989-2003
IF₂₀₁₂: 1,893 MNiSW: 25
3. **Janusz G.**, Jaszek M., Matuszewska A., Drączkowski P., Osińska-Jaroszuk M. (2015) Proteolytic modifications of laccase from *Cerrena unicolor*. *J. Mol. Cat. B: Enz.*, 122, pp. 330-338
IF₂₀₁₂: 2,189 MNiSW: 25
4. **Janusz G.** ☒, Sulej J., Jaszek M., Osińska-Jaroszuk M. (2016) Effect of different wavelengths of light on laccase, cellobiose dehydrogenase, and proteases produced by *Cerrena unicolor*, *Pycnoporus sanguineus* and *Phlebia lindtneri*. *Acta Biochim. Pol.* 63, 63(2): 223-228
IF₂₀₁₂: 1,159 MNiSW: 15
5. **Janusz G.** ☒, Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., Pawlik A., Ciołek B., Paszczyński A., Kubik-Komar A. (2018) Comparative transcriptome analysis of white root fungus *Cerrena unicolor* reveals different metabolic strategies- *Microbiol. Res.* 207: 256-268
IF₂₀₁₆: 3,037 MNiSW: 25

i 2 prace przeglądowe:

6. **Janusz G.** ☒, Kucharzyk K.H., Pawlik A., Staszczak M., Paszczyński A.J. (2013) Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 52(1):1-12.
IF₂₀₁₃: 2,966 MNiSW: 30
7. **Janusz G.** ☒, Pawlik A., Sulej J., Świdorska-Burek U., Jarosz-Wilkolażka A., Paszczyński A. (2017) Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution, *FEMS Microbiol. Rev.* 41(6): 941-962
IF₂₀₁₆: 12,198 MNiSW: 45

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) w.w. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: 23.654

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW 185 pkt

* jest „Checinsks”, powinno być „Chęcińska”

* jest „Karczmarczyk”, powinno być „Kaczmarczyk”

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

Cel naukowy wybranych prac:

Celem badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym było określenie znaczenia lakazy w adaptacji grzyba *Cerrena unicolor* do zmiennych warunków środowiska i rozkładu różnych gatunków drewna. Prace badawcze, które doprowadziły do realizacji tego celu obejmowały:

1. Identyfikację i sekwencjonowanie genu *lacI* kodującego lakazę *C. unicolor*, zmapowanie regionu promotorowego tego genu oraz identyfikację elementów regulatorowych zaangażowanych w ekspresję *lacI*.
2. Określenie znaczenia modyfikacji potranslacyjnych (chemicznych i proteolitycznych) dla aktywności lakazy *C. unicolor* w układzie *in vitro*.
3. Określenie istotności lakazy w metabolizmie *C. unicolor* w zmiennych warunkach środowisk naturalnych. W tej części badań szczególne znaczenie miało udowodnienie zróżnicowanej biosyntezy lakazy w zależności od rodzaju rozkładanego drewna oraz warunków naświetlenia podczas wzrostu grzyba.

Wprowadzenie – przedmiot badań

Złożona morfologia ściany komórkowej roślin i duża odporność chemiczna substancji wchodzących w jej skład sprawia, że jedynie bakterie i grzyby mogą efektywnie rozkładać drewno. Organizmy posiadające zdolność degradacji kompleksu ligninocelulozowego pokonują liczne bariery, by zainfekować roślinę i w efekcie wykorzystać jej materiał organiczny dla swojego wzrostu [Kirk, 1983]. Organizmy należące do królestwa *Fungi* w sprzyjających warunkach wykształcają strzępki ułatwiające im penetrację w głąb ściany komórkowej roślin oraz enzymy dyfundujące do podłoża wzrostu [Smith i Berry, 1974]. W oparciu o strategię rozkładu drewna grzyby uczestniczące w tym procesie zostały podzielone na trzy grupy:

- grzyby „brunatnej zgnilizny drewna”
- grzyby „białej zgnilizny drewna”
- grzyby „miękkiej zgnilizny drewna” [Schwarze, 1999].

Wśród niebezpiecznych patogenów drzew powodujących białą zgniliznę drewna, znajdują się organizmy zdolne do przeprowadzenia całkowitego rozkładu tkanki roślinnej łącznie z ligniną, co jednocześnie uważa się za detoksyfikację środowiska z substancji fenolowych powstających w procesie rozpadu ligninocelulozy. Szczególne zdolności grzybów białej zgnilizny do degradacji ligninocelulozy wynikają nie tylko z organizacji ich strzępek, które ułatwiają im penetrację w głąb ściany komórkowej drewna, ale także ze zdolności produkcji specyficznych enzymów katalizujących rozkład poszczególnych składników drewna, jak również niskocząsteczkowych substancji ułatwiających enzymatyczną degradację ligninocelulozy [Kirk, 1983; Smith i Berry, 1974].

Grzybowe enzymy zaangażowane w rozkład drewna można podzielić na kilka grup w zależności od rodzaju polimeru, w którego rozkładzie uczestniczą. Spośród celulaz należy wymienić: endo-glukanazę, egzo-glukanazę, β -1,4-glukozydazę oraz dehydrogenazę celobiozową (CDH). Natomiast do rozkładu hemicelulozy niezbędne są enzymy ksylanolityczne (endo-1,4- β -ksylanaza i β -ksylozydaza, α -L-arabinofuranozydaza, α -glukuronidaza i acetyloesteraza) oraz mannanolityczne (endo-1,4- β -mannanaza, β -mannozydaza, β -glukozydaza i α -galaktozydaza). Rozkład trzeciego polimeru tj. ligniny wydaje się najbardziej skomplikowany, a enzymy biorące udział w tym procesie zostały podzielone na kolejne dwie podgrupy ze względu na zakres interakcji z substratem. Pierwsza podgrupa, zwana obecnie LME (Lignin Modifying Enzymes) obejmuje fenylooksydazy (lakaza, peroksydazy) i dioksygenazy, druga obejmuje enzymy współdziałające z enzymami grupy pierwszej (LDA – Lignin Degrading Auxiliary Enzymes) (m.in. oksydazę glioksalową i dehydrogenazę celobiozową), ale pozbawione zdolności samodzielnego oddziaływania na drewno [Janusz i wsp. 2017].

Lakaza (EC 1.10.3.2) to enzym, który w warunkach tlenowych jest zdolny do utleniania wielu związków aromatycznych, włącznie z występującymi w ligninie aminami aromatycznymi, benzenotiolami i hydroksyindolami. Ponadto wśród substratów lakazy znajdują się związki nieorganiczne/organiczne zawierające jony metali: mangan lub żelazo. Uważa się, że lakaza grzybowa poza funkcją w rozkładzie ligniny może pełnić istotną rolę w patogenezie kryptokokozy (grzybica), detoksyfikacji środowiska naturalnego oraz morfogenezie grzybów [Janusz i wsp., 2017].

Cerrena unicolor (gmatkówka szarawa) jest grzybem białej zgnilizny drewna, w warunkach naturalnych rozwijającym się na żywym lub martwym drewnie wielu drzew liściastych takich jak: jesion (*Fraxinus excelsior*), brzoza (*Betula L.*), wierzba (*Salix L.*), klon (*Acer L.*), jabłoń

dzika (*Malus sylvestris*), jarzab (*Sorbus L.*), kasztanowiec zwyczajny (*Aesculus hippocastanum*). Dotychczas wykazano, że grzyb ten jest producentem kilku izoform lakazy, peroksydazy manganozależnej, dehydrogenazy celobiozowej, celulaz i ksylanaz biorących udział w degradacji ligninocelulozy i stanowi ważne ogniwo w procesach rozkładu drewna. Analiza sekwencji genomu *C. unicolor* wskazuje, że liczba genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład drewna może być znacznie większa, a ich ekspresja może w dużej mierze zależeć od składu podłoża i warunków hodowli. Jednocześnie wiele prac badawczych wskazuje *C. unicolor* jako organizm zdolny do produkcji lakazy w ilościach, które przekraczają możliwości innych grzybów białej zgnilizny drewna. W związku z łatwością produkcji lakazy jaką wykazuje ten grzyb, uważa się, że jest ona syntetyzowana konstytutywnie w komórkach *C. unicolor*. Ponadto, w ostatnich 20 latach opublikowano wiele prac wskazujących na biotechnologiczne znaczenie tego enzymu. Unikalne właściwości katalityczne grzybowej lakazy sprawiły, że znalazła ona zastosowanie między innymi w konstrukcji bioogniw [Nazaruk i wsp. 2010], syntezie barwników [Polak i wsp., 2016] a także jako potencjalny czynnik antynowotworowy [Statkiewicz i wsp. 2017]. Pomimo dużej liczby prac wskazujących na biotechnologiczne zastosowanie lakazy, wciąż niewiele wiadomo jaką rolę pełni ten enzym w metabolizmie *C. unicolor*.

Omówienie wyników badań składających się na osiągnięcie naukowe prezentowane w postępowaniu habilitacyjnym:

1. Identyfikacja i sekwencjonowanie genu *lac1* kodującego lakazę *C. unicolor*, zmapowanie regionu promotorowego genu oraz identyfikacja elementów regulatorowych zaangażowanych w ekspresję *lac1*.

W trakcie badań, które złożyły się na moją pracę doktorską zauważyłem, że lakaza *C. unicolor* występująca w czterech izoformach jest syntetyzowana przez grzyba w nierównych ilościach. Na podstawie wyników hybrydyzacji Southerna, stwierdzono, że w genomie *C. unicolor* mogą być co najmniej cztery geny kodujące hipotetyczne lakazy. Duża wydajność syntezy lakazy w komórkach *C. unicolor* bez udziału induktorów skłoniła mnie do identyfikacji genu kodującego izoformę lakazy produkowaną w komórkach grzyba w największej ilości. Z grzybni *C. unicolor* wyhodowanej na podłożu mineralnym Lindeberga-Holm wyizolowano DNA i mRNA, a z podłoża pohożlowanego izolowano białka o aktywności lakazowej. Wobec braku dostępnej wówczas pełnej sekwencji genomu *C. unicolor*, zaprojektowano startery na podstawie sekwencji genów kodujących lakazy grzybów należących do rodziny *Corioloraceae*,

co pozwoliło na amplifikację genu *lacI* na matrycy DNA *C. unicolor*. mRNA zostało użyte do syntezy i amplifikacji odpowiedniego fragmentu cDNA. Powielone odcinki genomowego DNA i cDNA zsekwencjonowano. Na podstawie porównania sekwencji genomowego DNA i cDNA, stwierdzono w genie *lacI* obecność 10 intronów różnej długości. W sekwencji cDNA zidentyfikowano hipotetyczną otwartą ramkę odczytu kodującą białko o długości 510 aminokwasów, którego sekwencja wykazywała znaczące podobieństwo do lakaz grzybowych, głównie z rodzajów *Spongipellis*, *Trametes*, *Pycnoporus* i *Pleurotus*. W N-końcowej części lakazy *C. unicolor* zidentyfikowano peptyd sygnałny długości ok. 20 aminokwasów. Komputerowa analiza sekwencji aminokwasowej lakazy pozwoliła określić jej hipotetyczną masę cząsteczkową (MW=54387 kDa), punkt izoelektryczny (pI=4.69) oraz wytypować miejsca N-glikozylacji (w obrębie reszt aminokwasowych Asn-253, Asn-447, Asn-483). Wytypowano także konserwatywne reszty aminokwasowe (10 reszt histydyny i 1 cysteiny) odpowiedzialne za wiązanie atomów miedzi w centrum aktywnym hipotetycznego enzymu.

Stosując technikę AFR-PCR zmapowano promotor genu *lacI*, który obejmuje odcinek DNA o długości 1310 pz. W obrębie promotora zidentyfikowano sekwencję TATA w odległości -108 pz powyżej kodonu start oraz cztery sekwencje CAAT w odległościach odpowiednio -128, -324, -395, i -511 pz względem kodonu startowego. Ponadto w regionie promotorowym wykryto elementy regulatorowe, takie jak: HSE (heat shock element), MRE (metal-responsive element), CRE (cAMP-response element), XRE (xenobiotic-responsive element), ARE (antioxidant-responsive element), ACE, Sp1 (mammalian enhancer element), AP1 and AP2 (nitrogen response elements), Mig (carbon response element), które wskazują, że ekspresja genu *lacI* może podlegać bardzo złożonej regulacji w zależności od zmiennych warunków środowiskowych.

Białka wyizolowane z płynu pohodowlanego tej samej hodowli *C. unicolor*, która posłużyła do izolacji DNA i mRNA zostały rozdzielone techniką elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Prążki białkowe odpowiadające wielkością lakazie zostały poddane analizie LC-MS/MS. Uzyskane wyniki (MASCOT score=756, sequence coverage=18%) pozwoliły stwierdzić, że opisana wyżej sekwencja genu lakazy koduje izoformę wydzielaną przez *C. unicolor* w największej ilości.

Obecność licznych elementów regulatorowych zidentyfikowanych w sekwencji promotora genu *lacI* skłoniła mnie do zbadania wpływu składu podłoża i warunków hodowli grzyba na biosyntezę głównych enzymów ligninolitycznych (LME): lakazy oraz peroksydaz hemowych (peroksydazy ligninowej i peroksydazy manganozależnej. W tym celu

przeanalizowano dostępną literaturę i sekwencje regionów promotorowych wspomnianych enzymów. Wykazano, że w sekwencji regionów promotorowych lakaz wielu grzybów można zidentyfikować elementy regulatorowe, które mogą wpływać na ekspresję tego genu w odpowiedzi na obecność w środowisku metali, ksenobiotyków, zmian w stężeniu węgla, azotu, a także zmian temperatury. Jednocześnie wykazano, że wspomniane elementy regulatorowe nie występują w każdym regionie promotorowym poszczególnych genów kodujących lakazy. Sugeruje to zróżnicowanie biosyntezy poszczególnych izoform lakazy zależnie od zmieniających się warunków środowiska, co może być jednym z elementów warunkujących sukces ewolucyjny organizmów grzybowych w ich niszach ekologicznych. Na podstawie przeprowadzonych analiz komputerowych regionów promotorowych lakaz, zaproponowano nową sekwencję konsensusową dla jednego z elementów regulatorowych typu ACE1 odpowiedzialnego za odpowiedź grzyba na obecność w podłożu jonów miedzi i manganu.

Efektom doświadczeń wykonanych w ramach realizacji tego zadania badawczego była identyfikacja genu *lac1* i zmapowanie jego regionu promotorowego, w którym wykryto liczne elementy regulatorowe wskazujące, że regulacja ekspresji lakazy w komórkach *C. unicolor* może być złożona i zależna od różnych czynników środowiskowych. Również ekspresja poszczególnych izoform lakazy, może być zróżnicowana w zależności od warunków wzrostu grzyba. Analiza sekwencji aminokwasowej lakazy wskazała, że enzym może być modyfikowany potranslacyjnie.

Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane i przedyskutowane w dwóch pracach:

*Janusz G., Mazur A., Checinska A., Malek W., Rogalski J., Ohga S. (2012) Cloning and characterization of a laccase gene from biotechnologically important basidiomycete *Cerrena unicolor*. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 57(1):41-49*

Janusz G. [✉], Kucharzyk K.H., Pawlik A., Staszczak M., Paszczynski A.J. (2013) Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. Enzyme Microb. Technol. 52(1):1-12.

2. Określenie wpływu modyfikacji chemicznych i trawienia proteolitycznego na właściwości kinetyczne lakazy *in vitro*.

Dane literaturowe wskazywały, że na aktywność enzymów mogą wpływać chemiczne modyfikacje ich struktury [Longo i Combes, 1997]. W związku z tym przeprowadzono cykl doświadczeń mających na celu modyfikację izoform lakazy poprzez hydrofobizację, hydrofilizację oraz polimeryzację. Celem tych doświadczeń była zmiana struktury enzymu skutkująca przesunięciem optimum pH lub/i optimum temperatury oraz zmniejszenie wpływu

inhibitorów na aktywność lakazy. Połączenie grup lizynowych (w sekwencji aminokwasowej lakazy *C. unicolor* zidentyfikowano 11 reszt Lys) z estrem N-HSP (palmitynian N-hydroksybursztynoimidu) (hydrofobizacja) pozwoliło stwierdzić, że 2 grupy lizyny prawdopodobnie znajdują się w centrum aktywnym enzymu. Użycie kwasu weratrowego jako przestrzennego analogu substratowego pozwala odwracalnie blokować te grupy na czas modyfikacji struktury enzymu. Ponadto ten rodzaj modyfikacji zaowocował zwiększoną odpornością enzymu na inhibicję halogenkami. Hydrofilizacja lakazy z użyciem glukozy i celobiozy pozwala przesunąć optimum pH enzymu w kierunku niższych wartości, podczas gdy użycie laktozy i galaktozy przynosiło odwrotny efekt przesuwając optimum pH w kierunku wyższych wartości. Jednocześnie wykazano, że hydrofilizacja z użyciem laktozy i celobiozy pozwala odwrócić efekt inhibicji aktywności lakazy nawet przez NaF (typowy inhibitor lakazy stosowany przy oznaczeniach dehydrogenazy celobiozowej). Użycie kwasu askorbinowego wykazało dodatkowo wzmocniony efekt odwracania inhibicji. Polimeryzacja lakazy z użyciem czynników sieciujących takich jak glutaraldehyd czy karbodiimid doprowadziło do nieznacznego przesunięcia optimum pH enzymu w kierunku niższych wartości i uzyskania większej odporności na inhibicję halogenkami. Obserwowana w badaniach większa odporność lakazy na inhibicję halogenkami tłumaczona jest otoczeniem enzymu dodatkową strukturą złożoną z cukrów, która utrudnia dyfuzję halogenków do centrum aktywnego. W ostatnich latach zaproponowano hipotezę, że w warunkach naturalnych lakaza jako enzym zewnątrzkomórkowy jest stabilizowana w środowisku za pomocą glukanu wydzielanego przez grzyba, co może prowadzić do zmiany aktywności enzymu.

Jednym z przykładów modyfikacji potranslacyjnych białka jest jego trawienie proteolityczne, jednak w odniesieniu do lakazy dane literaturowe dotyczące tego procesu są znikome. Lakaza podobnie jak większość grzybowych enzymów zewnątrzkomórkowych jest potranslacyjnie glikozylowana, co ma chronić enzym przed proteolizą (ze względu na niską zawartość azotu w drewnie, grzyb może odzyskiwać ten istotny dla życia pierwiastek poprzez proteolizę wydzielonych wcześniej białek). Przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie wpływu trawienia proteolitycznego na aktywność lakazy *C. unicolor*. W początkowych analizach użyto komercyjnie dostępnych proteaz takich jak pepsyna, tripsyna, proteinaza K, papaina i pepsyna grzybów z rodzaju *Rhizopus*. Uzyskane wyniki wskazywały, że tylko trawienie lakazy z użyciem proteinazy K znacznie zmniejszało jej aktywność o ponad 90%. Pozostałe proteazy zwiększały aktywność lakazy (nawet do 140% w przypadku tripsyny), co mogło być bezpośrednio związane z podwojeniem V_{max} enzymu. Ponadto udowodniono, że w wyniku trawienia proteolitycznego wzrastały właściwości prooksydacyjne

oraz dwukrotnie piki katodowe i anodowe w analizach elektrochemicznych lakazy. Jednocześnie stwierdzono, że lakaza wykazuje zdolności inhibitorowe wobec pepsyny, papainy oraz trypsyny. Obrazy elektroforetyczne (Native-PAGE) wskazują, że po trawieniu pepsyną lub trypsyną z czterech izoform lakazy pozostawała jeden prążek o zmienionej mobilności elektroforetycznej. Użycie metod kalorymetrycznych wskazywało raczej na reakcje związane z centrum aktywnym proteaz niż na interakcje białko-białko, które w konsekwencji polimeryzacji mogłyby zmieniać aktywności lakaz czy proteaz. Ten problem badawczy był kontynuowany z użyciem proteaz endogennych *C. unicolor* w ramach projektu „Znaczenie lakazy *Cerrena unicolor* w jej adaptacji do rozkładu kilku gatunków drewna i zmiennych warunków środowiska (Opus 5 - 2013/09/B/NZ9/01829).

Wyniki, które uzyskano w trakcie realizacji tego zadania badawczego pozwalają stwierdzić, że modyfikacje chemiczne lakazy, które mogą powodować zmiany w strukturze białka wpływają na optimum pH i temperatury działania enzymu, a także wpływają na jego większą odporność na inhibicję np. halogenkami. Ponadto potwierdzono, że na aktywność lakazy wpływa trawienie proteolityczne powodując zwiększenie V_{max} , właściwości prooksydacyjnych oraz pików katodowych i anodowych w analizach elektrochemicznych.

Wyniki tych badań opublikowano w dwóch pracach:

Kucharzyk K.H., Janusz G., Karczmarczyk I., Rogalski J. (2012) Chemical modifications of laccase from white-rot basidiomycete Cerrena unicolor. Appl. Biochem. Biotechnol. 168(7):1989-2003

Janusz G., Jaszek M., Matuszewska A., Drączkowski P., Osińska-Jaroszuk M. (2015) Proteolytic modifications of laccase from Cerrena unicolor. J. Mol. Catal. B: Enz., 122, pp. 330-338

3. Zbadanie znaczenia lakazy *Cerrena unicolor* w adaptacji grzyba do rozkładu różnych gatunków drewna i wzrostu w zmiennych warunkach naświetlenia.

Spośród grzybów białej zgnilizny drewna, *C. unicolor* jest opisywana w literaturze jako najlepsze źródło zewnątrzkomórkowej lakazy. Z ewolucyjnego punktu widzenia taka zdolność może stanowić ważny element konkurencyjności grzyba w warunkach naturalnych. Podjęto badania, których celem było określenie, czy jednym z mechanizmów adaptacji *C. unicolor* do rozkładu wielu gatunków drewna jest nadprodukcja izoform lakazy o różnych właściwościach.

Aby określić potencjał enzymatyczny grzyba związany z rozkładem różnych gatunków drewna przeprowadzono analizy transkryptomu *C. unicolor* (doświadczenie typu RNAseq). Grzybnie wyhodowano na trocinach trzech gatunków drzew pospolitych w Polsce tj. jesionu, klonu i brzozy oraz na podłożu mineralnym (warunki kontrolne). Na podstawie analizy danych RNAseq w genomie grzyba zidentyfikowano 10396 genów, które ulegały ekspresji w analizowanych warunkach, spośród których 9567 stanowiły geny wspólne dla trzech wariantów hodowlanych. Najwięcej unikalnych transkryptów (101) wykryto, w warunkach wzrostu grzyba na podłożu mineralnym (kontrola), a najmniej (11) w przypadku grzyba hodowanego na trocinach klonu. Globalny poziom ekspresji genów w komórkach grzyba hodowanego na trocinach różnił się znacząco w porównaniu do podłoża mineralnego. Największą liczbę genów (828), których ekspresja istotnie zwiększyła się względem kontroli stwierdzono po hodowli *C. unicolor* na trocinach jesionu. W transkryptomie *C. unicolor* zidentyfikowano transkrypty 294 genów kodujących białka potencjalnie zaangażowane w rozkład drewna. Poziom transkrypcji 59 z nich w czasie hodowli grzyba na podłożach z trocinami różnił się istotnie ($p < 0,05$) w porównaniu do kontroli (podłoże mineralne). Zmiany poziomu ekspresji 37 genów kodujących hipotetyczne enzymy rozkładające drewno były bardzo duże (≥ 4 -krotne). W transkryptomie *C. unicolor* zidentyfikowano transkrypty 21 genów kodujących hipotetyczne celulazy, których ekspresja zmieniła się znacząco, gdy grzyb rósł na każdym z podłoży zawierających trociny. Podczas wzrostu grzyba na podłożach z trocinami indukowana była ekspresja czterech genów kodujących hemicelulazy. Analizy transkryptomu wykazały, że w rozkładzie ligniny wszystkich zbadanych gatunków drewna *C. unicolor* wykorzystuje lakazę, peroksydazę ligninową (LiP), peroksydazę manganozależną (MnP), peroksydazę hybrydową (VP), peroksydazę DyP oraz oksydazę alkoholową. Podczas wzrostu grzybni na każdym rodzaju trocin, transkrypty genu kodującego jedną z izoform lakazy i dwóch genów oksydazy alkoholowej były syntetyzowane w znacząco większych ilościach. Z kolei w czasie wzrostu grzybni na trocinach brzozy lub jesionu transkrypty dla innych izoform lakazy były obecne w komórkach grzyba w mniejszych ilościach w porównaniu do kontroli. Wykazano, że *C. unicolor* do rozkładu ligniny wykorzystuje także enzymy pomocnicze (LDA): monooksygenazę oraz cytochrom P-450. Warto podkreślić, że co najmniej jedna izoforma lakazy spełnia istotną rolę w rozkładzie każdego z analizowanych rodzajów drewna (zwiększoną ekspresję tego genu wykryto we wszystkich wariantach hodowlanych).

W transkryptomach *C. unicolor* rosnącej na różnych gatunkach drewna stwierdzono ekspresję genów kodujących białka wchodzące w skład grzybowych fotoreceptorów. Biorąc pod uwagę, że zmienne warunki naświetlenia mogą stanowić czynnik stresowy dla

mikroorganizmów, oraz fakt, że lakaza grzybowa bierze udział w odpowiedzi komórki na zmienne warunki środowiska postanowiono zbadać wpływ różnych warunków naświetlenia na syntezę tego enzymu w *C. unicolor*. Analizy wykonano dla grzybni hodowanej w podłożu Lindeberga i Holm (1952) w 5 różnych warunkach oświetlenia: ciemności (kontrola), światła białego (1600 lumenów, 290-740 nm), niebieskiego (325–495 nm), zielonego (450–590 nm) i czerwonego (600–700 nm). Wszystkie zastosowane warunków naświetlenia indukowały syntezę lakazy *C. unicolor* w porównaniu do grzyba hodowanego w ciemności. Wzrost grzyba w świetle niebieskim skutkował aż dwukrotnym wzrostem aktywności enzymu w podłożu pochodowlanym. Biorąc pod uwagę opisywany wyżej wpływ proteaz komercyjnych na aktywność lakazy postanowiono w tych samych warunkach zbadać aktywność proteaz zewnątrzkomórkowych *C. unicolor*. Największą aktywność proteolityczną stwierdzono podczas wzrostu grzyba w ciemności, natomiast aktywność lakazy była najmniejsza. Badania te są kontynuowane w ramach aktualnie realizowanego projektu „Wpływ światła na metabolizm *Cerrena unicolor*” (Opus 8 - 2014/15/B/NZ9/01990), którego jestem kierownikiem.

Rosnąca w ostatnich latach liczba publikacji z zakresu genomiki i proteomiki grzybów rozkładających drewno przyczyniła się w znaczącym stopniu do rozwoju wiedzy o ekologii, biologii oraz ewolucji tych organizmów. Warto podkreślić, że w wyniku zmian ewolucyjnych grzybów wykształciły się co najmniej dwa rodzaje mechanizmów rozkładu ligniny: enzymatyczny oraz drugi, oparty w dużej mierze na reakcjach chemicznych (m. in. reakcji Fentona). W świetle dostępnych danych literaturowych postuluje się, że ten drugi mechanizm mógł powstać z mechanizmów enzymatycznych. Chociaż grzyby do rozkładu ligniny wykorzystują całą gamę enzymów, to uważa się, że główną rolę jako enzymy samodzielnie modyfikujące ligninę (LME) spełniają lakaza i ligninolityczne peroksydazy klasy II zawierające hem (POD). Wiele gatunków grzybów białej zgnilizny drewna jest pasożytami lub saprotrofami więcej niż jednego gatunku drzewa. *C. unicolor* podobnie jak inne grzyby, w rozkładzie ligniny pochodzącej z różnych drzew wykorzystuje kombinację POD (peroksydaza ligninowa, peroksydaza manganozależna lub peroksydaza hybrydowa) oraz co najmniej kilku izoform lakazy. Ze względu na niski potencjał oksydoredukcyjny, lakazy reagują głównie z wolnymi, fenolowymi fragmentami ligniny. Jednakże w obecności mediatorów mogą utleniać niefenolowe związki w ligninie, które mają wysoki potencjał oksydoredukcyjny. Powstające w tych reakcjach produkty są dalej utleniane np. przez oksydazę alkoholową. Ponadto lakaza jako jeden z kilku enzymów jest odpowiedzialna za powstawanie w takich reakcjach reaktywnych form tlenu (ROS), które mogą same reagować z ligniną. Dotychczasowe badania wskazują, że

lakaza jest istotnym, ale też jednym z wielu elementów wchodzących w skład skomplikowanej „maszyny”, jaką grzyby wykorzystują w rozkładzie ligniny. Badania na rolę lakazy w rozkładzie tego niejednorodnego polimeru utrudnia pełnienie przez ten enzym wielu funkcji w organizmach grzybowych oraz występowanie w co najmniej kilku izoformach, które są syntetyzowane nie tylko w odpowiedzi na obecność składników pokarmowych, ale też w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że w bogatym zestawie enzymów jakie *C. unicolor* wykorzystuje w degradacji ligniny z różnych gatunków drewna, lakaza odgrywa istotną rolę (ekspresję genu kodującego jedną z izoform lakazy wykryto w czasie wzrostu grzybni na wszystkich badanych rodzajach trocin). Wykazano, że ekspresja poszczególnych izoform lakazy jest zróżnicowana w zależności od rodzaju rozkładanego gatunku drzewa. Udowodniono również, że na metabolizm drewna przez *C. unicolor* mogą wpływać zmienne warunki naświetlenia grzybni, co jest skorelowane z poziomem ekspresji lakazy i proteaz zewnątrzkomórkowych.

Na podstawie analizy danych literaturowych można przypuszczać, że podobnie jak *C. unicolor* większość organizmów zdolnych do rozkładu drewna, wykorzystuje w tym procesie kombinację różnych izoform lakazy i ligninolitycznych peroksydaz klasy II zawierających hem (POD).

Wyniki tych prac zostały przedstawione w dwóch publikacjach eksperymentalnych i przedyskutowane w artykule przeglądowym:

Janusz G. [✉], Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., Pawlik A., Ciołek B., Paszczyński A., Kubik-Komar A. (2018) Comparative transcriptome analysis of white root fungus *Cerrena unicolor* reveals different metabolic strategies- *Microbiol. Res.* 207: 256-268

Janusz G. [✉], Sulej J., Jaszek M., Osińska-Jaroszuk M. (2016) Effect of different wavelengths of light on laccase, cellobiose dehydrogenase, and proteases produced by *Cerrena unicolor*, *Pycnoporus sanguineus* and *Phlebia lindtneri*. *Acta Biochim. Pol.* 63, pp 1-6

Janusz G. [✉], Pawlik A., Sulej J., Świdorska-Burek U., Jarosz-Wilkołazka A., Paszczyński A. (2017) Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution, *FEMS Microbiol. Rev.* 41(6): 941-962

Znaczącą część przedstawionych powyżej badań wykonano w ramach grantów:

1. Grant interdyscyplinarny zespołowy Prorektora UMCS ds. Badań Naukowych i Współpracy z Zagranicą pt. „Analiza molekularna genu lakazy grzyba białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor*” (2008) – kierownik projektu

2. Znaczenie lakazy *Cerrena unicolor* w jej adaptacji do rozkładu kilku gatunków drewna i zmiennych warunków środowiska - 2013/09/B/NZ9/01829 - Narodowe Centrum Nauki – Zakład Biochemii UMCS (2013-2017) - kierownik projektu

Literatura:

1. Kirk, T.K. (1983) Degradation and Conversion of Lignocelluloses. In: The filamentous fungi, (J.E. Smith, D.R. Berry, B. Kristiansen, eds.) London, Edward Arnold, 266-295
2. Schwarze, F.W.R., Baum, S., Fink, S. (2000) Dual modes of degradation by *Fistulina hepatica* in xylem cell walls of *Quercus robur*. *Mycol. Res.*, 104: 846-852
3. Smith, J.E., Berry, D.R. (1974) The vegetative state In: An Introduction to Biochemistry of Fungal Development., (Smith, J.E., Berry, D.R., eds.) Academic Press, London, New York, 106-155
4. Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świdorska-Burek U., Jarosz-Wilkołazka A., Paszczyński A. (2017) Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution, *FEMS Microbio. Rev.* 41(6): 941-962
5. Nazaruk E., Sadowska K., Biernat J.F., Rogalski J., Ginalska G., Bilewicz R. (2010) Enzymatic electrodes nanostructured with functionalized carbon nanotubes for biofuel cell applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010 Oct;398(4):1651-60
6. Polak, J., Jarosz-Wilkołazka, A., Szałapata, K., Graz, M., Osińska-Jaroszuk, M. (2016) Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties - the optimisation process. *New Biotech.*, 33 (2), 255-262
7. Statkiewicz, M., Matuszewska, A., Jaszek, M., Janusz, G., Osinska, M., Sulej, J., Stefaniuk, D., Mikula, M., Ostrowski, J. (2017) Antimelanomic effects of high- and low-molecular weight bioactive subfractions isolated from the mossy maze mushroom, *Cerrena unicolor* (Agaricomycetes). *Inter. J. Med. Mushrooms*, 19 (7): 619-628.
8. Longo M.A., Combes D. (1997) Influence of surface hydrophilic/hydrophobic balance on enzyme properties. *J Biotechnol.* 1997 Oct 2;58(1):21-32.

Podsumowanie:

Za najważniejsze osiągnięcia związane z opisanym powyżej problemem badawczym, zawarte w monotematycznym cyklu 5 oryginalnych prac eksperymentalnych i 2 artykułów przeglądowych można uznać:

- **identyfikacja w genomie grzyba *C. unicolor* genu *lac1* i zmapowanie jego regionu promotorowego, w którym wykryto liczne elementy regulatorowe, co pozwoliło stwierdzić, że regulacja ekspresji lakazy jest złożona i zależna od różnych czynników środowiskowych;**
- **ekspresja poszczególnych izoform lakazy jest zróżnicowana w zależności od warunków wzrostu grzyba;**
- **analiza sekwencji aminokwasowej lakazy wskazała, że enzym jest potencjalnie modyfikowany potranslacyjnie;**

- modyfikacje chemiczne lakazy, które mogą powodować zmiany w strukturze białka, wpływają na optimum pH i temperatury działania enzymu, a także zwiększają jego odporność na inhibicję np. halogenkami;
- na aktywność lakazy wpływa trawienie proteolityczne zwiększając jej V_{max} , właściwości prooksydacyjne oraz piki anodowe i katodowe w analizach elektrochemicznych;
- w bogatym zestawie enzymów jakie *C. unicolor* wykorzystuje w degradacji ligniny z różnych gatunków drewna, lakaza odgrywa istotną rolę (ekspresję genu kodującego jedną z izoform lakazy wykryto w czasie wzrostu grzybni na wszystkich badanych rodzajach trocin);
- wykazano, że poziom ekspresji poszczególnych izoform lakazy jest zróżnicowany w zależności od rodzaju rozkładanego gatunku drzewa;
- na rozkład drewna przez *C. unicolor* mogą wpływać zmienne warunki naświetlenia grzybni, co jest skorelowane z poziomem ekspresji lakazy i proteaz zewnątrzkomórkowych;
- przedstawione wyniki badań oraz dane literaturowe wskazują, że *C. unicolor* podobnie jak większość organizmów zdolnych do rozkładu drewna, wykorzystuje w tym procesie kombinację różnych izoform lakazy i ligninolitycznych peroksydaz klasy II zawierających hem (POD).

V. Omówienie innych prac naukowo badawczych niewliczanych do osiągnięcia naukowego stanowiącego monotematyczny cykl publikacji

A) Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę naukowo-badawczą rozpocząłem w 1998 roku w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Jerzego Rogalskiego jako student IV roku kierunku Biologia (specjalność Biochemia), Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii), Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Przeprowadzone przeze mnie badania były realizowane we współpracy z dr hab. Małgorzatą Pleszczyńską z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS i dotyczyły dekstranazy produkowanej przez szczep *Penicillium funiculosum* ATCC 11797. Miały one na celu optymalizację składu podłoża oraz warunków hodowli grzyba w celu intensyfikacji produkcji dekstranazy. Przeprowadzono hodowlę fermentorową z immobilizowaną grzybnią udowadniając możliwość uzyskania preparatu enzymatycznego w następujących po sobie cyklach hodowli. Przeprowadzono oczyszczanie dekstranazy z użyciem

technik chromatografii niskociśnieniowej (FPLC), a za pomocą SDS-PAGE określono masę cząsteczkową dekstranazy na 40,73 kDa. Z użyciem chromatogoniskowania oznaczono punkt izoelektryczny (pI) enzymu wynoszący 6,1, stałe kinetyczne enzymu (K_m i V_{max}) wobec dekstranu oraz zawartość składnika węglowodanowego na poziomie 1.34 %. Badania te zostały opisane w mojej pracy magisterskiej pt. „Optymalizacja hodowli i oczyszczanie dekstranazy z *Penicillium funiculosum* ATCC 11797”, którą obroniłem w lipcu 2000 r. z wynikiem bardzo dobrym.

Po uzyskaniu tytułu magistra kontynuowałem pracę w Zakładzie Biochemii UMCS w ramach V Ramowego Programu Unii Europejskiej [grant ICA2-CT-2000-10050-EURCURR 12-38] kierowanego przez prof. dr hab. Andrzeja Leonowicza. Jednocześnie byłem słuchaczem indywidualnych studiów doktoranckich UMCS pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Rogalskiego. W listopadzie 2003 roku zostałem zatrudniony na etacie asystenta w Zakładzie Biochemii UMCS. Prowadzone przeze mnie badania koncentrowały się na porównaniu właściwości fizyko-chemicznych oraz kinetycznych lakaz *Cerrena unicolor*, *Rhizoctonia praticola*, *Panus tigrinus*, *Phlebia radiata*. Wykonałem optymalizację warunków hodowli wyżej wymienionych organizmów w celu intensyfikacji produkcji zewnątrzkomórkowych lakaz zarówno typu niebieskiego jak i żółtego. W następnym etapie określiłem optima pH i temperatury dla poszczególnych enzymów. Stosując różnorodne techniki chromatograficzne oczyściłem lakazy *C. unicolor*, *R. praticola*, *P. tigrinus*, *P. radiata*. Przeprowadziłem pełną charakterystykę oczyszczonych białek, czyli wyznaczenie pI, MW, stałych kinetycznych, potencjału redoks, ilościową i jakościową zawartość składnika węglowodanowego oraz zawartość jonów miedzi. W celu wykazania obecności miedzi wykonałem spektra absorpcyjne dla oczyszczonych form enzymów. Ponadto określiłem przynależność gatunkową badanych grzybów analizując ich sekwencję ITS (Internal Transcribed Spacer) oraz określiłem liczbę kopii genu lakazy w badanych organizmach metodą hybrydyzacji Southerna.

Pracę doktorską „Badania porównawcze lakaz grzybowych” obroniłem 07.12.2005.

Badania przeprowadzone przeze mnie i współautorów przed uzyskaniem stopnia doktora zostały opublikowane w 3 pracach w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym:

1. **Janusz G.**, Rogalski J., Jarosz-Wilkolażka A., Leonowicz A (2002) Intensyfikacja produkcji zewnątrzkomórkowej lakazy z *Cerrena unicolor*. **Inżynieria i aparatura chemiczna**, 41: 57-58.
2. Jarosz-Wilkolażka A., **Janusz G.**, Ruzgas T.A., Gorton L., Malarczyk E., Leonowicz A. (2004) Development of a laccase-modified electrode for amperometric detection of mono- and diphenols. The influence of enzyme storage method. **Anal. Lett.** 37 (8): 1497-1513

3. Rogalski J., **Janusz G.**, Krzysztofik I., Feldman A. (2005) Optymalizacja warunków syntezy żółtej lakazy z *Phlebia radiata* i *Panus tigrinus*. **Inżynieria i aparatura chemiczna**, **44**: 88-90.

oraz **16 krajowych i międzynarodowych doniesieniach konferencyjnych.**

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych zostałem zatrudniony od 1 lutego 2007 r. na stanowisku adiunkta w Zakładzie Biochemii UMCS, w którym pracuję do dnia dzisiejszego.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **1.165**

Suma punktów **MNiSW** za prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **23**.

B) Przebieg mojej pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora oraz realizowane aktualnie zadania badawcze

Moje zainteresowania badawcze z opisywanego okresu pracy naukowej można podzielić na kilka grup tematycznych:

1. Analiza filogenetyczna i fenotypowa grzybów

W ramach współpracy z Instytutem Agrofizyki PAN w Lublinie, Uniwersytetem Przyrodniczym w Poznaniu, Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie oraz Zakładem Genetyki i Mikrobiologii UMCS brałem udział w charakterystyce filogenetycznej i fenotypowej grzybów z rodzajów: *Coprinus*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Flammulina* oraz *Aspergillus*. Organizmy stanowiące przedmiot badań zostały sklasyfikowane do gatunku poprzez sekwencjonowanie regionów ITS (Internal Transcribed Spacer). Następnie, stosując analizę typu AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) określono zróżnicowanie filogenetyczne tych gatunków grzybów. Dla większości badanych szczepów dodatkowo przeprowadzono analizy fenotypowe, które polegały na określeniu zdolności do katabolizowania źródeł węgla i azotu z użyciem systemu Biolog FF Microplates. Ponadto wykazano zróżnicowanie w ekspresji lakazy przez szczepy *Flammulina* w zależności od rodzaju induktora i czasu indukcji. Uzyskane wyniki opisano w poniższych pracach:

- Pawlik, A., Malinowska, A., Siwulski, M., Frac, M., Rogalski, J., **Janusz, G.**[✉] (2015) Determination of biodiversity of *Coprinus comatus* using genotyping and metabolic profiling tools. *Acta Biochim. Pol.*, 62 (4), pp. 683-689.
- Rola, B., Pawlik, A., Frac, M., Małek, W., Targoński, Z., Rogalski, J., **Janusz, G.**[✉] (2015) The phenotypic and genomic diversity of *Aspergillus* strains producing glucose dehydrogenase. *Acta Biochim. Pol.*, 62 (4), pp. 747-755.
- Pawlik, A., **Janusz, G.**[✉], Dębska, I., Siwulski, M., Frac, M., Rogalski, J. (2015) Genetic and metabolic intraspecific biodiversity of *Ganoderma lucidum*. *BioMed Res. Int.*, 2015, art. no. 726149

- **Janusz, G.** [✉], Czuryło, A., Frąc, M., Rola, B., Sulej, J., Pawlik, A., Siwulski, M., Rogalski, J. (2015) Laccase production and metabolic diversity among *Flammulina velutipes* strains. *World J. Microbiol. Biotech.*, 31 (1), pp. 121-133.
- Pawlik, A., **Janusz, G.**, Koszerny, J., Małek, W., Rogalski, J. Genetic diversity of the edible mushroom *Pleurotus sp.* by amplified fragment length polymorphism (2012) *Curr. Microbiol.*, 65 (4), pp. 438-445.

2. Izolacja metabolitów grzybowych o właściwościach biomedycznych

W ramach działania w multidyscyplinarnej sieci badawczej kierowanej przez dr hab. Magdalenę Jaszek (Zakład Biochemii UMCS) obejmującej następujące ośrodki badawcze:

1. Uniwersytet Marii Curie–Skłodowskiej w Lublinie:
 - Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii
 - Zakład Wirusologii i Immunologii, Wydział Biologii i Biotechnologii
2. Politechnika Lubelska:
 - Katedra Podstaw Inżynierii Produkcji, Wydział Mechaniczny,
3. Uniwersytet Medyczny w Lublinie:
 - Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, II Wydział Lekarski,
 - Katedra i Zakład Fizjologii Człowieka, I Wydział Lekarski,
4. Centrum onkologii–Instytut Marii Skłodowskiej–Curie w Warszawie:
 - Zakład Genetyki

brałem udział w badaniach mających na celu izolację, charakterystykę oraz badanie nowych możliwości aplikacyjnych (biomedycznych i przemysłowych) metabolitów produkowanych przez grzyby białej zgnilizny drewna. W wyniku przeprowadzonych badań wyizolowano trzy główne grupy związków: polisacharydy, lakazę oraz związki niskocząsteczkowe. Udowodniono, że wymienione metabolity grzybowe wykazują właściwości antybakteryjne, antynowotworowe lub antywirusowe. Uzyskane wyniki zostały opisane w poniższych pracach i patentach:

- Statkiewicz, M., Matuszewska, A., Jaszek, M., **Janusz, G.**, Osińska, M., Sulej, J., Stefaniuk, D., Mikula, M., Ostrowski, J. (2017) Antimelanomic effects of high- and low-molecular weight bioactive subfractions isolated from the mossy maze mushroom, *Cerrena unicolor* (*Agaricomycetes*). *Int. J. Med. Mushrooms*, 19 (7), 619-628.
- Osińska-Jaroszuk, M., Jaszek, M., Sulej, J., Stefaniuk, D., Urbaniak, M., Siwulski, M., **Janusz, G.** [✉] (2016) Complex biochemical analysis of fruiting bodies from newly isolated polish *Flammulina velutipes* strains. *Pol. J. Microbiol.*, 65 (3), 295-305.
- Matuszewska, A., Karp, M., Jaszek, M., **Janusz, G.**, Osińska-Jaroszuk, M., Sulej, J., Stefaniuk, D., Tomczak, W., Giannopoulos, K. (2016) Laccase purified from *Cerrena unicolor* exerts antitumor activity against leukemic cells. *Oncol. Lett.*, 11 (3), 2009-2018.
- Mizerska-Dudka, M., Jaszek, M., Błachowicz, A., Rejczak, T.P., Matuszewska, A., Osińska-Jaroszuk, M., Stefaniuk, D., **Janusz, G.**, Sulej, J., Kandefer-Szerszeń, M. (2015) Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. *Int. J. Biol. Macromol.* s, 79, 459-468.
- Osińska-Jaroszuk, M., Jaszek, M., Mizerska-Dudka, M., Błachowicz, A., Rejczak, T.P., **Janusz, G.**, Wydrych, J., Polak, J., Jarosz-Wilkolazka, A., Kandefer-Szerszeń, M. (2014) Exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* as a promising bioactive

compound with cytostatic and antibacterial properties. *BioMed Res. Int.*, 2014, art. no. 743812.




- Jaszek, M., Osińska-Jaroszuk, M., **Janusz, G.**, Matuszewska, A., Stefaniuk, D., Sulej, J., Polak, J., Ruminowicz, M., Grzywnowicz, K., Jarosz-Wilkołazka, A. (2013) New Bioactive fungal molecules with high antioxidant and antimicrobial capacity isolated from *Cerrena unicolor* idiophasic cultures. *BioMed Res. Int.*, 2013, art. no. 497492,
- **Patenty:**
- Nr 225934. Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych krwi. Magdalena Jaszek., Anna Matuszewska, Monika Osińska–Jaroszuk, **Grzegorz Janusz**, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Krzysztof Giannopoulos, Marta Karp. (2013)
- Nr 225869. Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu raka szyjki macicy: Anna Matuszewska, Magdalena Jaszek, **Grzegorz Janusz**, Monika Osińska–Jaroszuk, Justyna Sulej, Dawid Stefaniuk, Jerzy Rogalski, Magdalena Mizerska–Dudka, Martyna Kandefer–Szerszeń. (2013)

3. Wybór organizmów, optymalizacja warunków syntezy, izolacja i zastosowanie enzymów grzybowych

W ramach prac w projekcie Preludium 1 „Dehydrogenazy grzybowe wybranych grzybów ligninolitycznych” (2011/01/N/NZ1/03458) wyizolowano i scharakteryzowano dehydrogenazę celobiozową (CDH) z trzech gatunków grzybów. Moje zadanie badawcze w tym projekcie polegało na identyfikacji i analizie sekwencji genów kodujących te enzymy oraz potwierdzeniu z użyciem techniki LCSM/MS, że izolowane białka to produkty tych genów. Podczas badań w projekcie LIDER/24/48/1-2/10/NCBiR/2011 „Opracowanie innowacyjnego biopreparatu do optymalizacji procesu fermentacji metanowej” (Instytut Agrofizyki PAN w Lublinie) wyizolowano środowiskowy szczep *Trichoderma atroviride*. Udowodniono, że grzyb ten jest bardzo wydajnym producentem zewnątrzkomórkowych celulaz, których synteza została dodatkowo zoptymalizowana. Na bazie zewnątrzkomórkowej celulazy *T. atroviride* opracowano biopreparat zastosowany w procesie fermentacji metanowej. Ponadto w ramach Badań Statutowych prowadzonych w Zakładzie Biochemii uczestniczyłem w izolacji i charakterystyce biochemicznej lakazy z *Sinorizhobium meliloti* i określeniu sekwencji genu bakteryjnego kodującego ten enzym. W ramach podobnych badań wyizolowano i scharakteryzowano lipazę z *Rhizomucor variabilis*. Opisane badania zostały opublikowane w poniższych pracach:

- Oszust, K., Pawlik, A., Siczek, A., **Janusz, G.**, Gryta, A., Bilińska-Wielgus, N., Frac, M. (2017). Efficient cellulases production by *Trichoderma atroviride* G79/11 in submerged culture based on soy flour-cellulose-lactose. *BioResources*, 12(4), 8468-8489
- Oszust, K., Pawlik, A., **Janusz, G.**, Ziemiński, K., Cyran, M., Siczek, A., Gryta, A., Bilinska-Wielgus, N., Frac, M. (2017) Characterization and influence of a multi-

enzymatic biopreparation for biogas yield enhancement. *BioResources*, 12 (3), pp. 6187-6206.

- Pawlik, A., Wójcik, M., Rułka, K., Motyl-Gorzel, K., Osińska-Jaroszuk, M., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., Skorupska, A., Rogalski, J., **Janusz, G.** (2016) Purification and characterization of laccase from *Sinorhizobium meliloti* and analysis of the lacc gene. *Int. J. Biol. Macromol.*, 92, pp. 138-147.
- Bancierz, R., Osińska-Jaroszuk, M., Jaszek, M., **Janusz, G.**, Stefaniuk, D., Sulej, J., Janczarek, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Rogalski, J. (2016) New alkaline lipase from *Rhizomucor variabilis*: biochemical properties and stability in the presence of microbial EPS. *Biotech. App. Bioch.*, 63 (1), pp. 67-76.
- Sulej, J., **Janusz, G.** , Osińska-Jaroszuk, M., Rachubik, P., Mazur, A., Komaniecka, I., Choma, A., Rogalski, J. (2015) Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important *Cerrena unicolor* strain. *App. Bioch. Biotech.*, 176 (6), pp. 1638-1658.
- Sulej, J., **Janusz, G.** , Mazur, A., Zuber, K., Zebracka, A., Rogalski, J. (2013) Cellobiose dehydrogenase from the ligninolytic basidiomycete *Phlebia lindtneri* *Proc. Biochem.*, 48 (11), pp. 1715-1723.
- Sulej, J., **Janusz, G.** , Osińska-Jaroszuk, M., Małek, P., Mazur, A., Komaniecka, I., Choma, A., Rogalski, J. (2013) Characterization of cellobiose dehydrogenase and its FAD-domain from the ligninolytic basidiomycete *Pycnoporus sanguineus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 53 (6-7), pp. 427-437.

4. Wpływ światła na metabolizm grzybów

Od 2013 roku prowadzę badania nad grzybowymi fotoreceptorami i wpływem światła na metabolizm grzybów rozkładających drewno. Dotychczas zaobserwowano zależność pomiędzy wydajnością syntezy lakazy, CDH oraz proteaz w świetle o różnej długości fali. Uzyskane w ten sposób wyniki stały się podstawą do złożenia projektu badawczego, który uzyskał finansowanie. Od 2014 roku kieruję projektem Opus 8 „Wpływ światła na metabolizm *Cerrena unicolor*” (2014/15/B/NZ9/01990), w ramach którego zostały zanalizowane transkryptomy grzyba rosnącego w różnych warunkach naświetlenia (praca w przygotowaniu). Wykazano różnice w aktywnościach metabolicznych w hodowli grzyba w zależności od długości światła z użyciem aparatu Biolog FF Microplate (praca w przygotowaniu). Dalsze badania obejmują określenie zmian w syntezie enzymów rozkładających drewno oraz proteaz, związków niskocząsteczkowych oraz aktywności kanałów jonowych.

5. Izolacja i charakterystyka grzybowych glukanów

W trakcie współpracy z zespołem kierowanym przez dr hab. Adriana Wiatera (Zakład Mikrobiologii Przemysłowej UMCS) brałem udział w badaniach mających na celu izolację i charakterystykę glukanów z grzybni i owocników gatunków grzybów uważanych za lecznicze.

Do moich zadań należała identyfikacja gatunkowa izolowanych szczepów z użyciem technik biologii molekularnej. Wyniki badań zostały opublikowane w pracach:

- Wiater, A., Choma, A., Komaniecka, I., Pleszczyńska, M., Siwulski, M., Polak, P., **Janusz, G.**, Szczodrak, J. (2016) Fruiting bodies of *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. - A new source of water-insoluble (1→3)- α -D-glucan. *Acta Soc. Botan. Pol.*, 85 (3), art. no. 5950,
- Wiater, A., Paduch, R., Choma, A., Pleszczyńska, M., Siwulski, M., Dominik, J., **Janusz, G.**, Tomczyk, M., Szczodrak, J. (2012) Biological study on carboxymethylated (1→3)- α -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 51 (5), 1014-1023.
- Wiater, A., Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., **Janusz, G.** (2012) Comparative studies on the induction of *Trichoderma harzianum* mutanase by α -(1→3)-glucan-rich fruiting bodies and mycelia of *Laetiporus sulphureus*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 13 (8), 9584-9898.

6. Analiza transkryptomu *Abortiporus biennis*

W trakcie badań w projekcie „Charakterystyka i znaczenie nowej oksydazy kwasu szczawiowego (OXOAb) w odpowiedzi *Abortiporus biennis* na obecność metali ciężkich w środowisku wzrostu” OPUS7 (2014/13/B/NZ9/02106) wykonałem analizę sekwencji genu kodującego oksydazę kwasu szczawiowego (praca w przygotowaniu). Ponadto uczestniczyłem w analizie transkryptomu *A. biennis* izolowanego z grzybni indukowanej kwasem szczawiowym. Wyniki zostały opisane w pracy:

- Grąż, M., Jarosz-Wilkolażka, A., **Janusz, G.**, Mazur, A., Wielbo, J., Koper, P., Żebracki, K., Kubik-Komar, A. (2017) Transcriptome-based analysis of the saprophytic fungus *Abortiporus biennis* – response to oxalic acid. *Microbiol. Res.*, 199, 79-88.

Najważniejsze rezultaty naukowe po uzyskaniu stopnia doktora nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Analiza fenotypowa i filogenetyczna grzybów z rodzaju: *Coprinus*, *Pleurotus*, *Aspergillus*, *Ganoderma* i *Flammulina*.
2. Izolacja metabolitów grzybowych (polisacharydy, lakaza oraz związki niskocząsteczkowe) o właściwościach antybakteryjnych, antynowotworowych lub antywirusowych.
3. Izolacja i charakterystyka enzymów (lakaza, celulazy, lipaza, dehydrogenaza celobiozowa) o znaczeniu biotechnologicznym.
4. Ustalenie wpływu barwy światła na dynamikę zmian aktywności lakazy, dehydrogenazy celobiozowej oraz proteaz syntetyzowanych przez grzyby *Pycnoporus sanquineus* i *Phlebia lindtneri*.

5. Oznaczenie sekwencji genu kodującego oksydazę szczawianową oraz analiza transkryptomu *A. biennis*.

Wyniki badań, w których uczestniczyłam po uzyskaniu stopnia doktora stały się również treścią doniesień zaprezentowanych na konferencjach międzynarodowych (20) oraz krajowych (9).

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) moich prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych (bez prac stanowiących osiągnięcie naukowe) zgodnie z rokiem opublikowania wyniósł: **49,0**

Suma punktów MNiSW uzyskanych za prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora (bez prac stanowiących osiągnięcie naukowe) zgodnie z rokiem opublikowania: **656 pkt.**

Podsumowanie całego dorobku (bez prac stanowiących osiągnięcie naukowe): **IF = 49,273**, punkty **MNiSW = 667**).

VI. Plany naukowe

Moje plany naukowe to kontynuacja obecnie realizowanych nurtów badawczych dotyczących:

- a) wpływu światła na metabolizm grzybów;
- b) regulacji ekspresji grzybowych enzymów rozkładających drewno;
- c) badania zróżnicowania mikrobiologicznego ekosystemów leśnych.

VII. Podsumowanie aktywności naukowej

Dane bibliometryczne	Liczba publikacji	IF ^a	Punkty MNiSW ^b
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	7	23,654	185
Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego):		52,043	692
A) przed uzyskaniem stopnia doktora	1		
B) po uzyskaniu stopnia doktora	29		
Publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR:		0	11
A) przed uzyskaniem stopnia doktora	2		
B) po uzyskaniu stopnia doktora	1		
Liczba streszczeń naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych:		-	-
A) przed uzyskaniem stopnia doktora	16		
B) po uzyskaniu stopnia doktora	28		
Łączna liczba publikacji * Razem = 40	40	75,697	888

a- IF zgodnie z rokiem opublikowania			
b – MNIŚW zgodnie z rokiem opublikowania			
*Wykaz wszystkich prac obejmujących mój dorobek naukowy przedstawiono w Załączniku nr 3			
Ocena bibliometryczna:			
Całkowita liczba cytowań bez autocytowań wg Web of Science:		242	
Całkowita liczba cytowań bez autocytowań wg Scopus:		274	
Indeks Hirscha bez autocytowań (wg Web of Science)		9	
Indeks Hirscha bez autocytowań (wg Scopus)		9	

