



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław 10.05.2021

Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe

prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Ocena osiągnięcia naukowego w postępowaniu w sprawie nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego Pani dr Magdaleny Płotki, wraz z oceną całego dorobku naukowego, dydaktycznego, organizacyjnego i współpracy międzynarodowej

Pani Magdalena Płotka ukończyła studia magisterskie w roku 1999, uzyskując stopień magistra biotechnologii na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod opieką promotorską Prof. dr hab. Janusza Limona. Następnie kontynuowała badania w tej samej jednostce naukowej i w roku 2007 uzyskała stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii, pod opieką promotorską Prof. dr hab. Jarosława Marszałka, przygotowując i broniąc rozprawę doktorską pt. „Białkowe składniki mitochondrialnego nukleoidu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”. Po uzyskaniu stopnia doktora Pani Magdalena Płotka zrealizowała zagraniczny staż naukowy w charakterze *postdoctoral research assistant* w John Radcliffe Hospital w Oxfordzie w latach 2007-2010. Następnie, w latach 2010-2011 zdobywała doświadczenie w Diagnostycznych Laboratoriach Medycznych Invicta w Gdańsku jako asystent w Laboratorium Biologii Molekularnej i Cytogenetyki. Od roku 2012 do dziś pozostaje związana z Katedrą Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie początkowo pracowała jak strażnik specjalista, a od 2014 roku na stanowisku adiunkta.





1. Ocena osiągnięcia naukowego przedstawionego w postaci jednotematycznego cyklu publikacji, pt.: „Analiza molekularna bakteriofagowych i bakteryjnych enzymów litycznych wykazujących podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan”

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu publikacji naukowych powiązanych tematycznie. Wszystkie prace mają charakter oryginalny i zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Applied and Environmental Microbiology*, *PLoS One*, *Scientific Reports*, *Viruses*, *International Journal of Molecular Sciences*. Łączna wartość współczynnika wpływu (*Impact Factor*) prac składających się na osiągnięcie wynosi 19,095, a łączna liczba punktów MNiSW wynosi 580 pkt. Tematyka prac dotyczy enzymów litycznych pochodzących z wirusów bakteryjnych aktywnych wobec bakterii z rodzaju *Thermus*, a także białka LysC pochodzącego z *Clostridium intestinale*. Enzymy cechują się podobieństwem do białek eukariotycznych rozpoznających peptydoglikan. Habilitantka w przedstawionym cyklu prac podejmuje się charakterystyki molekularnej oraz charakterystyki funkcjonalnej enzymów.

Chronologicznie pierwsza z prac, opublikowana w roku 2014 w piśmie *Applied and Environmental Microbiology*, ma swoje źródło z interesującym przedsięwzięciem naukowym, jakim była izolacja i analiza genomów bakteriofagów termofilnych, pochodzących z gorących źródeł na terenie Islandii. Habilitantka podjęła się badania enzymu Ph2119, wyróżniającego się podobieństwem do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan; charakterystyczny był równoczesny brak podobieństwa Ph2119 do znanych enzymów litycznych pochodzących z mikroorganizmów termofilnych. Habilitantka przeprowadziła indywidualną analizę i wykazała błędne zaklasyfikowanie Ph2119 jako lizozymu (N-acetylmuramidazy), podczas gdy enzym wykazuje cechy amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowej). Następnie przeprowadziła klonowanie odpowiedniego genu do wektora ekspresyjnego, optymalizację produkcji, produkcję i oczyszczanie badanego białka. W ten sposób uzyskany został enzym w ilości umożliwiającej jego charakterystykę biochemiczną i funkcjonalną. Pozwoliło to na eksperymentalne wykazanie działania litycznego, w tym wobec peptydoglikanu mezofilnych bakterii Gram-ujemnych, a także określenie optymalnych warunków fizykochemicznych oraz stabilności enzymu. W tej części swoich badań Pani Magdalen Płotka wykazała się



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

dociekliwością i krytycyzmem, które pozwoliły na skorygowanie wcześniejszego stanu wiedzy, a także wniosła oryginalny wkład w słabo poznanym obszarze badań nad termostabilnymi enzymami bakteriolitycznymi.

Druga praca włączona do cyklu opublikowana została w roku 2015 w piśmie *PLoS One*. Jest to kontynuacja zainteresowań Habilitantki i skupia się na bardzo podobnym do Ps2119 białku oznaczonym jako Ts2631. Nowy enzym został również wybrany jako reprezentujący enzymy lityczne pochodzące z bakteriofagów termofilnych. Razem stanowiły w chwili opublikowania pracy jedynych reprezentantów białek tego typu, bez istotnych homologii do innych enzymów litycznych. Nowy enzym Ts2631 został również wyprodukowany w bakteryjnym systemie ekspresyjnym po sklonowaniu odpowiedniego genu, a uzyskane białko aktywne zostało zbadane w zakresie specyficzności i optymalnych warunków fizykochemicznych, co pozwoliło na wykazanie jego bardzo wysokiej termostabilności. Ponadto, Habilitantka ustaliła wpływ jonów metali na aktywność enzymu i wykazała szczególną rolę cynku w tym zakresie, a także eksperymentalnie zbadała centrum katalityczne enzymu. Badanie to opierało się na mutagenie miejscowo-specyficznej i pozwoliło jej potwierdzić rolę wytypowanych teoretycznie reszt aminokwasowych (H30, Y58, H131 i C139). Powyższy zakres prac i uzyskane wyniki wskazują nie tylko na konsekwencję habilitantki w analizowaniu wybranego przez nią obszaru badawczego, ale także udowadniają jej biegłość w technikach biologii molekularnej i w praktycznej pracy badawczej nad aktywnymi enzymami litycznymi.

Uzyskane wyniki zainspirowały Panią Magdalenę Płotkę do dalszego badania enzymu Ts2631, a wyniki tych prac znajdujemy w dwóch publikacjach z 2019 roku. Pierwsza z nich została zaprezentowana w piśmie *Scientific Reports*. Habilitantka skupiła się na określeniu, które reszty aminokwasowe badanego białka są odpowiedzialne ze jego wiązanie z peptydoglikanem. Aby je zidentyfikować oparła się na analizie bioinformatycznej, która wskazała 19 hipotetycznych reszt, a ich rola była następnie weryfikowana poprzez mutagenę ukierunkowaną. Pozwoliło to na wskazanie 6 reszt poza centrum katalitycznym, które decydowały o aktywności enzymu. Następnie wśród nich zidentyfikowane zostały dwie, których zmiana skutkowałą utratą zdolności do wiązania peptydoglikanu gospodarza bakteryjnego. W połączeniu z określeniem struktury przestrzennej praca wnosi oryginalny



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

i unikalny wkład w rozumienie oddziaływań enzymów litycznych fagów termofilnych z peptydoglikanem bakteryjnym na poziomie molekularnym. Habilitantka wykazała się samodzielnością i zdolnością do inicjowania oraz prowadzenia i organizowania oryginalnych badań w mało poznanej dziedzinie.

Druga publikacja z 2019 prezentująca badania nad enzymem litycznym Ts2631 została opublikowana w piśmie *Viruses*. Habilitantka oparła pomysł tej części badań na własnej obserwacji wskazującej, że enzym wykazywał aktywność lityczną nawet wobec bakterii, których błona zewnętrzna osłaniająca peptydoglikan nie została usunięta. Podjęte badania miały więc na celu określenie potencjału Ts2631 jako czynnika bezpośrednio niszczącego bakterie. Doprowadziły do wykazania, że endolizyna ta jest zdolna do zabijania komórek niektórych patogennych bakterii szczepów wielolekoopornych (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*). Efekt mogą wzmacniać substancje destabilizujące błonę zewnętrzną. Uzyskane wyniki są jeszcze dość odległe od możliwości bezpośredniego projektowania terapii z użyciem badanego enzymu, ale udało się potwierdzić eksperymentalnie, że może on być aktywny także w temperaturze 37° C. Bardzo wartościową część pracy stanowią obserwacje wskazujące, że endolizyna Ts2631 posiada zdolność do samodzielnej destabilizacji błon bakteryjnych, mediowaną przez N-terminalny fragment białka. Ze względu na liczne problemy, jakie napotykają próby praktycznego stosowania endolizyn skierowanych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, występujące właśnie ze względu na obecność błon zewnętrznych, uważam tę obserwację za szczególnie cenną i mogącą mieć duże znaczenie praktyczne w przyszłości.

Ostatnia, piąta praca ocenianego cyklu została opublikowana w roku 2020 w piśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Stanowi ona rozszerzenie badań o potencjalne enzymy zidentyfikowane *in silico* jako podobne do Ph2119 i Ts2631, ale pochodzące nie z grup ekstremofilnych, ale z rodzaju *Clostridium*. Habilitantka wybrała prawdopodobny enzym lityczny LysC z *Clostridium intestinale*. Wobec trudności technicznych w pracy z *Clostridium* większość badań aktywności litycznej została przeprowadzona z użyciem komórek *Staphylococcus aureus*. Również dla tego enzymu Habilitantka zbadała i opisała centrum katalityczne. Następnie skupiła się na N-terminalnej części białka, charakteryzującej się wewnętrznym nieuporządkowaniem (tzw. region IDR) i poprzez analizę bioinformatyczną wytypowała go jako potencjalnie reaktywną, przeciwbakteryjną część białka. Aktywność tę



zweryfikowała i potwierdziła eksperymentalnie, poprzez badanie syntetycznego peptydu, odpowiadającego 30 pierwszym resztom aminokwasowym białka LysC. Zatem, wzbogaciła aktualną wiedzę o enzymach bakteriolitycznych o eksperymentalne potwierdzenie aktywności nowego enzymu oraz poprzez zidentyfikowanie jego aktywnego fragmentu. Praca ta po raz kolejny demonstruje konsekwencję Habilitantki w badaniach enzymów litycznych, a w tym jej samodzielność, dociekliwość i umiejętność przeprowadzenia kompletnych badań, począwszy od analiz *in silico*, poprzez biotechnologiczne metody produkcji i badania białek, aż do analiz funkcjonalnych i obrazowania.

Opisany cykl prac oceniam bardzo wysoko, przede wszystkim ze względu na wysoką oryginalność tematyki, dobrą jakość naukową i bardzo dobrą spójność tematyczną. Nie budzi wątpliwości dominujący udział Habilitantki w publikacjach zaliczanych do jednolitego cyklu poddanego ocenie, poświadczony oświadczeniami współautorów opisujących ich indywidualny wkład we wspólnie opublikowanych pracach, a także pierwszoautorską pozycją Habilitantki we wszystkich pracach włączonych do cyklu. Co więcej, w trzech pracach Habilitantka współdzieli rolę autora korespondencyjnego z ostatnim lub przedostatnim współautorem publikacji.

2. Ocena aktywności naukowej

Po obronie doktoratu habilitantka opublikowała łącznie 12 prac w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (w tym 5 włączono do cyklu jednotematycznego stanowiącego osiągnięcie naukowe poddawane ocenie). Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora opublikowała dwie takie prace. W większości tych prac Habilitantka znajduje się na wysokiej pozycji autorskiej i przedstawiła istotny wkład merytoryczny, jaki wniosła. Również współczynniki wpływu pism, w których prace opublikowano są dobre. Sumaryczne dane naukometyczne to: Index Hirscha 7 (Web of Science), suma współczynników wpływu *Impact Factor* 48,545 (w tym 19,095 cykl stanowiący oceniane osiągnięcie naukowe oraz 29,450 pozostałe prace), liczba punktów MNiSW łącznie 1510 (w tym 580 cykl stanowiący oceniane osiągnięcie naukowe oraz 930 pozostałe prace), stan cytowań na dzień opracowania to 124 cytowania łącznie (Web of Science).



Aktywność Habilitantki w zakresie zdobywania i realizacji projektów grantowych to przede wszystkim udział w realizacji grantów różnego typu. Na pozytywne podkreślenie zasługuje uczestnictwo w charakterze głównego wykonawcy w dwóch międzynarodowych, wielośrodkowych projektach badawczych realizowanych w ramach programów Komisji Europejskiej: 7. Programu Ramowego oraz programu HORYZONT 2020. W roli kierownika projektu Habilitantka wystąpiła w granie Narodowego Centrum Nauki MINIATURA 3, realizując swoją główną tematykę badawczą obejmującą analizy struktury i funkcji peptydów stanowiących N-terminalne regiony białek litycznych.

Jest to dorobek w mojej opinii spełniający wymogi, jakie są stawiane przed naukowcami ubiegającymi się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.

3. Ocena w zakresie dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego

Aktywność Habilitantki obejmuje też konferencje naukowe, sympozja i zjazdy, głównie o zasięgu międzynarodowym, na których przedstawiła łącznie 31 zgłoszeń. Wśród nich znalazło się 10 wystąpień ustnych, w tym 9 już po obronie doktoratu. Habilitantka należała też do komitetów organizacyjnych i naukowych zagranicznych konferencji naukowych oraz regularnie wykonuje recenzje dla czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym, a także wykonywała recenzje grantów złożonych do Research Foundation-Flanders. W mojej opinii fakty te świadczą o jej rozpoznawalności na arenie międzynarodowej.

Pani Magdalena Płotka prowadzi też działalność popularyzatorską wśród młodzieży, prowadząc wykłady o tematyce biotechnologicznej i goszcząc w laboratorium uczniów klas licealnych w ramach praktycznych zajęć edukacyjnych.

4. Ocena w zakresie współpracy międzynarodowej

Pani Magdalena Płotka odbyła trzy zagraniczne staże badawcze w bardzo dobrych ośrodkach zagranicznych, w tym 4-tygodniowy staż w wiodącej grupie badającej enzymy pochodzenia bakteriofagowego w laboratorium Prof. Yves'a Briers'a na Uniwersytecie w Gandawie w Belgii. Również publikacje wchodzące w skład przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego są rezultatem współpracy z ośrodkami naukowymi oraz firmami biotechnologicznymi w Polsce i za granicą.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

5. Wniosek końcowy

Osiągnięcie naukowe oraz inne dokonania Habilitantki uzyskane po otrzymaniu stopnia doktora wskazują na znaczny wkład autorki w rozwój dyscypliny naukowej. Szczególnie wysoko oceniam oryginalność i wartość naukową przedstawionego w formie pięciu prac oryginalnych osiągnięcia naukowego. Habilitantka wykazała się też istotną aktywnością naukową, a jej dorobek naukowy uzasadnia nadanie doktora habilitowanego nauk biologicznych w zakresie biologii. Zatem, wniosek Habilitantki oceniam pozytywnie i stwierdzam, że Pani dr Magdalena Płotka spełnia wymagania określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Ponadto zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie osiągnięcia naukowego Habilitantki przewidzianą w regulaminie nagrodą.