

AUTOREFERAT

Anna Pawlik

**Katedra Biochemii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie**

Lublin 2021

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych ..	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).....	4
4.1. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników	5
4.1.1. Wprowadzenie.....	5
4.1.2. Cel badań	8
4.1.3. Osiągnięte wyniki	9
4.1.4. Podsumowanie najważniejszych wyników badań opublikowanych w artykułach stanowiących osiągnięcie naukowe	24
4.1.5. Literatura.....	26
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	28
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	33
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej, nieomówione w punktach 4-5	35

1. Imię i nazwisko

Anna Pawlik

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2013 - stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii

Rozprawa doktorska pt.: „Lakazy bakteryjne”

Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Rogalski

2005 - tytuł zawodowy magistra biologii w zakresie biochemii

Praca magisterska pt.: „Zastosowanie technik molekularnych do określenia podobieństw między szczepami *Trichoderma reesei*”

Wydział Biologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Rogalski

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

2014 - do chwili obecnej – zatrudnienie w Katedrze Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie na stanowisku **adiunkta**



2005 - 2014 – zatrudnienie w Zakładzie Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie na stanowisku **asystenta**

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.)


Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 5 badawczych artykułów naukowych opublikowanych w latach 2019 – 2020 i powiązanych tematem:

Zmienne warunki oświetlenia jako czynnik modyfikujący właściwości metaboliczne i cechy morfologiczne grzyba białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor*, ze szczególnym uwzględnieniem zdolności tego grzyba do rozkładu ligninocelulozy.


W skład osiągnięcia naukowego wchodzi następujące publikacje:

A1. Pawlik A. , Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., Kubik-Komar A., Janusz G.  (2019) RNA sequencing reveals differential gene expression of *Cerrena unicolor* in response to variable lighting conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2), 290.

IF = 4,183, punkty MNiSW = 140

A2. Pawlik A. , Ruminowicz-Stefaniuk M., Frąc M., Mazur A., Wielbo J., Janusz G. (2019) The wood decay fungus *Cerrena unicolor* adjusts its metabolism to grow on various types of wood and light conditions. *PLOS ONE* 14(2), e0211744.

IF = 2,776, punkty MNiSW = 100

A3. Pawlik A. , Jaszek M., Stefaniuk D., Świdorska-Burek U., Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., Janusz G. (2020) Combined effect of light and nutrients on the micromorphology of the white rot fungus *Cerrena unicolor*. *International Journal of Molecular Sciences* 21(5), 1678.

IF = 4,556, punkty MNiSW = 140

A4. Pawlik A. [✉], Jaszek M., Sulej J., Janusz G. (2019) Light-regulated synthesis of extra- and intracellular enzymes related to wood degradation by the white rot fungus *Cerrena unicolor* during solid-state fermentation on ash sawdust-based medium. *Acta Biochimica Polonica* 66(4), 419-425.

IF = 1,239, punkty MNiSW = 40

A5. Pawlik A. [✉], Jaszek M., Swatek A., Rumnowicz-Stefaniuk M., Ciołek B., Mazur A., Janusz G. (2020) Lighting conditions influence the dynamics of protease synthesis and proteasomal activity in the white rot fungus *Cerrena unicolor*. *Biomolecules* 10(9), 1322.

IF = 4,082, punkty MNiSW = 100

[✉] - autor korespondencyjny

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania:

16,863

Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem publikacji:

520

4.1. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

4.1.1. Wprowadzenie

Światło jest bardzo ważnym czynnikiem środowiskowym warunkującym życie na Ziemi. Dla większości żywych organizmów stanowi źródło energii i/lub informacji o otaczającym świecie, a zdolność do odbierania bodźców świetlnych wpływa na ich przewagę ewolucyjną oraz przetrwanie w naturze.

Grzyby wykorzystują światło jako źródło informacji o otaczającym je środowisku, które kontroluje m.in. procesy metaboliczne, cykle rozwojowe, morfogenezę, adaptacje fizjologiczne, rytmy cyrkadiańskie i odpowiedź komórek na stres [1-4]. Wielokrotnie

wykazano, że organizmy te są w stanie odbierać sygnały świetlne za pomocą białkowych receptorów, które przekształcając informacje środowiskowe zawarte w świetle są zdolne do wywołania określonej reakcji biologicznej organizmu. Cechą wspólną wszystkich fotoreceptorów grzybowych jest obecność charakterystycznej dla tego typu struktur niebiałkowej grupy chromoforowej, która warunkuje aktywność biologiczną holoproteiny i odpowiedzialna jest za absorpcję fotonów światła o określonej barwie. Do fotoreceptorów grzybowych zaklasyfikowano:

- flawinowe kryptochromy,
- występujące w kompleksie z retinalem opsyny,
- fitochromy połączone z tetrapirolem (biliwerdyną).

Te główne klasy fotoreceptorów odpowiedzialne są za odbieranie światła o różnej intensywności i długości fali (barwie), tj.: od niebieskiego i UV (kryptochromy), poprzez zielone (opsyny), aż do czerwonego i dalekiej podczerwieni (fitochromy), sugerując zdolność grzybów do detekcji specyficznych sygnałów świetlnych w zakresie od około 450 do 700 nm [2, 5].

Reakcja grzybów na bodziec świetlny jest wielokierunkowa i może znacząco wpływać na dostosowanie tych organizmów do wymagań środowiskowych, a to z kolei może istotnie modyfikować ich sukces ewolucyjny. W ostatnich latach wielokrotnie udowodniono, że pod wpływem światła różne gatunki grzybów zmieniają profil globalnej ekspresji genów, co reguluje ich metabolizm i liczne szlaki sygnałowe [5, 6]. Należy jednak podkreślić, że rodzaj i skala zmian indukowanych światłem jest zmienna i zależy również od wzajemnego oddziaływania innych czynników środowiskowych. Poprzez zmiany dostępności i rodzaju źródła węgla w podłożu hodowlanym można modulować wpływ światła na wzrost i metabolizm grzybów, co sugeruje, że odpowiedź na dostępność związków pokarmowych oraz światło są ze sobą ściśle powiązane [7, 8]. Wiedząc, że światło może być również źródłem stresu oksydacyjnego dla komórek grzybowych należy wziąć pod uwagę także negatywne działanie światła (zwłaszcza promieniowania UV) na makrocząsteczki poprzez indukcję powstawania reaktywnych form tlenu, takich jak nadtlenek wodoru, ponadtlenki i inne wolne rodniki, które uszkadzają lipidy, białka i DNA [2]. Swoistym markerem poziomu stresu komórkowego są m.in. zachodzące w komórkach procesy związane z obrotem białkowym, czy zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Pojawienie się czynnika stresowego w środowisku wzrostu grzyba bezpośrednio wpływa na poziom syntezy i degradacji białek zaangażowanych w metabolizm podstawowy komórki. Procesy te odgrywają istotną rolę

regulacyjną i utrzymują homeostazę w komórce. Dla organizmów saprotroficznych i pasożytniczych zdolność do syntezy proteaz może być kluczowa w przeżywaniu i skutecznej kolonizacji nowych nisz ekologicznych [9-11]. Jednak fizjologiczne znaczenie wielu zagadnień związanych z regulacją aktywności proteaz grzybowych i zależności ich aktywności od światła pozostaje jak dotąd niewyjaśnione.

Opierając się na dostępnych danych literaturowych można stwierdzić, że światło jest czynnikiem, który niewątpliwie wpływa na wiele fizjologicznych aspektów cyklu życiowego grzybów. Jeden z nich wiąże się z pozyskiwaniem substancji odżywczych w biologicznym rozkładzie drewna, za który w przyrodzie odpowiedzialne są głównie saprotroficzne organizmy grzybowe. Różnorodność metaboliczna tej grupy mikroorganizmów przejawia się m.in. w zdolności do syntezy szerokiej gamy enzymów bezpośrednio lub pośrednio zaangażowanych w procesy degradacji kompleksu ligninocelulozowego [12]. Grzyby degradujące drewno wykształciły unikalne szlaki metaboliczne pozwalające im na rozkład i przyswajanie zarówno prostych jak i złożonych związków organicznych. Poznanie mechanizmów biologicznego rozkładu drewna jest istotne nie tylko ze względów ekologicznych wynikających z udziału grzybów w obiegu węgla w przyrodzie i zdolności do kolonizacji różnych nisz ekologicznych, ale również z punktu widzenia ich znaczenia ekonomicznego i roli w życiu człowieka [13]. W przyrodzie materiał ligninocelulozowy jest degradowany synergistycznie przez hydrolazy oraz unikalne enzymy oksydacyjne. Całkowita degradacja celulozy wymaga udziału szeregu celulaz oraz enzymów ksylanolitycznych i pomocniczych. Natomiast enzymy modyfikujące ligninę (*lignin-modifying enzymes*, LME) i dodatkowe enzymy pomocnicze (*lignin-degrading auxillary*, LDA) zaangażowane są w rozkład ligniny. W procesie tym wykazano również udział enzymów antyoksydacyjnych tj. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i katalaza, które pośrednio związane są z ligninolizą oraz z ochroną komórek przed toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu [14].

Dotychczasowe badania fotobiologii grzybów dotyczyły głównie niższych grzybów strzępkowych tj.: *Neurospora crassa*, *Trichoderma* sp. i *Aspergillus nidulans* [2]. Z kolei gatunki grzybów wyższych, włączając te zdolne do biologicznego rozkładu drewna, były jak dotąd pomijane w takich analizach.

Cerrena unicolor, czyli gmatkówka szarawa, jest podstawczakiem należącym do rzędu żagwiowców (*Polyporales*). Zaliczana jest do ekologicznej grupy grzybów białej zgnilizny drewna (*white rot fungi*, WRF), biorących udział w biologicznym rozkładzie drewna. Organizm ten zarówno pasożytuje na żywych drzewach jak i jest saprotrofem

żywiącym się martwym drewnem. *C. unicolor* jest gatunkiem szeroko rozpowszechnionym w Europie, Ameryce Południowej i Afryce [15, 16]. Występuje na martwym drewnie drzew liściastych takich jak klon (*Acer* spp.), brzoza (*Betula* spp.), jesion (*Fraxinus excelsior*), buk (*Fagus* spp.) i dąb (*Quercus* spp). Ponadto wiele szczepów *C. unicolor* zostało bardzo dobrze poznanych jako źródło biotechnologicznie istotnych enzymów, takich jak: zewnątrzkomórkowa lakaza, peroksydaza manganozależna, dehydrogenaza celobiozowa, ksylanaza i celulazy [17-19]. Wykazano również, że organizm ten zdolny jest do syntezy niskocząsteczkowych związków bioaktywnych o znaczeniu farmakologicznym i biomedycznym [20].

Jak dotąd niewiele jest informacji o wpływie światła na metabolizm grzybów rozkładających drewno, w tym *C. unicolor*. Ze względu na ogromne znaczenie ekologiczne organizmów z tej grupy, zdolność do rozkładu ligninocelulozy i możliwość zastosowania w biotechnologii, lepsze zrozumienie fotobiologii grzybów rozkładających drewno na przykładzie gatunku *C. unicolor* oraz regulacji szlaków metabolicznych poprzez światło wydaje się być bardzo cenne oraz uzasadnione tak w kontekście poznawczym jak i zastosowań praktycznych.

4.1.2. Cel badań

Celem badań stanowiących treść przedstawionego osiągnięcia naukowego było określenie wpływu różnych długości fali świetlnej na cechy metaboliczne i morfologiczne *C. unicolor*, ze szczególnym uwzględnieniem zdolności tego grzyba do rozkładu kompleksu ligninocelulozowego. Prace badawcze, które doprowadziły do realizacji przedstawionego celu obejmowały:

1. Wykazanie zmian profilu ekspresji genów poprzez dokonanie globalnej charakterystyki transkryptomu (RNA-Seq) *C. unicolor* w zależności od zastosowanych warunków świetlnych ze szczególnym naciskiem na identyfikację i analizę różnicową ekspresji genów kodujących enzymy degradujące ligninocelulozę.
2. Określenie profilu metabolicznego i wrażliwości chemicznej *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia i analiza fenotypowa zależności pomiędzy wzrostem tego grzyba na podłożu trocinowym a zdolnością do wykorzystania określonych źródeł węgla z użyciem systemu Biolog FF i mikromacierzy fenotypowych Biolog PM.

3. Wykazanie różnic mikromorfologicznych grzybni i ilości produkowanych zarodników przez *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia i na różnych podłożach hodowlanych z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej i skaningowego mikroskopu elektronowego. Wykazanie zmian profilu ekspresji genów zaangażowanych w morfogenezę i wzrost *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia.
4. Ocenę aktywności enzymów bezpośrednio degradujących ligninocelulozę (CAZymes, *carbohydrate-active enzymes*) i enzymów antyoksydacyjnych zaangażowanych w proces ligninolizy oraz określenie wzajemnych zależności tych enzymów u *C. unicolor* z wykorzystaniem technik biochemicznych. Wykazanie zmian poziomu ekspresji genów zaangażowanych w proces proteolizy oraz zmian aktywności proteaz i aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu 26S w odpowiedzi tego gatunku grzyba na zastosowane warunki świetlne w hodowlach stacjonarnych na podłożu z trocin jesionowych.

4.1.3. Osiągnięte wyniki

Wykazanie zmian profilu ekspresji genów (mRNA-Seq) *C. unicolor* w zależności od zastosowanych warunków oświetlenia ze szczególnym naciskiem na identyfikację i analizę różnicową ekspresji genów kodujących enzymy degradujące ligninocelulozę.

Transkryptom jako układ dynamiczny szybko odpowiada na zmiany środowiska i wyprzedza zmiany fenotypowe. Dlatego też przeprowadziłam identyfikację zmian ekspresji genów *C. unicolor* pod wpływem zmiennych warunków oświetlenia w hodowli półstałej (SSF, *Solid State Fermentation*) na trocinach jesionowych (w badaniach wstępnych na wybranym podłożu trocinowym obserwowano największą dynamikę wzrostu tego grzyba). W tym celu zsekwencjonowano transkryptomy (analiza mRNA-Seq) grzyba hodowanego w ciemności oraz w świetle białym, czerwonym, zielonym i niebieskim. W wyniku analizy danych RNA-Seq zidentyfikowałam 10413 genów, które ulegały ekspresji we wszystkich wariantach hodowlanych łącznie, a spośród których 7762 stanowiły geny wspólne (tzw. core genes). Należy zwrócić uwagę, że po raz pierwszy u grzybów rozkładających drewno zidentyfikowano transkrypty kodujące grzybowe fotoreceptory, takie jak kryptochromy, opsyny i fitochromy (białka WCC), co sugeruje, że badany gatunek jest zdolny do odbierania bodźców świetlnych o różnej długości fali. Obecność transkryptów kodujących białka podobne do kryptochromów i białek WCC *N. crassa*, fitochromów *C. purpureus* i opsyn *T. versicolor* wskazuje na to, że szczep *C. unicolor* jest zdolny „wyczuwać” światło w zakresie

od niebieskiego do dalekiej podczerwieni. W wyniku przeprowadzonych przeze mnie analiz wykazano, że najwięcej unikalnych transkryptów (112) wykryto podczas wzrostu grzyba w świetle zielonym, a najmniej (20) w trakcie hodowli w ciemności. Poziom ekspresji genów był zmienny i zależny od warunków hodowlanych. Największą liczbę genów o zróżnicowanej ekspresji (DEGs) względem kontroli (ciemność) stwierdziłam w przypadku hodowli *C. unicolor* w świetle białym. Z kolei najmniejszą liczbę DEGs (w sumie 216 genów) zaobserwowałam w hodowli prowadzonej w świetle zielonym. Wśród genów o zróżnicowanej ekspresji zidentyfikowano transkrypty kodujące białka potencjalnie zaangażowane w podstawowy metabolizm węglowodanów, metabolizm aminokwasów i karetonoidów, autofagię, systemy naprawcze nukleotydów oraz szlaki sygnałowe. Analiza szlaków metabolicznych w oparciu o bazę KEGG umożliwiła identyfikację transkryptów związanych z biosyntezą metabolitów wtórnych i antybiotyków we wszystkich wariantach hodowlanych. Wykazałam, że światło niebieskie specyficznie indukowało ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm histydyny, natomiast zwiększoną ekspresję genów metabolizmu retinolu obserwowałam w grzybni hodowanej w świetle czerwonym. Specyficzną indukcję genów kodujących dwuskładnikowy system transdukcji sygnału, MAPK, receptor RIG-I-podobny, degradację lizyny, metabolizm sfingolipidów i pirogronianu, szlaki naprawy DNA, endocytozę i autofagię stwierdziłam u szczepu *C. unicolor* hodowanego w świetle białym. Obniżoną ekspresję genów związanych z biogenezą rybosomów zaobserwowałam w grzybni hodowanej w świetle niebieskim i zielonym. Dodatkowo namnażanie biomasy grzybowej w świetle czerwonym skutkowało represją genów związanych z metabolizmem lizyny. Zastosowanie zielonego światła specyficznie obniżało ekspresję genów kodujących enzymy szlaku kwasu cytrynowego, natomiast ekspresja genów związanych z cyklem komórkowym, replikacją i metabolizmem tyrozyny była widocznie obniżana (w porównaniu z ciemnością) w grzybni hodowanej w świetle białym.


Ze względu na unikalne zdolności biodegradacyjne *C. unicolor*, zwłaszcza w odniesieniu do polimerów roślinnych, przeprowadziłam hodowlę tego grzyba na trocinach jesionowych i wykonałam również analizy ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w biologicznej degradacji drewna. Przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację genów kodujących enzymy zdolne do rozkładu celulozy, hemicelulozy i ligniny (tzw. enzymy LME i LDA). Najwięcej genów o zróżnicowanej ekspresji (16) zidentyfikowano w przypadku hodowli *C. unicolor* w świetle białym, a najmniej (4) w

warunkach światła zielonego. Większa liczba transkryptów obserwowana w świetle białym może wynikać z ogólnej stymulacji metabolizmu grzyba przez światło dzienne. Co więcej, we wszystkich zastosowanych warunkach oświetlenia (oprócz światła zielonego) zaobserwowałam wyraźną przewagę genów o zwiększonej ekspresji kodujących enzymy zaangażowane w rozkład drewna. Światło białe indukowało głównie ekspresję genów kodujących enzymy pomocnicze LDA obejmujące oksydazę alkoholową i cytochrom P450. Podobnie światło niebieskie indukowało ekspresję enzymów LDA, takich jak: dehydrogenaza aryl-alkoholowa, oksydaza piranozowa, monooksygenaza. Natomiast hodowla *C. unicolor* w świetle czerwonym i białym skutkowałą obniżeniem ekspresji genów kodujących lakazę. Z kolei ekspresja genów specyficznie kodujących wszystkie hemicelulazy i prawie wszystkie celulazy była wyraźnie indukowana przez różne długości fali świetlnej. Biorąc pod uwagę, że transkrypty genów kodujących enzymy rozkładające ligninocelulozę u *C. unicolor* wykryłam we wszystkich wariantach hodowlanych można przypuszczać, że zdolności grzyba do degradacji drewna zależne są nie tylko od warunków oświetlenia, ale również od innych warunków hodowli.

Poza genami kodującymi enzymy bezpośrednio zaangażowane w metabolizm i rozkład drewna przez *C. unicolor* po raz pierwszy zidentyfikowałam także transkrypty genów kodujących białka szlaków sygnałowych, co może sugerować, że światło jest czynnikiem, który prawdopodobnie reguluje inne procesy komórkowe. Wykazałam, że zarówno światło białe jak i niebieskie indukują ekspresję genu kinazy aktywowanej mitogenami MAPK oraz genów kodujących czynniki transkrypcyjne FOX, które mogą być odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów do szlaków związanych z filamentacją (odpowiedź stresowa na skutek uszkodzeń DNA), osmoregulacją i zatrzymaniem cyklu komórkowego (kinaza MAP) lub procesami odpowiedzi na stres oksydacyjny, naprawę DNA i proteolizę zależną od ATP (białka FOX). Stwierdziłam, że proces ubikwitynozależnej proteolizy może być również negatywnie regulowany przez receptor RIG-I-podobny, którego ekspresja u *C. unicolor* była indukowana poprzez światło białe. Dodatkowo określiłam pośrednią regulację szlaków metabolicznych związanych z β -oksydacją lipidów, wychwytem glukozy przez komórki i syntezą cholesterolu poprzez kinazę aktywowaną przez AMP (AMPK), której transkrypty zidentyfikowano w trakcie hodowli grzyba w świetle białym. Zwiększona ekspresja genów kodujących cytochrom P-450 i monooksygenazę w świetle czerwonym i niebieskim może sugerować udział białek WCC lub fitochromów w transdukcji sygnałów komórkowych przez

AMPK i MAPK. Z kolei możliwe jest pośrednie zahamowanie AMPK poprzez fosfatazę 2 (PP2A), której ekspresja u *C. unicolor* była hamowana przez światło czerwone.

Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane i przedyskutowane w następującej pracy naukowej:

AI. Pawlik A. , Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., Kubik-Komar A., Janusz G. (2019) RNA sequencing reveals differential gene expression of *Cerrena unicolor* in response to variable lighting conditions. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2), 290.

Określenie profilu metabolicznego i wrażliwości chemicznej *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia i analiza fenotypowa zależności pomiędzy wzrostem tego grzyba na podłożu trocinowym a jego uzdolnieniami metabolicznymi.

W celu zbadania potencjału metabolicznego (fenotypowego) i wrażliwości chemicznej *C. unicolor* w różnych warunkach hodowlanych (zmienne warunki oświetlenia i różne podłoża trocinowe) przeprowadziłam analizę zdolności grzyba do rozkładu różnych substratów węglowych z użyciem Systemu Biolog (BiologTM, USA). W oparciu o wykorzystanie technologii mikromacierzy fenotypowych Biolog (panel PM1 i PM2) określiłam zależność pomiędzy wstępną hodowlą tego grzyba na podłożu z trocin klonowych, jesionowych i brzozowych oraz podłożem mineralnym Lindeberga-Holma (LH) [21], a zdolnością do rozkładu potencjalnych 190 źródeł węgla. Uzyskane profile metaboliczne wykazały dużą różnorodność w obrębie badanych grup substratów, i były zależne od warunków hodowli grzyba, czego odzwierciedleniem była zróżnicowana wartość wskaźnika różnorodności R (*Richness*), który został obliczony na podstawie liczby wykorzystanych substratów węglowych. Najwyższą aktywność kataboliczną wykazałam w przypadku użycia trocin jesionu oraz brzozy jako podłoża hodowlanego, na których ujawniły się w zdolności *C. unicolor* do rozkładu największej liczby substratów (38). Natomiast wstępna hodowla na podłożu LH skutkowałą najslabszym wzrostem grzyba i najniższą aktywnością metaboliczną, co wskazuje na intensywną syntezę enzymów i aktywację szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za degradację ligninocelulozy w trakcie hodowli tego organizmu na naturalnych substratach (trocin). Analiza proporcji pomiędzy poszczególnymi grupami związków rozkładanymi przez *C. unicolor* wskazuje na metaboliczne preferencje tego grzyba w stosunku do rozkładu kwasów tłuszczowych (29%), polimerów (20%) i węglowodanów

(19%), gdy zastosowano podłoże z trocin jesionowych, brzoźowych i klonowych w trakcie wstępnej hodowli. Jednak polimery i węglowodany okazały się być najbardziej efektywnie rozkładanymi i preferowanymi grupami substratów niezależnie od zastosowanego podłoża hodowlanego. Fakt ten nie zaskakuje, ponieważ związki te wykorzystywane są przez *C. unicolor* w trakcie wzrostu na drewnie w środowisku naturalnym. Z kolei arginina, lizyna i ornityna były uniwersalnymi substratami wykorzystywanymi jako pojedyncze źródło energii przez *C. unicolor*. Najslabiej metabolizowanym źródłem węgla okazały się być aminy. Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że zdolność *C. unicolor* do rozkładu różnych źródeł węgla, a więc i dywersyfikacja syntezy enzymów zdolnych do ich metabolizowania wskazuje na możliwość powolnej adaptacji tego organizmu do wzrostu na różnych (nie zawsze optymalnych) podłożach.


W kolejnym etapie badań określiłam wpływ różnych warunków oświetlenia na profil metaboliczny *C. unicolor* z użyciem mikroplutek Biolog FF. Jak dotąd takie podejście nie było stosowane w badaniach fotobiologii grzybów wyższych, co należy uznać za jeden z nowatorskich elementów przeprowadzonych badań. W trakcie analiz uzyskano zróżnicowane i zależne od światła profile fenotypowe szczepu *C. unicolor* hodowanego w świetle białym, niebieskim, czerwonym, zielonym i ciemności. Otrzymane wyniki jednoznacznie wykazały, że zdolności *C. unicolor* do metabolizowania analizowanych źródeł węgla były największe w trakcie hodowli w ciemności, czego odzwierciedleniem było wykorzystanie aż 74 spośród 95 dostępnych substratów. Jednakże w tych warunkach grzyb nie był zdolny do metabolizowania D-glukozy, D-ksylozy i kwasu bromobursztynowego, które to związki były efektywnie wykorzystywane w pozostałych wariantach świetlnych. Co ciekawe kwas sebacynowy był metabolizowany przez *C. unicolor* tylko w trakcie hodowli w świetle białym. Jednak w tych warunkach wzrostu badany szczep metabolizował najmniejszą liczbę substratów – zaledwie 38, co stanowi jedynie 40% wszystkich analizowanych związków. Najbardziej uniwersalnym źródłem węgla okazał się być kwas *p*-hydroksyfenylooctowy, który rozkładany był we wszystkich wariantach hodowli grzybowych. W toku realizacji badań wykazałam po raz pierwszy, że metaboliczne preferencje *C. unicolor* w stosunku do określonej grupy substratów są ściśle skorelowane z warunkami oświetlenia. Zdolność do rozkładu węglowodanów i polimerów zmniejszała się w kolejności: światło białe > ciemność = światło czerwone > światło niebieskie > światło zielone, natomiast w przypadku aminokwasów zaobserwowano odwrotną zależność. Efektywny wzrost grzyba obserwowałam zarówno na substratach węglowodanowych jak i polimerach, co potwierdza zdolność *C. unicolor* do syntezy

enzymów rozkładających kompleks ligninocelulozowy. Przeprowadzona wielowymiarowa analiza statystyczna grupowania obiektów i cech w zakresie wykorzystania pojedynczych substratów z poszczególnych kategorii związków potwierdziła zróżnicowanie metaboliczne *C. unicolor* i podkreśliła odmienność profilu metabolicznego uzyskanego dla tego gatunku w warunkach wzrostu w świetle białym. Dodatkowo analiza zależności pomiędzy znormalizowanymi wartościami aktywności mitochondrialnej (OD_{490nm}) tego szczepu, a produkcją biomasy (OD_{750nm}) wykazała również duże zróżnicowanie. Obliczona na tej podstawie teoretyczna efektywność metaboliczna *C. unicolor* okazała się być najwyższa (1,06) przy zastosowaniu w trakcie hodowli światła zielonego. Najniższą efektywność metaboliczną wykazałam dla światła białego (1,75).

Zastosowanie przeze mnie w kolejnym etapie badań mikromacierzy fenotypowych Biolog (panele PM21-PM25) pozwoliło po raz pierwszy określić wrażliwość chemiczną *C. unicolor* w różnych warunkach naświetlenia hodowli w stosunku do 120 różnych związków chemicznych, wśród których znajdowały się potencjalne toksyczne czynniki stresowe. Przeprowadzone badania jednoznacznie wykazały, że hodowla badanego szczepu w ciemności powodowała metabolizowanie największej liczby związków, co świadczy o największej tolerancji *C. unicolor* w warunkach braku oświetlenia wobec analizowanych związków chemicznych. Z kolei największą wrażliwość grzyba na badane związki zaobserwowałam stosując naświetlanie hodowli światłem białym. Jak wiadomo światło widzialne może mieć negatywny wpływ na mikroorganizmy poprzez oddziaływanie na procesy oddychania komórkowego, uszkodzając DNA, błony komórkowe i inne składniki komórkowe [22]. Może więc prawdopodobnie również istotnie wpływać na zdolności *C. unicolor* do zasiedlania nowych nisz ekologicznych. Spośród ośmiu badanych grup związków, do których należały różnego rodzaju aniony, kationy, związki wpływające na funkcjonowanie błon biologicznych, związki chelatujące (chelatory), cykliczne, organiczne i azotowe oraz antybiotyki, *C. unicolor* wykazywał największą wrażliwość na większość substancji z grupy antybiotyków (84%) oraz związków azotowych (71%), które oddziałują negatywnie na maszynię enzymatyczną grzybów i uznawane są za toksyczne. Hodowla w świetle białym uwrażliwiała badany organizm na wszystkie związki azotowe i prawie wszystkie antybiotyki i powodowała całkowite zahamowanie wzrostu grzybni. W takich warunkach jedynie D-cykloseryna nie wykazywała negatywnego wpływu na wzrost *C. unicolor*. Co ciekawe światło niebieskie uwrażliwiała grzyba na działanie wszystkich anionów. *C. unicolor* hodowany w ciemności dobrze tolerował obecność Co^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} ,

Pd^{2+} i Al^{3+} , jednak związki wpływające na funkcje błon biologicznych wyraźnie hamowały wzrost grzyba. Spośród 13 badanych związków z tej grupy aż 10 powodowało całkowite zahamowanie wzrostu grzyba w badanych warunkach hodowlanych. Stwierdziłam, że badany organizm prawie we wszystkich wariantach hodowlanych wykazywał odporność na nystatynę. Z kolei związki cykliczne stanowiły grupę substancji, które hamowały wzrost grzyba. Jednak w ciemności szczep ten był najmniej wrażliwy na ich negatywne oddziaływanie. W toku realizacji badań wykazałam, że działanie związków organicznych na *C. unicolor* było dość zróżnicowane. Jedynie pięć spośród 32 związków (kwas L-asparaginowy, blastycydyna, 6-azauracyl, chloroalanina i kломifen) nie miało negatywnego wpływu na dynamikę wzrostu grzyba we wszystkich wariantach hodowlanych (poza światłem białym). Co więcej, zastosowanie światła białego hamowało wzrost biomasy grzybowej w przypadku wszystkich analizowanych związków organicznych. Przeprowadzone analizy pozwoliły po raz pierwszy stwierdzić, że badany szczep jest najmniej wrażliwy na chelatory. Silne zahamowanie wzrostu zaobserwowano tylko w przypadku pirofosforanu sodu. Jednak *C. unicolor* hodowany w ciemności okazał się niewrażliwy na ten związek. Wysoka tolerancja badanego organizmu na chelatory nie budzi zaskoczenia jeśli weźmiemy pod uwagę kluczową rolę nieenzymatycznych mechanizmów oksydacyjnych zaangażowanych w biodegradację drewna przez grzyby. Te niskocząsteczkowe związki zdolne do chelatowania metali, a syntetyzowane w trakcie wzrostu grzyba, katalizują wstępną oksydację i depolimeryzację roślinnej ściany komórkowej w procesie rozkładu drewna [23, 24]. Dodatkowo kationy miedzi i manganu stanowią istotny składnik miejsc aktywnych lakazy i peroksydazy manganowej, więc duża tolerancja na obecność tych składników przez *C. unicolor* jest naturalną konsekwencją sposobu pozyskiwania substancji odżywczych przez grzyba.

Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane i przedyskutowane w następującej pracy naukowej:

A2. Pawlik A. , Ruminowicz-Stefaniuk M., Frąc M., Mazur A., Wielbo J., Janusz G. (2019) *The wood decay fungus Cerrena unicolor adjusts its metabolism to grow on various types of wood and light conditions. PLOS ONE 14(2), e0211744.*

Wykazanie różnic mikromorfologicznych grzybni i ilości produkowanych zarodników przez *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia i na różnych podłożach hodowlanych z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej i skaningowego mikroskopu elektronowego. Wykazanie zmian profilu ekspresji genów zaangażowanych w morfogenezę i wzrost *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia.


Analizę mikromorfologiczną grzybni *C. unicolor* przeprowadziłam w zaproponowanych już wcześniej wariantach oświetlenia (światło białe, zielone, niebieskie i czerwone oraz ciemność jako warunki kontrolne) przy użyciu techniki mikroskopii konfokalnej (CLSM) oraz skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Charakterystyka morfologiczna tego gatunku grzyba dostępna w literaturze była wykonana tylko dla hodowli prowadzonych w ciemności i jak dotąd nie podejmowano badań mających na celu określenie wpływu światła na ten aspekt biologii *C. unicolor*. Próbki materiału biologicznego pochodziły z trzech wariantów doświadczalnych: a) podłoże mineralne LH z dodatkiem 1,5% agaru, b) hodowla półstała (SSF) na trocinach jesionowych, c) trociny jesionowe zestalone 1,5 % agarem. W celu określenia zmian morfologicznych grzybni wykonałam po raz pierwszy analizy porównawcze obejmujące zarówno rodzaj występujących w badanych preparatach struktur takich jak strzępki czy zarodniki oraz występujące pomiędzy nimi zależności jakościowe i ilościowe. Przeprowadzone badania pozwoliły po raz pierwszy wykazać wyraźny wpływ zastosowanych warunków oświetlenia zarówno na wzrost jak i rozwój grzyba *C. unicolor* namnażanego w zaproponowanych warunkach eksperymentalnych. Grzybnia wzrastająca na podłożach LH zestalonych agarem wykazywała cechy typowego wzrostu promienistego ze strefami koncentrycznymi [25], lekko nieregularnymi w przypadku światła białego. Najsłabsze tempo wzrostu zaobserwowałam w przypadku grzybni wzrastającej w świetle niebieskim, zaś najszybsze w ciemności. Zjawisko bardziej kompaktowego wzrostu grzybni w świetle niż ciemności może być związane z ekspresją genów kodujących białka WCC (fotoreceptory światła niebieskiego), które mogą być wymagane w trakcie wzrostu grzybni [4]. Jak wykazałam w trakcie badań transkrypty białek WCC zidentyfikowano u *C. unicolor*, co może sugerować istnienie podobnych szlaków regulacyjnych również w przypadku badanego organizmu. Analiza mikroskopowa preparatów pozwoliła stwierdzić w badanych próbkach materiału biologicznego obecność struktur morfologicznych typowych dla grzybów poliporoidalnych. Podczas wzrostu w warunkach *in vitro* rozwinęły się typowe aseptowane nierozgałęzione strzępki szkieletowe, które dominowały oraz strzępki rozgałęzione (łącznikowe), które występowały najliczniej w

hodowli namnażanej w ciemności zarówno na podłożu mineralnym, jak i trocinach. Zaobserwowałam również obecność septowanych strzępek zarodnikonośnych. Szerokość obserwowanych struktur zmieniała się w zależności od zastosowanego wariantu oświetlenia i rodzaju podłoża hodowlanego. Przeprowadzone obrazowanie mikroskopowe ujawniło obecność licznych cienkościennych zarodników (artospor) o kształcie subcylicylnym, rzadziej elipsoidalnym, których powstanie jest najczęściej wynikiem segmentacji lub fragmentacji istniejących strzępek w wyniku stresu metabolicznego [26]. Natomiast ilość artospor zależna była od podłoża i zastosowanego światła, co może świadczyć o obecności dodatkowych sygnałów metabolicznych morfogenezy i występowaniu potencjalnych interakcji pomiędzy fotoreceptorami a sygnałami metabolicznymi pochodzącym z podłoża hodowlanego. Rozmiar artospor wahał się pomiędzy $4,41-6,55 \times 2,03-2,65 \mu\text{m}$ z wyjątkiem światła białego, gdzie był wyraźnie mniejszy. Największą ilość zarodników zaobserwowałam w hodowlach prowadzonych w świetle niebieskim i białym na podłożu trocinowym zestalonym agarem, gdzie dominowały długie i cienkie strzępki szkieletowe. Światło, a zwłaszcza światło niebieskie, jest najlepiej opisanym stresowym czynnikiem fotomorfogenezy u grzybów [4, 8]. Obecność opisanych struktur została potwierdzona również techniką SEM. Różnice morfologiczne grzybni pomiędzy różnymi wariantami hodowlanymi były szczególnie widoczne w przypadku szczepu *C. unicolor* hodowanego na podłożu trocinowym w ciemności. W takich warunkach grzyb formował szerokie rozgałęziające się strzępki. Z kolei wzrost grzybni w świetle czerwonym charakteryzował się niezwykle regularnym rozmieszczeniem strzępek, które były długie, cienkie i nierozgałęzione.

Ze względu na stwierdzenie istotnych różnic w mikromorfologii grzybni *C. unicolor* hodowanej w różnych warunkach oświetleniowych po raz pierwszy w odniesieniu do opisywanych warunków wzrostu podjęłam się przeprowadzenia bardziej szczegółowej analizy profilu ekspresji genów zaangażowanych w morfogenezę i wzrost grzyba w oparciu o bazę Gene Ontology (GO). Zaproponowane podejście należy uznać za nowatorskie, gdyż biorąc pod uwagę brak doniesień naukowych dotyczących tego zagadnienia po raz pierwszy podjęto próbę integracji danych morfologicznych i danych transkryptomicznych dotyczących wzrostu grzybów rozkładających drewno w różnych warunkach oświetlenia. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdziłam, że transkrypty zaangażowane we wzrost i rozwój grzyba stanowiły znaczącą część całkowitej liczby genów o zróżnicowanej ekspresji (451 DEGs), do których przypisano terminy GO i różniły się znacząco tj. od 40,31% (w świetle

białym) do 56,35% genów DEGs (w świetle czerwonym) pomiędzy transkryptomami uzyskanymi dla *C. unicolor*. Najliczniejszą funkcjonalną grupę genów stanowiły kategorie: „procesy komórkowe” oraz „organizacja składników komórkowych lub biogeneza”, co sugeruje duże znaczenie tych szlaków w morfogenezie *C. unicolor*. Transkrypty sklasyfikowane w kategorii „organizacja komórki i biogeneza” były najliczniej reprezentowane w transkryptomach tego grzyba niezależnie od warunków oświetleniowych i wahały się w granicach od 5,15% w przypadku światła zielonego do 7,14% dla hodowli w świetle czerwonym. Z kolei spośród wszystkich kategorii funkcjonalnych GO, geny o zróżnicowanej ekspresji związane z „metabolizmem zasad nukleotydowych, nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych” dominowały w transkryptomie *C. unicolor* hodowanym w świetle czerwonym (9,52%). Natomiast transkrypty sklasyfikowane w kategorii „rozmnażanie” i „rozwój” były najliczniej reprezentowanymi genami DEGs zidentyfikowanymi w świetle czerwonym (7,94%) i zielonym (6,19%).

Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane i przedyskutowane w następującej pracy naukowej:

A3. Pawlik A. , *Jaszek M., Stefaniuk D., Świdorska-Burek U., Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., Janusz G. (2020) Combined effect of light and nutrients on the micromorphology of the white rot fungus *Cerrena unicolor*. International Journal of Molecular Sciences 21(5), 1678.*

Ocena poziomu aktywności enzymów degradujących ligninocelulozę i antyoksydacyjnych zaangażowanych w proces ligninolizy oraz określenie ich wzajemnych zależności u *C. unicolor* hodowanego w różnych warunkach oświetleniowych. Wykazanie zmian poziomu ekspresji genów zaangażowanych w proces proteolizy oraz zmian aktywności proteaz i aktywności chymotrypsynopodobnej proteasomu 26S w odpowiedzi tego gatunku grzyba na zastosowane warunki świetlne.

W oparciu o wyniki analizy RNA-Seq stwierdziłam, że poziom transkrypcji genów zaangażowanych w degradację ligninocelulozy u *C. unicolor* zmienia się w zależności od zastosowanych warunków oświetlenia. Wcześniejsze prace zespołu wykazały również wyraźne zmiany aktywności lakazy i proteaz syntetyzowanych przez komórki tego grzyba hodowanego na podłożu mineralnym LH i zawierającym celulozę [27]. Brak było jednak

kompleksowych analiz obejmujących badania aktywności enzymów zaangażowanych w degradację ligninocelulozy u *C. unicolor* hodowanego w różnych warunkach oświetlenia na naturalnym podłożu trocinowym. W związku z tym po raz pierwszy podjęłam badania mające na celu określenie wpływu światła na syntezę enzymów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych bezpośrednio i pośrednio związanych z rozkładem drewna u tego organizmu. Jak poprzednio hodowlę *C. unicolor* przeprowadziłam w pięciu wariantach hodowlanych różniących się warunkami oświetlenia na podłożu półstałym (SSF) zawierającym trociny jesionu. W doświadczeniach uwzględniono enzymy, których transkrypty zostały wykryte w wyniku przeprowadzonej analizy RNA-Seq [28]. Bez względu na zastosowany wariant hodowlany zaobserwowałam bardzo niskie lub całkowity brak aktywności następujących enzymów: AAD (dehydrogenaza aryl-alkoholowa), CDH (dehydrogenaza celobiozowa), LiP (peroksydaza ligninowa), β -glukuronidaza, β -ksylozydaza i β -mannanaza. Uzyskane wyniki pozwoliły również stwierdzić, że światło wywierało bardzo istotny wpływ na aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów LME (peroksydazy manganozależnej; MnP), enzymów celulo- i ksylanolitycznych (endo-1,4- β -glukanaza, endo-1,4- β -ksylanaza, ogólna aktywność celulolityczna) oraz wewnątrzkomórkowych enzymów antyoksydacyjnych (dysmutaza ponadtlenkowa; SOD i katalaza). Wykazałam, że synteza MnP była ewidentnie stymulowana białym światłem, a najwyższe aktywności tego enzymu (598 nkat/l – światło białe) zaobserwowałam 8-go dnia hodowli. Dosyć wysokie aktywności odnotowałam również w hodowlach prowadzonych w świetle czerwonym (510 nkat/l) i ciemności (444 nkat/l), co potwierdza wcześniej otrzymane wyniki analiz RNA-Seq. Stymulację aktywności światłem białym zaobserwowałam także w przypadku katalazy. Maksymalną aktywność enzymu (24 U/ml) zarejestrowałam 8-go dnia hodowli. Widoczny wzrost aktywności enzymatycznej zaobserwowałam także w przypadku zastosowania światła niebieskiego i ciemności. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowane warunki hodowlane miały niewielki wpływ na syntezę β -glukozydazy i lakazy, co sugeruje, że aktywność enzymatyczna jest zależna nie tylko od zastosowanego w trakcie hodowli oświetlenia, ale jest wypadkową działania wielu różnych czynników. Lakaza osiągnęła maksymalną aktywność na poziomie około 9-10 tysięcy nkat/l pomiędzy 6-tym a 9-tym dniem hodowli niezależnie od zastosowanego oświetlenia. Natomiast w przypadku β -glukozydazy zaobserwowałam tylko nieznaczne zmiany aktywności spowodowane różnymi warunkami oświetleniowymi w trakcie hodowli grzyba. Przeprowadzone badania pozwoliły mi wykazać duże zróżnicowanie profili enzymatycznych w przypadku pomiarów całkowitej aktywności celulolitycznej. Warto podkreślić, że światło niebieskie stymulowało systematyczny wzrost aktywności celulaz w

zakresie od 5 U/ml 5-go dnia, do niemal 31 U/ml 14-go dnia hodowli. W przypadku innych wariantów świetlnych aktywności celulolityczne były dość zmienne. To widoczne zróżnicowanie wskazuje na możliwość synergistycznego działania kompleksu enzymów zaangażowanych w rozkład celulozy i wykazuje ogólną zdolność do hydrolizy celulozy przez *C. unicolor*. Opierając się na uzyskanych wynikach przeprowadziłam bardziej szczegółowe analizy aktywności poszczególnych celulaz biorących udział w degradacji tego biopolimeru. Zaobserwowałam wyraźną stymulację aktywności endo-1,4- β -glukanazy w ciemności. Dla porównania aktywności tego enzymu, które uzyskałam dla innych wariantów hodowlanych były średnio 25-30% niższe. Przeprowadzone badania wykazały, że światło miało największy wpływ na produkcję enzymów ksylanolitycznych. Wyraźny wzrost aktywności endo-1,4- β -ksylanazy (90 mU/ml) odnotowałam w hodowli *C. unicolor* w ciemności, co może sugerować, że światło może hamować syntezę tej grupy enzymów. Obserwowałam stopniowy wzrost aktywności enzymów celulo- i ksylanolitycznych w trakcie hodowli, co może być wynikiem zastosowania naturalnego podłoża trocinowego i ograniczenia biodostępności polimerów celulozowych i hemicelulozowych, których trawienie jest trudniejsze.

Synteza enzymów antyoksydacyjnych pośrednio zaangażowanych w proces ligninolizy również okazała się wykazywać pewną zmiennością zależną od warunków hodowlanych. Aktywność SOD w badanym przedziale czasowym wahała się od 61 do 81%. Najwyższe aktywności odnotowałam w grzybni *C. unicolor* hodowanej w świetle czerwonym (73-81%), a najniższe uzyskałam w przypadku zastosowania światła niebieskiego (61-76%). Z kolei aktywność katalazy pozostawała na wysokim poziomie pomiędzy 5-tym a 9-tym dniem hodowli, zwłaszcza w przypadku światła białego, niebieskiego i ciemności, oraz wykazywała duże różnice pomiędzy zastosowanymi wariantami.

Znaczenie regulacji aktywności proteaz przez światło u *C. unicolor* nie było jak dotąd badane i nie podejmowano kompleksowych badań dotyczących wpływu światła na syntezę tych enzymów. Uzyskane w toku badań wyniki sekwencjonowania mRNA-Seq szczepu *C. unicolor* hodowanego na podłożu trocinowym w różnych warunkach oświetlenia pozwoliły mi na przeprowadzenie dodatkowej analizy poziomu ekspresji genów kodujących proteazy. Największą liczbę genów o zróżnicowanej ekspresji zaangażowanych w procesy proteolityczne zaobserwowałam w czasie hodowli grzyba w świetle białym. Natomiast najmniejszą liczbę genów DEGs (4) odnotowałam gdy badany organizm był hodowany w świetle zielonym. Ponadto w trakcie hodowli *C. unicolor* w badanych warunkach oświetleniowych od 1 do aż 25 transkryptów kodujących hipotetyczne białka o aktywności

proteolitycznej i proteasomalnej wykazywało specyficzną ekspresję i były to tzw. transkrypty unikalne. Zwiększoną ekspresję genów DEGs obserwowałam u *C. unicolor* w świetle czerwonym, natomiast geny o zmniejszonej ekspresji względem kontroli (ciemność) przeważały w hodowlach w świetle niebieskim. Wśród genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję znalazły się transkrypty genów kodujących białka należące do różnych rodzin enzymów proteolitycznych (proteazy aspartyłowe, serynowe, cysteinowe i metaloproteazy). Wykazałam, że światło białe hamowało w dominującym stopniu ekspresję genów kodujących proteazy serynowe, cysteinowe i metaloproteazy. Z drugiej strony hodowla *C. unicolor* w świetle czerwonym powodowała wzrost ekspresji genów kodujących niektóre metaloproteazy i wszystkie proteazy serynowe. Co ciekawe, po raz pierwszy zaobserwowałam, że wszystkie geny kodujące proteazy typu aspartyłowego wykazywały obniżoną ekspresję w zastosowanych wariantach hodowlanych za wyjątkiem światła czerwonego, w których to warunkach w ogóle nie wykryto obecności omawianych transkryptów. Z kolei na ekspresję genów kodujących proteazy cysteinowe miało wpływ tylko światło białe i niebieskie. Przeprowadzone analizy transkryptomu *C. unicolor* sugerują również zmiany poziomu ekspresji genów związanych z syntezą ubikwityny, która jest bezpośrednio zaangażowana w ATP-zależną degradację białek wewnątrzkomórkowych z udziałem proteasomu 26S. W toku badań stwierdziłam, że hipotetyczne geny związane z aktywnościami proteasomalnymi wykazywały podwyższoną ekspresję w świetle czerwonym, a obniżoną w świetle białym. Jak udowodniono wcześniej system ten odgrywa niezwykle ważną rolę w odpowiedzi grzybów białej zgnilizny drewna na warunki stresowe i regulację aktywności enzymów ligninolitycznych w warunkach stresu [10, 29].

W kolejnym etapie badań przeprowadziłam analizę porównawczą wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych aktywności proteolitycznych oraz aktywności proteasomu 26S *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia hodowli. Wartości ogólnej zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej w pH kwaśnym wobec hemoglobiny jako substratu reakcji okazały się być wyższe w odniesieniu do proteaz wewnątrzkomórkowych (homogenat grzybni). Najwyższe aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz stwierdziłam w kulturach grzybowych hodowanych w ciemności. Z kolei w przypadku homogenatów komórkowych najwyższe aktywności (0,63 U/min/mg) zaobserwowałam w hodowlach *C. unicolor* w świetle czerwonym. Aktywność alkalicznych proteaz wewnątrzkomórkowych utrzymywała się w miarę na stałym poziomie w trakcie całego okresu hodowli *C. unicolor* w świetle białym, co może mieć związek z rolą opiekuńczą (tzw. *housekeeping enzymes*) proteaz zasadowych


(serynowych). Najwyższe aktywności proteaz wewnątrzkomórkowych w środowisku kwaśnym stwierdziłam w homogenatach pozyskanych z hodowli *C. unicolor* w świetle białym (0,13 U/min/mg). Oznaczenia aktywności proteolitycznych w pH kwaśnym i zasadowym wobec substratu BODIPY-BSA (modyfikowana albumina wołowa) wykazały wyraźne różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami. Przeprowadzone badania pozwoliły wykryć najwyższe aktywności proteolityczne 5-go dnia hodowli w świetle czerwonym, zarówno w przypadku enzymów zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowych. Warto podkreślić, że światło czerwone i niebieskie stymulowało wyraźnie produkcję proteaz zewnątrzkomórkowych niemal w całym okresie hodowli *C. unicolor*. Efekt stymulacji aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz alkalicznych uzyskałam również w wyniku zastosowania światła zielonego. Wartości te wahały się od 17,69 do 39,11 RFU/min/mg. Podobnie jak w przypadku preparatów zewnątrzkomórkowych, próbki pozyskane z grzybni wykazywały najwyższe aktywności proteolityczne (37,99 RFU/min/mg) 5-go dnia hodowli w świetle czerwonym. Trend ten sugeruje istnienie zależności między fotoreceptorami światła czerwonego a stymulacją aktywności proteaz kwaśnych, co widoczne jest zwłaszcza na wstępnym etapie hodowli grzyba. Z kolei efekt inhibicyjny wykazywało światło białe i w porównaniu z innymi warunkami hodowlanymi uzyskane aktywności były najniższe. Wykorzystanie koniugowanej elastyny BODIPY-elastin jako substratu reakcji pozwoliło mi wykazać po raz pierwszy dla zastosowanych warunków obecność w badanych preparatach biologicznych aktywności elastynolitycznych, które odgrywają u grzybów rolę czynnika wirulencji. W przypadku pH kwaśnego zaobserwowałam indukcję zewnątrzkomórkowych aktywności proteolitycznych dla grzybni namnażanej w świetle niebieskim i zielonym. Bardzo podobny efekt stymulacji stwierdziłam również w homogenatach grzybni. Wykazałam, że aktywności elastynolityczne zależą od warunków oświetleniowych i stwierdziłam silną stymulację aktywności wewnątrzkomórkowych przez światło białe, czerwone, zielone i niebieskie. Jednak zdecydowanie najwyższe aktywności uzyskałam w przypadku hodowli *C. unicolor* w świetle czerwonym (58,74 RFU/min/mg) i niebieskim (57,69 RFU/min/mg). Zewnątrzkomórkowe aktywności proteaz kazeinolitycznych (zaangażowanych w obrót białkowy i utrzymanie homeostazy w komórce) były dość zróżnicowane i zmienne, jednak wciąż zależne od warunków oświetlenia w trakcie trwania eksperymentu. Najwyższe aktywności obserwowałam w przypadku płynów pohodowlanych pozyskanych z hodowli *C. unicolor* w ciemności (156,62 RFU/min/mg), w świetle białym (165,83 RFU/min/mg) i zielonym (153,64 RFU/min/mg) 5-go dnia. Zastosowanie światła

czerwonego i niebieskiego w trakcie hodowli *C. unicolor* hamowało aktywności proteaz kazeinolitycznych obecnych w badanych ekstraktach w porównaniu z ciemnością.


Analiza zymograficzna wszystkich wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych ekstraktów przeprowadzona w pH kwaśnym wykazała obecność prążków aktywności wskazujących na obecność proteaz. Zwiększone tempo trawienia substratów naturalnych uzyskałam dla ekstraktów zewnątrzkomórkowych pochodzących z hodowli *C. unicolor* w świetle czerwonym, zielonym i niebieskim. W tych warunkach pojawił się dodatkowy charakterystyczny prążek białkowy wykazujący aktywność proteolityczną. Może mieć to związek ze zwiększonym tempem aktywacji cząsteczki proenzymu (prekursor migruje wolniej w polu elektrycznym) do katalitycznie aktywnej hydrolazy, której pojawienie się widoczne jest jako dodatkowy prążek białkowy. W obrazie elektroforetycznym ekstraktów wewnątrzkomórkowych obecność dodatkowego prążka białkowego o aktywności proteolitycznej zaobserwowałam tylko w próbkach pozyskanych z hodowli *C. unicolor* w świetle czerwonym i niebieskim. Nie stwierdziłam obecności szybko migrującego prążka w preparatach pochodzących z hodowli tego grzyba w świetle zielonym. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić obecność najintensywniejszych prążków aktywności wewnątrzkomórkowych proteaz w homogenatach grzybni pochodzących z hodowli w świetle czerwonym.

Po raz pierwszy w zastosowanych wariantach doświadczalnych stwierdziłam istotne różnice w przypadku chymotrypsynopodobnej (CHT-L) aktywności proteasomu 26S mierzonej w zagęszczonych wewnątrzkomórkowych frakcjach wysokocząsteczkowych. Najwyższe aktywności specyficzne (48 nM/mg), a więc i najwyższe tempo degradacji fluorogennego substratu zaobserwowałam 5-dnia hodowli w świetle białym, co może wskazywać na zaangażowanie proteolizy ATP-zależnej w adaptację *C. unicolor* do warunków stresowych, w tym wypadku światła. W tym czasie najniższe aktywności CHT-L stwierdziłam dla grzybni hodowanej w ciemności - 24 nM/mg.

Wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane i przedyskutowane w następujących pracach naukowych:

A4. Pawlik A. , Jaszek M., Sulej J., Janusz G. (2019) *Light-regulated synthesis of extra- and intracellular enzymes related to wood degradation by the white rot fungus Cerrena unicolor*

during solid-state fermentation on ash sawdust-based medium. *Acta Biochimica Polonica* 66(4), 419-425.

A5. Pawlik A. , Jaszek M., Swatek A., Ruminowicz-Stefaniuk M., Ciołek B., Mazur A., Janusz G. (2020) Lighting conditions influence the dynamics of protease synthesis and proteasomal activity in the white rot fungus *Cerrena unicolor*. *Biomolecules* 10(9), 1322.

Wyniki badań stanowiące powyższe osiągnięcie naukowe zostały uzyskane w trakcie realizacji projektu badawczego NCN Opus 8 pt.: „Wpływ światła na metabolizm *Cerrena unicolor*” 2014/15/B/NZ9/01990, którego byłam wykonawcą.

4.1.4. Podsumowanie najważniejszych wyników badań opublikowanych w artykułach stanowiących osiągnięcie naukowe

Najważniejsze osiągnięcia naukowe przedstawione w monotematycznym cyklu 5 oryginalnych prac eksperymentalnych:

1. Zsekwencjonowanie (analiza typu RNA-Seq) transkryptomu grzyba *C. unicolor* hodowanego w pięciu wariantach oświetlenia: w ciemności (kontrola) oraz w świetle białym, czerwonym, niebieskim i zielonym. Po raz pierwszy u grzybów degradujących drewno dokonano identyfikacji transkryptów kodujących hipotetyczne fotoreceptory grzybowe, co sugeruje, że *C. unicolor* jest w stanie odbierać bodźce świetlne i reagować na nie w zróżnicowany sposób poprzez zmiany ogólnego metabolizmu. Określono różnice jakościowe i ilościowe w ekspresji poszczególnych genów w zależności od warunków oświetlenia.
2. Zidentyfikowano geny kodujące enzymy rozkładające drewno i wykazano po raz pierwszy ich zróżnicowaną ekspresję w zależności od barwy światła oraz zidentyfikowano szlaki sygnałowe zależne od światła, które mogą regulować inne procesy komórkowe i stanowić centrum integrujące transdukcję różnych sygnałów środowiskowych.
3. Określono profile metaboliczne (fenotypowe) *C. unicolor* i wykazano zdolność tego organizmu do metabolizowania różnych źródeł węgla w zależności od warunków naświetlenia hodowli. Ponadto po raz pierwszy określono wrażliwość chemiczną tego organizmu względem różnych grup związków chemicznych w zależności od zastosowanej w trakcie hodowli barwy światła, co dostarczyło informacji o

globalnych fenotypach *C. unicolor* i specyficznym wykorzystaniu różnych składników pokarmowych przez ten organizm. Wykazano korelację pomiędzy metabolicznymi preferencjami *C. unicolor* do rozkładu określonych substratów, zastosowanym podłożem hodowlanym, a warunkami oświetlenia grzybni. Najwyższą aktywność metaboliczną grzyba i największą tolerancję na związki chemiczne stwierdzono w ciemności.

4. Po raz pierwszy wykazano różnice mikromorfologiczne grzybni (tempo wzrostu, typ strzępek, długość i szerokość strzępek) i ilości produkowanych zarodników przez *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia i na różnych podłożach hodowlanych, które zostały częściowo potwierdzone w zróżnicowanej ekspresji genów na poziomie transkryptomu. Wykazano również potencjalną zależność pomiędzy rodzajem zastosowanego podłoża hodowlanego i warunkami oświetlenia a cechami morfologicznymi grzyba. Uzyskane wyniki sugerują istnienie złożonych interakcji pomiędzy czynnikami pokarmowymi i środowiskowymi, a ich wpływem na wzrost i cechy morfologiczne *C. unicolor*.
5. Po raz pierwszy stwierdzono, że światło wpływa bezpośrednio nie tylko na syntezę enzymów degradujących drewno, ale również działa pośrednio poprzez regulację syntezy enzymów antyoksydacyjnych rozkładających toksyczne produkty uboczne rozkładu ligniny. Wykazano, stymulację syntezy MnP i katalazy przez światło białe, a ksylanazy w ciemności. Udowodniono, że światło ma również znaczący wpływ na syntezę endo-1,4- β -glukanazy. Stwierdzono, że zdolności *C. unicolor* do degradacji materiału roślinnego są prawdopodobnie w znacznym stopniu zależne od warunków oświetlenia.
6. Wykazano wyraźny wpływ różnych warunków oświetlenia na równowagę redoks w komórkach grzybowych poprzez stymulację aktywności antyoksydantów enzymatycznych: dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy.
7. Określono aktywności oraz wykonano analizy zymograficzne aktywności proteaz *C. unicolor* syntetyzowanych w różnych warunkach oświetlenia hodowli. Wykazano znaczne zróżnicowanie profili enzymatycznych proteaz wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, wyraźnie zależne od zastosowanego światła i substratu. Wykazano zależne od światła zmiany aktywności proteaz wobec substratów naturalnych i syntetycznych, co sugeruje, że warunki oświetlenia mogą z dużym

prawdopodobieństwem bezpośrednio wpływać na poziom proteolizy w komórkach *C. unicolor*. Stwierdzono, że aktywności proteolityczne związane z proteasomem 26S wzrastają w początkowej fazie wzrostu *C. unicolor*, co wskazuje na kluczową rolę ATP-zależnej proteolizy w początkowym etapie adaptacji grzyba do warunków stresowych, w tym wypadku zmiennych długości fali świetlnej.

8. Wykazano, że geny kodujące białka o aktywności proteolitycznej i proteasomalnej są transkrybowane specyficznym i w zróżnicowanym stopniu w trakcie hodowli *C. unicolor* w różnych warunkach oświetlenia, co sugeruje, że grzyb reaguje na światło poprzez syntezę transkryptów kodujących proteazy z różnych rodzin katalitycznych.
9. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie wielopoziomowej regulacji metabolizmu *C. unicolor*, włączając w to zagadnienia syntezy enzymów zaangażowanych w rozkład drewna, co może mieć bezpośredni wpływ na zdolności tego organizmu do kolonizacji nowych siedlisk i tym samym przetrwania w środowisku. Udowodniono również, że analizując wpływ światła na metabolizm grzybów należy uwzględniać wiele różnych zmiennych, takich jak skład podłoża i obecność ksenobiotyków w środowisku wzrostu badanego organizmu.

4.1.5. Literatura

1. Tisch, D. & Schmoll, M. (2010) Light regulation of metabolic pathways in fungi, *Applied microbiology and biotechnology*. **85**, 1259-77.
2. Fuller, K. K., Dunlap, J. C. & Loros, J. J. (2016) Chapter One - Fungal Light Sensing at the Bench and Beyond in *Advances in Genetics* (Friedmann, T., Dunlap, J. C. & Goodwin, S. F., eds) pp. 1-51, Academic Press.
3. Corrochano, L. M. (2007) Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour, *Photochemical & Photobiological Sciences*. **6**, 725-736.
4. Corrochano, L. M. & Galland, P. (2016) 11 Photomorphogenesis and Gravitropism in Fungi in *Growth, Differentiation and Sexuality* (Wendland, J., ed) pp. 235-266, Springer International Publishing, Cham.
5. Yu, Z. & Fischer, R. (2019) Light sensing and responses in fungi, *Nature reviews Microbiology*. **17**, 25-36.
6. Schmoll, M. (2011) Assessing the relevance of light for fungi: Implications and insights into the network of signal transmission, *Advances in applied microbiology*. **76**, 27-78.
7. Carlile, M. J. (1965) The Photobiology of Fungi, *Annual Review of Plant Physiology*. **16**, 175-202.
8. Friedl, M. A., Schmoll, M., Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S. (2008) Photostimulation of *Hypocrea atroviridis* growth occurs due to a cross-talk of carbon metabolism, blue light receptors and response to oxidative stress, *Microbiology (Reading)*. **154**, 1229-1241.
9. Jaszek, M., Zuchowski, J., Dajczak, E., Cimek, K., Graz, M. & Grzywnowicz, K. (2006) Ligninolytic enzymes can participate in a multiple response system to oxidative stress in white-rot basidiomycetes: *Fomes fomentarius* and *Tyromyces pubescens*, *Int Biodeter Biodegr*. **58**, 168-175.
10. Staszczak, M. (2008) The role of the ubiquitin-proteasome system in the response of the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* to nitrogen deprivation, *Fungal Genetics and Biology*. **45**, 328-337.

11. Osiewacz, H. D. (2002) Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*, *Mechanisms of ageing and development*. **123**, 755-64.
12. Blanchette, R. A., Nilsson, T., Daniel, G. & Abad, A. (1990) Biological Degradation of Wood, *Adv Chem Ser.* **225**, 141-174.
13. Mester, T., Varela, E. & Tien, M. (2004) Wood Degradation by Brown-Rot and White-Rot Fungi in *Genetics and Biotechnology* (Kück, U., ed) pp. 355-368, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
14. Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkołazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. & Rogalski, J. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin, *Journal of basic microbiology*. **41**, 185-227.
15. Roody, W. C. (2003) *Mushrooms of West Virginia and the Central Appalachians*, University Press of Kentucky, Lexington.
16. Enebak, S. A. & Blanchette, R. A. (1989) Canker Formation and Decay in Sugar Maple and Paper Birch Infected by *Cerrena unicolor*, *Can J Forest Res.* **19**, 225-231.
17. Hibi, M., Hatahira, S., Nakatani, M., Yokozeki, K., Shimizu, S. & Ogawa, J. (2012) Extracellular oxidases of *Cerrena* sp. complementarily functioning in artificial dye decolorization including laccase, manganese peroxidase, and novel versatile peroxidases, *Biocatal Agric Biote.* **1**, 220-225.
18. Sulej, J., Janusz, G., Osinska-Jaroszuk, M., Rachubik, P., Mazur, A., Komaniecka, I., Choma, A. & Rogalski, J. (2015) Characterization of Cellobiose Dehydrogenase from a Biotechnologically Important *Cerrena unicolor* Strain, *Appl Biochem Biotech.* **176**, 1638-1658.
19. Belova, O. V., Lisov, A. V., Vinokurova, N. G., Kostenevich, A. A., Sapunova, L. I., Lobanok, A. G. & Leontievsky, A. A. (2014) Xylanase and cellulase of fungus *Cerrena unicolor* VKM F-3196: Production, properties, and applications for the saccharification of plant material, *Appl Biochem Micro+*. **50**, 148-153.
20. Mizerska-Dudka, M., Jaszek, M., Blachowicz, A., Rejczak, T. P., Matuszewska, A., Osinska-Jaroszuk, M., Stefaniuk, D., Janusz, G., Sulej, J. & Kandefer-Szerszen, M. (2015) Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds, *Int J Biol Macromol.* **79**, 459-468.
21. Lindeberg, G. & Holm, G. (1952) Occurrence of Tyrosinase and Laccase in Fruit Bodies and Mycelia of some Hymenomycetes, *Physiologia Plantarum.* **5**, 100-114.
22. Robertson, J. B., Davis, C. R. & Johnson, C. H. (2013) Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **110**, 21130-21135.
23. 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 Microbiology Reviews.* **41**, 941-962.
24. Arantes, V. & Milagres, A. M. F. (2006) Degradation of cellulosic and hemicellulosic substrates using a chelator-mediated Fenton reaction, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* **81**, 413-419.
25. Westhuizen, G. C. A. v. d. (1963) The cultural characters, structure of the fruit body, and type of interfertility of *Cerrena unicolor* (Bull. ex Fr.) Murr, *Canadian Journal of Botany.* **41**, 1487-1499.
26. Barrera, C. R. (1985) Formation and Germination of Fungal Arthroconidia, *CRC Critical Reviews in Microbiology.* **12**, 271-292.
27. Janusz, G., Sulej, J., Jaszek, M. & Osinska-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 Biochimica Polonica.* **63**, 223-228.
28. Pawlik, A., Mazur, A., Wielbo, J., Koper, P., Żebracki, K., Kubik-Komar, A. & Janusz, G. (2019) RNA Sequencing Reveals Differential Gene Expression of *Cerrena Unicolor* in Response to Variable Lighting Conditions, *International Journal of Molecular Sciences.* **20**, 290.
29. Swatek, A. & Staszczak, M. (2020) Effect of Ferulic Acid, a Phenolic Inducer of Fungal Laccase, on 26S Proteasome Activities In Vitro, *International Journal of Molecular Sciences.* **21**, 2463.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Pracę naukowo-badawczą rozpoczęłam w 2005 roku w zespole kierowanym przez Prof. dr hab. Jerzego Rogalskiego jako absolwentka studiów biologicznych w zakresie biochemii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii), Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Przeprowadzone przeze mnie w trakcie pracy magisterskiej badania dotyczyły zastosowania technik biologii molekularnej do określania podobieństwa genetycznego szczepów *Trichoderma reesei*. Badania te realizowane były we współpracy z Prof. Shoji Ohga z Uniwersytetu w Kyushu w Japonii (Laboratory of Forest Resources Management, Division of Forest Environmental Sciences, Department of Agro - environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japonia). Uzyskane wyniki zostały opisane w pracy:

A6. Pawlik A., Deptuła T., Targoński T., Rogalski J., Ohga S. (2012) AFLP fingerprinting of *Trichoderma*¹ *reesei* strains. *Journal of The Faculty of The Agriculture Kyushu University* 57(1), 1-6.

¹ jest „*Tricoderma*” , powinno być „*Trichoderma*”

W 2005 roku w czasie stażu naukowego na Uniwersytecie w Idaho (USA) nawiązałam współpracę naukową z Prof. Andrzejem Paszczyńskim (School of Food Science, University of Idaho and Washington State University, USA). Realizowane w ramach tej współpracy inicjatywy naukowe koncentrowały się na mikroorganizmach (głównie grzybach białej zgnilizny drewna) zdolnych do biologicznego rozkładu ligniny. Badania skupiały się również na regulacji ekspresji genów kodujących lakazę, peroksydazę managanozależną i ligninową, a także na mechanizmach i ewolucji genów kodujących inne białka zaangażowane w degradację ligniny w przyrodzie. W wyniku tej współpracy powstały prace przeglądowe związane z tą tematyką. Wykazałam, że organizmy grzybowe angażują różne strategie degradacji ligniny skorelowane z liczbą genów kodujących białka wydzielnicze. Szczegółowo zbadałam ekspresję genów kodujących izoenzymy lakazy *C. unicolor*. Część badań realizowana była w ramach projektu NCN pt. „Znaczenie lakazy *Cerrena unicolor* w jej adaptacji do rozkładu kilku gatunków drewna i zmiennych warunków środowiska” 2013/09/B/NZ9/01829, których rezultaty zostały szczegółowo omówione w punkcie 7.

niniejszego Autoreferatu. Wynikiem współpracy jest 5 prac naukowych, które zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

A7. Pawlik A., Ciołek B., Sulej J., Mazur A., Grela P., Staszczak M., Niścior M., Jaszek M., Matuszewska A., Janusz G., Paszczyński A. (2021) *Cerrena unicolor* laccases, genes expression and regulation of activity. *Biomolecules* 11(3), 468.

A8. Janusz G., **Pawlik A.**, Świdarska-Burek U., Polak J., Sulej J., Jarosz-Wilkolazka A., Paszczyński A. (2020) Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences* 21(3), 966.

A9. Janusz G., Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., **Pawlik A.**, Ciołek B., Paszczyński A., Kubik-Komar A. (2018) Comparative transcriptomic analysis of *Cerrena unicolor* revealed differential expression of genes engaged in degradation of various kinds of wood. *Microbiological Research* 207, 256-268.

A10. Janusz G., **Pawlik A.**, Sulej J., Swiderska-Burek U., Jarosz-Wilkolazka A., Paszczyński A. (2017) Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Review* 41(6), 941-962.

A11. 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 and Microbial Technology* 52(1), 1-12.

W 2011 roku podjęłam ścisłą współpracę naukową z Prof. dr hab. Magdaleną Frąc z Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. W ramach wspólnych inicjatyw badawczych podjęłam badania, których celem była m.in. charakterystyka biochemiczna grzybów występujących w odpadach organicznych oraz ocena możliwości ich zastosowania w procesach biodegradacji. Powyższe badania były realizowane w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Iuventus Plus, Nr IP2010 009370 „Charakterystyka zbiorowisk grzybów występujących w wybranych odpadach organicznych oraz ocena ich przydatności w degradacji odpadów”, którego byłam wykonawcą. Z kolei w ramach projektu Lider nr 048/L-2/10 finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju „Opracowanie innowacyjnego biopreparatu do optymalizacji procesu fermentacji metanowej odpadów organicznych” wyizolowano nowy środowiskowy szczep *Trichoderma atroviride* G79/11. W trakcie badań udowodniłam, że grzyb ten jest bardzo wydajnym producentem zewnątrzkomórkowych celulaz, których synteza została zoptymalizowana. Na bazie zewnątrzkomórkowej celulazy *T. atroviride* opracowano biopreparat zastosowany w procesie

fermentacji metanowej. Badania te realizowane były również we współpracy z dr. hab. inż. Krzysztofem Ziemińskim z Politechniki Łódzkiej. Uzyskane wyniki wykazały wysoki potencjał aplikacyjny i stały się podstawą zgłoszenia patentowego, które zakończyło się w 2017 roku **uzyskaniem patentu krajowego P.409138** pt. „Nowy szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11, sposób otrzymywania biopreparatu do fermentacji metanowej odpadów organicznych z wykorzystaniem tego szczepu oraz sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu”, którego jestem współtwórcą. Moja współpraca z Instytutem była kontynuowana poprzez zaangażowanie w realizację kolejnego projektu NCN Sonata ID 2012/07/D/NZ9/03357 „Występowanie, detekcja oraz charakterystyka molekularna i metaboliczna toksynotwórczych grzybów termoopornych (*Neosartorya fisheri* i *Byssochlamys fulva*)” w latach 2013-2016. Mój wkład w realizację tych badań polegał na opracowaniu metod określania przynależności taksonomicznej badanych szczepów metodami molekularnymi oraz zastosowania metody AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) do typowania genetycznego *N. fisheri* i *B. fulva*. Wyniki badań przeprowadzonych przeze mnie w ramach współpracy z IA PAN zostały opublikowane w 2 pracach w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

A12. Oszust K., **Pawlik A.**, Siczek A., Janusz G., Gryta A., Bilińska-Wielgus N., Frąc M. (2017) Efficient cellulases production by *Trichoderma atroviride* G79/11 in submerged culture based on soy flour-cellulose-lactose. *BioResources* 12(4), 8468-8489.

A13. Oszust K., **Pawlik A.**, Janusz G., Ziemiński K., Cyran M., Siczek A., Gryta A., Bilińska-Wielgus N., Frąc M. (2017) Characterization and influence of a multi-enzymatic biopreparation for biogas yield enhancement. *BioResources* 12(3), 6187-6206.

oraz zaprezentowane w **5 krajowych i 4 międzynarodowych doniesieniach konferencyjnych**. Wynikiem realizacji wspólnych przedsięwzięć naukowych jest również **18 zgłoszeń sekwencji nukleotydowych do bazy danych GenBank** (NCBI). Współpraca naukowa z Instytutem była kontynuowana poprzez **realizację 2 projektów badawczych NCN** pt.: „Wpływ światła na metabolizm *Cerrena unicolor*” 2014/15/B/NZ9/01990 oraz „Znaczenie lakazy *Cerrena unicolor* w jej adaptacji do rozkładu kilku gatunków drewna i zmiennych warunków środowiska” 2013/09/B/NZ9/01829, których rezultaty zostały szczegółowo omówione w punkcie 4. i 7. niniejszego Autoreferatu.

W ramach dalszej współpracy z Instytutem Agrofizyki PAN w Lublinie oraz Uniwersytetem Przyrodniczym w Poznaniu (Prof. dr. hab. Marek Siwulski) brałam udział w

charakterystyce filogenetycznej i fenotypowej grzybów z rodzaju *Coprinus* i *Flammulina*. Organizmy stanowiące przedmiot badań zostały sklasyfikowane do gatunku poprzez sekwencjonowanie wewnętrznych regionów ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Stosując analizę typu AFLP określiłam zróżnicowanie filogenetyczne tych gatunków grzybów. Dodatkowo przeprowadziłam analizy fenotypowe, które polegały na określeniu zdolności badanych organizmów do metabolizowania różnych źródeł węgla z użyciem systemu Biolog FF. Ponadto wykazano zależne od induktora i czasu indukcji zróżnicowanie syntezy lakazy przez szczepy *Flammulina velutipes*. Uzyskane wyniki opisano w poniższych pracach:

A14. Pawlik A., Malinowska A., Siwulski M., Frąc M., Rogalski J., Janusz G. (2015) Determination of biodiversity of *Coprinus comatus* using genotyping and metabolic profiling tools. *Acta Biochimica Polonica* 62(4), 683-689.

A15. 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 Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(1), 121-133.

oraz **2 międzynarodowych i 1 krajowym doniesieniu konferencyjnym.**

W latach 2012-2016 byłam zaangażowana w realizację międzynarodowego projektu finansowanego w ramach Polsko-Szwajcarskiego Programu Badawczego PSPB – 079/2010 pt. „Tailored Lipidic Mesophases as Novel Functional Nanomaterials in Bioenergetics and Biosensing”. Partnerami w projekcie były następujące ośrodki naukowo-badawcze:

- Instytut Chemii Organicznej Uniwersytetu w Zurychu,
- Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego,
- Zakład Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej (obecnie Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych UMCS).

W ramach tej współpracy realizowałam badania polegające na charakterystyce molekularnej i metabolicznej szczepów *Ganoderma lucidum* i *Aspergillus* sp. zdolnych do syntezy oksydoreduktaz (lakaza i dehydrogenaza glukozy, GDH), które ze względu na swoją elektrochemiczną aktywność znajdują zastosowanie w konstrukcji biosensorów i bioogniw paliwowych. Organizmy stanowiące przedmiot badań zostały sklasyfikowane do gatunku poprzez sekwencjonowanie regionów ITS. Określiłam również zróżnicowanie filogenetyczne (AFLP) i fenotypowe (Biolog FF) tych gatunków grzybów. Dla szczepów *G. lucidum* przeprowadzono również analizy wzrostu i produkcji biomasy na różnych podłożach

hodowlanych. Powyższe badania zostały opublikowane w 2 pracach w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

A16. Pawlik A., Janusz G., Dębska I., Siwulski M., Frąc M., Rogalski J. (2015) Genetic and metabolic intraspecific biodiversity of *Ganoderma lucidum*. *BioMed Research International* 2015, 726149.

A17. Rola B., Pawlik A., Frąc M., Małek W., Targoński Z., Rogalski J., Janusz G. (2015) The phenotypic and genomic diversity of *Aspergillus* strains producing glucose dehydrogenase. *Acta Biochimica Polonica* 62(4), 747-755.

oraz **3 międzynarodowych i 1 krajowym doniesieniu konferencyjnym**. Dodatkowo moje zaangażowanie w realizację projektu PSPB polegało na pełnieniu roli asystenta koordynatora projektu ze strony UMCS – Prof. dr. hab. Jerzego Rogalskiego, w latach 2012-2016.

Poza współpracą naukową związaną z wykonywaniem zadań badawczych w ramach omówionych powyżej projektów, zaangażowana byłam w powstanie poniższej publikacji, która jest efektem współpracy naukowej z Prof. Margaret E. Daub z Uniwersytetu Stanowego Karoliny Północnej w USA (Department of Plant and Microbial Biology, North Carolina State University, USA):

A18. Świdarska-Burek U., Daub M.E., Thomas E., Jaszek M., Pawlik A., Janusz G. (2020) Phytopathogenic cercosporoid fungi—from taxonomy to modern biochemistry and molecular biology. *International Journal of Molecular Sciences* 21(22), 8555.

W pracy skupiono się na molekularnych i biochemicznych aspektach badań grzybów cercosporoidalnych co stanowi nowatorskie podejście w charakterystyce tej grupy grzybów. Dokonano kompleksowego przeglądu i syntezy wiedzy dotyczącej szlaków metabolicznych biosyntezy cercosporiny i jej toksyczności w kontekście powstających równolegle w komórkach grzyba reaktywnych form tlenu (ROS). Prześledzono udział cercosporiny w procesie fitopatogenezy i chorobach infekcyjnych roślin oraz po raz pierwszy w literaturze dokonano charakterystyki enzymów zaangażowanych w te procesy. Zwrócono uwagę na aplikacyjne możliwości zastosowania grzybów cercosporoidalnych w biotechnologii.

W 2018 roku brałam udział w tworzeniu multidyscyplinarnego konsorcjum naukowego, w skład którego jako członkowie weszły następujące ośrodki naukowo-badawcze:

- Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii (obecnie Katedra Biochemii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych),
- Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny,
- Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Wydział Nauk o Zdrowiu,
- Politechnika Białostocka, Zamiejscowy Wydział Leśny PB w Hajnówce (obecnie Instytut Nauk Leśnych, Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku).

Celem powstałego konsorcjum jest prowadzenie wspólnych, szeroko zakrojonych badań związanych z poszukiwaniem, pozyskiwaniem i weryfikacją działania substancji biologicznie aktywnych z grzybów. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano i scharakteryzowano dwa nowe szczepy grzybów, których metabolity wykazywały właściwości antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe. Uzyskane wyniki opublikowano w 2 pracach w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

A19. Fijałkowska A., Muszyńska B., Sułkowska-Ziaja K., Kała K., **Pawlik A.**, Stefaniuk D., Matuszewska A., Piska K., Pękala E., Kaczmarczyk P., Piętka J., Jaszek M. (2020) Medicinal potential of mycelium and fruiting bodies of an arboreal mushroom *Fomitopsis officinalis* in therapy of lifestyle diseases. *Scientific Reports* 10(1), 20081.

A20. Sadowska A., Zapora E., Sawicka D., Niemirowicz-Laskowska K., Surażyński A., Sułkowska-Ziaja K., Kała K., Stocki M., Wołkowycki M., Bakier S., **Pawlik A.**, Jaszek M., Muszyńska B., Car H. (2020) *Heterobasidion annosum* induces apoptosis in DLD-1 cells and decreases colon cancer growth in *in vivo* model. *International Journal of Molecular Sciences* 21(10), 3447.

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

Od początku swojej pracy zawodowej jako nauczyciel akademicki aktywnie uczestniczę w procesach dydaktyczno-wychowawczych. Prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne dla kursu biochemii, biochemii II i enzymologii dla studentów biologii i biotechnologii, ćwiczenia z biochemii skóry i tkanek współzależnych oraz biotechnologii dla

studentów chemii środków bioaktywnych i kosmetyków. Prowadziłam również konwersatoria z podstaw biochemii dla studentów chemii i konwersatoria z molekularnych mechanizmów ewolucji dla studentów biotechnologii. Od roku 2017 prowadzę wykłady z molekularnych mechanizmów ewolucji dla studentów biotechnologii.

W chwili obecnej jestem **współkoordynatorem** dwóch kursów – biochemii II dla studentów I roku II stopnia biologii i molekularnych mechanizmów ewolucji dla II roku II stopnia biotechnologii ogólnej. W związku z tym brałam **czynny udział w opracowaniu autorskich programów zajęć** dla wyżej wymienionych przedmiotów.

Od roku 2014 byłam **promotorem 7 i recenzentem 3 prac licencjackich**. Od roku 2005 pełniłam rolę **opiekuna merytorycznego dla 10 magistrantów** przygotowujących swoje prace dyplomowe w Katedrze Biochemii i Biotechnologii. Obecnie pełnię funkcję **promotora pracy magisterskiej**.

W roku 2017 oraz 2020 sprawowałam opiekę nad studentami biotechnologii odbywającymi praktyki zawodowe w Katedrze Biochemii i Biotechnologii.

Przygotowałam i przeprowadziłam zajęcia z zakresu biologii molekularnej i biochemii dla uczniów I LO im. Stanisława Staszica w Lublinie przygotowujących się do centralnego etapu Olimpiady Biologicznej w 2017 i 2018 roku.

W 2019 roku moje osiągnięcia dydaktyczne i wychowawcze zostały uhonorowane przyznaniem mi przez Ministra Edukacji Narodowej **medalem Komisji Edukacji Narodowej**.

W latach 2016 – 2019 byłam **członkiem Rady Wydziału** Biologii i Biotechnologii UMCS (przedstawiciel niesamodzielnych pracowników naukowych), a od 2019 roku jestem **członkiem Rady Naukowej** Instytutu Nauk Biologicznych UMCS. Od 2013 roku jestem **członkiem Polskiego Towarzystwa Genetycznego O/Lubelski oraz Polskiego Towarzystwa Mykologicznego** (w latach 2015 - 2020 pełniłam funkcję **wiceprzewodniczącej Zarządu Sekcji „Biotechnologia grzybów” PTMyk**). W latach 2008-2012 byłam także **członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego O/Lubelski**.

W latach 2012 – 2016 pełniłam funkcję **asystenta koordynatora UMCS międzynarodowego projektu PSPB - 079/2010 „Tailored Lipidic Mesophases as Novel Functional Nanomaterials in Bioenergetics and Biosensing”** współfinansowanego w ramach Polsko-Szwajcarskiego Programu Badawczego.


Obecnie sprawuję funkcję **redaktora naukowego** wydania specjalnego (Guest Editor) czasopisma Biomolecules pt.: „Fungal Metabolism - Enzymes and Bioactive Compounds” (2020-2021 r.). W 2015 roku byłam **członkiem komitetu naukowego** I Konferencji Naukowej ENZYMOS „Enzymy w nauce i przemyśle”. W roku 2013, 2015, 2018 i 2019 byłam **członkiem komisji konkursowej** (udział w pracach komisji oceniającej) w Konkursie Biochemicznym – ogólnopolskim konkursie dla młodzieży licealnej organizowanym przez Katedrę Biochemii i Biotechnologii UMCS.

Moja aktywność popularyzatorska przejawiała się głównie poprzez aktywne zaangażowanie w następujące działania:

- Udział w „Nocy Biologów” organizowanej na UMCS w latach 2013 - 2020 (corocznie) – przygotowanie i prowadzenie warsztatów dla młodzieży odwiedzającej Wydział Biologii i Biotechnologii.
- Udział w akcji promocyjnej „Drzwi Otwarte” UMCS w latach 2007, 2010, 2018, 2019 – przygotowanie programu i prowadzenie warsztatów dla młodzieży odwiedzającej Wydział Biologii i Biotechnologii, przygotowanie stoiska Wydziałowego. W 2010 otrzymałam list gratulacyjny Dziekana Wydziału za przygotowanie programu i organizację „Drzwi Otwartych” na Wydziale.
- W roku 2009 brałam udział w przygotowaniach lubelskiej edycji warsztatów „DNA Encyklopedia Życia”.
- W 2015 roku uczestniczyłam w przygotowaniu i przeprowadzeniu warsztatów dla uczniów Gimnazjów w Bychawie, Ludwinie i Łaziskach, w ramach popularyzatorskiego projektu „Objazdowy Festiwal Nauki, czyli nauka bez barier” 85/UD/SKILLS/2015 przyznanego w konkursie ENGAGE finansowanego w ramach programu SKILLS przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej, nieomówione w punktach 4-5

Poza aktywnością naukową omówioną w punkcie 4. i 5. niniejszego Autoreferatu, przed uzyskaniem stopnia doktora byłam zaangażowana w realizację badań opisanych w pracy:

A21. Pawlik A. , Janusz G., Koszerny J., Małek W., Rogalski J. (2012) Genetic diversity of the edible mushroom *Pleurotus* sp. by Amplified Fragment Length Polymorphism. *Current Microbiology* 65, 438–445.

 - autor korespondencyjny

gdzie dokonałam zróżnicowania genetycznego 21 szczepów *Pleurotus* sp. Uzyskane profile AFLP okazały się być charakterystyczne dla każdego badanego organizmu i skutecznie różnicować szczepy *Pleurotus*. Zastosowanie metody średnich połączeń UPGMA pozwoliło na zgrupowanie badanych organizmów w dwa główne klastry oraz wydzielenie niezależnej linii na obrzeżach drzewa filogenetycznego zajmowanej przez środowiskowy szczep *Pleurotus* sp.

Poza aktywnością naukową omówioną w punkcie 4. i 5. niniejszego Autoreferatu, po uzyskaniu stopnia doktora byłam zaangażowana, jako jeden z wykonawców, w realizację dwóch projektów badawczych NCN. Pierwszy projekt pt. „Znaczenie lakazy *Cerrena unicolor* w jej adaptacji do rozkładu kilku gatunków drewna i zmiennych warunków środowiska” (NCN, Opus 5, ID 2013/09/B/NZ9/01829) dotyczył oceny istotności syntezy lakazy dla grzyba *Cerrena unicolor* w jego adaptacji do rozkładu kilku gatunków drewna oraz zmiennych warunków środowiska. Przeprowadzone analizy transkryptomu *C. unicolor*, w których brałam udział, pozwoliły wykazać, że w bogatym zestawie enzymów jakie ten grzyb wykorzystuje w degradacji ligniny pochodzącej z różnych gatunków drewna, lakaza odgrywa istotną rolę - ekspresja genu kodującego jedną z izoform lakazy zwiększała się we wszystkich wariantach hodowlanych, tj. w przypadku zastosowania trocin jesionu, klonu i brzozy. Globalny poziom ekspresji genów szczepu *C. unicolor* hodowanego na trocinach różnił się znacząco w porównaniu do podłoża mineralnego. W transkryptomie badanego organizmu zidentyfikowano transkrypty 294 genów kodujących białka potencjalnie zaangażowane w rozkład drewna, a zmiany poziomu ekspresji 37 genów kodujących hipotetyczne enzymy rozkładające drewno były bardzo duże (≥ 4 -krotne). Udowodniono, że ekspresja poszczególnych izoform lakazy jest zróżnicowana w zależności od rodzaju rozkładanego gatunku drzewa. 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. Wykazano, że *C. unicolor* do rozkładu ligniny wykorzystuje także enzymy pomocnicze, LDA. Przeprowadzone przez mnie analizy poziomu ekspresji genów kodujących lakazę metodą qPCR wskazują na transkrypcyjną regulację syntezy lakazy u *C. unicolor*. Natomiast oznaczenia aktywności enzymu w

połączeniu z metodami elektroforezy PAGE 1D i 2D i techniką LC-MS/MS pozwoliły stwierdzić, że regulacja syntezy lakazy odbywa się również na poziomie potranskrypcyjnym i potranslacyjnym. Efektem realizacji projektu są wyniki, które zostały przedstawione w wymienionych poniżej publikacjach eksperymentalnych i przedyskutowane w artykule przeglądowym:

A7. Pawlik A., Ciołek B., Sulej J., Mazur A., Grela P., Staszczak M., Niścior M., Jaszek M., Matuszewska A., Janusz G., Paszczyński A. (2021) *Cerrena unicolor* laccases, genes expression and regulation of activity. *Biomolecules* 11(3), 468.

A9. Janusz G., Mazur A., Wielbo J., Koper P., Żebracki K., **Pawlik A.**, Ciołek B., Paszczyński A., Kubik-Komar A. (2018) Comparative transcriptomic analysis of *Cerrena unicolor* revealed differential expression of genes engaged in degradation of various kinds of wood. *Microbiological Research* 207, 256-268.

A10. Janusz G., **Pawlik A.**, Sulej J., Swiderska-Burek U., Jarosz-Wilkolazka A., Paszczyński A. (2017) Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Review* 41(6), 941-962.

oraz **3 międzynarodowych i 1 krajowym doniesieniu konferencyjnym.**


W ramach projektu pt.: „Ocena potencjału antyoksydacyjnego i przeciwdrobnoustrojowego grzybowej dehydrogenazy celobiozowej jako składnika opakowań aktywnych” (NCN, Sonata 9, ID 2015/17/D/NZ9/02066) zaangażowana byłam w badania, których celem było otrzymanie wysokoaktywnych preparatów enzymatycznych dehydrogenazy celobiozowej produkowanych przez różne gatunki grzybów rozkładających drewno. Uzyskane wyniki opublikowano w pracy w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

A22. Sulej J., Osińska-Jaroszuk M., Jaszek M., Grąż M., Kutkowska J., **Pawlik A.**, Chudzik A., Bancierz R. (2019) Antimicrobial and antioxidative potential of free and immobilised cellobiose dehydrogenase isolated from wood degrading fungi. *Fungal Biology* 123(12), 875-886.

oraz w postaci **2 międzynarodowych i 1 krajowym doniesieniu konferencyjnym.** Część uzyskanych przez mnie wyników przedstawiona została w formie prezentacji posterowej pt.: „Immobilizacja dehydrogenazy celobiozowej na naturalnych polimerach do zastosowań biomedycznych i farmaceutycznych” w ramach X Konferencji Młodych Adeptów Fizjologii

„Homeostaza-mikrobiom-ksenobiotyki” w 2018 roku stała się również podstawą przyznanej **nagrody za najlepszą prezentację plakatu**.

W roku 2016 opublikowana została praca, w której zaprezentowałam część wyników badań, które przeprowadziłam jeszcze w trakcie wykonywania doświadczeń do mojej pracy doktorskiej pt.: „Lakazy bakteryjne”:

A23. Pawlik A. , Wójcik M., Rułka K., Motyl-Gorzela 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. *International Journal of Biological Macromolecules* 92, 138-147.

 - autor korespondencyjny

W trakcie przeprowadzonych badań przesiewowych wyselekcjonowałam nowy środowiskowy szczep bakteryjny *Sinorhizobium meliloti* (*Ensifer meliloti*), który syntetyzował lakazę o wysokiej aktywności. W toku badań opracowałam metodę izolacji i oczyszczania enzymu technikami chromatograficznymi. Szczególną uwagę poświęcono również określeniu podstawowych właściwości fizyko-chemicznych i biochemicznych nowej lakazy (m.in.: MW, pI, optima pH i temperatury, termo- i pH-stabilność, Km, kcat). Zbadałam właściwości antyoksydacyjne enzymu bakteryjnego, co stanowiło pierwsze takie doniesienie w literaturze. Ocena podstawowych parametrów katalitycznych wykazała znaczny potencjał biodegradacyjny lakazy *S. meliloti*. Dokonałam również identyfikacji, klonowania i sekwencjonowania genu *lacc S. meliloti*, który wykazał cechy charakterystyczne dla genów innych lakaz. W toku prowadzonych badań do pracy doktorskiej zoptymalizowałam syntezę enzymu w warunkach hodowli wytrząsanych, co pozwoliło na uzyskanie wysokoaktywnego preparatu lakazy o pochodzeniu prokariotycznym. Powyższe badania w dużej części były realizowane dzięki środkom finansowym przyznanym w ramach **2 konkursów wewnętrznych UMCS** na projekty badawcze dla młodych naukowców w roku 2011 i 2012, których byłam kierownikiem. Wyniki przeprowadzonych analiz zostały zaprezentowane w postaci **5 krajowych i 3 międzynarodowych doniesień konferencyjnych oraz 1 prezentacji ustnej (wykład na zaproszenie)**.

Uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej wyniki dotyczące charakterystyki lakazy bakteryjnej *S. meliloti* okazały się na tyle obiecujące w kontekście potencjalnych zastosowań biotechnologicznych enzymu, że badania te kontynuowałam w ramach **1 projektu wewnętrznego UMCS** przyznanego w ramach konkursu na projekty badawcze dla

młodych naukowców w roku 2015 oraz działania naukowego **NCN Miniatura 1** w 2017 roku pt.: „Ocena potencjału bioremediacyjnego lakazy *Sinorhizobium meliloti*” ID 2017/01/X/NZ9/00819, **którego byłam kierownikiem**. Celem prowadzonych badań była wstępna ocena zdolności lakazy *S. meliloti* do degradacji/transformacji związków aromatycznych i ich pochodnych, co pozwoliło mi na określenie możliwości wykorzystania tego enzymu do celów biotechnologicznych. Zrealizowane przez mnie zadanie badawcze obejmowało określenie właściwości katalitycznych lakazy w stosunku do wybranych związków aromatycznych tj. bisfenolu A, antracenu i diklofenaku. Wyniki realizowanych badań zaprezentowałam w postaci prezentacji posterowej pt.: „Oxidation of bisphenol A by laccase from Gram-negative bacterium *Sinorhizobium meliloti*” na międzynarodowej konferencji naukowej Oxizymes w Belfaście, Irlandia Północna (wyniki przygotowane do publikacji). Badania wstępne stanowiące podstawę przygotowanego projektu dotyczące właściwości i budowy enzymu były również podstawą publikacji:

A8. Janusz G., **Pawlik A.**, Świdarska-Burek U., Polak J., Sulej J., Jarosz-Wilkołazka A., Paszczyński A. (2020) Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences* 21(3), 966.

Szczepy glebowych bakterii (rizobiów) stały się również przedmiotem mojej współpracy z pracownikami Katedry Genetyki i Mikrobiologii UMCS. W ramach badań określiłam przynależność gatunkową środowiskowych szczepów *Ensifer* sp. poprzez sekwencjonowanie genu 16S rDNA, *recA*, *atpD* and *nodC*. Zbadano również ich wydajność symbiotyczną, zróżnicowanie genetyczne oraz profil metaboliczny wybranych szczepów. Wykazano możliwość ich zastosowania jako efektywnego składnika bionawozu dla roślin bobowatych. Wyniki tych badań opublikowano w pracy:

A24. Marek-Kozaczuk, M., Wielbo, J., **Pawlik, A.**, Skorupska, A. (2014) Nodulation competitiveness of *Ensifer meliloti* Alfalfa nodule isolates and their potential for application as inoculants. *Polish Journal of Microbiology* 63(4), 375–386.

Poza współpracą naukową związaną z wykonywaniem zadań badawczych w ramach omówionych powyżej projektów, wraz z pracownikami Katedry Mikrobiologii Środowiskowej i Przemysłowej, zaangażowana byłam w powstanie poniższej publikacji:

A25. Jaroszuk-Ściseł J., Tyśkiewicz R., Nowak A., Ozimek E., Majewska M., Hanaka A., Tyśkiewicz K., **Pawlik A.**, Janusz G. (2019) Phytohormones (Auxin, gibberellin) and ACC deaminase *in vitro* synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTKZ3A0 strain and

changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences* 20(19), 4923.

która dotyczyła charakterystyki nowego środowiskowego szczepu *Trichoderma* zdolnego do produkcji fitohormonów (auksyny i gibereliny) i deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC). W toku badań dokonałam identyfikacji molekularnej szczepu *Trichoderma* DEMTKZ3A0 i przeprowadziłam jego analizę filogenetyczną. Wykazano antagonistyczny wpływ szczepu DEMTKZ3A0 na grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium* i zdolność do syntezy enzymów chityno- i glukanolitycznych. Miało to pozytywny wpływ na wzrost roślin, regulację wydzielania hormonów roślinnych i w efekcie na wzrost zdolności obronnych przed fuzariozami. Udowodniono, że fitopatogeniczne szczepy grzybów *Fusarium* spp. stanowią dobry układ modelowy do badań porównawczych interakcji grzybów *Trichoderma* z gospodarzem roślinnym. Wynikiem powyższej współpracy są również **2 krajowe doniesienia konferencyjne**.

W 2016 opublikowana została praca:

A26. Czemińska M., Szcześ A., **Pawlik A.**, Wiater A., Jarosz-Wilkołazka A. (2016) Production and characterisation of exopolymer from *Rhodococcus opacus*. *Biochemical Engineering Journal* 112, 143-152.

w której wykazano właściwości bioflokulacyjne 10 szczepów bakterii z grupy promieniowców. W ramach realizacji badań dokonano identyfikacji genetycznej badanych mikroorganizmów oraz oczyszczono, scharakteryzowano właściwości i określono skład egzopolimeru produkowanego przez *R. opacus*. Udowodniono, że zewnątrzkomórkowy związek polimeryczny syntetyzowany przez badany szczep wykazuje ciekawe właściwości flokulacyjne w stosunku do kationów metali, co predysponuje go do zastosowania jako naturalnego flokulanta do usuwania zanieczyszczeń środowiska metalami ciężkimi oraz oczyszczania ścieków.

Omówione powyżej publikacje powstałe w ramach współpracy z naukowcami z Katedry Biochemii i Biotechnologii, Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej i Katedry Genetyki i Mikrobiologii oraz Katedry Botaniki, Mykologii i Ekologii UMCS były podstawą kilku wniosków o nagrodę zespołową J.M. Rektora UMCS.

Do przyznanych nagród należą:

2021 – nagroda zespołowa J.M. Rektora UMCS za wyróżniającą się pracę naukową, a w szczególności za wysoko punktowany artykuł naukowy opublikowany w 2020 r.,

2020 – nagroda zespołowa J.M. Rektora UMCS za wyróżniającą się pracę naukową, a w szczególności za wysoko punktowany artykuł naukowy opublikowany w 2020 r.,

2020 – nagroda zespołowa J.M. Rektora UMCS za wyróżniającą się pracę naukową, a w szczególności za wysoko punktowany artykuł naukowy opublikowany w okresie od stycznia 2020 r. do 31 marca 2020 r.,

2019 - nagroda zespołowa J.M. Rektora UMCS za wyróżniającą się pracę naukową, a w szczególności za wysoko punktowany artykuł naukowy opublikowany w okresie od 1 października 2019 r. do 31 grudnia 2019 r.,

2018 - nagroda zespołowa III stopnia J.M. Rektora UMCS za wyróżniającą się pracę naukową, a w szczególności za cykl artykułów naukowych,

2017 – list gratulacyjny J.M. Rektora UMCS w uznaniu dorobku naukowego na rzecz UMCS,

2016 – list gratulacyjny Dziekana Wydziału za wyróżniającą się pracę naukową,

2014 - nagroda zespołowa III stopnia J.M. Rektora UMCS.

Moja praca naukowa została również doceniona i uhonorowana przez Prezydenta RP przyznaniem mi w 2017 roku „**Medalem Brązowym za Długoletnią Służbę**”.

Do innych przyznanych mi nagród związanych z działalnością naukową należą:

2021 – wyróżnienie za prezentację plakatową (ustne wystąpienie) za pracę pt.: „Analiza profilu ekspresji genów zaangażowanych we wzrost i rozwój grzyba białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor* w trakcie hodowli w różnych warunkach oświetlenia” w ramach V Ogólnopolskiego Sympozjum Mikrobiologicznego „Metagenomy Różnych Środowisk”,

2018 - nagroda za najlepszą prezentację plakatową w sesji Ksenobiotyki i substancje pochodzenia naturalnego jako czynniki modulujące funkcjonowanie organizmu za pracę pt.: „Immobilizacja dehydrogenazy celobiozowej na naturalnych polimerach do zastosowań biomedycznych i farmaceutycznych” w ramach X Konferencji Młodych Adeptów Fizjologii „Homeostaza-mikrobiom-ksenobiotyki”,

2012 - stypendium doktorskie (1,5 roku) przyznane w ramach projektu „Stypendia Naukowe dla Doktorantów II” realizowanego przez Departament Gospodarki i Innowacji Urzędu Marszałkowskiego Województwa Lubelskiego w Lublinie.

Ponadto jestem współautorem w sumie **106 sekwencji nukleotydowych** zgłoszonych do bazy GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI).

W ramach podnoszenia swoich kwalifikacji zawodowych ukończyłam następujące studia podyplomowe:

- 2012** - „Menedżer projektów badawczych”, WSEI, Lublin (2 semestry),
- 2010** - „Public Relations w badaniach naukowych”, Polska Fundacja Ośrodków Wspomagania Rozwoju Gospodarczego OIC Poland, Lublin (2 semestry),
- 2009** - „Zarządzanie projektami badawczymi i pracami rozwojowymi”, WSEI, Lublin (2 semestry),
- 2007** - „Biologia Molekularna”, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków (2 semestry)

oraz odbyłam szkolenia i seminaria zawodowe:

- 2019** - „Optimize your RNA workflow - hints and pitfalls of RT-qPCR” organizowane przez Promega Poland, Lublin,
- 2019** – „Innowacyjne rozwiązania do hodowli komórek ssaczy” organizowane przez Merck Sp. z o.o., Lublin,
- 2017** – „Analiza obrazu w mikroskopii” organizowane przez OLYMPUS Polska, Lublin,
- 2014** - „Wykorzystanie MS Project 2013 Professional w zarządzaniu inicjatywami strategicznymi UMCS” organizowane przez Softronic, Lublin,
- 2013** - „Praktyczne aspekty wyceny technologii” zorganizowane przez Eco Invest, Kraków,
- 2012** - „Semiconductor sequencing from Megabases to Gigabases: technology, applications and context” organizowane przez Life Technologies Polska, Kraków,
- 2012** - „Komercjalizacja wiedzy” organizowany przez Urząd Marszałkowski Woj. Lubelskiego oraz GetBEST, Lublin
- 2012** - „Basic real-time PCR training”, szkolenie organizowane przez Applied Biosystems, Warszawa,
- 2011** - „9th Poznan Summer School of Bioinformatics”, kurs organizowany przez Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań
- 2011** - „Uczelnie i biznes – współpraca gwarancją sukcesu” organizowane przez Centrum Innowacji i Transferu Technologii LPNT, Lublin
- 2010** - „Nauka stymulatorem rozwoju gospodarki”, szkolenie organizowane przez CITT LPNT Sp. z o.o., Lublin
- 2010** - szkolenie z zakresu zakładania i zarządzania firmami typu spin off „Przedsiębiorczy Uniwersytet” realizowane przez Polską Fundację Ośrodków Wspomagania Rozwoju Gospodarczego OIC Poland, Nałęczów
- 2009** - „DNA Sequencing School” realizowane przez Applied Biosystems, Warszawa,

2008 - „Ochrona własności intelektualnej i przemysłowej oraz komercjalizacja wyników badań naukowych” realizowanym przez LPNT Sp. z o.o., Lublin.

Moje przyszłe plany naukowe związane są z kontynuacją obecnie realizowanych nurtów badawczych dotyczących:

- wpływu światła na metabolizm grzybów oraz możliwości wykorzystania regulacji metabolizmu tych organizmów przez światło do zwiększania wydajności syntezy enzymów istotnych w biotechnologii,
- biotechnologicznych zastosowań lakazy bakteryjnej.

..... Anna Pawlik

(podpis wnioskodawcy)