**Załącznik 3**

# AUTOREFERAT

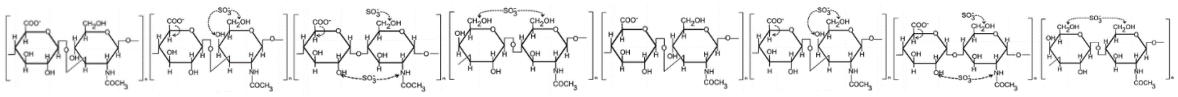

## dr Lidia Gaffke

**Katedra Biologii Molekularnej**

**Wydział Biologii**

**Uniwersytet Gdański**


**Gdańsk, 2023**



Dokument zanonimizowany za pomocą UG DLP Anonimizator, 2026-10-13 14:39:52

Science is like a fairy tale of sorts,

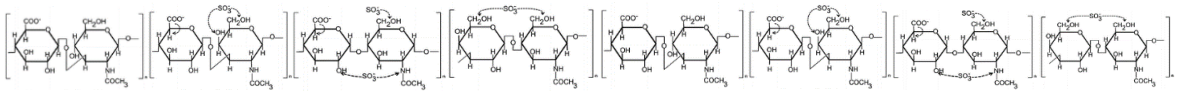
with a little creativity, more curiosity,

persuding your goals

with being true to yourself,

one can expect a happy ending.

LG



**[1] Imię i nazwisko:** Lidia Gaffke

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

**19.06.2012** tytuł licencjata, kierunek Biologia, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

**10.07.2014** tytuł magistra biologii, kierunek Biologia (specjalność: Biologia Molekularna), Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

Promotor: prof. dr hab. Tadeusz Kaczorowski

Tytuł pracy magisterskiej: *Zastosowanie białek biorących udział w procesie rekombinacji homologicznej Pyrococcus wosei do optymalizacji układów simplex i multiplex PCR*

**29.01.2021** stopień Doktora Nauk Ścisłych i Przyrodniczych w dyscyplinie Nauki biologiczne, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

Promotor: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

Tytuł pracy doktorskiej: *Zmiany w procesach komórkowych jako nowy aspekt patogenezy mukopolisacharydoz : badania transkryptomiczne*

**[3] Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

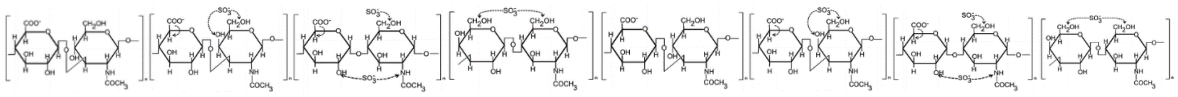
01.10.2014 - 30.11.2020: doktorantka Studiów Doktoranckich z Biologii, Ekologii i Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

02.03.2020 - 30.09.2021: **asystent**, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

15.08.2019 - 14.09.2019: staż naukowy, Laboratorium Neuropatologii Molekularnej,

Zakład Biochemii Instytutu Nauk Neurologicznych Blanchette Rockefeller, West Virginia University, Morgantown, USA

01.10.2021 do teraz: **adiunkt,** Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański



**[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 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

**[4a] Tytuł głównego osiągnięcia habilitacyjnego**

*Choroby jednogenowe - to bardziej skomplikowane. Wykorzystanie transkryptomiki i stymulacja procesu autofagii dla zrozumienia mechanizmu i potencjalnej terapii mukopolisacharydoz*

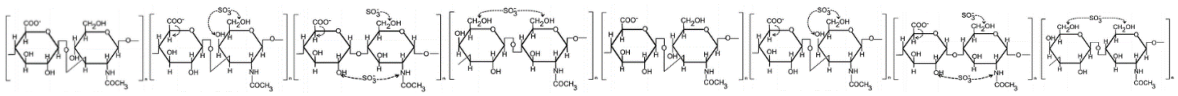
**[4b] Cykl publikacji wchodzący w skład głównego osiągnięcia habilitacyjnego**

1. Pierzynowska K, Deresz P, Węgrzyn G, **Gaffke L***. (2023) Dysregulation of genes coding for proteins involved in metabolic processes in mucopolysaccharidoses, evidenced by a transcriptomic approach. *Metab Brain Dis.* 38(6):2133-2144.

   $IF_{2022}$: **3.655**; MEiN: **70**; kwartyl: **Q2**; liczba cytowań: 0 (Scopus), 0 (WoS)
2. Cyske Z, **Gaffke L**, Pierzynowska K, Węgrzyn G. (2022) Complex Changes in the Efficiency of the Expression of Many Genes in Monogenic Diseases, Mucopolysaccharidoses, May Arise from Significant Disturbances in the Levels of Factors Involved in the Gene Expression Regulation Processes. *Genes (Basel).* 13(4):593.

   $IF_{2021}$: **4.141**; MEiN: **100**; kwartyl: **Q2**; liczba cytowań: 9 (Scopus), 8 (WoS)
3. **Gaffke L**, Pierzynowska K, Rintz E, Cyske Z, Giecewicz I, Węgrzyn G. (2021) Gene Expression-Related Changes in Morphologies of Organelles and Cellular Component Organization in Mucopolysaccharidoses. *Int J Mol Sci.* 22(5):2766.

   $IF_{2021}$: **6.208**; MEiN: **140**; kwartyl: **Q1**; liczba cytowań: 15 (Scopus), 15 (WoS)
4. **Gaffke L**, Pierzynowska K, Cyske Z, Podlacha M, Węgrzyn G. (2023) Contribution of vesicle trafficking dysregulation to the pathomechanism of mucopolysaccharidosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 665:107-117.



IF$_{2022}$: **3.322**; MEiN: **100**; kwartyl: **Q1**; liczba cytowań: 1 (Scopus), 1 (WoS)

5. **Gaffke L***, Rintz E, Pierzynowska K, Węgrzyn G. (2023) Actin Cytoskeleton Polymerization and Focal Adhesion as Important Factors in the Pathomechanism and Potential Targets of Mucopolysaccharidosis Treatment. *Cells*. 12(13):1782.

   IF$_{2021}$: **7.666**; MEiN: **140**; kwartyl: **Q1**; liczba cytowań: 0 (Scopus), 0 (WoS)

6. Cyske Z, **Gaffke L**, Pierzynowska K, Węgrzyn G. (2023) Tubulin Cytoskeleton in Neurodegenerative Diseases-not Only Primary Tubulinopathies. *Cell Mol Neurobiol*. 43(5):1867-1884.

   IF$_{2021}$: **5.046**; MEiN: **100**; kwartyl: **Q1**; liczba cytowań: 1 (Scopus), 1 (WoS)

7. **Gaffke L***, Firyn N, Rintz E, Pierzynowska K, Piotrowska E, Mazur-Marzec H, Węgrzyn G. (2023) Therapeutic potential of lithium chloride and valproic acid against neuronopathic types of mucopolysaccharidoses through induction of the autophagy process. *Arch Biochem Biophys*. 109754. doi: 10.1016/j.abb.2023.109754. Epub ahead of print.

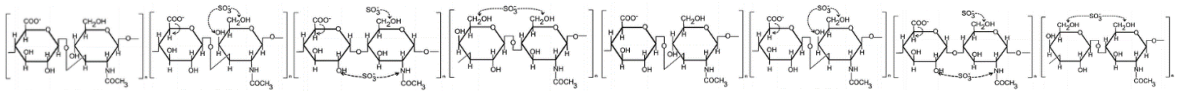
   IF$_{2022}$: **4.114**; MEiN: **140**; kwartyl: **Q1**; liczba cytowań: 0 (Scopus), 0 (WoS)

8. Rintz E, Podlacha M, Cyske Z, Pierzynowska K, Węgrzyn G, **Gaffke L*.** (2023) Activities of (Poly)phenolic Antioxidants and Other Natural Autophagy Modulators in the Treatment of Sanfilippo Disease: Remarkable Efficacy of Resveratrol in Cellular and Animal Models. *Neurotherapeutics*. 20(1):254-271.

   IF$_{2021}$: **7.62**; MEiN: **140**; kwartyl: **Q1**; liczba cytowań: 1 (Scopus), 1 (WoS)

*Autor korespondujący

Łączna wartość wskaźnika Impact Factor prac wchodzących w skład głównego osiągnięcia habilitacyjnego: **41.772**



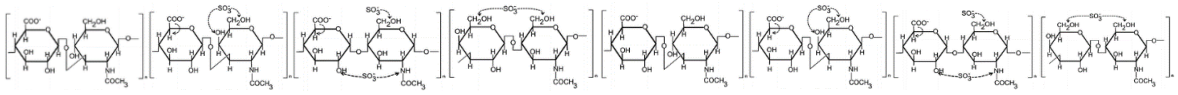
**[4c] Omówienie głównego osiągnięcia habilitacyjnego**

Choroby genetyczne stanowią jedne z największych wyzwań współczesnej medycyny. Okazuje się, że nawet wśród chorób jednogenowych, dokładne mechanizmy patogenezy tych schorzeń pozostają niejasne. Stanowi to z jednej strony dużą przeszkodę w prognozowaniu postępów choroby u pacjentów, a z drugiej w poszukiwaniu celów dla opracowywanych terapii.

Nasza świadomość na temat chorób rzadkich, do których zaliczymy mukopolisacharydozy (MPS), jest wciąż ograniczona. Niewątpliwie jest to związane z ograniczoną grupą pacjentów, co z kolei wpływa znacząco na zainteresowanie sponsorowaniem badań przez koncerny farmaceutyczne. Pierwsze objawy zwykle pojawiają się dopiero we wczesnym dzieciństwie. W połączeniu z dużą liczbą możliwych obrazów klinicznych, fakt ten stanowi poważny problem w zakresie diagnostyki. W wyniku tego aktualnie istnieje ograniczona pula opcji terapeutycznych. W przypadku MPS dochodzi do akumulacji w lizosomach glikozoaminoglikanów (GAG), które są długołańcuchowymi polisacharydami zaangażowanymi w różne procesy, takie jak adhezja komórek, sygnalizacja molekularna i inne.

Pierwotną przyczyną choroby, jedyną jak do niedawna sądzono, jest obecność mutacji w genach kodujących białka odpowiedzialne bezpośrednio lub pośrednio za degradację GAG. W konsekwencji dochodzi do ich nadmiernej akumulacji w różnych tkankach, co prowadzi do dysfunkcji wielu układów, w tym układu nerwowego i krążenia. Zmniejszona ruchomość stawów, niski wzrost, choroby serca, dysfunkcja szkieletu i zmętnienie rogówki są typowymi objawami u chorych. MPS są chorobami genetycznymi, dziedziczonymi w sposób autosomalny recesywny (wszystkie typy z wyjątkiem MPS II, który jest chorobą sprzężoną z chromosomem X). Istnieje 14 typów mukopolisacharydoz, sklasyfikowanych na podstawie braku lub nieprawidłowego działania określonego białka.

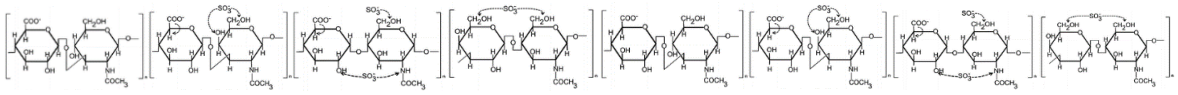
Głównym podejściem stosowanym dotychczas w terapiach jest zmniejszenie poziomu GAG w komórkach albo poprzez przywrócenie normalnej aktywności



enzymatycznej białek odpowiedzialnych za ich degradację, albo poprzez hamowanie ich syntezy w komórkach. Najczęściej stosowanymi metodami leczenia są (i) enzymatyczna terapia zastępcza, (ii) przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych (HSCT) oraz (iii) terapia genowa. Jednakże żadne z nich nie są w pełni skuteczne i zapewniają jedynie częściową poprawę. Mnogość zróżnicowania wobec pojawiających się objawów, nawet w obrębie poszczególnych typów choroby, a także brak poprawy po zastosowaniu terapii, świadczy o bardziej złożonym patomechanizmie MPS.

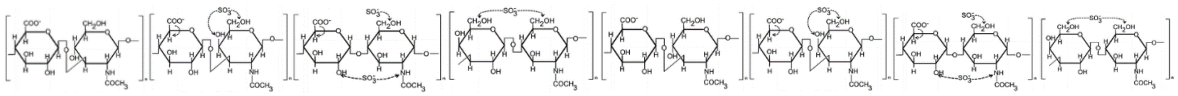
**W moich badaniach podjęłam się odnalezienia innych niż zaburzony metabolizm GAG procesów komórkowych, które mogą wpływać na patogenezę MPS.** Podczas realizacji pracy doktorskiej w doświadczeniach jako pierwsza na świecie, wykorzystałam linie komórkowe fibroblastów pobrane od pacjentów ze wszystkimi ówcześnie znanymi typami i podtypami MPS (wtedy było ich 11). Wykazałam, że ekspresja setek genów jest rozregulowana w komórkach MPS, co może znacząco wpływać na fizjologię komórek. Choć był to niewątpliwie przełomowy wynik, postanowiłam zgłębić temat. **W świetle uzyskanych przeze mnie rezultatów pojawiło się pytanie, czy nieprawidłowości metaboliczne obserwowane w komórkach MPS wynikają wyłącznie z pierwotnego magazynowania GAG, czy też zaburzona jest regulacja ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w różne procesy metaboliczne**?

Metabolizm komórkowy opiera się na wzajemnie powiązanej, złożonej sieci szlaków i reakcji biochemicznych, które przekształcają wybrane substraty w celu zaspokojenia potrzeb energetycznych komórki. Produkty tych przemian są niezbędne do utrzymania prawidłowych funkcji komórek, a także całego organizmu. Utrzymanie homeostazy wymaga skoordynowanego działania procesów, które są stale zaangażowane w degradację i syntezę nowych cząsteczek. Uważa się, że metabolizm, oprócz tego, że sam w sobie jest ściśle regulowany, pełni również rolę sygnalizacyjną. Pozwala komórkom skutecznie reagować na bodźce, w tym zmiany stężenia substratów. Wszelkie zakłócenia tej równowagi prowadzą do stanów



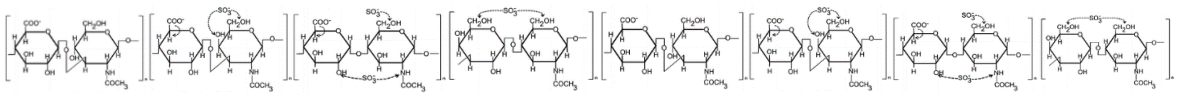
patologicznych i przyczyniają się do rozwoju chorób. Chociaż MPS są z definicji chorobami metabolicznymi, wszystkie możliwe nieprawidłowości związane z regulacją i przebiegiem tych procesów nadal nie są w pełni zrozumiałe. Istotnie badania metabolomiczne wykazały obecność poważnych nieprawidłowości metabolicznych wśród pacjentów z MPS III. Wady te obejmowały większość szlaków związanych między innymi z aminokwasami, lipidami, nukleotydami czy witaminami. Analizy transkryptomiczne przeprowadzone w pracy *Pierzynowska et al. (2023) Dysregulation of genes coding for proteins involved in metabolic processes in mucopolysaccharidoses, evidenced by a transcriptomic approach. Metab Brain Dis. 38(6):2133-2144* (**Publikacja nr 1**) wskazują, że dysregulacja wielu genów w komórkach MPS może znacząco przyczyniać się do globalnych zaburzeń metabolicznych. Dotyczy ona nie tylko metabolizmu GAG, czy wtórnego magazynowania sfingolipidów. Co więcej, silnie podwyższona ekspresja niektórych genów, takich jak *CD9* i *CLU*, może powodować niezależne zwiększenie obciążenia metabolicznego, prowadząc do zwiększonego nasilenia objawów, zwłaszcza tych związanych z neuropatologią. **Wnioskuję, że poważne zaburzenia metaboliczne obserwowane w komórkach MPS mogą częściowo wynikać ze zmian w ekspresji wielu genów kodujących białka zaangażowane w procesy metaboliczne.**

Skala zmian w ekspresji dużej frakcji genów nie może być wyjaśniona przez blokadę jednego szlaku biochemicznego. W pracy *Cyske et al. (2022) Complex Changes in the Efficiency of the Expression of Many Genes in Monogenic Diseases, Mucopolysaccharidoses, May Arise from Significant Disturbances in the Levels of Factors Involved in the Gene Expression Regulation Processes. Genes (Basel). 13(4):593* (**Publikacja nr 2**) wykazano, że produkcja białek kodujących geny zaangażowanych w regulację ekspresji wielu innych genów, u pacjentów z MPS, jest znacznie zaburzona. Chociaż 4-krotna zmiana została wybrana arbitralnie, na podstawie wcześniejszych badań można wskazać, że jest to poziom zmiany wykazujący znaczącą i jednoznaczną zmianę ekspresji, która może wpływać na funkcje komórkowe. Zidentyfikowano zmiany w przypadku 28 genów



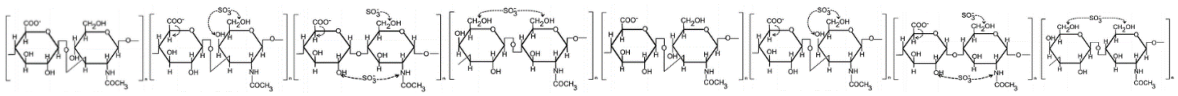
odpowiedzialnych za: transdukcję sygnału (np, *NOTCH3*), inicjację transkrypcji (np. *HOXC9*), splicing (np. *SRSF10*), degradację RNA (np. *EXOSC9*) czy translację (np. *RPL23*). Aby dokładniej zbadać ekspresję wybranych genów, zmierzono poziomy ich produktów. Co ciekawe, zmiany te nie były w żaden sposób kompatybilne, tj. w niektórych przypadkach kierunki zmian (regulacja w górę lub w dół) w poziomie transkryptów były przeciwne do tych w poziomach białek. Zatem w przypadku tych genów regulacja ich ekspresji przebiega zarówno na etapie transkrypcyjnym, jak i potranskrypcyjnym, być może obejmując również kontrolę translacji. Wcześniej wskazano, że mutacje genów, które zostały szczegółowo przeanalizowane w MPS i wykazały wysoki poziom zmian w ekspresji, prowadzą do rozwoju różnych chorób, których objawy przypominają te obserwowane w MPS. Mianowicie, dysfunkcja *EXOSC9* prowadzi do choroby neurodegeneracyjnej, hipoplazji móżdżku typu 1b, a neurodegeneracja występuje w większości typów MPS. Można zatem założyć, że obniżony poziom EXOSC9 może przyczyniać się do procesów neurodegeneracyjnych u pacjentów z MPS. Mutacje w genie *NOTCH3* powodują różne nieprawidłowości, w tym arteriopatię i leukoencefalopatię, które występują również (w różnym stopniu) w MPS, co sugeruje, że regulacja ekspresji tego genu może również być związana z objawami MPS.

**Z punktu widzenia rozwoju skutecznych terapii MPS niezwykle ważnym było sprawdzenie czy usunięcie złogów GAG, skutkuje normalizacją wykrytych zmian.** Wykorzystanie genisteiny (cząsteczki upośledzającej wydajność syntezy GAG) skorygowało poziom pierwotnie zmienionych białek, ale nie we wszystkich przypadkach. Zmiany te mogą być bardziej stabilne niż oczekiwano i nie muszą być znormalizowane, nawet jeśli pierwotny defekt metaboliczny zostanie odwrócony. Uzyskane wyniki mogą częściowo wyjaśnić niepowodzenie w odwróceniu wszystkich objawów MPS za pomocą obecnie stosowanych metod terapeutycznych. Dodatkowo normalizacja poziomu GAG za pomocą rekombinowanych ludzkich enzymów specyficznych dla różnych typów MPS poprawiła morfologię niektórych, ale nie wszystkich, organelli. Wiedząc, że struktury organelli komórkowych ulegają



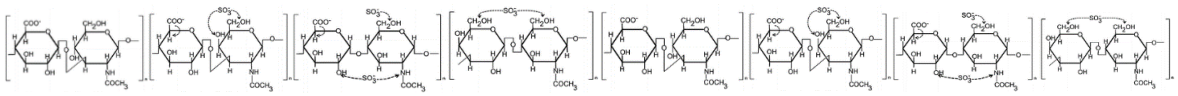
zmianom w MPS, w pracy *Gaffke et al. (2021) Gene Expression-Related Changes in Morphologies of Organelles and Cellular Component Organization in Mucopolysaccharidoses. Int J Mol Sci. 22(5):2766* (**Publikacja nr 3**) sprawdziłam, czy zmiany te mogą być spowodowane przez rozregulowanie genów związanych z ich tworzeniem i funkcjami. W celu weryfikacji tej hipotezy badawczej przeprowadziłam badania transkryptomiczne i mikroskopowe, którym towarzyszyło biochemiczne oznaczenie poziomu GAG i analizy Western-blotting. Z użyciem mikroskopii elektronowej poddano ocenie morfologię lizosomów, jąder komórkowych, mitochondriów, aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej. Zaobserwowano zmiany we większości typów MPS, podczas gdy niektóre były specyficzne dla poszczególnych typów/podtypów. **Sugeruje to, że poważne zmiany w organellach w komórkach MPS mogą wynikać z rozregulowania ekspresji szeregu genów zaangażowanych w strukturę i funkcję organelli**

Możemy rozważyć scenariusz, w którym zmiany struktury, a następnie funkcji organelli (innych niż lizosomy), które są zmienione ze względu na akumulację GAG w MPS, są spowodowane przez rozregulowanie ekspresji genów. Przykładowo białko kodowane przez *SAR1A* jest zaangażowane w kontrolę transportu między retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego i może wpływać na strukturę i funkcję tych organelli. Wykazano obniżoną ekspresję tego genu w zdecydowanej większości linii MPS, a znaczące zmiany w aparacie Golgiego i retikulum endoplazmatycznym były widoczne w kilku typach MPS. Komunikacja między mitochondriami i cytoplazmą, która wpływa na strukturę i funkcje mitochondriów, odbywa się między innymi poprzez regulację fosforu. Jednym z białek zaangażowanych w tę regulację jest białko wiążące SH35 (SH3BP5), a zmiany w ekspresji odpowiedzialnego genu dotyczą wszystkich badanych linii komórkowych. Znaczące zmiany w morfologii mitochondriów wystąpiły u większości pacjentów z MPS. Po zastosowaniu terapii z użyciem odpowiednich enzymów, zaobserwowano poprawę morfologii lizosomów, mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego.



Stosunkowo niedawno opisano nowo zidentyfikowaną chorobę i sklasyfikowano jako zespół MPS-plus (MPS-PS). Pomimo normalnych funkcji enzymów lizosomalnych, GAG są gromadzone w komórkach MPS-PS, a mutacja w genie *VPS33A* została uznana jako przyczyna tej choroby. Nasuwa się pytanie, w jaki sposób GAG może gromadzić się w komórkach bez upośledzenia enzymów je degradujących? Analizy wykonane w pracy *Gaffke et al. (2023) Contribution of vesicle trafficking dysregulation to the pathomechanism of mucopolysaccharidosis. Biochem Biophys Res Commun. 665:107-117* (**Publikacja nr 4**), wskazują, iż **zmiany w transporcie pęcherzykowym mogą w znacznym stopniu przyczyniać się do mechanizmu zwiększonej akumulacji GAG w komórkach MPS.** W tym świetle intrygujące jest to, że białko kodowane przez *VPS33A* jest zaangażowane w tworzenie kompleksu sortującego białka wakuoli, biorąc udział w transporcie pęcherzykowym. Dlatego też, jeśli transport pęcherzykowy jest upośledzony w MPS-PS, wówczas dostarczanie GAG do lizosomów może być nieefektywne, co skutkuje nieskuteczną degradacją tych związków. Chociaż stwierdzono, że specyficzny patogenny wariant *VPS33A* (c.1492C > T; p.Arg498Trp) nie powodował upośledzenia transportu wewnątrzkomórkowego, taki wniosek opierał się jedynie na kolokalizacji siarczanu heparanu (jednego z GAG) z enzymami lizosomalnymi i błonami oraz na normalnych poziomach filipiny. Nie wyklucza to występowania GAG w cytoplazmie, a poziomy filipiny nie determinują normalnego ich transportu. Dlatego hipoteza o zaangażowaniu wadliwego transportu GAG (prowadzącego pośrednio do ich akumulacji) w komórkach MPS-PS i MPS-PS-podobnych w mechanizmie tych chorób jest nadal możliwa.

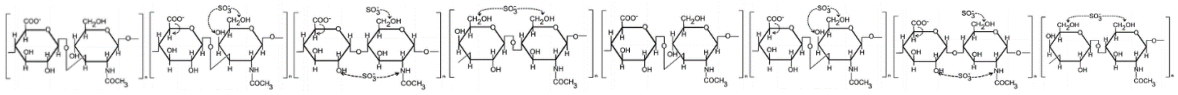
Najprawdopodobniej pierwotne magazynowanie GAG może powodować stres komórkowy prowadząc do rozregulowania ekspresji wielu genów, co z kolei skutkuje zmianami w procesach komórkowych, takich jak transport pęcherzyków. Co ważne, w komórkach MPS, akumulacja GAG występuje nie tylko w lizosomach, ale także w cytoplazmie i na zewnątrz komórek. W rzeczywistości cytozolowe i zewnątrzkomórkowe GAG, gdy są obecne na podwyższonym poziomie, mogą



bezpośrednio oddziaływać z różnymi białkami, w tym z receptorami komórkowymi, powodując ich agregację. Odnotowano obniżony poziom kaweoliny w komórkach MPS z powodu zaburzonej ekspresji genu *CAV1*. W związku z tym transport pęcherzykowy, w którym pośredniczy kaweolina, jest prawdopodobnie upośledzony. Dodatkowo wykryłam podwyższony poziom klatryny w komórkach pacjentów i tkankach myszy z MPS I, który w warunkach enzymatycznej terapii zastępczej in vitro (w MPS I i II), a także w obecności genisteiny (w MPS I, II, IIIA i IVA), uległ obniżeniu. **Wyniki te sugerują, że zniesienie pierwotnego defektu biochemicznego (akumulacja GAG) w komórkach MPS może zmniejszyć stres komórkowy, prowadząc do normalizacji poziomów klatryny w warunkach, w których specyficzna odpowiedź obronna nie jest już wymagana.**

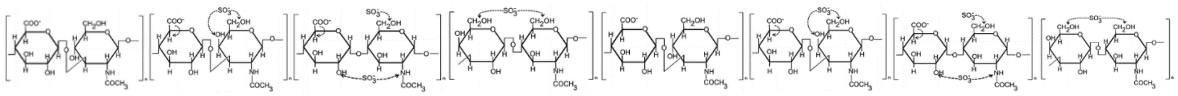
Z transportem nierozerwalnie związany jest cytoszkielet komórkowy. W komórkach neuronalnych naprzemienna polimeryzacja i depolimeryzacja mikrofilamentów zachodzi okresowo, co wymaga obecności ATP. Filamenty aktynowe umożliwiają ruchy organelli, a także całej komórki. Ponadto mogą one wpływać na jej kształt i dostosowywać się do struktury zewnętrznej. Cytoszkielet aktyny jest niezbędny do wewnątrzkomórkowego transportu określonych cząsteczek. Inną ważną rolą mikrofilamentów jest udział w formowaniu, wzmacnianiu i dojrzewaniu kolców dendrytycznych, występujących w dendrytach neuronów. Kolce dendrytyczne mają wiele receptorów i białek sygnalizacyjnych związanych z częścią presynaptyczną aksonu. Podczas zmian w strukturze synaps, które zachodzą podczas uczenia się lub starzenia, tworzenie się kolców dendrytycznych ulega modyfikacji.

Nieprawidłowości w aktynowym cytoszkielecie zostały powiązane z wieloma chorobami, np. stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS), chorobą Friedreicha, chorobą Huntingtona (HD), chorobą Alzheimera (AD), a nawet chorobą prionową. Dotychczasowe badania dotyczące polimeryzacji cytoszkieletu aktyny i ogniskowej adhezji w MPS są nieliczne, dotyczą pojedynczego podtypu choroby. Celem mojej kolejnej pracy ***Gaffke et al. (2023) Actin Cytoskeleton Polymerization and Focal***

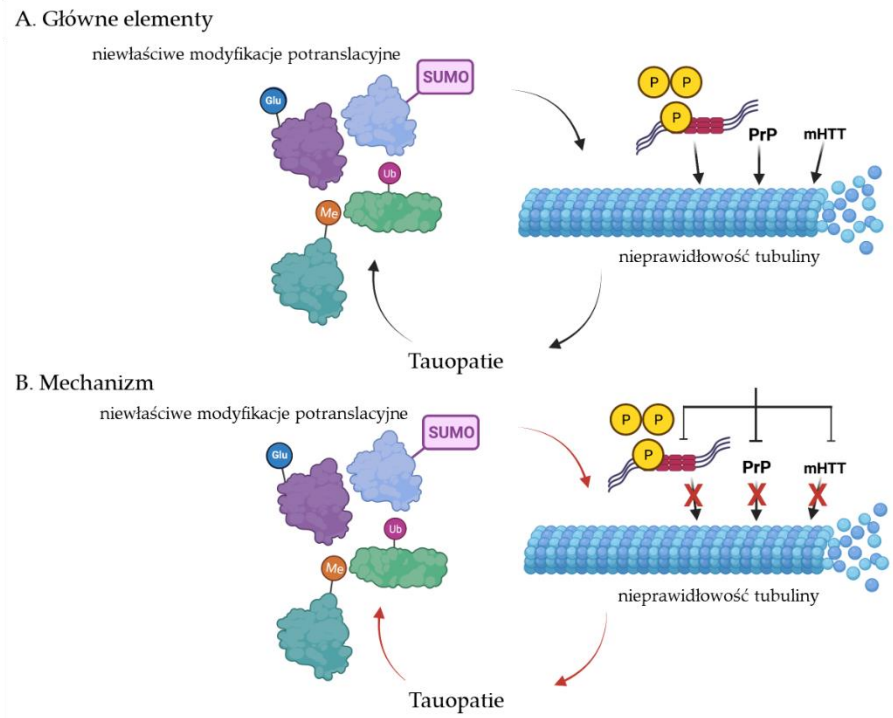


*Adhesion as Important Factors in the Pathomechanism and Potential Targets of Mucopolysaccharidosis Treatment. Cells. 12(13):1782* była ocena zmian, które zachodzą w cytoszkielecie aktynowym i ogniskowej adhezji w komórkach pacjentów oraz na modelu mysim, oraz sprawdzenie, czy mogą one stanowić potencjalny cel terapeutyczny dla różnych typów MPS (**Publikacja nr 5**). Zaobserwowano znaczące zmiany w ekspresji genów i poziomie białek związanych z cytoszkieletem aktynowym i adhezją ogniskową. Przykładami genów o podwyższonej ekspresji są geny kodujące profilinę (PFN1), która odgrywa ważną rolę w dynamice aktyny poprzez regulację polimeryzacji aktyny w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe, oraz białko CAPG, które przyczynia się do kontroli ruchliwości opartej na aktynie w komórkach mięśniowych. Co ważne, wyniki te zostały potwierdzone przez badania z wykorzystaniem modelu mysiego MPS I. Zaobserwowane defekty można było częściowo skorygować poprzez zastosowanie aktywnej formy dysfunkcyjnego enzymu lub zmniejszenie syntezy GAG w wyniku leczenia genisteiną. Wskazuje to, że polimeryzacja cytoszkieletu aktyny i ogniskowa adhezja mogą być uważane za potencjalne cele terapeutyczne. Z drugiej strony, tylko częściowa poprawa sugeruje, że warto rozważyć opcję terapii kombinowanej, uwzględniającej zarówno znormalizowanie poziomu GAG, jak i korektę nieprawidłowości cytoszkieletu. **Wyniki te rzuciły nowe światło na zrozumienie patomechanizmu choroby, która do niedawna była uważana za znacznie mniej skomplikowaną. Poszerzyły one również zakres potencjalnych opcji terapeutycznych.**

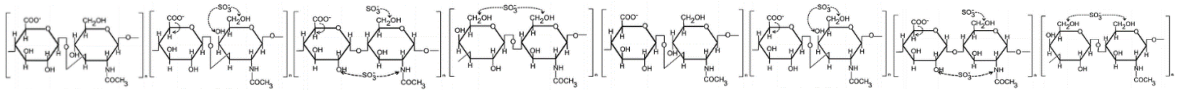
Zaburzenia cytoszkieletu tubulinowego są również często obserwowane w różnych chorobach neurodegeneracyjnych. Jak podsumowano w pracy *Cyske et al. (2023) Tubulin Cytoskeleton in Neurodegenerative Diseases-not Only Primary Tubulinopathies. Cell Mol Neurobiol. 43(5):1867-1884* (**Publikacja nr 6**), należą do nich zarówno pierwotne tubulinopatie neurodegeneracyjne (spowodowane mutacjami w genach kodujących elementy mikrotubul, takie jak *TUBA4A*, *TUBB2A* i *TUBB3*), jak i zaburzenia spowodowane różnymi patogennymi interakcjami między różnymi związkami a cytoszkieletem. Takie dysfunkcje obserwuje się zwłaszcza



w ALS, AD, HD, chorobie Parkinsona (PD), i chorobach prionowych. Dysregulacja genów kodujących białka zaangażowane w strukturę i funkcje cytoszkieletu została opisana w MPS. Co ważne, podczas neurodegeneracji zmiany w mikrotubulach odnotowano zarówno w neuronach, jak i komórkach glejowych. Zrozumienie zasad molekularnych mechanizmów zaburzeń mikrotubul w tych chorobach prowadzi do wniosku, że ich korekta może złagodzić progres choroby. W rezultacie, znalezienie nowych celów molekularnych dla potencjalnych leków może stać się możliwe w niedalekiej przyszłości. Szczególnie interesujące są defekty mikrotubul spowodowane albo niewłaściwymi modyfikacjami potranslacyjnymi cząsteczek tubuliny, które skutkują wadliwym transportem wewnątrzkomórkowym, albo P-tau i innymi patogennymi białkami, takimi jak toksyczne formy PrP i huntingtyny, które z kolei nasilają tauopatię. Przerwanie takiej patogennej spirali (**Rycina 1**) może być atrakcyjną opcją terapeutyczną, a ostatnie eksperymenty na komórkowych i zwierzęcych modelach (HD i AD) sugerują, że takie podejście może być skuteczne w korygowaniu fenotypów dotkniętych komórek i organizmów.



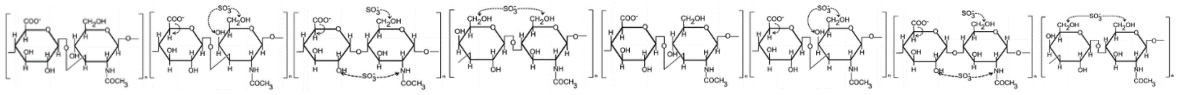

**Rycina 1.** Główne elementy patogennej spirali wpływającej na mikrotubule w różnych chorobach neurodegeneracyjnych (A) oraz potencjalne podejścia terapeutyczne przerywające taką spiralę i przywracające homeostazę cytoszkieletu (B). Hiperfosforylowane białko tau (P-tau), białko prionowe (PrP) lub zmutowana huntingtyna (mHTT) mogą powodować



nieprawidłowości tubuliny, co z kolei nasila tauopatię. Proces ten jest dodatkowo stymulowany przez niewłaściwe potranslacyjne modyfikacje tubuliny (tyrozynazacja, acetylacja, poliglutamylacja i SUMOylacja wydają się być najważniejszymi modyfikacjami tubuliny). W ten sposób powstaje patogenna spirala (A). Aby przerwać tę spiralę i przywrócić homeostazę cytoszkieletu, można zaproponować usunięcie P-tau, PrP lub mHTT, na przykład poprzez stymulację procesu autofagii. Na podstawie *Cyske et al. (2022)*, jednej z prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

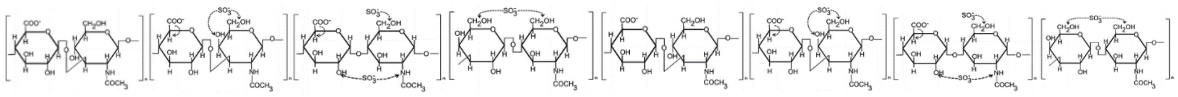
Jednym ze sposobów przerwania patogennej spirali jest indukcja procesu autofagii. Autofagia, jako wysoce konserwatywny proces, we wszystkich komórkach eukariotycznych, funkcjonuje na niskim poziomie i aktywowana jest głównie przez działanie różnych czynników zewnętrznych. Stymulacja autofagii została zaproponowana jako obiecująca strategia terapeutyczna w chorobach neurodegeneracyjnych związanych z agregacją białek (takich jak HD, AD, PD), ponieważ stymulowane usuwanie tych toksycznych struktur może przywrócić homeostazę komórkową. **Nasuwa się pytanie czy wykorzystując stymulację procesu, można usunąć również inne złogi, w tym GAG?** Hipotezę tę zweryfikowałam realizując przez ostatnie 3 lata grant Preludium Narodowego Centrum Nauki, którego byłam kierownikiem. Przetestowałam szereg naturalnych induktorów autofagii pod kątem efektywności degradacji GAG w komórkach pacjentów z MPS (**Publikacja 7 i 8**). Najnowsze doniesienia w temacie obejmowały wykorzystanie fluoksetyny do aktywacji autofagii poprzez mechanizm zależny od TFEB w mysim modelu MPS IIIA czy modulację aktywności mTOR w modelu *Drosophila* MPS VII.

Enzymatyczna terapia zastępcza nie jest w stanie skorygować objawów ze strony centralnego układu nerwowego. Dlatego też poszukiwanie niskocząsteczkowych związków, zdolnych przekroczyć barierę krew-mózg, jest niezwykle ważne dla neuronopatycznych form MPS. Badania nad wykorzystaniem różnych form litu czy kwasu walproinowego są udokumentowane dla szeregu zaburzeń: HD, AD, PD czy ALS. Co ciekawe węglan litu jest stosowany w leczeniu nawracających zaburzeń afektywnych. Niektórzy pacjenci otrzymywali lek przez okres do 20 lat z minimalnymi działaniami niepożądanymi. Walproinian jest powszechnie stosowanym lekiem przeciwpadaczkowym w leczeniu napadów



uogólnionych i częściowych. Jest bezpieczny do stosowania zarówno u dorosłych, jak i u dzieci w wieku powyżej trzech lat. Kwas walproinowy (VPA) wykazuje kilka mechanizmów działania, obejmują one hamowanie deacetylazy histonowej, działanie przeciwzapalne i właściwości neuroprotekcyjne. Może również działać poprzez indukcję autofagii. Podobnie chlorek litu (LiCl), może wywierać działanie terapeutyczne w stanach neurodegeneracyjnych, poprzez neuroprotekcję, właściwości przeciwzapalne i modulację autofagii. W pracy *Gaffke et al. (2023) Therapeutic potential of lithium chloride and valproic acid against neuronopathic types of mucopolysaccharidoses through induction of the autophagy process. Arch Biochem Biophys. 109754. doi: 10.1016/j.abb.2023.109754.* **(Publikacja nr 7**) zauważyłam zwiększoną biogenezę lizosomów oraz zmiany w poziomach białek markerowych, a mianowicie zmniejszony poziom p62 i fosfo-TFEB (Ser122) oraz zwiększony poziom LC3-II. Oznaczenia poziomu siarczanu heparanu potwierdzono także za pomocą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas. **Oba badane związki (VPA i LiCl) są skuteczne w obniżaniu poziomu GAG, co jest związane ze stymulacją procesu autofagii. Wraz z innymi niedawnymi doniesieniami wskazuje to, że stymulacja autofagii może być uważana za obiecującą opcję terapeutyczną dla neuronopatycznych postaci MPS.**

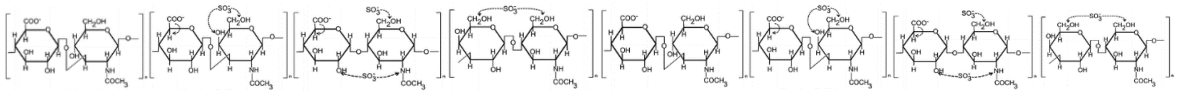
Niestety, większość silnych egzogennych aktywatorów autofagii jest szkodliwa dla komórek, gdy jest stosowana przez długi czas, dlatego nie są one odpowiednimi kandydatami do leczenia chorób genetycznych. Dlatego skupiono się na naturalnych związkach, które są bezpieczne dla pacjentów do długotrwałego stosowania i które skutecznie stymulują autofagię. W pracy *Rintz et al. (2023) Activities of (Poly)phenolic Antioxidants and Other Natural Autophagy Modulators in the Treatment of Sanfilippo Disease: Remarkable Efficacy of Resveratrol in Cellular and Animal Models. Neurotherapeutics. 20(1):254-271* (**Publikacja 8**) przetestowano szereg związków: kapsaicynę, kurkuminę, resweratrol, kalcytriol oraz trehalozę. Najbardziej obiecujący z kandydatów - resweratrol został wytypowany do dalszych badań, już na modelu mysim (MPS IIIB). Poziomy GAG w moczu zostały



znormalizowane u myszy z MPS IIIB leczonych związkiem w dawce 50 mg/kg/dzień przez 12 tygodni lub dłużej. Testy behawioralne wykazały całkowitą korektę nadpobudliwości i lęku u tych zwierząt. Analizy biochemiczne wykazały, że podawanie resweratrolu powodowało stymulację autofagii poprzez szlak niezależny od kinazy mTOR w tkankach myszy z MPS IIIB. **Wyniki te wskazują na potencjalne zastosowanie resweratrolu (i prawdopodobnie innych stymulatorów autofagii) w leczeniu choroby Sanfilippo.** Co ciekawe obiecujące wyniki uzyskano dla innych lizosomalnych chorób spichrzeniowych (do których zaliczamy MPS) - w chorobie Battena, Gaucher'a czy Pompego. Jednakże w tych przypadkach mechanizm działania pozostaje niejasny lub autorzy wskazują na właściwości przeciwutleniające resweratrolu. Neuroprotekcyjne właściwości resweratrolu zostały potwierdzone w modelach AD, gdzie wykazano, że poprawia on procesy pamięciowe, a także zwiększa przeżywalność komórek poprzez stymulację komórek pamięci. Podsumowując, działanie resweratrolu, podobnie zresztą jak pozostałych induktorów autofagii, może być różne w różnych lizosomalnych chorobach spichrzeniowych i jest to temat warty dalszej eksploracji.

Uzyskane przeze mnie wyniki badań przedstawione w ramach mojego osiągnięcia habilitacyjnego wykonywane były w ramach realizacji 2 projektów grantowych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki:

- Opus 13 „Zmiany w procesach komórkowych jako kluczowe defekty w patogenezie dziedzicznych chorób metabolicznych z grupy mukopolisacharydoz" - główny wykonawca (kierownik projektu: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn)
- Preludium 15 „Stymulacja różnych szlaków indukcji autofagii w aspekcie efektywności degradacji glikozoaminoglikanów w neuronopatycznych typach mukopolisacharydoz" - kierownik projektu

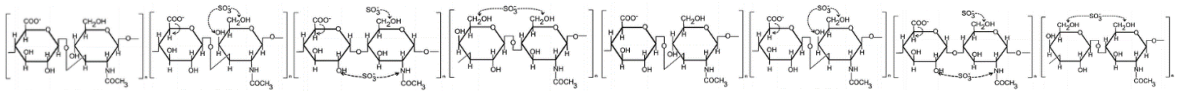


**Podsumowanie**

Badania, które wykonałam w ciągu ostatnich 2 lat (na przełomie 2021-2023), z których składa się moje osiągnięcie habilitacyjne, wskazują, że:

- poważne zaburzenia metaboliczne obserwowane w komórkach MPS mogą częściowo wynikać ze zmian w ekspresji wielu genów kodujących białka zaangażowane w procesy metaboliczne;
- produkcja białek kodowanych przez geny zaangażowane w regulację ekspresji wielu innych genów, u pacjentów z MPS, jest znacznie zaburzona – dotyczy to m.in. białek odpowiedzialnych za transdukcję sygnału (*NOTCH3*), inicjację transkrypcji (*HOXC9*), splicing (*SRSF10*), degradację RNA (*EXOSC9*) i translację (*RPL23*);
- zmiany w organellach w komórkach MPS mogą wynikać z rozregulowania ekspresji szeregu genów zaangażowanych w strukturę i funkcję organelli;
- zmiany w transporcie pęcherzykowym mogą w znacznym stopniu przyczyniać się do mechanizmu zwiększonej akumulacji GAG w komórkach MPS;
- istnieją znaczące zmiany w ekspresji genów i poziomach białek związanych z cytoszkieletem aktynowym i adhezją ogniskową;
- zastosowanie chlorku litu, kwasu walproinowego czy resweratrolu prowadzi do indukcji procesu autofagii i może być skuteczne w leczeniu MPS.

Wszystkie wykryte przeze mnie zmiany stanowią z jednej strony dodatkowy element patogenezy MPS, a z drugiej wykazują silny potencjał jako cele terapeutyczne. Jednakże warto pamiętać, że uzyskiwano częściową korekcję, co może wskazywać na konieczność zastosowania terapii łączonej, wykorzystującej eliminację GAG wraz z wpływem na dodatkowe elementy (np. zaburzenie cytoszkieletu aktyny). Alternatywnie można wykorzystać stymulację procesu autofagii, który jak potwierdziłam, może być z powodzeniem wykorzystany do usuwania złogów GAG u pacjentów.

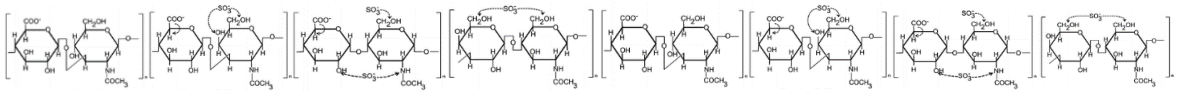


**[4d] Pozostałe osiągnięcia naukowe**

Kandydat do stopnia doktora habilitowanego powinien wykazać się więcej niż jednym osiągnięciem naukowym (art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. 2018 poz. 1668, z późniejszymi zmianami), dlatego chciałabym przedstawić moje pozostałe osiągnięcia naukowe. Generalnie można je podzielić na **dwa główne nurty eksperymentalne: badania mikrobiologiczne** (powiązanie procesu replikacji DNA z metabolizmem komórkowym i wykorzystanie bakteriofagów) oraz **badania na organizmach eukariotycznych** (poszukiwanie nowych elementów patogenezy oraz strategii terapeutycznych dla chorób neurodegeneracyjnych).

Już na drugim roku studiów (kierunek Biologia na Uniwersytecie Gdańskim) wiedziałam, że swoją przyszłość pragnę związać z badaniami molekularnymi. Udałam się wówczas do prof. dr hab. Tadeusza Kaczorowskiego w sprawie możliwości nauki pracy laboratoryjnej. Pomimo braku istnienia koła naukowego, zostałam zaangażowana w aktualne prace Katedry Mikrobiologii. Pod opieką ówczesnej doktorantki mgr inż. Aleksandry Stefańskiej zapoznałam się z podstawowymi technikami laboratoryjnymi: metodami hodowlanymi, elektroforezą, standardowym klonowaniem DNA czy oczyszczaniem białek z użyciem chromatografii powinowactwa. Wszystkie z powyższych metod zastosowałam z powodzeniem podczas realizacji pracy magisterskiej „Zastosowanie białek biorących udział w procesie rekombinacji homologicznej *Pyrococcus wosei* do optymalizacji układów simplex i multiplex PCR", którą wykonywałam w ramach realizacji projektu "Exgenome molecular enzymes" (*7 **Program Ramowy Unii Europejskiej***) (**Publikacja I**).

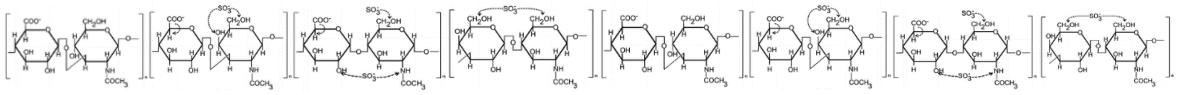
Podczas studiów doktoranckich, z przyczyn ode mnie niezależnych, pracowałam w 3 różnych grupach badawczych. Doświadczenie to nie wpłynęło negatywnie na efektywność mojej pracy, wręcz przeciwnie, z każdej współpracy wyniosłam nowe umiejętności, które dodatkowo owocowały publikacjami naukowymi. W zespole dr Moniki Glinkowskiej (obecnie dr hab.) doskonaliłam



warsztat hodowlany, nabyłam kolejne kompetencje w postaci umiejętności izolacji RNA i oceny jego jakości do badań transkryptomicznych. Wykazaliśmy, że zmiany w komórce, związane z zaburzeniem różnych enzymów metabolizmu, wpływają na kontrolę inicjacji replikacji (**Publikacja II**). Ponadto wraz z dr Moniką Maciąg-Dorszyńską odkryliśmy, że różne metabolity mogą tłumić wpływ mutacji w różnych genach replikacji *Escherichia coli* na wzrost bakterii czy morfologię komórek. Stanowi to dowód na to, że w powiązaniu centralnego metabolizmu węgla z replikacją pośredniczą metabolity, a nie bezpośrednie interakcje białko-białko (**Publikacja III**). W tamtym czasie byłam wykonawcą 2 grantów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (***Harmonia 2***: *Korelacja pomiędzy kontrolą replikacji chromosomu Escherichia coli a stanem fizjologicznym komórek bakterii*; 2012/04/M/NZ2/00122 - kierownik prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn; ***Preludium 3***: *Analiza zależności między replikacją DNA, centralnym metabolizmem węgla oraz cyklem komórkowym u Escherichia coli*; 2012/05/N/NZ1/00535 - kierownik dr Monika Maciąg-Dorszyńska). **Wystąpienie *„An interplay between central carbon metabolism and DNA replication control"* zostało uhonorowane wyróżnieniem** na konferencji Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki.

W drugim zespole badawczym doskonaliłam umiejętność konstruowania mutantów. Stworzyłam ich kilkanaście oraz moje eksperymenty stanowiły wyniki wstępne do złożenia wniosku grantowego (***Sonata 12***: *Molekularne mechanizmy wzajemnej korelacji procesów odpowiedzi stresowych, replikacji DNA i metabolizmu u Escherichia coli*; 2016/23/D/NZ1/02601 - kierownik dr Monika Maciąg-Dorszyńska). Część wyników została przedstawiona w **Publikacji nr III**. Dodatkowo izolowałam DNA w różnych warunkach hodowlanych i przeprowadzałam analizy ilościowego PCR w czasie rzeczywistym do oceny statusu replikacji DNA (stosunek *origin/terminus*) w mutantach replikacyjnych, metabolicznych i replikacyjno-metabolicznych.

I. Stefanska A, **Gaffke L**, Kaczorowska AK, Plotka M, Dabrowski S, Kaczorowski T. (2016) Highly thermostable RadA protein from the archaeon



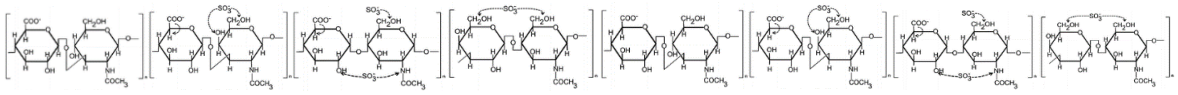
Pyrococcus woesei enhances specificity of simplex and multiplex PCR assays. *J Appl Genet.* 57(2):239-249.

II. Tymecka-Mulik J, Boss L, Maciąg-Dorszyńska M, Matias Rodrigues JF, **Gaffke L**, Wosinski A, Cech GM, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G, Glinkowska M. (2017) Suppression of the Escherichia coli dnaA46 mutation by changes in the activities of the pyruvate-acetate node links DNA replication regulation to central carbon metabolism. *PLoS One*. 12(4):e0176050.

III. Krause K, Maciąg-Dorszyńska M, Wosinski A, **Gaffke L**, Morcinek-Orłowska J, Rintz E, Bielańska P, Szalewska-Pałasz A, Muskhelishvili G, Węgrzyn G. (2020) The Role of Metabolites in the Link between DNA Replication and Central Carbon Metabolism in Escherichia coli. *Genes (Basel).*11(4):447.

Warto nadmienić, że nie wszystkie publikacje powstały w okresie, kiedy byłam integralną częścią danego zespołu. Oczyszczałam białko, które uległo degradacji, będąc już doktorantką I roku studiów doktoranckich. Wykorzystałam wtedy nowe podejście, współpracując ściśle z dr Michałem Miętusem, specjalistą w zakresie oczyszczania białek. Natomiast doświadczenia do pracy z 2020 roku wykonywałam na IV roku studiów doktoranckich.

Wreszcie trafiłam do grupy prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna poszukującej markerów chorobowych i potencjalnych terapii na różne choroby genetyczne, ze szczególnym uwzględnieniem chorób neurodegeneracyjnych. Zmiana modelu badawczego niejako 'zmusiła mnie' do przyswojenia kolejnych umiejętności i rozpoczęcia realizacji pracy doktorskiej od nowa, na III roku studiów doktoranckich. Wyniki badań, przeprowadzonych na modelach dwóch chorób, AD (**Publikacja IV**) i HD (**Publikacja V i VI**), wyraźnie wskazały na obniżenie poziomu nagromadzonych toksycznych form białek. Ponadto testy behawioralne wykazały, że chore zwierzęta leczone genisteiną są nie do odróżnienia od zwierząt zdrowych. Badania te wskazują



na genisteinę jako potencjalny lek poprzez stymulację procesu autofagii (**Publikacja VII i VIII**).

IV. Pierzynowska K, Podlacha M, **Gaffke L**, Majkutewicz I, Mantej J, Węgrzyn A, Osiadły M, Myślińska D, Węgrzyn G. (2019) Autophagy-dependent mechanism of genistein-mediated elimination of behavioral and biochemical defects in the rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 148:332-346.

V. Pierzynowska K, **Gaffke L**, Cyske Z, Węgrzyn G. (2019) Genistein induces degradation of mutant huntingtin in fibroblasts from Huntington's disease patients. *Metabolic Brain Disease*, 34:715–720.

VI. Pierzynowska K, **Gaffke L**, Hać A, Mantej J, Niedziałek N, Brokowska J, Węgrzyn G. (2018) Correction of Huntington's disease phenotype by genistein-induced autophagy in the cellular model. *Neuromolecular Medicine*. 20:112-123.

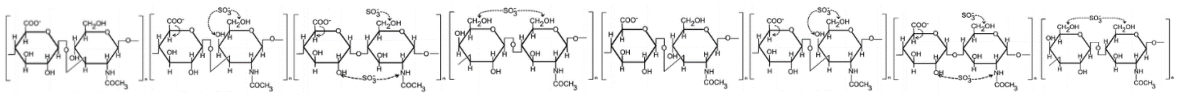
VII. Pierzynowska K, **Gaffke L**, Cyske Z, Michał Puchalski, Estera Rintz, Michał Bartkowski, Marta Osiadły, Michał Pierzynowski, Jagoda Mantej, Ewa Piotrowska, Węgrzyn G. (2018) Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. Metabolic Brain Disease. 33:989-1008.

VIII. Pierzynowska K, **Gaffke L**, Podlacha M, Brokowska J, Węgrzyn G. (2020) Mucopolysaccharidosis and autophagy: controversies on the contribution of the process to the pathogenesis and possible therapeutic applications. *Neuromolecular Medicine*. 22:25-30.

Efektem prowadzonych badań naukowych w tej tematyce jest patent przyznany przez Urząd Patentowy RP.

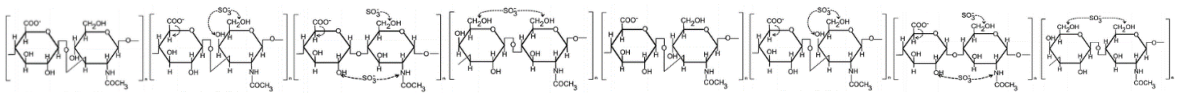
Dane patentu:

Węgrzyn G, **Gaffke L**, Pierzynowska K, Podlacha M, Myślińska D, Majkutewicz I (2021) Genisteina do zastosowania do leczenia choroby Alzheimera (ang. Genistein and its composition to be used in treatment of Alzheimer disease)



numer patentu: 237739, data udzielenia prawa: 17 maja 2021 r.

Po zapoznaniu z podstawowymi technikami pracy wykorzystywanymi w laboratorium komórkowym - hodowle komórkowe, testy żywotności, Western-blotting, czy wyciszanie ekspresji genów, mój warsztat eksperymentalny umożliwił mi realizację kolejnych projektów naukowych. Dodatkowo czerpałam ze zdobytych już umiejętności - opracowałam metody izolacji odpowiedniej jakości RNA do badań transkryptomicznych, z komórek eukariotycznych, roślin (w ramach wykonania ekspertyzy dla Ministerstwa Klimatu i Środowiska) czy tkanek zwierzęcych. Wykorzystałam tę wiedzę do przygotowania prób i analiz poziomu ekspresji genów. Jako główny wykonawca projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (***OPUS 13****: Zmiany w procesach komórkowych jako kluczowe defekty w patogenezie dziedzicznych chorób metabolicznych z grupy mukopolisacharydoz;* 2017/25/B/NZ2/00414 - kierownik prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn) jestem współautorem/autorem wiodącym ponad 30 publikacji, z czego 4 weszły w skład mojej rozprawy doktorskiej. **Rozprawa ta zdobyła wyróżnienie nie tylko Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne,** prace te weszły w skład cyklu publikacji nagrodzonego przez **Rektora Uniwersytetu Gdańskiego (Nagroda Zespołowa I stopnia).** Zdobyłam również **Nagrodę Naukową Gdańskiego Towarzystwa Naukowego i Prezydenta Miasta Gdańska** dla młodych pracowników nauki za rok 2021 w Wydziale II Nauk Biologicznych i Medycznych. W tym czasie równolegle byłam kierownikiem 3 własnych projektów naukowych: 2 dla młodych naukowców finansowanych przez Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego i 1 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (**Preludium 15**, którego wyniki częściowo weszły w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego). Wyniki badań przeprowadzonych w ramach grantu Preludium przedstawiałam na kilku konferencjach naukowych, krajowych i międzynarodowych. Zdobyły one szerokie uznanie, o czym świadczy przyznana **Nagroda im. prof. W. Szybalskiego na 3. Kongresie Bio-nauki Polskiej BIO2018.** W ramach grantu OPUS 13 zakupiono system do automatycznej detekcji białek. Ze względu na fakt, że był to pierwszy egzemplarz w Polsce, staliśmy się krajową jednostką referencyjną. Od momentu zakupu sprzętu



tj. 2018 roku jestem jego głównym użytkownikiem, a także osobą odpowiedzialną za szkolenie indywidualne każdej osoby pragnącej z niego skorzystać.

W wyniku współpracy z lekarzami często otrzymujemy materiał do badań od różnych pacjentów, najczęściej w postaci krwi, co zaowocowało opisami przypadków (**Publikacje IX-XI**). Przygotowano również przegląd literatury, który wskazuje trudności w diagnostyce MPS (**Publikacja XII**) i zaproponowano optymalizację opieki dla pacjentów z zastosowaniem wielodyscyplinarnego podejścia dla poprawy jakości życia pacjentów z chorobą Sanfilippo (**Publikacja XIII**).

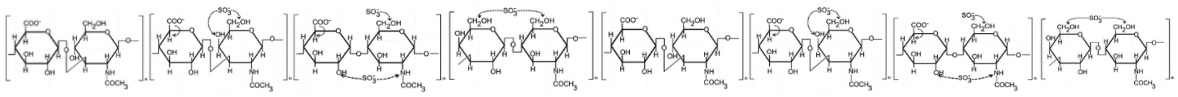
IX. Pierzynowska K, Mański A, Limanówka M, Wierzba J, **Gaffke L**, Anikiej P, Węgrzyn G. (2020) Untypically mild phenotype of a patient suffering from Sanfilippo syndrome B with the c.638C>T/c.889C>T (p.Pro213Leu/p.Arg297Ter) mutations in the NAGLU gene. *Mol Genet Genomic Med*. 8(9):e1356.

X. Anikiej-Wiczenbach P, Mański A, Milska-Musa K, Limanówka M, Wierzba J, Jamsheer A, Cyske Z, **Gaffke L**, Pierzynowska K, Węgrzyn G. (2022) Highly diverse phenotypes of mucopolysaccharidosis type IIIB sibling patients: effects of an additional mutation in the AUTS2 gene. *J Appl Genet.* 63(3):535-542.

XI. Kujawa MJ, Świętoń D, Wierzba J, Grzywińska M, Budziło O, Limanówka M, Pierzynowska K, **Gaffke L**, Grabowski Ł, Cyske Z, Rintz E, Rąbalski Ł, Kosiński M, Węgrzyn G, Mański A, Anikiej-Wiczenbach P, Ranganath L, Piskunowicz M. (2023) Clinical presentation of 13 children with alkaptonuria. *J Inherit Metab Dis*. 2023 Jul 3. doi: 10.1002/jimd.12647. Epub ahead of print.

XII. Wiśniewska K, Wolski J, **Gaffke L**, Cyske Z, Pierzynowska K, Węgrzyn G. (2022) Misdiagnosis in mucopolysaccharidoses. *J Appl Genet*. 63(3):475-495.

XIII. Cyske Z, Anikiej-Wiczenbach P, Wisniewska K, **Gaffke L**, Pierzynowska K, Mański A, Wegrzyn G. (2022) Sanfilippo Syndrome: Optimizing Care with a Multidisciplinary Approach. *J Multidiscip Healthc*. 2022. 15:2097-2110.



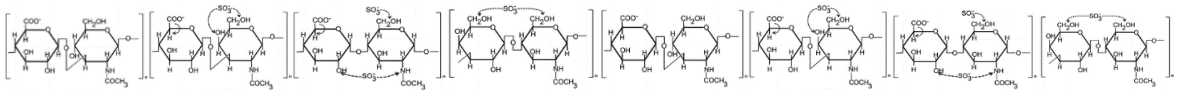
Aktualnie dysponuję szerokim wachlarzem umiejętności laboratoryjnych, który wykorzystuję w codziennej pracy i staram się go ciągle rozwijać. Mimo, że pracuję w zespole badającym choroby genetyczne, nie zamykam się na możliwości pracy na innych modelach czy szeroko pojętej współpracy. Opracowywanie nowych procedur to coś z czym mierze się na co dzień, często ucząc się na własnych błędach (jak na eksperymentatora przystało). W ostatnim czasie, z wykorzystaniem techniki Northern-blotting, przeprowadziłam eksperymenty z mutantem pozbawionym części genu *hfq*, a uzyskane wyniki sugerują, że region ten może być zaangażowany w regulację ekspresji oporności na antybiotyki u *E. coli*. (**Publikacja XIV**). Problem lekooporności został poruszony również w pracach przeglądowej i metodologicznej (**Publikacja XV i XVI**) oraz sprawdzono aktywność między innymi przeciwbakteryjną, związków wytwarzanych przez nowo wyizolowane szczepy *Streptomyces* (**Publikacja XVII**).

XIV. **Gaffke L**, Kubiak K, Cyske Z, Węgrzyn G. (2021) Differential Chromosome- and Plasmid-Borne Resistance of Escherichia coli hfq Mutants to High Concentrations of Various Antibiotics. *Int J Mol Sci*. 22(16):8886.

XV. Grabowski Ł, **Gaffke L**, Pierzynowska K, Cyske Z, Choszcz M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. (2022) Enrofloxacin-The Ruthless Killer of Eukaryotic Cells or the Last Hope in the Fight against Bacterial Infections? *Int J Mol Sci.* 23(7):3648.

XVI. Kubiak K, **Gaffke L**, Pierzynowska K, Cyske Z, Grabowski Ł, Kosznik-Kwaśnicka K, Jaroszewicz W, Węgrzyn A, Węgrzyn G. (2022) Determination of Effects and Mechanisms of Action of Bacterial Amyloids on Antibiotic Resistance. *Methods Mol Biol*. 2538:189-205.

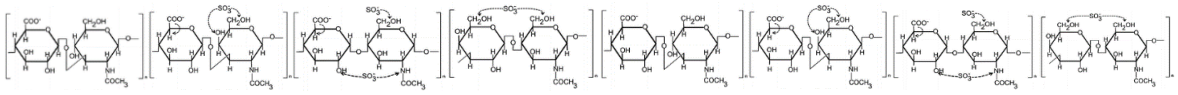
XVII. Jaroszewicz W, Bielańska P, Lubomska D, Kosznik-Kwaśnicka K, Golec P, Grabowski Ł, Wieczerzak E, Dróżdż W, **Gaffke L**, Pierzynowska K, Węgrzyn G, Węgrzyn A. (2021) Antibacterial, Antifungal and Anticancer Activities of Compounds Produced by Newly Isolated Streptomyces Strains



from the Szczelina Chochołowska Cave (Tatra Mountains, Poland). *Antibiotics (Basel).* 10(10):1212.

Do pozostałych projektów, których jestem wykonawcą należą:

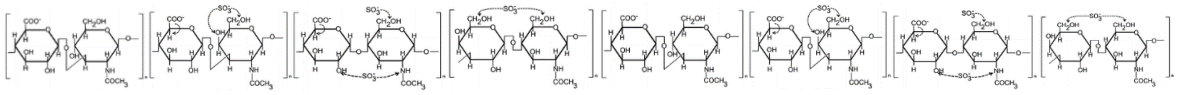
- „Molekularne mechanizmy stymulacji autofagii przez genisteinę oraz jej efekty komórkowe i fizjologiczne w chorobie Huntingtona", Opus 19, Narodowe Centrum Nauki;
- „Molekularny mechanizm zaburzeń ferroptozy w mukopolisacharydozie typu I oraz ich wpływ na przebieg choroby", Sonata 18, Narodowe Centrum Nauki;
- „Mechanizm degradacji glikozoaminoglikanów pod wpływem resweratrolu w mysim modelu neuronopatycznej choroby z grupy mukopolisacharydoz", Preludium 18, Narodowe Centrum Nauki;
- „Wpływ eksperymentalnej terapii z użyciem modulatorów autofagii, na procesy zapalne w układzie obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym podstawowych odmian NBIA" (PKAN, BPAN, MPAN, PLAN), Fundacja NBIA Polska;
- „Genisteina w chorobie Alzheimera - badania na modelach zwierzęcych", Fundacja ORLEN);
- „Biologiczne badania efektywności i bezpieczeństwa terapii fagowej na modelu zakażeń kurcząt wywołanych szczepami Salmonella", Opus 14, Narodowe Centrum Nauki;
- współpraca z prof. Andriyem Sibirnym: określenie roli wybranych genów w procesie autofagii i zbadanie różnic pomiędzy komórkami drożdżowymi i ludzkimi w tym aspekcie - opis w rozdziale [5];
- współpraca z prof. Gregory'm Konatem: określenie roli zmian w ekspresji genów zaangażowanych w proteostazę podczas indukcji obwodowego stanu zapalnego u myszy - opis w rozdziale [5].



**[4e] Dalsze plany badawcze**

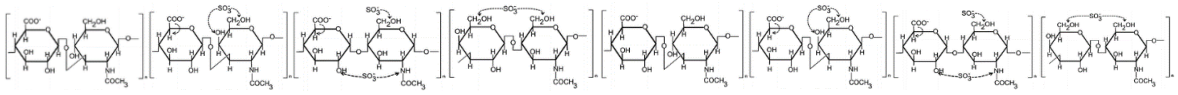
Moja dalsza kariera naukowa nierozerwalnie będzie związana z realizacją projektów, które zostały wymienione w poprzednim punkcie. Przede wszystkim skupię się na dalszym eksplorowaniu indukcji procesu autofagii w różnych jednostkach chorobowych. Dodatkowo wyniki wstępne, częściowo uzyskane przeze mnie, stały się podwaliną niedawno przyznanego projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki: *„Molekularny mechanizm zaburzeń ferroptozy w mukopolisacharydozie typu I oraz ich wpływ na przebieg choroby”*. Planujemy określić dokładne ścieżki molekularne, prowadzące do zaobserwowanej podczas badań wstępnych, obniżonej efektywności ferroptozy w MPS I. Zbadamy także mechanizm ferroptozy zależnej od autofagii (ang. autophagy-dependent ferroptosis), który stanowi nowe, niedawno opisane zagadnienie. Podczas przygotowania rewizji **Publikacji 7**, wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego, nawiązałam współpracę z prof. dr hab. Hanną Mazur-Marzec. Przeprowadziłam analizę poziomu siarczanu heparanu w komórkach fibroblastów, według autorskiej procedury. Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) najczęściej jest wykorzystywana do analiz GAG z tkanek czy moczu. Co ciekawe, niektóre oznaczenia disacharydów przeprowadzone w oparciu o tryb monitorowania wielu reakcji (MRM) i opisane w literaturze opierają się tylko na jednym przejściu, budząc wątpliwości co do wiarygodności identyfikacji związku. Otrzymane rezultaty skłaniają nas do dalszych badań i przygotowania publikacji metodycznej w tym zakresie.

W związku z nawiązaniem współpracy z Fundacją NBIA Polska, posiadamy sporą kolekcję linii komórkowych, pobranych od pacjentów z różnymi odmianami encefalopatii związanej z odkładaniem się żelaza w mózgu (*Neurodegeneration with brain iron accumulation*, NBIA). Obecnie jesteśmy w trakcie realizacji projektu *„Wpływ eksperymentalnej terapii z użyciem modulatorów autofagii, na procesy zapalne w układzie obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym podstawowych odmian NBIA”*. Uzyskujemy satysfakcjonujące rezultaty pod wpływem testowanej terapii.



Niestety, podobnie jak w przypadku mukopolisacharydoz, proces diagnostyczny chorób należących do tej grupy, jak i dostępne formy terapii są dalekie od ideału. Fakt ten skłonił mnie do rozszerzenia tematu o kolejne wątki badawcze. Po pierwsze zbadałam w jaki sposób zaburzona jest aktywność proteasomu u pacjentów, a po drugie zauważyłam drastyczne zmiany w poziomie F-aktyny, głównego komponentu cytoszkieletu aktynowego. Oba spostrzeżenia zachęciły mnie do dalszych prac nad dodatkowymi elementami patogenezy choroby. Aktualnie jestem w trakcie przygotowania wniosku grantowego do Narodowego Centrum Nauki, w którym podejmę się próby zgłębienia patogenezy i mechanizmu działania wybranych substancji na wykryte zmiany.

W celu realizacji tego projektu zakładam nawiązanie co najmniej 2 nowych współprac naukowych, które zapewnią mi możliwość dalszego rozwoju oraz poszerzą zakres umiejętności (od zawsze czułam się w laboratorium jak przysłowiowa ryba w wodzie). Po pierwsze integralną częścią będą wyskoprzepustowe analizy, tym razem planuję poszerzyć swoje kompetencje o analizę danych proteomicznych. Dodatkowo chciałabym nawiązać współpracę z NBIAcure. Wraz z NBIA Disorders Association i firmą OzGene, opracowali model myszy (PKAN Knock-In Mice; jeden z rodzajów NBIA), dzięki której możemy "włączyć" zmianę genetyczną tylko w określonych tkankach, takich jak wątroba lub mózg. Byłaby to nieoceniona pomoc przy badaniach patomechanizmu choroby, szczególnie w sytuacji, kiedy nie ma dobrego modelu badawczego, pod względem objawów występujących u pacjentów. W niedalekiej przyszłości zamierzam odbyć szkolenie, zapewniające pełną samodzielność do pracy ze zwierzętami (od planowania eksperymentów do uśmiercania). Z jednej strony wpłynie to pozytywnie na rozwój mojego warsztatu eksperymentalnego, a z drugiej umożliwi realizację planów badawczych.

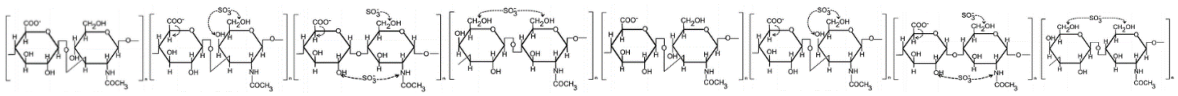


**[5] Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

Moją dotychczasową działalność badawczą prowadziłam nie tylko w obrębie jednostki macierzystej, lecz także na Uniwersytecie Zachodniej Wirginii oraz w Instytucie Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk we Lwowie.

Odbyłam miesięczny staż naukowy w Uniwersytecie Zachodniej Wirginii w Morgantown (USA; NAWA, program Prom). Prof. Gregory Konat opracował model badawczy imitujący obwodowe zakażenie wirusowe oraz jego wpływ na funkcje ośrodkowego układu nerwowego. Celem mojej pracy było określenie czy są aktywowane przez PIC (kwas poli-inozylowo-cytydynowy) inne procesy komórkowe (niż już opisane) i czy mogą przyczyniać się do rozwoju objawów nasilających odpowiedź mózgową w przypadku infekcji obwodowych. Wskazaliśmy na liczne zmiany w ekspresji genów odpowiadających za proteostazę. Manuskrypt z uzyskanych wyników jest w trakcie przygotowywania.

Współpraca z grupą prof. Andriya Sibirnego (Ukraina) dotyczy badania procesu autofagii. To połączenie eksperymentów przeprowadzanych na drożdżach i komórkach ludzkich. Odbyłam kilka wizyt krótkoterminowych we Lwowie w ramach współpracy, która doprowadziła do uzyskania wspólnego projektu grantowego „***Identification of genes involved in autophagic degradation of soluble proteins in yeast and human cells***" (2019-2022). Okazało się, że gen drożdży *Komagataella phaffii*, kodujący β-1,6-N-acetylglukozoaminylotransferazę, pełni istotną rolę w zależnej od autofagii degradacji białek cytoplazmatycznych i peroksysomalnych. U człowieka są 3 geny kodujące podobny produkt: *GCNT2, MGAT5 oraz SP1.* Wyciszyłam ich ekspresję, lecz nie wpłynęło to na efektywność procesu autofagii. Być może nie ma analogicznego procesu w komórkach ludzkich bądź dopiero wyciszenie wszystkich genów w jednym czasie skutkowałoby upośledzeniem procesu. Druga z hipotez wymaga dalszej weryfikacji. Omówione rezultaty zostały szczegółowo opisane w pracy ***Zazulya et al. (2023) The Komagatella***



*phaffii ACG1 gene, encoding β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, is involved in the autophagy of cytosolic and peroxisomal proteins. Yeast. 40(8):367-376.* Ze względu na prowadzenie prac badawczych zarówno na Uniwersytecie Gdańskim jak i w Instytucie Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk, w artykule tym przypisane są mi afiliacje obu tych jednostek naukowych.

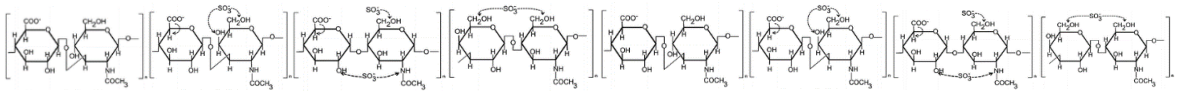
**[6] Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

**[6a] Informacja o osiągnięciach dydaktycznych**

Od początku studiów doktoranckich (2014) prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów kierunków: Ochrona Środowiska, Biologia, Biologia medyczna, Genetyka i biologia eksperymentalna na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Prowadziłam następujące kursy:

1) Mikrobiologia (kierunek: Ochrona Środowiska);
2) Biologia molekularna z biotechnologią (kierunek: Biologia);
3) Technologie informacyjne (kierunek: Biologia);
4) Neurofizjologia molekularna (kierunek: Genetyka i biologia eksperymentalna);
5) Propedeutyka chorób wewnętrznych (kierunek: Biologia medyczna);
6) Seminarium (kierunek: Biologia, Biologia medyczna, Genetyka i biologia eksperymentalna);
7) Pracownia dyplomowa (kierunek: Biologia, Biologia medyczna, Genetyka i biologia eksperymentalna).

Od pierwszego roku studiów doktoranckich pogłębiam swoje umiejętności dydaktyczne, począwszy od III Ogólnopolskiej Konferencji Dydaktyki Akademickiej Ideatorium, której byłam aktywnym uczestnikiem. Warto dodać, że do prowadzonych przedmiotów przygotowałam własne materiały dydaktyczne w postaci skryptów. W wyniku prowadzonych przeze mnie przedmiotów studenci nabywali kompetencje



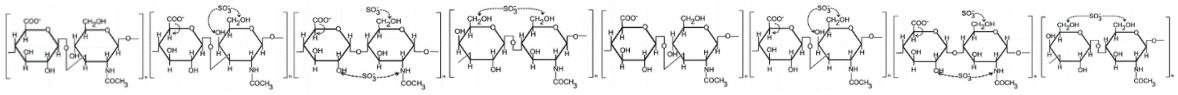
od hodowli bakteryjnych, przez szeregi biochemiczne, klonowanie, po hodowle komórek eukariotycznych. Wprowadziłam innowacyjne podejście do przedmiotu Technologie informacyjne, przygotowując klonowanie '*in silico*', co spotkało się z dużym zainteresowaniem. Podobnie jak seminarium w module warsztatowo-praktycznym, podczas którego każdy ze studentów miał możliwość samodzielnie pasażować komórki eukariotyczne. Od początku studiów doktoranckich opiekowałam się osobami wykonującymi prace dyplomowe czy odbywającymi praktyki studenckie (około 20 osób). Studenci ci otrzymywali za swoje osiągnięcia nagrody Rektora, czy odpowiednich Władz Miasta. Cztery z tych osób kontynuowały naukę w Szkole doktorskiej, w tym jedna już jest po nadaniu stopnia, a druga ma wyznaczony termin obrony rozprawy doktorskiej. Opiekowałam się także studentkami, które przyjechały w ramach współpracy z University of Houston Downtown, Texas, USA. Jedna z nich została laureatką za najlepszy komunikat podczas konferencji ***The Molecular Basis of Infectious Diseases Retreat (Lopez-Lugo S, Pierzynowska K, Gaffke L, Węgrzyn G: Changes in the cytoskeleton of mucopolysaccharidosis (MPS) patients).***

Od obrony rozprawy doktorskiej (ostatnie 2 lata) wypromowałam 5 licencjatów oraz 2 magistrów. Ponadto recenzowałam 5 innych prac dyplomowych. Mimo, że oficjalnie nie jestem promotorem pomocniczym żadnej rozprawy doktorskiej, współpracuję czasowo z niemal każdym doktorantem/studentem w naszym laboratorium, zapewniając odpowiednią jakość przeprowadzanych przez nas badań. Aktywnie poszukuję nowych rozwiązań technicznych/metodycznych i udzielam częstych konsultacji w zakresie zaadoptowania różnych metod do zapotrzebowania eksperymentatora, nie tylko młodszym pracownikom nauki.

**[6b] Informacja o osiągnięciach organizacyjnych**

Organizowałam konferencje naukowe:

- 4th Congress of Baltic Microbiologists, 2018, Gdańsk, Polska
- II Konferencja Doktorantów Pomorza BioMed Session 2018, Gdańsk, Polska



- The last word belongs to microbes – Celebrating the 200th anniversary of the birth of Louis Pasteur, 2022, Warszawa, Polska

Wykonałam ponad 50 recenzji artykułów wysłanych do międzynarodowych czasopism naukowych (*Metabolic Brain Disease, International Journal of Molecular Science, Cells, Pharmacological Reports, Cell Biochemistry and Biophysics i inne).* Pełnię funkcje:

- Review Editor - *Biomolecules*
- Topical Advisory Panel Member - *Biology*
- Review Editor - *Frontiers in Cellular Neuropathology*
- Review Editor - *Frontiers in Antibiotic Resistance and New Antimicrobial drugs*

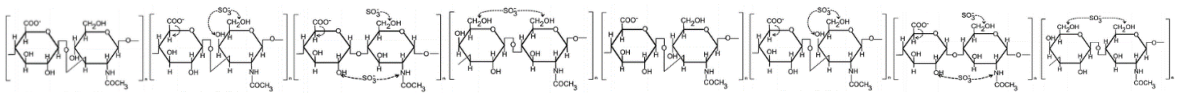
Pełniłam/pełnię również funkcje na macierzystym Wydziale Biologii UG:

- Członek Sekcji Promocji Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (2020-2023);
- Przewodniczący komisji podczas obron prac dyplomowych (2022-2023)

**[6c] Informacja o aktywnościach popularyzujących naukę**

Od drugiego roku studiów należałam do Studenckiego Koła Naukowego Fizjologów „Homunculus", gdzie nie tylko prezentowałam wyniki na konferencji Neuronus w Krakowie, ale od tamtej pory aktywnie jestem zaangażowana we wszystkie wydarzenia popularnonaukowe: Dni Mózgu (od pierwszego organizowanego jeszcze w Wyższej Szkole Psychologii Społecznej w Sopocie), Dni Otwarte, Bałtycki Festiwal Nauki czy Noc Biologów (2011 - obecnie). Łącznie przeprowadziłam kilkadziesiąt warsztatów/pokazów, dotyczących m.in. produkcji naturalnych kosmetyków, rodzajów drobnoustrojów czy właściwości antybakteryjnych żywności. Dodatkowo asystowałam podczas cyklu zajęć *Czy mydło zabija drobnoustroje?* w gdańskim przedszkolu.

Badania, w których uczestniczę odbijają się szerokim echem w mediach. Zdarza mi się rozmawiać z pacjentami, wyjaśniając potencjalne zastosowanie związków przez nas badanych, w różnych chorobach neurodegeneracyjnych. Moja rola jako istotnego



członka zespołu, została podkreślona w kilku artykułach prasowych. Udzieliłam też krótkiej wypowiedzi do materiału emitowanego w programie Dzień dobry tu Gdańsk.

**[8] Podsumowanie kariery naukowej**

Moje zainteresowania dotyczą dwóch **głównych nurtów eksperymentalnych: badań mikrobiologicznych** oraz **badań na organizmach eukariotycznych**.

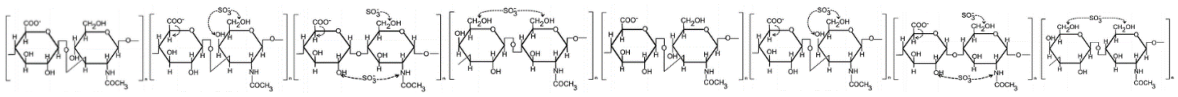
Jestem współautorką **61 artykułów** w czasopismach naukowych i **3 rozdziałów** w monografiach. Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowanych zostało 37 z tych artykułów, z czego 8 weszło w skład mojego głównego osiągnięcia habilitacyjnego. Moje wyniki prezentowane były na **blisko 50 konferencjach i sympozjach** krajowych i międzynarodowych (wystąpienia te zdobyły liczne nagrody m.in. **Nagrodę im. prof. W. Szybalskiego)**. Podczas 3 wydarzeń o zasięgu międzynarodowym miałam wystąpienia ustne. Organizowałam 3 konferencje naukowe.

Uczestniczyłam w realizacji **16 projektów** badawczych finansowanych na drodze konkursów ogólnopolskich i europejskich (NCN, NCBiR, 7 Program Ramowy Unii Europejskiej), w jednym **w roli kierownika** (Preludium, NCN). Dodatkowo byłam kierownikiem **2 projektów** i wykonawcą kolejnych **4 projektów** finansowanych przez Uniwersytet Gdański.

Odbyłam **staż naukowy** w West Virginia University oraz 3 wyjazdy badawcze (Ukraina). Pełnię funkcję **Reviewer Editor** dla: *Biomolecules*; *Frontiers in Cellular Neuropathology* i *Frontiers in Antibiotic Resistance and New Antimicrobial drugs* oraz **Topical Advisory Panel** dla *Biology.*

Wykonałam ponad **50 recenzji** artykułów wysłanych do międzynarodowych czasopism naukowych (*Metabolic Brain Disease, International Journal of Molecular Science, Cells, Pharmacological Reports, Cell Biochemistry and Biophysics i inne).*

Opiekowałam się studentami wykonującymi prace dyplomowe czy praktyki studenckie, a także uczestnikami wymian międzynarodowych (**około 20 osób**), którzy zostali docenieni przez różne gremia konkursowe.

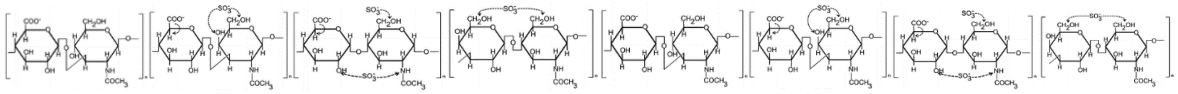


Aktywnie uczestniczę w popularyzacji nauki - przeprowadziłam kilkadziesiąt warsztatów podczas wydarzeń: **Dni mózgu, Dni Otwarte, Bałtycki Festiwal Nauki czy Noc Biologów**. Współpracuję z Instytutem Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka, Centrum Chorób Rzadkich Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz licznymi organizacjami pacjentów (Fundacja Sanfilippo, Stowarzyszenie Chorych na Mukopolisacharydozę i Choroby Rzadkie, Stowarzyszenie NBIA Polska).

Tematyka badań naszego zespołu często jest poruszana w różnych materiałach prasowych czy telewizji (m.in. materiał emitowany w programie **Dzień dobry tu Gdańsk**).

Moje dane naukometryczne na dzień 19 września 2023 r. przedstawiają się następująco:

- Indeks Hirsha: **15** (wg Scopus), **15** (wg WoS);
- Łączny Impact Factor: **278,245**;
- Liczba cytowań: **1679** (wg Scopus), **1330** (wg WoS).

Signed by / Podpisano przez:
Lidia Łucja Gaffke
Uniwersytet Gdański
Date / Data: 2023-09-20 11:48

Podpis elektroniczny/certyfikat został usunięty podczas anonimizacji dokumentu.