



Agnieszka Zdybicka-Barabas

**AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA APOLIPOFORYNY III
I JEJ ROLA W ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ
BARCIAKA WIĘKSZEGO *GALLERIA MELLONELLA***

Autoreferat

Lublin 2015

dr Agnieszka Zdybicka-Barabas

Zakład Immunobiologii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

barabas@poczta.umcs.lublin.pl

tel.: (081) 537-50-50, fax: (081) 537-50-50

AUTOREFERAT

1. IMIĘ I NAZWISKO

Agnieszka Zdybicka-Barabas

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

1994r. Dyplom magistra biologii, specjalność biologia molekularna

Praca magisterska pt.: „Wpływ wanadu na poziom aldehydu dimalonowego w wątrobie i nerkach szczurów szczepu Wistar”

wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) UMCS.

Promotor: prof. dr hab. Renata Śnieżko

2003r. Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii

Praca doktorska pt.: „Białka i peptydy odpowiedzi humoralnej barciaka większego *Galleria mellonella*” wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) UMCS.

Promotor: prof. dr hab. Teresa Jakubowicz

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

1995-2004 **asystent** w Zakładzie Patologii Owadów Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, w 2001r. nazwa zmieniona na Zakład Immunologii Bezkręgowców

2004- obecnie **adiunkt** w Zakładzie Immunologii Bezkręgowców Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, w 2012r. nazwa zmieniona na Zakład Immunobiologii

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Praca magisterska

Tytuł magistra biologii (specjalność biologia molekularna) uzyskałam w 1994 roku na podstawie pracy magisterskiej p.t.: „Wpływ wanadu na poziom aldehydu dimalonowego w wątrobie i nerkach szczurów szczepu Wistar” wykonanej w Zakładzie Biologii Komórki, UMCS kierowanym przez prof. dr hab. Renatę Śnieżko.

W organizmie zwierząt i człowieka powstają wolne rodniki, które w zależności od warunków mogą być utleniaczami lub reduktorami. Reakcje wolnorodnikowe prowadzą do utlenienia lipidów, przez co zmniejsza się poziom lipidów nienasyconych oraz powstają aldehydy, np. dialdehyd malonowy (MDA), które wykazują dużą toksyczność związaną z działaniem mutagennym i rakotwórczym. Jony wanadu mogą uczestniczyć w inicjacji i propagacji procesów wolnorodnikowych oraz wpływać na układ antyoksydacyjny poprzez obniżenie poziomu kwasu L-askorbinowego w wątrobie, nerce oraz śledzionie.

Celem pracy magisterskiej było sprawdzenie jaki wpływ na proces peroksydacji lipidów (LPO) ma wanad (V^{5+}) podawany szczurom w wodzie do picia. Zwierzęta otrzymywały trzy dawki metawanadanu amonu (MVA) w ciągu doby ok.: 1,5; 5 i 10-11 mgV/kg masy ciała przez okres 4 tygodni. Najniższa dawka wanadu nie powodowała zmian w spożyciu paszy i masie ciała w porównaniu z kontrolą. Natomiast u zwierząt otrzymujących dwie wyższe dawki wystąpiło statystycznie istotne obniżenie spożycia płynów oraz paszy w porównaniu z kontrolą, czemu towarzyszył istotny spadek masy ciała w stosunku do masy wyjściowej. U szczurów zatrutowanych różnymi dawkami wanadu nie stwierdziłam jednak istotnych statystycznie różnic w masie bezwzględnej i względnej wątroby oraz nerek (gromadzą najwięcej wanadu). Jako wskaźnik LPO mierzyłam poziom MDA w wątrobie i nerkach szczurów szczepu Wistar obu płci. Peroksydacja lipidów w badanych organach, zarówno spontaniczna jak i w obecności induktorów (kwas L-askorbinowy lub $FeSO_4$), miała podobny przebieg u samców i samic. Niższe dawki wanadu nie wpływały na poziom MDA. Natomiast wanad podawany w najwyższej dawce powodował wzrost poziomu MDA w badanych narządach zwierząt. Największy wzrost poziomu MDA obserwowałam w nerkach i wątrobie w obecności jonów Fe^{2+} jako induktorów LPO.

Otrzymane wyniki wykazały, że w warunkach *in vivo* wanad jest pierwiastkiem działającym jako prooksydant, który może osłabiać działanie układu antyoksydacyjnego.

Praca naukowo-badawcza przed doktoratem

W 1995 roku zostałam zatrudniona na etacie asystenta w Zakładzie Patologii Owadów Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, kierowanym przez prof. dr hab. Jana Jarosza (obecnie Zakład Immunobiologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii). W tamtych latach była to jedna z pierwszych w Polsce jednostek zajmujących się odpornością przeciwważną owadów. Zainteresowanie patologią owadów, wynikało z faktu, że biologiczne metody zwalczania owadów będących szkodnikami od dawna były dynamicznie rozwijającymi się kierunkami ochrony środowiska. W dobie rozwoju przyjaznych dla środowiska metod walki biologicznej ważna jest możliwość skutecznego modulowania procesów zaangażowanych w odporność owadów, a także typowych dla owadów procesów syntezy chityny i odkładania kutikuli, bez ryzyka toksycznego wpływu na człowieka, ssaki, ptaki oraz rośliny. Umożliwi to opracować insektycydy (pestycydy owadobójcze), które działają wybiórczo na owady, a nie ludzi czy zwierzęta użytkowe.

Pierwsze lata mojej pracy związane były z badaniem działania preparatu Dimilin 480SC, stosowanego w sadownictwie do zwalczania szkodników, na układ immunologiczny gąsienic barciaka większego (*Galleria mellonella*; Lepidoptera: *Pyrilidae*). Na podstawie danych literaturowych wiadomo było, że aktywny składnik preparatu, diflubenzuron (z grupy benzoilofenylolecznika) przenika osłonki jaj, przez co zapobiega wylęgowi larw, a u larw hamuje ich rozwój i metamorfozę. Jednak brak było danych dotyczących jego działania na odpowiedź humoralną owadów. Do badań używałam gąsienice *G. mellonella* (stadium III-V), którym preparat podawałam *per os*, lub w iniekcji bezpośrednio do hemocelu owada. Gąsienice traktowane *per os* preparatem były mniej ruchliwe i pozostawały w tym samym stadium, a ich kutikula była jasna, co mogło świadczyć o braku sklerotyzacji powłok ciała owada. U wszystkich osobników poziom aktywności lizozymu Gm (lizozym *Galleria mellonella*) w hemolimfie drastycznie wzrastał i utrzymywał się na wysokim poziomie, aż do 96 godz. po podaniu diflubenzuronu. Pomimo zaburzenia metamorfozy nie obserwowano pojawiania się w hemolimfie gąsienic aktywności przeciwbakteryjnej anty-*Escherichia*

coli. Natomiast iniekcja insektycydu wywoływała przejściowy paraliż ciała owadów trwający około 1 godz. oraz wzrost poziomu aktywności lizozymu Gm oraz indukcję aktywności bakteriobójczej anty-*E. coli* w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* w porównaniu do owadów kontrolnych i karmionych *per os*. Dimilin 480SC hamował również odpowiedź immunologiczną gąsienic pobudzonych lipopolisacharydem (LPS) *E. coli*. Wykazałam, że aktywność przeciwbakteryjną dużo skuteczniej obniżał preparat podany drogą pokarmową niż w iniekcji.

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF	MNiSW
Zdybicka-Barabas A.* Cell-free immune response in dimilin poisoned larvae of <i>Galleria mellonella</i> (Insecta: Lepidoptera). <i>Acta Poloniae Toxicologica</i> 6(2): 271-280	1998	-	3

Kolejny etap badań dotyczył analizy działania diflubenzuronu i cykloheksymidu (inhibitora syntezy białek u organizmów eukariotycznych) na humoralne procesy odpornościowe gąsienic *G. mellonella*. Wykazałam, że aktywność lizozymu Gm w hemolimfie owadów pobudzonych immunologicznie (gąsienice immunizowane LPS *E. coli*) najskuteczniej obniża diflubenzuron podany *per os* (o ok. 84%), a podany w iniekcji okazał się najslabszym inhibitorem (ok. 38%). Ponadto zaobserwowałam, że oba preparaty obniżają poziom aktywności peptydów odpornościowych w hemolimfie immunizowanych gąsienic. Jednoczesne podanie immunosupresorów bardziej efektywnie blokowało odpowiedź humoralną niż podanie każdego inhibitora osobno. Wykazałam również, że układ obronny *G. mellonella* jest bardziej wrażliwy na cykloheksymid niż diflubenzuron. Działanie inhibitorów polegające na hamowaniu odpowiedzi immunologicznej owadów może być podstawą opracowania preparatów owadobójczych.

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF	MNiSW
Zdybicka-Barabas A.* Odpowiedź humoralna typu lizozymu i cekropin u gąsienic <i>Galleria mellonella</i> traktowanych diflubenzuronem i cykloheksymidem. <i>Pestycydy</i> 2-3: 49-54	1998	-	4

Wyniki zostały również przedstawione w formie komunikatów zjazdowych.

W badaniach nad immunomodulacją reakcji odpornościowych *G. mellonella* stosowałam również hormon juwenilny III (JH-III), który podawałam gąsienicom z drugiej połowy ostatniego (VII) stadium w okresie poprzedzającym przeobrażenie, gdy

brak w organizmie endogennego hormonu juvenilnego. JH-III naniesiony na okrywę ciała obniżał poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej w hemolimfie owadów pobudzonych LPS. Zaburzenie odpowiedzi humoralnej przez hormon umożliwiało rozwój bakterii entomopatogennej *Pseudomonas aeruginosa* w hemolimfie gąsienic *G. mellonella*, które padały z wyraźnymi objawami posocznicy. Natomiast w hemolimfie gąsienic niepobudzonych immunologicznie po podaniu JH-III obserwowano obniżenie poziomu lizozymu Gm oraz brak aktywności przeciwko *E. coli*. Uzyskane wyniki sugerują, że zaburzenie prawidłowej metamorfozy owadów może modulować funkcjonowanie układu odpornościowego, co może pomóc w opracowaniu skutecznych preparatów owadobójczych o ukierunkowanym/selektywnym działaniu w stosunku do szkodników, a nie pożytecznych owadów.

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF	MNiSW
Zdybicka-Barabas A.* Cell-free immune response in juvenile hormone JH-III treated <i>Galleria mellonella</i> larvae. <i>Acta Poloniae Toxicologica</i> 7(2): 209-216	1999	-	3

Wyniki zostały również przedstawione w formie komunikatów zjazdowych.

Praca doktorska

W 2000 roku, po tragicznej śmierci prof. dr hab. Jana Jarosza, kierownictwo Zakładu objęła prof. dr hab. Teresa Jakubowicz, która została moim opiekunem naukowym. W znaczący sposób został zmieniony kierunek badawczy Zakładu oraz jego nazwa, na Zakład Immunologii Bezkęrgowców (obecnie Zakład Immunobiologii).

Badania ostatnich lat dostarczyły dowodów uzasadniających przydatność owadów jako dobrego modelu do studiów nad funkcjonowaniem wrodzonych mechanizmów odpornościowych. Ze względu na to, że owady zasiedlają różne nisze ekologiczne musiały wykształcić skuteczną obronę, która bardzo szybko zwalcza różnego rodzaju zakażenia. Dlatego w moich badaniach skupiałam się na poznaniu mechanizmów biorących udział w regulacji procesów odpornościowych związanych z odpowiedzią humoralną. Jako organizmu modelowego nadal używałam barciaka większego *G. mellonella*.

W pierwszym etapie badań porównywałam aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy gąsienic oraz poczwerek w różnym czasie od podania LPS *E. coli* jako immunogenu. Wykazałam pojawianie się aktywności przeciwbakteryjnej skierowanej przeciwko

E. coli we wszystkich badanych stadiach rozwojowych *G. mellonella* już 6 godzin po immunizacji. Najwyższe działanie przeciwbakteryjne obserwowałam w hemolimfie gąsienic żerujących między 12-48 godz. po immunizacji LPS. Do oznaczania aktywności stosowałam metodę dyfuzji radialnej. **W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wykazałam też, że dodanie lizozymu białka jaja kurzego (EWL) do podłoża zwiększa kilkanaście do kilkudziesięciu razy aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy immunizowanych owadów w stosunku do bakterii Gram-ujemnej *E. coli*.** Metoda ta pozwala na wykrycie aktywności peptydów przeciwdrobnoustrojowych przy ich niewielkim stężeniu już 3 godz. od immunizacji.

Do wykrywania aktywności przeciwbakteryjnej oprócz testu dyfuzji w agarze stosowałam również opracowany przeze mnie test bioautografii po elektroforezie w warunkach denaturujących SDS/PAGE. Rozdzielone białka i peptydy, po usunięciu SDS, poddawałam procedurze renaturacji, która przywróciła im prawidłową konformację i aktywność. **Metoda ta pozwoliła nie tylko określić aktywność przeciwbakteryjną peptydów, ale także w przybliżeniu oszacować ich masę cząsteczkową.** W celu zwiększenia czułości testu, do podłoża z bakteriami dodawałam EWL. Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, że w obecności lizozymu niższe stężenie cekropiny B lub białek hemolimfy owadów immunizowanych było wymagane do zahamowania wzrostu bakterii [Cytryńska i in. 2001].

Kolejny etap badań dotyczył identyfikacji peptydów pojawiających się w hemolimfie pod wpływem immunizacji. Ze względu na to, że hemolimfa zawiera duże ilości białek o masie cząsteczkowej powyżej 30kDa a wśród nich lipoforyny, które utrudniają analizę peptydów odpornościowych, do badań używałam metanolowych ekstraktów hemolimfy. W tym celu zmodyfikowałam metodę stosowaną przez Schoofs i in. [1990] do oczyszczania neuropeptydów *Locusta migratoria*. **Pozwolilo to po raz pierwszy otrzymać ekstrakty hemolimfy *G. mellonella*, które głównie zawierają apolipoforynę III (apoLp-III) oraz białka i peptydy poniżej 30kDa, co znacznie ułatwiło i zwiększyło skuteczność oczyszczenia peptydów odpornościowych.** Prążki odpowiadające peptydom o masie 3,5kDa (peptyd B) i 4,2kDa (peptyd A) były widoczne na barwionych żelach po rozdzielach elektroforetycznych ekstraktów hemolimfy owadów immunizowanych, ale nie były obserwowane w hemolimfie owadów niepobudzonych. Pojawianie się peptydów było skorelowane ze wzrostem aktywności przeciwbakteryjnej skierowanej przeciwko *E. coli*, wykrywanej zarówno w teście dyfuzji radialnej, jak i teście bioautografii. Badanie sekwencji aminokwasowej

peptydów wykazało, że zidentyfikowane fragmenty peptydu A i B mają sekwencję identyczną z peptydami 5.11.1 i 8.4.1 opisanymi przez Maka i in. [2001]. Peptyd A jest peptydem przeciwbakteryjnym bogatym w prolinę z unikalną sekwencją aminokwasową, która nie wykazuje podobieństwa do poznanych dotąd peptydów. Natomiast peptyd B, na podstawie sekwencji zaliczyłam do rodziny cekropin [Cytryńska i in. 2007; Zdybicka-Barabas i in. 2010].

Niezależnie od badań nad peptydami przeciwbakteryjnymi obiektem moich zainteresowań były też dwa białka hemolimfy *G. mellonella*, hemolina i apolipoforyna III (apoLp-III).

Hemolina, mimo, że nie ma aktywności przeciwdrobnoustrojowej przylączy się do powierzchni komórek mikroorganizmów, jako PRR (ang. *pattern recognitions receptor*), i uruchamia różne reakcje odpowiedzi immunologicznej m.in. układ oksydazy fenolowej (PO), fagocytozę, nodulację i inkapsulację. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że rozpoznawane przez przeciwciała przeciwko hemolinie *Manduca sexta* białko o m.cz. 48kDa jest homologiem hemoliny *M. sexta*. Wykazałam w tym białku obecność domen Ig za pomocą testu immunoblottingu z wykorzystaniem białka A, oraz jego glikozylację przy pomocy barwienia PAS. Dodatkowo wykazałam obecność reszt cukrowych w białkach o masie 70-80kDa oraz około 30kDa [Cytryńska i in. 2002].

Kolejna część badań dotyczyła identyfikacji oraz oczyszczania apoLp-III, białka występującego w dużym stężeniu w hemolimfie. ApoLp-III pełni ważną rolę w transporcie lipidów podczas lotu oraz w odpowiedzi immunologicznej owada jako PRR. Uczestniczy ona w rozpoznaniu i detoksyfikacji lipopolisacharydów (LPS) oraz kwasów lipotejchojowych (LTA) - składników ściany komórkowej bakterii. Przeciwciała skierowane przeciwko apoLp-III *M. sexta* rozpoznawały w hemolimfie *G. mellonella* pojedyncze białko o m.cz. 18kDa, wskazując jednocześnie na podobieństwo między apoLp-III obu gatunków owadów. Opracowałam dwie procedury frakcjonowania białek hemolimfy, które pozwoliły otrzymać homogeny preparat apoLp-III [Cytryńska i in. 2002]. Wykazałam, że tak oczyszczona apoLp-III hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* i *Sarcina lutea*, natomiast nie hamuje wzrostu bakterii Gram-ujemnej *E. coli*. Stosując rozdział 2D IEF/SDS-PAGE preparatów hemolimfy, metanolowych ekstraktów hemolimfy oraz oczyszczonego białka apoLp-III, wykazałam obecność kilku polipeptydów o masie 18kDa, nieznacznie różniących się pI, które były rozpoznawane przez przeciwciała

anty-apoLp-III *M. sexta*. Na podstawie uzyskanych wyników można jednoznacznie stwierdzić, że apoLp-III barciaka większego występuje w izoformach nieznacznie różniących się punktem izoelektrycznym w zakresie pH 6-8.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały zamieszczone w mojej pracy doktorskiej pt. „Białka i peptydy odpowiedzi humoralnej barciaka większego *Galleria mellonella*”, którą obroniłam 10 czerwca 2003r.

Do najważniejszych osiągnięć mojej pracy doktorskiej można zaliczyć:

1/ opracowanie testu bioautografii; 2/ wykazanie synergizmu działania EWL i peptydów odpornościowych hemolimfy *G. mellonella* w stosunku do bakterii *E. coli*; 3/ identyfikację peptydu należącego do cekropin o masie cząsteczkowej 3,5kDa oraz unikalnego peptydu o dużej zawartości proliny o masie 4,3kDa; 4/ wykazanie obecności hemoliny w hemolimfie immunizowanych gąsienic *G. mellonella*; 5/ wykazanie obecności apolipoforyny III w hemolimfie gąsienic i poczwerek *G. mellonella*, występowania jej w kilku izoformach oraz aktywności apoLp-III w stosunku do bakterii Gram-dodatnich.

Cytowana literatura:

Mak P., Chmiel D., Gacek G.J., (2001), Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*. Acta Biochimica Polonica 48: 1191-1195
Schoofs L., Holman GM., Hayes TK., Nachman RJ., De Loof A., (1990), Locusta tachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides from the vertebrate tachykinin family. FEBS Lett. 261: 397-401

Część wyników wchodzących w skład pracy doktorskiej została opublikowana w formie oryginalnych artykułów naukowych:

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania IF	MNiSW
Przed doktoratem			
Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A. , Andrejko M., Jabłoński P., Jakubowicz T. Antimicrobial peptides and proteins in <i>Galleria mellonella</i> hemolymph. 3 rd International Conference, Łądek Zdrój 2001 – Arthropods: Chemical, physiological and environmental aspects, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2002, 193- 197	2002	-	3
Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A. , Jabłoński P., Jakubowicz T. Detection of antibacterial polypeptide activity <i>in situ</i> after sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 299(2):274-276	2001	2,019	24
Po doktoracie			
Cytryńska M., Mak P., Zdybicka-Barabas A. , Suder P., Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from <i>Galleria mellonella</i> immune hemolymph. Peptides 28:533-546	2007	2,368	27
Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M., Jakubowicz T. A kinetic study on antibacterial peptides of <i>Galleria mellonella</i> larvae and pupae synthesized in response to challenge with <i>Escherichia coli</i> lipopolisaccharide. Annales UMCS Sectio C (Biologia) LXV 2(C): 18-25	2010	-	6

Wyniki badań zamieszczono w 5 publikacjach przed doktoratem (zgodnie z rokiem opublikowania łączny impact factor wynosi **2,019**; suma punktów MNiSW wynosi **37** pkt.) oraz w 2 publikacjach po doktoracie (IF=2,368; MNiSW pkt.=33) oraz zaprezentowano na 14 konferencjach (4 międzynarodowych i 10 krajowych). Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych od 01.02.2004 zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Immunologii Bezkęgowców UMCS w Lublinie (nazwa zmieniona na Zakład Immunobiologii), w którym pracuję do dzisiaj.

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje:

- 25 prac eksperymentalnych, w tym 22 w czasopismach z listy JCR
- 2 artykuły przeglądowe
- 2 rozdziały w monografii
- 33 doniesienia zjazdowe w tym 11 z konferencji międzynarodowych

Łączny impact factor prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **54,701**, suma punktów MNiSW wynosi **645**.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki [Dziennik Ustaw nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami jak w Dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455])

4a. TYTUŁ

Osiągnięciem naukowym jest monotematyczny cykl publikacji naukowych przedstawiony pod tytułem:

AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA APOLIPOFORYNY III I JEJ ROLA W ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ BARCIAKA WIĘKSZEGO *GALLERIA MELLONELLA*

4b. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO		Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
7 oryginalnych prac eksperymentalnych, 1 praca przeglądowa			IF	MNiSW
P1	Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M. The involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of <i>Galleria mellonella</i> larvae. Comp. Biochem. Physiol. B 158: 90-98	2011	1,989	30
P2	Zdybicka-Barabas A. , Januszani B., Mak P., Cytryńska M. An atomic force microscopy study of <i>Galleria mellonella</i> apolipoprotein III effect on bacteria. Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes, 1808: 1896-1906	2011	3,990	32
P3	Zdybicka-Barabas A. , Stączek S., Mak P., Piersiak T., Skrzypiec K., Cytryńska M. The effect of <i>Galleria mellonella</i> apolipoprotein III on yeasts and filamentous fungi. J. Insect Physiol. 58: 164-177	2012	2,236	35
P4	Palusińska-Szys M., Zdybicka-Barabas A. , Pawlikowska-Pawłęga B., Mak P. Cytryńska M. Anti- <i>Legionella dumoffii</i> activity of <i>Galleria mellonella</i> defensin and apolipoprotein III. Int. J. Mol. Sci. 13: 17048-17064	2012	2,598	30
P5	Zdybicka-Barabas A. , Stączek S., Mak P., Skrzypiec K., Mendyk E., Cytryńska M. Synergistic action of <i>Galleria mellonella</i> apolipoprotein III and lysozyme against Gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 1828: 1449-1456	2013	3,434	35
P6	Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M. Apolipoproteins in insects immune response. Inv. Surv. J. (ISJ) 10: 58-68 (praca przeglądowa)	2013	1,059	20
P7	Zdybicka-Barabas A. , Palusińska-Szys M., Gruszecki W.I., Mak P., Cytryńska M. <i>Galleria mellonella</i> apolipoprotein III - an apolipoprotein with anti- <i>Legionella pneumophila</i> activity. Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 1838: 2689-2697	2014	3,836	35
P8	Zdybicka-Barabas A.* , Sowa-Jasiłek A., Stączek S., Jakubowicz T., Cytryńska M. Different forms of apolipoprotein III in <i>Galleria mellonella</i> larvae challenged with bacteria and fungi. Peptides 68: 105-112	2015	2,618	25

(* autor korespondencyjny)

Summaryczny *impact factor* - IF ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **21,76**

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: **242 pkt.**

4c. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie – przedmiot badań

Barciak większy *Galleria mellonella* (Lepidoptera: *Pyralidae*) w warunkach naturalnych jest szkodnikiem pasiek pszczelich natomiast w badaniach naukowych jest często stosowanym organizmem modelowym, który wykorzystuje się do poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej [Lionakis, 2011; Vilcinskas, 2010; Kavanagh i Reeves, 2004].

Funkcjonowanie układu odpornościowego owadów opiera się głównie na wrodzonych reakcjach komórkowych i humoralnych. Jednym z ważnych składników odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* jest apolipoforyna III (apoLp-III), białko występujące w hemolimfie w relatywnie dużej ilości. ApoLp-III budzi duże zainteresowanie naukowców ze względu na funkcje pełnione w organizmie owadów. ApoL-III obecna jest w różnych tkankach owadów np. hemolimfie, ciele tłuszczowym, hemocytach i płynie wylinkowym. Produkowana jest w różnych stadiach rozwojowych owada (jajach, gąsienicach, poczwarkach, imago). Należy do białek termostabilnych, dobrze rozpuszczających się w wodzie, o masie cząsteczkowej między 17-20kDa w zależności od gatunku owada. U Orthoptera ulega glikozylacji, natomiast u Lepidoptera brak tej modyfikacji. Analiza struktury I-rzędowej apoLp-III wykazała niskie podobieństwo sekwencji aminokwasowej pomiędzy przedstawicielami różnych rzędów owadów, natomiast wysoką homologię struktury przestrzennej i funkcji fizjologicznych białka [Publikacja P6].

Najlepiej poznaną rolę apoLp-III, jest jej **udział w transporcie lipidów** do mięśni podczas lotu oraz rozwoju osobniczego owadów, przy wysokim zapotrzebowaniu energetycznym. ApoLp-III ma zdolność przyłączania się do i odłączania od kompleksu lipoforyn o wysokiej gęstości (HDLp; ang. *high density lipophorin*) zawierającego apolipoforynę I (apoLp-I), apolipoforynę II (apoLp-II) oraz transportowane lipidy. Dlatego w hemolimfie może występować w formie wolnej, jako monomer, lub związanej z lipidami. Lipidy dostarczane są do tkanek z komórek ciała tłuszczowego

przez lipoforyny o niskiej gęstości (LDLp; ang. *low-density lipophorins*), zbudowane z HDLp oraz diacyloglicerolu (DAG) i apoLp-III. Z powierzchnią jednej cząstki HDLp, może być zasocjowanych od 14 do 16 cząsteczek apoLp-III w zależności od gatunku owada, co powoduje przekształcenie jej w cząsteczkę LDLp. Po uwolnieniu lipidów do tkanek następuje dysocjacja kompleksu, a apoLp-III i HDLp mogą ponownie uczestniczyć w transporcie kolejnych cząsteczek lipidów. Udział apoLp-III w transporcie lipidów uwarunkowany jest szczególną budową cząsteczki tego białka. Cząsteczka apoLp-III zbudowana jest z pięciu α -helis ułożonych naprzemianlegle, połączonych krótkimi regionami zawiasowymi, które tworzą cylindryczną wiązkę. Ugrupowania polarne (hydrofilowe) aminokwasów skierowane są na zewnątrz w stronę środowiska wodnego hemolimfy, natomiast hydrofobowe są ukryte wewnątrz cząsteczki. Dzięki takiej budowie, możliwe jest oddziaływanie apoLp-III z lipidami. Podczas wiązania z lipidami konformacja apoLp-III ulega drastycznym zmianom, dochodzi do otwarcia zamkniętej wiązki helis w taki sposób, że hydrofobowe wnętrze oddziałuje z cząsteczkami lipidów, a oddziaływania między helisami zostają zastąpione przez oddziaływania helisa-lipid [Weers i Ryan, 2006; **Publikacja P6**].

Drugą bardzo ważną rolą apoLp-III jest jej **udział w odpowiedzi immunologicznej**. Warunkiem niezbędnym do uruchomienia reakcji odpornościowych jest rozpoznanie patogenów, które dostały się do organizmu. W literaturze naukowej dobrze udokumentowana jest rola apoLp-III jako receptora rozpoznającego molekularne determinanty patogenów (PRRs ang. *pattern recognition receptors*), który wiąże się do składników powierzchniowych ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych (LPS) i Gram-dodatnich (LTA) oraz grzybów (β -1,3-glukan), określanych jako PAMPs (ang. *pathogen associated molecular patterns*) [Dunphy i Halwani, 1997; Halwani i in. 2000; Pratt i Weers, 2004; Whitten i in. 2004; Leon i in. 2006a, b; Ma i in. 2006; **Publikacja P6**]. Uważa się, że apoLp-III może pełnić rolę detoksyfikującą/neutralizującą toksyny drobnoustrojów. Wiązanie LTA *B. subtilis* przez apoLp-III chroni plazmatocyty przed uszkodzeniem. Natomiast apoLp-III *G. mellonella* wiążąc LPS bakterii patogennej *Xenorhabdus nematophilus* obniża jego toksyczne działanie na organizm oraz zapobiega uszkodzeniu hemocytów [Dunphy i Halwani, 1997; Halwani i in. 2000; **Publikacja P6**]. Wyjaśniony został częściowo mechanizm wiązania białka do LPS, zaangażowane są w nim lipid A i kwas 2-keto-3-deoksyoktanowy (KDO) obecny w części cukrowej cząsteczki LPS. Oddziaływanie między cząsteczkami prowadzi do zmiany konformacji apoLp-III, podobnej do tej jaka zachodzi podczas łączenia się z

lipidami [Leon i in. 2006a, b]. Sugeruje się, że apoLp-III *G. mellonella* rozbija agregaty LPS poprzez tworzenie kompleksów białko-LPS. Wykryto, że w przypadku LPS *Escherichia coli* 4 cząsteczki apoLp-III mogą oddziaływać z 24 cząsteczkami LPS, a w odniesieniu do LPS *Klebsiella pneumoniae* 3 cząsteczki apoLp-III łączą się z 9 cząsteczkami LPS. W początkowej fazie istotną rolę odgrywają siły jonowe między częścią cukrową LPS a białkiem, później przyłączenie do lipidu A opiera się na oddziaływaniu hydrofobowym [Oztug i in. 2012; **Publikacja P6**].

ApoLp-III uważana jest za cząsteczkę „sygnałową”, ponieważ uczestniczy w przekazywaniu informacji o zakażeniu w organizmie. Przyłącza się wówczas do lipidów w hemolimfie i jako składnik lipoforyn pobierana jest przez granulocyty na drodze endocytozy. Ponadto, apoLp-III uczestniczy w regulacji aktywności układu oksydazy fenolowej, który uruchamiany jest jako jeden z pierwszych w odpowiedzi na zakażenie. Dotychczasowe badania wykazały również, że iniekcja oczyszczonej lub rekombinowanej apoLp-III do hemocelu *G. mellonella* wzmacnia aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy owadów [Wiesner i in. 1997; Niere i in. 1999; **Publikacja P6**].

ApoLp-III zaangażowana jest także w odpowiedź komórkową, poprzez oddziaływanie z jednej strony z powierzchnią komórek drobnoustrojów, a z drugiej z powierzchnią hemocytów. Białko to modyfikuje właściwości adhezyjne granulocytów i plazmatocytów, co może wpływać na przebieg procesu fagocytozy. ApoLp-III przyspiesza fagocytozę komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przez plazmatocyty, oraz inkapsulację *in vitro* i tworzenie nodul *in vivo* wokół komórek grzyba *Metarhizium anisopliae* [Wiesner i in. 1997; Whitten i in. 2004]. Z kolei obniżenie poziomu apoLp-III hamuje zdolność hemocytów do tworzenia nodul u *Plutella xylostella* w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne [Son i Kim, 2011; **Publikacja P6**].

Należy zaznaczyć, że jedną ze strategii organizmów entomopatogennych umożliwiających przełamanie barier systemu immunologicznego gospodarza jest właśnie obniżanie poziomu apoLp-III, np. u gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych przez *Pseudomonas aeruginosa* [Andrejko i in. 2013, 2014], czy u *P. xylostella* po złożeniu jaj przez pasożytnicze osy *Cotesia plutellae* [Son i Kim, 2011; **Publikacja P6**].

Wykazano także, że obecność apoLp-III w komórkach jelita komara *Anopheles gambiae* hamuje rozwój *Plasmodium berghei*, natomiast brak tego białka wyraźnie

ułatwia rozwój infekcji zarodźcem [Gupta i in. 2010; **Publikacja P6**]. Natomiast przeżywalność gąsienic *G. mellonella* znacznie wzrasta po podaniu konidiów entomopatogenicznego grzyba *M. anisopliae* opłaszczonych apoLp-III w porównaniu do tych nietraktowanych białkiem [Whitten i in. 2004; **Publikacja P6**].

Wydaje się, że oba procesy, transport lipidów i reakcje odpornościowe, w których uczestniczy apoLp-III są ze sobą powiązane i konkurują o białko. Wykazano, że świerszcze *Gryllus texensis* były bardziej podatne na infekcję bakteryjną po odbytych locie [Adamo i in. 2008; **Publikacja P6**].

Cel badań

W świetle powyższych danych podjęłam badania mające na celu określenie innych potencjalnych funkcji tego białka w odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* m.in. jako czynnika o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Badania obejmowały:

- I. Określenie zmian poziomu apoLp-III w hemolimfie, hemocytach i cieple tłuszczowym oraz obecności różnych form białka po zakażeniu bakteriami i grzybami.
- II. **A)** Określenie aktywności przeciwbakteryjnej apoLp-III oraz mechanizmu jej działania.
Występowanie homologii między apoLp-III owadów, a N-kończącą domeną apolipoproteiny E (apoE) człowieka oraz zaangażowanie obu białek w odpowiedź immunologiczną przeciwko patogenom ludzkim m.in. *K. pneumoniae*, *Listeria monocytogens* [Roselaar i Daugherty, 1998; De Bont i in. 1999, 2000; Mukherjee i in. 2010; Insua i in. 2013; Wand i in. 2013] skłoniło mnie do podjęcia badań w kierunku sprawdzenia, czy apoLp-III ma również aktywność przeciwko bakteriom *Legionella*.
B) Działanie apoLp-III na *Legionella pneumophila* i *L. dumoffii*.
- III. Określenie aktywności przeciwgrzybowej apoLp-III.
- IV. Synergizm działania apoLp-III i lizozymu.

Omówienie wyników przeprowadzonych badań

Badania, których wyniki zawarte zostały w monotematycznym cyklu oryginalnych prac eksperymentalnych są kontynuacją tematyki podjętej w pracy doktorskiej. Wstępne obserwacje dotyczące udziału apoLp-III w odpowiedzi immunologicznej barciaka większego były niezwykle intrygujące, dlatego w swoich dalszych badaniach chciałam pogłębić wiedzę o roli tego białka w reakcjach odpornościowych.

- W pracy doktorskiej badałam poziom apoLp-III w hemolimfie gąsienic oraz poczwerek po podaniu LPS *E. coli*. W tej części badań do immunizacji stosowałam różne grupy drobnoustrojów m.in.: bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, drożdże oraz grzyby pleśniowe. Natomiast do badań używałam różnych tkanek gąsienic *G. mellonella* (hemolimfę, hemocyty, ciało tłuszczowe).
- Do immunodetekcji apoLp-III w pracy doktorskiej używałam przeciwciał przeciwko apoLp-III *M. sexta*, które otrzymałam od prof. R.O. Ryana z Wydziału Biochemii Uniwersytetu Alberta w Kanadzie. Obecnie stosowałam przeciwciała anty-apoLp-III *G. mellonella*, które zostały otrzymane przez nasz zespół badawczy.
- Ponadto dopracowałam procedurę oczyszczania apoLp-III, która pozwoliła na otrzymanie preparatu homogenego białka.

I. Zmiany poziomu apoLp-III w odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* na zakażenie drobnoustrojami

Układ odpornościowy *G. mellonella* odróżnia zakażenie wywołane różnymi klasami mikroorganizmów i odpowiada na nie zróżnicowaną kinetyką pojawiania się oraz różnym poziomem poszczególnych peptydów odpornościowych w hemolimfie [Mak i in. 2010]. Dlatego, w pierwszym etapie badań przebadalam kinetykę zmian poziomu apoLp-III w hemolimfie *G. mellonella* po immunizacji bakteriami Gram-dodatnimi (*Micrococcus luteus*) lub Gram-ujemnymi (*E. coli*, *K. pneumoniae*) [**Publikacja P1**]. Przy pomocy techniki immunoblotingu z wykorzystaniem przeciwciał anty-apoLp-III *G. mellonella*, **wykazałam zróżnicowany poziom apoLp-III w zależności od podanego immunogenu**. Immunizacja gąsienic wywoływała stopniowy wzrost poziomu apoLp-III w hemolimfie do 8 godz. od podania bakterii *M. luteus*. Natomiast zakażenie bakteriami Gram-ujemnymi wywołało wzrost poziomu w przypadku *E. coli* po 1 godz., a *K. pneumoniae* po 0,5 godz. od iniekcji. Relatywnie wysoki poziom białka w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* obserwowałam jeszcze po 24 godz. od

immunizacji bakteriami *M. luteus*. Natomiast po podaniu *E. coli* i *K. pneumoniae* poziom ten uległ obniżeniu, odpowiednio, o 28% i 58% w porównaniu do nieimmunizowanych owadów.

Zmiany poziomu apoLp-III w hemolimfie owadów krótko po zakażeniu bakteriami Gram-ujemnymi mogą być związane z szybkim rozpoznaniem infekcji i bezpośrednią detoksyfikacją LPS przez apoLp-III oraz uruchomieniem reakcji odpornościowych. Na tym etapie badań trudno wyjaśnić jednoznacznie, czy obserwowany wzrost poziomu białka związany jest z jego syntezą i następnie wydzielaniem z ciała tłuszczowego do hemolimfy, czy tylko z uwolnieniem zmagazynowanej wcześniej puli apoLp-III. Z drugiej strony, spadek poziomu apoLp-III obserwowany 8-24 godz. po immunizacji *G. mellonella* bakteriami Gram-ujemnymi może być spowodowany interakcją białka z powierzchnią komórek i endocytozą kompleksu lipoforyn przez hemocyty [**Publikacje P1, P6**; Dettloff i in. 2001a, b].

W dalszej części badań sprawdziłam, czy istnieje korelacja w czasie pomiędzy zmianami poziomu apoLp-III zachodzącymi w hemolimfie, hemocytach i ciele tłuszczowym *G. mellonella*, ważnych elementach układu immunologicznego, po zakażeniu różnymi klasami mikroorganizmów [**Publikacja P8**]. Przeprowadziłam wpływ zakażenia gąsienic *G. mellonella* bakteriami (*M. luteus*, *E. coli*), drożdżakami (*Candida albicans*) i grzybami pleśniowymi (*Fusarium oxysporum*) na poziom apoLp-III. Obserwowane zmiany poziomu apoLp-III w hemolimfie były skorelowane ze zmianami poziomu białka w ciele tłuszczowym i hemocytach [**Publikacja P8**]. Zakażenie bakteriami zwiększało poziom białka w hemolimfie, a obniżało w ciele tłuszczowym, podczas gdy w hemocytach po iniekcji *E. coli* notowano wzrost, a po *M. luteus* spadek poziomu apoLp-III. Podanie grzybów obniżało poziom apoLp-III w hemolimfie i/lub hemocytach, czemu towarzyszył znaczący wzrost poziomu tego białka w ciele tłuszczowym owadów. **Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że zakażenie różnymi drobnoustrojami wpływa na poziom apoLp-III nie tylko w hemolimfie, ale również w hemocytach i ciele tłuszczowym, a zmiany poziomu apoLp-III w tych elementach układu immunologicznego są skorelowane w czasie [Publikacja P8].**

W hemolimfie niepobudzonych i pobudzonych gąsienic *G. mellonella* poddanej rozdzielowi elektroforetycznemu w warunkach natywnych przeciwciała anti-apoLp-III rozpoznawały co najmniej 5 prążków, co mogło sugerować tworzenie kompleksów z innymi składnikami hemolimfy lub obecność izoform apoLp-III [**Publikacja P5**]. Warto tu zaznaczyć, że Wiesner i in. [1997] wykazali obecność dwóch izoform (pI 6,1 i

6,5) apoLp-III *G. mellonella* oraz trzy izoformy apoLp-III opisali również Chino i Yazawa [1986] u *Locusta migratoria* [**Publikacja P6**]. W badaniach z wykorzystaniem elektroforezy 2D IEF/SDS-PAGE, a następnie immunoblotingu z przeciwciałami skierowanymi przeciwko apoLp-III *G. mellonella* wykazałam, że w hemolimfie niepobudzonych gąsienic *G. mellonella* obecne są dwie główne izoformy o pI 6,5 i 6,1, a u immunizowanych owadów co najmniej 3 izoformy o różnym pI (5,9; 6,1; 6,5), ale bardzo zbliżonej masie cząsteczkowej [**Publikacje P1, P8**]. Wszystkie trzy formy apoLp-III obserwowałam w hemolimfie owadów 15 min. i 1 godz. po immunizacji niezależnie od immunogenu, ale po 24 godz. od pobudzenia profil izoform był różny i zależał od rodzaju podanego immunogenu [**Publikacja P8**]. U owadów immunizowanych *M. luteus* lub *C. albicans* widoczne były tylko dwie główne formy, tak jak w hemolimfie kontrolnej, natomiast po podaniu *E. coli* i *F. oxysporum* nadal obecne były trzy izoformy apoLp-III.

Co ciekawe, po immunizacji w hemolimfie pojawiały się dwa dodatkowe polipeptydy (**a**/pI 6,8 i **b**/pI 6,9) pochodzące z apoLp-III (ang. *apoLp-III-derived*) o niższej masie cząsteczkowej, jednak czas ich pojawiania się i utrzymywania w hemolimfie był ściśle uzależniony od podanego immunogenu. Nie obserwowałam ich tylko w hemolimfie gąsienic po 1 godz. od immunizacji *C. albicans* oraz 24 godz. po podaniu *M. luteus*.

W hemocytach niepobudzonych gąsienic *G. mellonella* wykazałam obecność dwóch form apoLp-III o pI 6,3-6,5, a w ciele tłuszczowym czterech. Natomiast cztery formy białka wykryłam w hemocytach owadów immunizowanych *F. oxysporum*, w pozostałych przypadkach nie obserwowałam zmian w porównaniu z kontrolnymi owadami.

W ciele tłuszczowym owadów kontrolnych i pobudzonych poza głównymi formami dodatkowo obserwowałam polipeptydy pochodzące z apoLp-III [**Publikacja P8**]. **Uzyskane wyniki wyraźnie pokazują, że immunizacja gąsienic *G. mellonella* różnymi immunogenami zmienia poziom apoLp-III i liczbę form nie tylko w hemolimfie, ale również hemocytach i ciele tłuszczowym oraz korelację tych zmian w czasie. Natomiast liczba form apoLp-III zależy od tkanki.** Ustalono, że główna izoforma o pI 6,5, jest obecna we wszystkich przebadanych tkankach zarówno owadów kontrolnych, jak i immunizowanych. Biorąc pod uwagę również możliwość oddziaływania białka z lipidami, wykryte formy apoLp-III mogą odzwierciedlać stan w jakim ono występuje (wolny lub związany z lipidami). **Ponadto, mimo, że po każdym**

immunogenie w hemolimfie obecne były polipeptydy pochodzące z apoLp-III, to czas ich pojawiania się i utrzymywania w hemolimfie uzależniony był od rodzaju immunogenu. Obserwowane różnice wyraźnie wskazują, że układ immunologiczny barciaka większego odróżnia zakażenie bakteriami i grzybami oraz odmiennie na nie odpowiada. Różne formy apoLp-III oraz polipeptydy pochodzące z apoLp-III, które pojawiają się w odpowiedzi na zakażenie, mogą powstawać na drodze proteolizy (być może ograniczonej?) i /lub innych procesów potranslacyjnych modyfikacji dojrzałego białka. Obecność różnych form w cieple tłuszczowym, głównym miejscu syntezy apoLp-III może sugerować, że różne izoformy w hemolimfie powstają podczas i po wydzieleniu z komórek ciała tłuszczowego. Porównując pI 6,5 głównej formy z pozostałymi formami o zbliżonej masie cząsteczkowej, ale różniących się pI można przypuszczać, że powstały one przez odcięcie pojedynczych aminokwasów od C-końca głównej izoformy. Natomiast pI i masa cząsteczkowa polipeptydów pochodzących z apoLp-III może być wynikiem ograniczonej proteolizy określonych wiązań w dojrzałej cząsteczce białka od N-końca przez amino- jak również karboksypeptydazy, których obecność stwierdzono jak dotąd w hemolimfie i cieple tłuszczowym niektórych Lepidoptera oraz w jelicie *G. mellonella* [**Publikacja P8**]. Wiadomo, że apoLp-III występuje w hemocytach, ale trudno wyjaśnić pochodzenie jej izoform. Można przypuszczać, że pochodzą z hemolimfy i są pobierane przez hemocyty w formie LDLp po rozpoznaniu immunogenu w hemolimfie [**Publikacja P6**; Dettloff i in. 2001a, b]. Z drugiej strony, jako, że opisano ekspresję genu dla apoLp-III w hemocytach u Lepidoptera [**Publikacja P6**; Kim i in. 2004; Son i Kim, 2011] można też sądzić, że część pochodzi z granul hemocytów, gdzie jest magazynowana i skąd jest uwalniana po infekcji [**Publikacja P8**].

II. Apolipoforyna III jako receptor rozpoznający patogeny u *G. mellonella*

Uważa się, że składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, z którym oddziałuje apoLp-III jest LTA, u Gram-ujemnych jest to LPS, a u grzybów β -1,3-glukan [Dunphy i Halwani, 1997; Halwani i in. 2000; Pratt i Weers, 2004; Whitten i in. 2004; Leon i in. 2006a, b; Ma i in. 2006; **Publikacja P6**]. Wykazałam, że apoLp-III wiąże się z powierzchnią zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [**Publikacje P1, P7**] oraz drożdży i grzybów pleśniowych [**Publikacja P3**]. Z moich badań wynika, że apoLp-III przyłącza się prawdopodobnie również do innych, niż wyżej wymienione,

składników powierzchni komórek drobnoustrojów. Wskazywała na to adsorpcja białka do bakterii Gram-dodatnich *M. luteus*, które nie zawierają LTA w ścianie komórkowej. Wykazałam, że wszystkie izoformy apoLp-III przyłączały się do powierzchni *B. circulans* i *K. pneumoniae* [Publikacja P1], natomiast tylko dwie główne (pI 6,1; 6,5) do powierzchni *M. luteus* i *E. coli*, jak również badanych grzybów [Publikacja P8]. **Zdolność łączenia się białka z powierzchnią komórek bakterii i grzybów, potwierdziła jego rolę jako PRR, która jest istotna w rozpoznaniu zakażenia i uruchomieniu odpowiedzi immunologicznej.**

II. A) Aktywność przeciwbakteryjna apolipoforyny III

Bezpośrednie oddziaływanie apoLp-III z powierzchnią komórek patogenów może wskazywać na jeszcze jedną bardzo ważną rolę tego białka w reakcjach odpornościowych jako czynnika o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej.

W związku z tym, w dalszej części badań przebadalam przeżywalność bakterii w obecności apoLp-III, stosując metodę zliczania kolonii oraz barwienie LIVE/DEAD. **Wykazałam, że apoLp-III ma aktywność przeciwbakteryjną.** Spośród przebadanych bakterii najbardziej wrażliwe na działanie apoLp-III były bakterie Gram-ujemne *K. pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium. Natomiast bakterie Gram-dodatnie były znacznie mniej wrażliwe na apoLp-III, przy czym najslabiej działała ona na *M. luteus* (Tab. 1).

Tabela 1. Wpływ apolipoforyny III *G. mellonella* na przeżywalność wybranych gatunków bakterii (Publikacja P1).

Bakterie	Gatunek	Śmiertelność (%)
Gram-dodatnie	<i>Bacillus circulans</i>	51,1 (±8,73)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	53,1 (±5,71)
	<i>Micrococcus luteus</i>	20,9 (±8,34)
	<i>Sarcina lutea</i>	48,5 (±12,1)
Gram-ujemne	<i>Escherichia coli</i> D31	19,7 (±7,29)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	81,3 (±3,38)
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	93,1 (±2,84)

Kontrolą były bakterie nie traktowane apoLp-III.

Warto podkreślić, że użyte stężenie apoLp-III (5µM) było 10-cio a nawet 18-sto krotnie niższe, niż to ustalone w hemolimfie gąsienic *G. mellonella*, odpowiednio, przez Wiesner i in. [1997] oraz Halwani i Dunphy [1999]. Pomimo, że apoLp-III adsorbuje się do powierzchni wszystkich przebadanych bakterii Gram-dodatnich i Gram-

ujemnych, to ich różna wrażliwość na białko może być związana z odmienną budową ściany komórkowej [**Publikacja P1**]. Można przypuszczać, że słabsze działanie apoLp-III na komórki szczepu *E. coli* D31 związane było ze zmienioną budową części cukrowej LPS [**Publikacja P1**]. Prawdopodobnie różnice w budowie ściany komórkowej również bakterii Gram-dodatnich mogą wpływać na skuteczność działania apoLp-III. Można sądzić, że wysoka wrażliwość *L. monocytogenes* na działanie apoLp-III wiązała się z obecnością LTA, którego łączenie się z apoLp-III opisano w literaturze naukowej. ApoLp-III była równie skuteczna w stosunku do *B. circulans*, ale brak LTA w ścianie tych bakterii sugeruje inny mechanizm działania białka. Natomiast brak LTA w ścianie komórkowej *M. luteus* mógł być z kolei przyczyną małej wrażliwości na apoLp-III [**Publikacja P1**].

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że apoLp-III może reagować jeszcze z innymi składnikami, poza LPS i LTA, znajdującymi się na powierzchni komórek bakterii [Publikacja P1]. Nie można wykluczyć, że słabe działanie apoLp-III związane jest z modyfikacjami składników ściany komórkowej. Wykazałam również, że kinetyka działania apoLp-III na wrażliwe bakterie jest różna; po 15 min. wzrost *K. pneumoniae* był zahamowany o 35%, podczas gdy *B. circulans* tylko o 2% [**Publikacja P1**].

Mikroskopia sił atomowych (AFM ang. *atomic force microscopy*) jest narzędziem umożliwiającym badanie zmian ultrastruktury powierzchni bakterii i grzybów pod wpływem biologicznie aktywnych cząsteczek [Zdybicka-Barabas i in. 2012]. Na potrzeby moich badań opracowałam procedurę przygotowywania preparatów pozwalających na obrazowanie i analizę zmian powierzchni komórek drobnoustrojów w AFM. **Wykazałam, że pod wpływem apoLp-III zachodzą wyraźne zmiany w strukturze powierzchni komórek bakterii** [badania wykonane we współpracy z Laboratorium Analitycznym, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie] [**Publikacja P2**; Zdybicka-Barabas i in. 2012].

Efektem działania apoLp-III na *B. circulans* była wyraźna zmiana struktury powierzchni, która stała się porowata i zawierała liczne ubytki. Stwierdziłam też wzrost szorstkości powierzchni komórek traktowanych apoLp-III (Tab. 2). Natomiast komórki *K. pneumoniae* pod wpływem apoLp-III utraciły regularny kształt oraz charakterystyczną strukturę przypominającą „zwoje mózgowe” (ang. *cortex bend-like*), zamiast której pojawiły się głębokie nieregularne bruzdy. Z kolei na powierzchni komórek *S. Typhimurium* widoczne były głębokie bruzdy i ubytki, a ich szorstkość wyraźnie wzrosła (Tab. 2). Co ciekawe, ubytki zlokalizowane były na biegunach

komórek *S. Typhimurium* [Publikacja P2]. Jednak na tym etapie trudno jest jednoznacznie wyjaśnić mechanizm ich powstawania, dlatego wymaga to dalszych badań. Natomiast powierzchnia komórek *M. luteus* nie ulegała zmianie [Publikacja P2], co było zgodne z niewielką wrażliwością tych bakterii na działanie apoLp-III [Publikacja P1] (Tab. 2).

Tabela 2. Zmiany szorstkości powierzchni komórek bakterii pod wpływem apoLp-III [Publikacja P2]

Bakterie	RMS roughness (nm)	
	Kontrola	Apolp-III
<i>B. circulans</i>	7,66 ($\pm 3,84$)	17,00 ($\pm 8,5$)
<i>M. luteus</i>	35,37 ($\pm 35,37$)	37,88 ($\pm 19,66$)
<i>K. pneumoniae</i>	16,34 ($\pm 7,07$)	20,15 ($\pm 7,43$)
<i>S. Typhimurium</i>	7,68 ($\pm 1,7$)	22,49 ($\pm 11,87$)

Uzyskane wyniki po raz pierwszy dostarczyły dowodów na to, że apoLp-III, ma **aktywność przeciwbakteryjną**. Ponadto, działanie apoLp-III zmienia powierzchnię komórek wrażliwych bakterii i jej właściwości nanomechaniczne już w niewielkim stężeniu (0,4 μ M). Wyniki wyraźnie wskazują na **nową rolę apoLp-III w reakcjach odpornościowych, jako składnika odpowiedzi humoralnej o aktywności przeciwdrobnoustrojowej**, który może wzmocnić skuteczność odpowiedzi immunologicznej w zwalczaniu zakażenia bakteriami [Publikacje P1, P2, P6].

II. B) Wrażliwość bakterii *Legionella* na działanie apolipoforyny III

Zaangażowanie apoLp-III i apoE, homologa owadziej apoLp-III, w odpowiedź immunologiczną przeciwko patogenom ludzkim zewnątrzkomórkowym *K. pneumoniae* i wewnątrzkomórkowym *Listeria monocytogenes* [Roselaar i Daugherty, 1998; De Bont i in. 1999, 2000; Mukherjee i in. 2010; Insua i in. 2013; Wand i in. 2013] skłoniło mnie do przebadania działania apoLp-III na bakterie *Legionella*.

Bakterie *Legionella* (Gram-ujemne pałeczki), które stanowią naturalną mikroflorę środowisk wodnych i glebowych mogą być przyczyną zakażeń dróg oddechowych u ludzi. Do zakażeń dochodzi na drodze inhalacji wodno-powietrznego aerozolu zawierającego bakterie, powstającego w wyniku działania m.in. systemów klimatyzacyjnych, wież chłodniczych, urządzeń przemysłowych i medycznych. W organizmie człowieka bakterie wywołują infekcje dróg oddechowych o różnym nasileniu: od grypopodobnej infekcji zwanej gorączką Pontiac, która nie wymaga

specjalistycznego leczenia, do ostrego wielopłatowego zapalenia płuc nazywanego chorobą Legionistów, która może prowadzić do śmierci.

Najczęściej legioneloza wywoływana jest przez *L. pneumophila* (70-80% przypadków), a *L. dumoffii* zajmuje czwarte miejsce pod względem częstości wywoływanych zakażeń [Palusińska-Szys, 2011]. Patogenność wewnątrzkomórkowych bakterii, do których należą *Legionella*, zależy przede wszystkim od struktur powierzchniowych takich jak białka, LPS oraz lipidy. Obecność fosfatydylocholiny (PC) i fosfatydyloetanolaminy (PE) w błonach, jako głównych fosfolipidów odróżnia je od innych bakterii Gram-ujemnych. Występowanie PC w błonie jest ważne ze względu na cykl życiowy *Legionella*, który jest ściśle związany z komórką eukariotyczną [Palusińska-Szys i Drożański, 2006]. Zdolność pałeczek *Legionella* do wykorzystania zewnątrzkomórkowych źródeł choliny ułatwia bakteriom przetrwanie wewnątrz komórek gospodarza. Pobierana z zewnątrz cholina jest wykorzystywana przez *L. pneumophila*, *L. dumoffii* i *L. bozemanii* do syntezy PC, składnika błony [Palusińska-Szys i in. 2011, 2014].

W ostatnich latach *G. mellonella* jest szeroko wykorzystywana jako alternatywny model w badaniach nad patogennością i czynnikami wirulencji bakterii chorobotwórczych dla ludzi, m.in. *L. pneumophila* [Harding i in. 2012, 2013]. Badania w tym zakresie są możliwe dzięki m.in. dużemu podobieństwu mechanizmów odporności wrodzonej owadów oraz ssaków [Scully i Bidochka, 2006; Uvel i Engström, 2007].

Wyniki moich badań, w których wykazałam aktywność przeciwbakteryjną apoLp-III [Publikacje P1, P2] oraz zaangażowanie apoE, homologa owadziej apoLp-III, w odpowiedź immunologiczną u ludzi, skłoniły mnie do przebadania działania apoLp-III na bakterie *L. pneumophila* i *L. dumoffii*. Jednocześnie sprawdziłam, czy suplementacja podłoża choliną wpływa na poziom wrażliwości bakterii na działanie apoLp-III *G. mellonella* (badania wykonane we współpracy z Zakładem Genetyki i Mikrobiologii, UMCS).

ApoLp-III w stężeniu 0,1 mg/ml hamowała wzrost *L. pneumophila* o ok. 55%, a w stężeniu 0,8 mg/ml o ok. 90%. Co ciekawe, wrażliwość bakterii nie zależała od warunków hodowli (podłoże bez choliny/z choliną) [Publikacja P7]. Zastosowanie AFM pozwoliło mi na wykazanie wyraźnych zmian w strukturze powierzchni komórek *L. pneumophila* traktowanych apoLp-III w porównaniu do kontroli. Dla biologicznych właściwości apoLp-III istotna jest jej zdolność do wchodzenia w interakcje z lipidami, jak również innymi składnikami powierzchni komórek bakterii, m.in. LPS. Do badania

tych interakcji zastosowałam spektroskopię absorpcyjną w podczerwieni FTIR-ATR (spektrometria FTIR w połączeniu z metodą całkowitego wewnętrznego odbicia, ATR; ang. *Attenuated Total Reflection*), która bada absorpcję promieniowania związaną ze wzbudzeniem poziomów oscylacyjnych cząsteczek. Pozwala to na obserwowanie struktury drugorzędowej białek oraz zachodzących w ich strukturze zmian powstających podczas oddziaływania z innymi cząsteczkami. Zmiany w kształcie pasm można powiązać ze zmianami w strukturze badanych cząsteczek. Analiza zmian widma różnicowego absorpcji w podczerwieni (badania wykonane we współpracy z Zakładem Biofizyki, Instytutu Fizyki, UMCS) wskazywała przede wszystkim na interakcję apoLp-III z LPS oraz innym niezidentyfikowanym lipidowym składnikiem powierzchni komórki bakterii *Legionella*. Dlatego, żeby uzyskać potwierdzenie czy LPS *L. pneumophila* zaangażowany jest w oddziaływanie z apoLp-III, do dalszych badań stosowałam LPS oczyszczony z komórek *L. pneumophila*. **Wykazałam, że apoLp-III i LPS *L. pneumophila* silnie ze sobą oddziałują tworząc stabilne kompleksy**, co zmieniło ich migrację w żelu poliakrylamidowym. Ponadto, analiza widm różnicowych FTIR wskazywała na zmianę konformacji cząsteczek apoLp-III oraz LPS *L. pneumophila* zachodzących w wyniku wzajemnego ich oddziaływania. Stwierdzono, że w oddziaływania te są zaangażowane wiązania wodorowe między apoLp-III a estrowymi grupami karbonyłowymi, PO₂ i C-O-P-O z LPS *L. pneumophila* [**Publikacja P7**]. Można sądzić, że dla aktywności bakteriobójczej apoLp-III niezbędnym warunkiem jest oddziaływanie z LPS.

ApoLp-III (0,4 mg/ml) powodowała spadek przeżywalności bakterii *L. dumoffii* hodowanych na podłożu bez choliny o ok. 30%, a obserwacje w mikroskopie elektronowym (TEM) uwidocznily zmiany w strukturze wewnętrznej bakterii w postaci m.in. zwiększonej wakuolizacji komórek, kondensacji cytoplazmy (badania wykonane we współpracy z Zakładem Anatomii i Antropologii Porównawczej, UMCS) [**Publikacja P4**]. Natomiast komórki *L. dumoffii* hodowane na podłożu w obecności choliny cechowała trzykrotnie wyższa wrażliwość w porównaniu do bakterii hodowanych na podłożu bez choliny, któremu towarzyszyło dużo większe uszkodzenie komórek. Obserwacje mikroskopowe wykazały obecność licznych wakuoli, zagęszczenie cytoplazmy, rejony o mniejszej gęstości elektronowej, a w niektórych komórkach poszerzoną przestrzeń peryplazmatyczną oraz liczne zmiany w strukturze ściany komórkowej [**Publikacja P4**].

Uzyskane wyniki wskazują na to, że różnice w budowie osłon komórkowych *L. dumoffii* i *L. pneumophila* decydują o odmiennej wrażliwości na apoLp-III. **Można sądzić, że LPS u *L. pneumophila* a PC u *L. dumoffii*, odgrywają istotną rolę w oddziaływaniu apoLp-III z osłonami komórkowymi tych bakterii [Publikacje P4, P7].**

Wrażliwość bakterii na apoLp-III może sugerować na zaangażowanie apoE, w reakcjach odpornościowych człowieka na infekcje wywoływane przez bakterie *Legionella*.

Chcąc wyjaśnić różnice we wrażliwości komórek *L. dumoffii* hodowanych na podłożu wzbogaconym w cholinę i bez dodatku choliny na działanie apoLp-III, użyłam białka znakowanego FITC oraz skaningowego mikroskopu konfokalnego. Wykazałam, że już 5 min. inkubacji *L. dumoffii* z FITC-apoLp-III wystarczyło do przyłączenia białka do powierzchni komórek bakterii. Co ważne, liczba komórek ze związaną apoLp-III po 15 min. inkubacji była o ok. 27% wyższa w przypadku bakterii hodowanych na podłożu wzbogaconym choliną. Badania czasu życia fluorescencji (FLIM; ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy*) wykazały, że FITC-apoLp-III wnika głębiej do ściany komórkowej *L. dumoffii* hodowanych na podłożu suplementowanym choliną. Wzrostowi wrażliwości bakterii towarzyszyły również zmiany w strukturze powierzchni i właściwościach nanomechanicznych komórek (AFM). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że apoLp-III łatwiej oddziałuje z powierzchnią komórek hodowanych na podłożu wzbogaconym choliną [Interactions of *Galleria mellonella* apolipoprotein III with *Legionella dumoffii* cell surface, **Zdybicka-Barabas A***, Palusińska-Szys M., Luchowski R., Reszczyńska E., Mak P., Gruszecki W., Cytryńska M., Pathogens and Disease PAD-15-07-0113 – autor korespondencyjny; praca wysłana do druku po recenzji; IF₂₀₁₄ 2,554; 25pkt. MNiSW]

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazały po raz pierwszy, że bakterie *Legionella* są wrażliwe na apoLp-III *G. mellonella*, a ich wrażliwość na to białko zależy od gatunku i budowy ich osłon komórkowych [Publikacje P4, P7].

III. Aktywność przeciwgrzybowa apolipoforyny III

W moich pracach wykazałam, że apoLp-III, jako cząsteczka PRR, przyłącza się do powierzchni drożdży i grzybów pleśniowych [Publikacja P3]. Natomiast jakie zmiany wywołuje w komórkach grzybów jest nadal sprawą otwartą.

Obserwowałam agregację komórek drożdży *C. wickerhamii* oraz *Zygosaccharomyces marxianus* w obecności apoLp-III. Natomiast komórki *C. albicans*

po 24 godz. inkubacji z apoLp-III przechodziły z formy pączkującej w długie pseudostrzępki i prawdziwe strzępki, jednakże ich aktywność metaboliczna nie ulegała zmianie w porównaniu do komórek kontrolnych. Co ciekawe, 1 godz. inkubacja z apoLp-III prowadziła do wyraźnego wzrostu aktywności metabolicznej komórek *C. albicans* w porównaniu z kontrolą (badania wykonane we współpracy z Zakładem Anatomii i Antropologii Porównawczej, UMCS). Odmienne, inkubacja *F. oxysporum* w obecności apoLp-III obniżała aktywność metaboliczną strzępek, zwiększała wakuolizację komórek oraz stymulowała tworzenie licznych monofialidiów z konidiami, ale nie hamowała kiełkowania zarodników *F. oxysporum*.

Obrazowanie powierzchni komórek grzybów za pomocą AFM wykazało wyraźne zmiany, które wskazują na interakcję apoLp-III ze składnikami ściany komórkowej [**Publikacja P3**]. Wiadomo, że apoLp-III oddziałuje z β -1,3-glukanem, jednakże β -1,3-glukan wraz z chityną tworzą wewnętrzną warstwę ściany komórkowej, która nie jest ekspozycja na zewnątrz. Zewnętrzną warstwę formują mannozylowane i ufosforylowane białka. Mimo, że nie są znane białka powierzchniowe, do których może się przyłączać apoLp-III, biorąc pod uwagę zdolność apoLp-III do oddziaływania z ugrupowaniami cukrowymi LPS, można przypuszczać że są to białka glikozylowane, a w oddziaływania zaangażowane są ich reszty cukrowe. Przyłączenie apoLp-III do „płaszcz” białkowy może powodować zmiany, które prowadzą do odsłonięcia β -1,3-glukanu, co może ułatwiać rozpoznanie infekcji oraz umożliwiać innym czynnikom przeciwdrobnoustrojowym, np. peptydom odpornościowym działanie na błonę komórki.

IV. Synergizm działania apolipoforyny III z lizozymem

ApoLp-III i lizozym są konstytutywnymi składnikami odpowiedzi humoralnej stale obecnymi w hemolimfie *G. mellonella*, co może wskazywać na współdziałanie tych białek w zwalczaniu infekcji drobnoustrojami w organizmie owada. Wiadomo, że obecność apoLp-III zwiększa aktywność EWL wobec *M. luteus in vitro* [**Publikacja P6**; Halwani i Dunphy, 1999], ale mechanizm ich synergistycznego działania nie został poznany. Uważa się, że za działanie lizozymu na bakterie Gram-dodanie odpowiada aktywność muramidazowa, natomiast aktywność przeciw bakteriom Gram-ujemnym przypisywana jest głównie działaniu nieenzymatycznemu podobnemu do działania kationowych peptydów odpornościowych. **W moich badaniach wykazałam, że apoLp-III znacznie wzmacniała aktywność muramidazową lizozymu *G. mellonella*.**

Ponadto, obecność apoLp-III zwiększała perforację błony komórek bakterii Gram-ujemnych *E. coli* JM83 przez lizozym o ok. 20%, mimo, iż sama apoLp-III nie wykazywała takiego działania. Może być to spowodowane zmianami powierzchni komórek bakterii *E. coli* i jej właściwości nanomechanicznych pod wpływem apoLp-III [**Publikacja P5**]. Uważa się, że przyłączenie apoLp-III zwiększa hydrofobowość, jak również ujemny ładunek powierzchni komórek [Halwani i Dunphy, 1999], co może wzmocnić oddziaływanie zasadowego lizozymu z powierzchnią komórek bakterii, a tym samym ułatwić trawienie peptydoglikanu, co w efekcie prowadzi do śmierci komórki. Analiza właściwości nanomechanicznych (szorstkość, elastyczność, adhezja) komórek bakterii wykazała, że pod wpływem mieszaniny obu składników dochodzi do wyraźnego wzrostu adhezji, ale, co ciekawe, pozostałe parametry pozostają bez zmian w porównaniu z kontrolą [**Publikacja P5**].

Można przypuszczać, że apoLp-III potęguje działanie lizozymu dwójako. Po pierwsze apoLp-III łącząc się z powierzchnią komórek *E. coli*, prawdopodobnie przez LPS, tak zmienia jej właściwości, że ułatwia i wzmacnia przyłączanie się lizozymu, a następnie może wzmacniać jego aktywność muramidazową.

Wykazałam ponadto, że cząsteczki obu białek nie tworzą między sobą kompleksów, co może sugerować, że apoLp-III ułatwia lizozymowi działanie raczej poprzez zmianę właściwości lub struktury powierzchni ściany komórkowej bakterii [**Publikacja P5**].

Uzyskane wyniki wskazują, że apoLp-III i lizozym są ważnymi białkami przeciwbakteryjnymi, które działają we wczesnym etapie odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella* zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych.

4d. Podsumowanie najważniejszych wyników badań, które stanowią osiągnięcie naukowe zawarte w monotematycznym cyklu publikacji

- ApoLp-III *G. mellonella*, jako PRR wiąże się do powierzchni bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz drożdży i grzybów pleśniowych. Pozwala to na rozpoznanie zakażenia.
- Zmiany poziomu apoLp-III w hemolimfie, w hemocytach oraz ciele tłuszczowym uzależnione są od immunogenu.

- Wykazano obecność różnych izoform apoLp-III i polipeptydów pochodzących z apoLp-III. Liczba form oraz różnice w ich profilu wskazują na ważną rolę apoLp-III w rozróżnianiu klas patogenów przez system immunologiczny owadów.
- ApoLp-III ma aktywność przeciwbakteryjną wobec niektórych bakterii, co może odgrywać ważną rolę w likwidowaniu zakażenia wywołanego przez bakterie we wczesnym etapie odpowiedzi immunologicznej.
- ApoLp-III działa bakteriobójczo na *L. pneumophila* i *L. dumoffii*, a wrażliwość bakterii uzależniona jest od gatunku.
- ApoLp-III nie działa grzybobójczo, ale może uwrażliwiać komórki grzybów na działanie innych czynników przeciwgrzybowych.
- ApoLp-III działając w kooperacji z lizozymem może likwidować zakażenie niektórymi bakteriami we wczesnym etapie odpowiedzi immunologicznej.
- ApoLp-III działa synergistycznie z lizozymem poprzez wzmocnienie jego aktywności muramidazowej oraz zwiększenie perforacji błony komórkowej bakterii przez lizozym.

BIBLIOGRAFIA

Adamo SA., Roberts JL., Easy RH., Ross NW., 2008, Competition between immune function and lipid transport for the protein apolipoprotein III leads to stress-induced immunosuppression in crickets. *J. Exp. Biol.* 211: 531-538

Andrejko M., **Zdybicka-Barabas A.**, Wawrzoszek M., Cytryńska M., **2013**, Diverse susceptibility of *Galleria mellonella* humoral immune response factors to the exoprotease activity of entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zool. Sci.* 30: 345-351.

Andrejko M., **Zdybicka-Barabas A.**, Cytryńska M., **2014**, Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* 115: 14-25.

Chino H., Yazawa M., 1986, Apolipoprotein III in locust: purification and characterization. *J. Lipid Res.* 27: 377-385.

De Bont N., Netea MG., Demacker PNM., Verschueren I., Kullberg BJ., Van Dijk KW, van der Meer JW., Stalenhoef AF., 1999, Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Lipid Res.* 40: 680-685.

De Bont N., Netea MG., Demacker PNM., Kullberg BJ., van der Meer JW., Stalenhoef AF., 2000, Apolipoprotein E-deficient mice have an impaired immune response to *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Invest.* 30: 818-822.

Dettloff M., Kaiser B., Wiesner A., 2001a, Localization of injected apolipoprotein III in vivo-new insights into the immune activation process directed by this protein. *J. Insect Physiol.* 47: 789-797.

Dettloff M., Wittwer D., Weise C., Wiesner A., 2001b, Lipoprotein of a lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell Tissue Res.* 306: 449-458.

Dunphy G., Halwani A., 1997, Haemolymph proteins of larvae of *Galleria mellonella* detoxify endotoxins of the insect pathogenic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *J. Insect Physiol.* 43: 1023-1029.

Gupta L., Noh JY., Jo YH., Oh SH., Kumar S., Noh MY., Lee YS., Cha S-J., Seo SJ., Kim I., Han YS., Barillas-Mury C., 2010, Apolipoprotein-III mediates antiplasmodial epithelial responses in *Anopheles gambiae* (G3) mosquitoes. *PLoS ONE* 5: e15410.doi:10.1371/journal.pone.0015410.

- Halwani AE., Dunphy GB., 1999, Apolipoprotein III in *Galleria mellonella* potentiates haemolymph lytic activity. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 563-570.
- Halwani AE., Niven DE., Dunphy GB., 2000, Apolipoprotein III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 233-241.
- Harding CR., Schroeder GN., Reynolds S., Kosta A., Collins JW., Mousnier A., Frankel G., 2012, *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infect. Immun.* 80: 2780-2790.
- Harding CR., Stoneham CA., Schuelein R., Newton H., Oates CV., Hartland FL., Schroeder GN., Frankel G., 2013, The Dot/Icm effector SdhA is necessary for virulence of *Legionella pneumophila* in *Galleria mellonella* and A/I mice. *Infect. Immun.* 81: 2598-2605.
- Insua JL., Llobet E., Moranta D., Pérez-Gutiérrez C., Tomás A., Garmendia J., Bengoechea JA., 2013, Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*, *Infect. Immun.* 81: 3552–3565
- Kavanagh K., Reeves EP., 2004, Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 101-112.
- Kim HJ., Je HJ., Park SY., Lee IH., Jin BR., Yun HK., Yun CY., Hanf YS., Kang YJ., Seo SJ., 2004, Immune activation of apolipoprotein III and distribution in hemocytes from *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 1011-1023.
- Lionakis MS., 2011, *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence* 2: 521-527.
- Leon LJ., Idangodage H., Wan CL., Weers PMM., 2006a, Apolipoprotein III: Lipopolysaccharide binding requires helix bundle opening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348: 1328-1333.
- Leon LJ., Pratt CC., Vasquez LJ., Weers PMM., 2006b, Tyrosine fluorescence analysis of apolipoprotein III – lipopolysaccharide interaction. *Archiv. Biochem. Biophys.* 452: 38-45.
- Ma G., Hay D., Li D., Asgari S., Schmidt O., 2006, Recognition and inactivation of LPS by lipoprotein particles. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 619-626.
- Mak P., **Zdybicka-Barabas A.**, Cytryńska M., 2010, A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Dev. Comp. Immunol.* 34: 1129-1136.
- Mukherjee K., Altincicek B., Hain T., Domann E., Vilcinskas A., Chakraborty T., 2010, *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 310-317.
- Niere M., Meisslitzer C., Dettloff M., Weise C., Ziegler M., Wiesner A., 1999, Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipoprotein III. *Biochim. Biophys. Acta* 1433: 16-26.
- Oztug M., Martinon D., Weers PMM., 2012, Characterization of the apoLp-III/LPS complex: insight into the mode of binding interaction. *Biochemistry* 51: 6220-6227.
- Palusińska-Szys M., “*Legionella*” Chapter 81. *Manual of Childhood Infections. The Blue Book* (3 ed.). Sharland M., Cant A., Shingadia D., Davies EG., (Eds). Oxford University Press, Oxford, UK, 2011
- Palusińska-Szys M., Drożański W., 2006, Patogeneza i czynniki wirulencji pałeczek z rodziny *Legionellaceae*. *Post. Hig. Med. Dośw.* 60: 24-44.
- Palusińska-Szys M., Janczarek M., Kalitowski R., Dawidowicz AL., Russa R., 2011, *Legionella bozemanii* synthesizes phosphatidylcholine from exogenous choline. *Microbiol. Res.* 166: 87-98.
- Palusińska-Szys M., Szuster-Ciesielska A., Kania M., Janczarek M., Chmiel E., Danikiweicz W., 2014, *Legionella dumoffii* utilizes exogenous choline for phosphatidylcholine synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 8256-8279.
- Pratt CC., Weers PMM., 2004, Lipopolysaccharide binding of an exchangeable apolipoprotein, apolipoprotein III, from *Galleria mellonella*. *Biol. Chem.* 385: 1113-1119.
- Roselaar SE., Daugherty A., 1998, Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J. Lipid Res.* 39: 1740-1743.

Scully LR., Bidochka MJ., 2006, Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens. FEMS Microbiol. Lett. 263: 1-9.

Son Y., Kim Y., 2011, Immunosupresion induced by entomopathogens is rescued by addition of apolipophorin III in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Invertebr. Pathol. 106: 217-222.

Uvell H., Engström Y., 2007, A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. Trends Genet. 23: 342-349.

Vilcinskas A., Lepidoptera as model mini-host for human pathogens and as a resource for peptide antibiotics. In: Molecular Biology and Genetics of Lepidoptera (Goldsmith MR and Marec F eds) str. 293-305. CRC Press, Boca Raton, 2010.

Wand ME., McCowen JW., Nugent PG., Sutton JM., 2013, Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. J. Med. Microbiol. 62: 1790-1798.

Weers PMM., Ryan RO., 2006, Apolipophorin III: Role model apolipoprotein. Insect Biochem. Mol. Biol. 36: 231-240.

Whitten MMA., Tew IF., Lee BL., Ratcliffe NA., 2004, A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in β -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. J. Immunol. 172: 2177-2185.

Wiesner A., Losen S., Kopáček P., Weise Ch., Götz P., 1997, Isolated apolipophorin III from *Galleria mellonella* stimulates the immune reactions of the insect. J. Insect Physiol. 43: 383-391.

Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., Wojda I., Andrejko M., Stączek S., Jakubowicz T., **2012**, Mikroskopia sił atomowych jako narzędzie do analizy oddziaływań peptydów i białek odpornościowych *Galleria mellonella* z komórkami drobnoustrojów. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce (red. Skrzecz I., Sierpińska A), Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, str. 343-356 (rozdział w monografii)

Część uzyskanych wyników badań w opisanym cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie monotematyczne została sfinansowana z grantów, w których uczestniczyłam jako:

„Rola apolipoforyny III i mechanizmy transmisji sygnałów w odpowiedzi immunologicznej *Galleria mellonella*”; projekt badawczy **KBN** No. 2P04C 080 29 - wykonawca

„Apolipoforyna III *Galleria mellonella* - białko o wielu funkcjach; projekt badawczy”; **MNiSW** No. N303 58 02 39 – główny wykonawca

„Mechanizmy odpowiedzi humoralnej *Galleria mellonella* w zakażeniach bakteryjnych i grzybowych – analiza profilu oraz roli peptydów odpornościowych hemolimfy”; projekt badawczy **MNiSW** No. N303 36 22 35 – główny wykonawca

„Właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz cytotoksyczność peptydów odpornościowych i apolipoforyny III *Galleria mellonella*”; grant indywidualny **Prorektora UMCS**

5. OMÓWIENIE INNYCH PRAC NAUKOWO-BADAWCZYCH NIE WLICZANYCH DO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO MONOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI

I. Rola peptydów i białek odpornościowych *Galleria mellonella* w odpowiedzi immunologicznej

Duża część moich badań dotyczy peptydów odpornościowych *G. mellonella*. Peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych zostały opisane zarówno u

organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Występują m.in. u bakterii, zwierząt i człowieka oraz roślin. Peptydy są kluczowymi składnikami mechanizmów odporności, ponieważ wykazują one aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybową, przeciwpierwotniaczą oraz przeciwwirusową, jak również przeciwnowotworową. Ze względu na zdolność modulowania przebiegu odpowiedzi immunologicznej nazywane są również peptydami odpornościowymi. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są zazwyczaj niewielkimi (3-10kDa) kationowymi cząsteczkami o właściwościach amfipatycznych. Znane są także nieliczne przykłady peptydów przeciwdrobnoustrojowych o charakterze anionowym. Głównym miejscem działania peptydów odpornościowych jest błona komórkowa drobnoustrojów. W wyniku ich interakcji z błoną komórkową dochodzi do zaburzenia prawidłowej struktury dwuwarstwy lipidowej, a w konsekwencji do jej depolaryzacji i zmiany przepuszczalności, co prowadzi do śmierci komórki [Zdybicka-Barabas i in. 2012; Cytryńska i Zdybicka-Barabas, 2015]. Peptydy mogą również oddziaływać w komórce z kwasami nukleinowymi, składnikami aparatu translacyjnego oraz białkami opiekuńczymi, co jest przyczyną zaburzenia procesów replikacji, transkrypcji, biosyntezy i prawidłowego fałdowania białek, i w efekcie powoduje śmierć drobnoustroju. Spośród ponad 5000 poznanych eukariotycznych peptydów odpornościowych u owadów opisano około 250. Wśród owadzich peptydów odpornościowych, ze względu na sekwencję aminokwasów i strukturę przestrzenną cząsteczki możemy wyróżnić trzy grupy: (a) peptydy liniowe przyjmujące strukturę α -helisy, nie zawierające cysteiny; (b) peptydy o strukturze $CS\alpha\beta$ stabilizowanej mostkami disiarczkowymi; (c) peptydy z dużą zawartością jednego z aminokwasów, np. proliny, glicyny. Owady syntetyzują je głównie w ciele tłuszczowym i hemocytach, skąd są wydzielane do hemolimfy, oraz w komórkach nabłonkowych [Zdybicka-Barabas i in. 2012; Cytryńska i Zdybicka-Barabas 2015]. Uważa się, że dany gatunek owada ma charakterystyczny dla niego zestaw peptydów przeciwdrobnoustrojowych. **Z hemolimfy immunizowanych gąsienic *G. mellonella* wyizolowaliśmy osiem peptydów, które scharakteryzowaliśmy pod względem biochemicznym oraz spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej** [Cytryńska i in. 2007; Zdybicka-Barabas i in. 2010] [badania wykonane we współpracy z Zakładem Biochemii Analitycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego]. Wśród nich są peptydy o charakterze kationowym: cekropina D, dwie defensyny, dwa peptydy bogate w prolinę i apolipoforycyna, oraz dwa anionowe peptydy odpornościowe. Pięć z nich, a

mianowicie peptyd bogaty w prolinę 2, peptyd podobny do defensyny, peptyd anionowy 1 i 2 (ang. *anionic peptides 1 and 2*; AP1, AP2) oraz apolipoforycyna nie były wcześniej opisane u barciaka większego. Należy podkreślić, że peptydy bogate w prolinę 1 i 2 (P1, P2) oraz anionowy 2 są charakterystyczne tylko dla *G. mellonella*, mają unikalną sekwencję aminokwasową, nie znaleziono w stosunku do nich podobieństw wśród sekwencji w dostępnych bazach danych [Cytryńska i in. 2007].

Kolejne badania wykazały, że układ immunologiczny barciaka większego, odróżnia klasy patogenów, co przejawia się zróżnicowaną kinetyką pojawiania się oraz odmiennym poziomem poszczególnych peptydów odpornościowych w hemolimfie gąsienic immunizowanych bakteriami Gram-dodatnimi (*M. luteus*), Gram-ujemnymi (*E. coli*), drożdżakami (*Candida albicans*) i grzybami nitkowatymi (*Fusarium oxysporum*) [Mak i in. 2010]. **Wykazaliśmy zmiany w stężeniu lizozymu i sześciu peptydów: anionowego 1 i 2, prolinowego 2, defensyny, podobnego do cekropiny D oraz apolipoforycyny w zależności od podanego immunogenu.** Zmiany te mogą być związane z aktywacją w ciele tłuszczowym różnych szlaków przekazywania sygnałów odpowiedzialnych za ekspresję genów peptydów odpornościowych. Co ciekawe, wszystkie badane przez nas peptydy odpornościowe obecne są w hemolimfie niepobudzonych owadów w niewielkim stężeniu, poza peptydem anionowym 2, który osiąga relatywnie wysokie stężenie (10-12 μM). **Uzyskane wyniki wskazują wyraźnie, że układ immunologiczny *G. mellonella*, podobnie jak *Drosophila melanogaster*, odróżnia klasy patogenów i odpowiada na nie syntezą charakterystycznego zestawu peptydów odpornościowych** [Mak i in. 2010].

Najważniejsza funkcja peptydów odpornościowych jest związana z ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Dzięki szerokiemu spektrum aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej [Cytryńska i in. 2007] umożliwiają likwidację zakażenia w organizmie. Natomiast wyizolowane mogą być wykorzystane jako wzorce do poszukiwania nowych skutecznych cząsteczek, które w przyszłości mogą stanowić matrycę do opracowania nowych leków - „antybiotyków III generacji”. Jest to niezwykle istotne ze względu na poważny problem jakim jest rosnąca liczba lekoopornych mikroorganizmów [Cytryńska i Zdybicka-Barabas, 2015]. Poszukiwanie skutecznych leków wymaga nie tylko projektowania/syntetyzowania stabilnych i nietoksycznych dla gospodarza cząsteczek, ale także odpowiednich metod pozwalających na właściwą ocenę ich działania. Stosując AFM wykazałam zmiany w strukturze powierzchni i właściwościach nanomechanicznych komórek bakterii i

grzybów zachodzące pod wpływem białek i peptydów odpornościowych *G. mellonella* [Zdybicka-Barabas i in. 2012a]. Wiadomo, że m.in. lizozym i peptydy przeciwdrobnoustrojowe są głównymi składnikami odpowiedzi humoralnej owadów zaangażowanymi w zwalczanie infekcji.

Rola lizozymu w odpowiedzi immunologicznej związana z jego działaniem głównie na bakterie Gram-dodatnie (aktywność muramidazowa) oraz nieliczne bakterie Gram-ujemne (*E. coli*, *Salmonella paratyphi*, *S. choleraesuis*) oraz grzyby. Do zahamowania wzrostu bakterii Gram-dodatnich (*M. luteus*, *B. circulans*, *S. aureus*) i wywołania wyraźnych zmian w topografii oraz właściwościach biofizycznych (elastyczności i adhezji) powierzchni komórek wystarczy lizozym w stężeniu 0,015 μM. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że obecność lizozymu w stężeniu 0,5 μM w hemolimfie owadów niepobudzonych [Mak i in. 2010] jest wystarczająca do zwalczania bakterii Gram-dodatnich w organizmie owada [Zdybicka-Barabas i in. 2012b]. Mechanizm działania lizozymu w stosunku do bakterii Gram-ujemnych i drożdży nie jest poznany. Prawdopodobnie nie jest związany z jego aktywnością enzymatyczną, lecz bardziej przypomina działanie kationowych peptydów odpornościowych. Można sądzić, że dodatni ładunek (pI 9.28) oraz amfipatyczny charakter cząsteczki lizozymu ułatwia mu oddziaływanie z ujemnie naładowanymi błonami mikroorganizmów. **Wykazałam, że lizozym *G. mellonella* ma zdolność do wiązania się zarówno do powierzchni bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [Zdybicka-Barabas i in. 2012b], jak również grzybów (*C. albicans*) [Sowa-Jasiłek i in. 2014].** Może to sugerować, że lizozym poza rolą w odpowiedzi humoralnej, związaną z działaniem przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybowym, może uczestniczyć w odpowiedzi immunologicznej jako PRR. Wykazałam, że lizozym (0,5 μM) perforował błonę bakterii *E. coli* JM83, co wskazuje na jego działanie na bakterie Gram-ujemne [Zdybicka-Barabas i in. 2012b]. Ponadto lizozym Gm w stężeniu 2,5-5 μM hamował prawie całkowicie wzrost *C. albicans*, a przy 0,5 μM obniżał przeżywalność drożdżaków o ok. 12%, czemu towarzyszyło obniżenie aktywności metabolicznej oraz zmiany w strukturze i właściwościach nanomechanicznych powierzchni komórek *C. albicans* [Sowa-Jasiłek i in. 2014].

Z literatury i naszych wcześniejszych badań wiadomo również, że EWL może działać synergistycznie z peptydami odpornościowymi *G. mellonella* w stosunku do bakterii *E. coli* zwiększając wrażliwość komórek na niższe stężenie peptydów [Cytryńska i in. 2001]. Jednoczesna obecność lizozymu, jak i AP2 w hemolimfie

owadów niepobudzonych sugeruje istotny udział tych cząsteczek w zwalczaniu zakażenia jeszcze przed indukcją syntezy innych peptydów odpornościowych. **Wykazałam, że lizozym Gm w obecności AP2 silniej perforuje błonę bakterii, mimo iż sam peptyd anionowy 2 nie wykazuje takiego działania.** Wynikiem działania obu czynników było pojawienie się kryształów NaCl, będące najprawdopodobniej efektem zaburzenia transportu jonów przez błonę komórkową oraz zmiany ciśnienia osmotycznego w komórce. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na synergizm działania lizozymu Gm i AP2 na *E. coli* [Zdybicka-Barabas i in. 2012b].

Ponadto wykazano, że AP2 wyraźnie obniża aktywność metaboliczną *C. albicans*, a jego obecność zwiększa działanie grzybobójcze lizozymu wobec komórek *Candida*. Można spekulować, że AP2 uwrażliwia komórki drożdżaka na działanie lizozymu. Inkubacja *C. albicans* z lizozymem Gm i AP2 wywołuje zmiany w morfologii komórek; zaobserwowano pojawianie się w hodowli pseudostrzępek i strzępek obok typowych komórek pączkujących [Sowa-Jasiłek i in. 2014]. Wykazałam, **że synergistyczne działanie lizozym i AP2 na komórki *C. albicans* [Sowa-Jasiłek i in. 2014] oraz *E. coli*, nie jest związane z tworzeniem między-cząsteczkowych kompleksów** [Zdybicka-Barabas i in. 2012b]. Uzyskane wyniki sugerują inny mechanizm wzmocnienia aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej lizozymu przez AP2. Być może jest on wynikiem oddziaływania z odpowiednimi strukturami powierzchniowymi komórek. Taką możliwość sugerują zmiany powierzchni komórek wywoływane przez peptyd anionowy 2. Ponadto można sądzić, że konstytutywna obecność lizozymu i AP2 w hemolimfie owadów jest ważna we wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej.

Innym przykładem współdziałania peptydów odpornościowych mogą być np. abecyna i hymenoptecyna, peptydy obecne u owadów z rzędu Hymenoptera np. *Bombus pascuorum* i *B. terrestris*. Wykazaliśmy, (we współpracy z grupą badaczy z Instytutu Biologii Molekularnej i Ekologii Stosowanej im. Franhofera w Giessen oraz Instytutu Fitopatologii i Zoologii Stosowanej, Uniwersytetu Justusa Liebiga w Giessen w Niemczech), że subletalna dawka hymenoptecyny (1,3µM) i abecyna w stężeniu 20µM wystarczy do całkowitego zahamowania wzrostu *E. coli*. Współdziałanie obu peptydów polega na wzmocnieniu przez abecynę działania hymenoptecyny (niższy MIC), a z drugiej strony hymenoptecyna poprzez perforację błony komórkowej bakterii ułatwia przedostanie się abecynie do cytoplazmy komórki, gdzie peptyd oddziałuje z DnaK, co uniemożliwia prawidłowe fałdowanie białek istotnych dla procesów życiowych i w efekcie kończy się

śmiercią bakterii [Rahnamaeian i in. 2015] (badania są kontynuowane, w trakcie przygotowywania do druku są dwie publikacje).

Opierając się na naszych wynikach i licznych danych literaturowych, widać wyraźnie, że organizmy żywe są źródłem aktywnych biologicznych cząsteczek, które mogą stanowić podstawę opracowania skutecznych leków przeciwko patogenom ludzkim i zwierzęcym. Uzyskane wyniki sugerują, że gąsienice *G. mellonella* są bogatym źródłem substancji przeciwdrobnoustrojowych przeciwko różnym mikroorganizmom w tym także patogenom człowieka, m.in. *Legionella gormanii* [Chmiel i in. 2014]. W naszych badaniach wykazaliśmy, że takie samo stężenie metanolowego ekstraktu hemolimfy immunizowanych gąsienic *G. mellonella* jak i apolipoforyny III (apoLp-III), głównego składnika ekstraktu, hamują wzrost *L. gormanii*, odpowiednio, o 75% i 10%. Za pomocą AFM wykazałam, że pod wpływem działania apoLp-III zachodzą wyraźne zmiany w morfologii komórek *L. gormanii*, jak i właściwościach nanaomechanicznych ich powierzchni.

W reakcjach odpornościowych owadów oraz procesach twardnienia/sklerotyzacji oskórka i gojenia ran uczestniczy oksydaza fenolowa (PO ang. *phenoloxidase*). Enzym ten uruchamiany jest jako jeden z pierwszych czynników zaangażowanych w odpowiedź humoralną owadów. W hemolimfie i hemocytach owadów niepobudzonych oksydaza fenolowa występuje w formie nieaktywnej w postaci profenolooksydazy (proPO). Układ PO ulega aktywacji po rozpoznaniu przez odpowiednie receptory charakterystycznych struktur (PAMPs) ścian komórkowych bakterii (LPS, LTA) lub grzybów (β -1,3-glukan). Wzrost aktywności PO obserwowano w hemolimfie owadów zakażonych *E. coli* i *Aspergillus oryzae* [Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010; Zdybicka-Barabas i in. 2014]. W wyniku uruchomienia układu PO w organizmie owada pojawiają się m.in. chinony, które działają toksycznie w stosunku do komórek patogenów, jak również gospodarza. Dlatego niezwykle istotna jest właściwa regulacja aktywności układu PO. Otrzymane wyniki, wskazują na pojawianie się w hemolimfie białek i peptydów, które mogą regulować aktywność PO *G. mellonella* [Zdybicka-Barabas i Cytryńska, 2010]. **Wykazałam, że trzy spośród nich defensyna, P1 oraz AP2, a także lizozym, wyraźnie obniżają aktywność PO w hemolimfie natomiast pozostałe peptydy (AP1, cekropina D, P2) nie wpływają na aktywność enzymu.** Interesujące wydaje się też działanie AP2, który hamuje aktywność PO, lecz ma inną kinetykę działania niż pozostałe aktywne peptydy. Otrzymane wyniki sugerują udział AP2 we wczesnej fazie regulacji aktywności enzymu (do 30 min.), poprzedzającej

działanie peptydów odpornościowych pojawiających w odpowiedzi na zakażenie [Zdybicka-Barabas i in. 2014]. Przeprowadzone badania pozwalają sądzić, że peptydy odpornościowe pełnią nie tylko bardzo ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej *G. mellonella*, ale mogą stanowić matrycę do opracowania skutecznych preparatów o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej będących alternatywą dla coraz mniej skutecznych antybiotyków. Opisane wyniki zostały zamieszczone w pracach:

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	punkty zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF	MNiSW
Chmiel E., Palusińska-Szys M., Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M., Mak P. The effect of <i>Galleria mellonella</i> hemolymph polypeptides on <i>Legionella gormanii</i> . <i>Acta Biochimica Polonica</i> 61: 123-127	2014	1,153	15
Cytryńska M., Mak P., Zdybicka-Barabas A. , Suder P., Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from <i>Galleria mellonella</i> immune hemolymph. <i>Peptides</i> 28:533-546	2007	2,368	27
Cytryńska M.*, Zdybicka-Barabas A.* Defense peptides: recent developments. <i>BioMolecular Concepts</i> 6:237-251; DOI:10.1515/bmc-2015-0014 (praca przeglądowa)	2015	-	-
Mak P., Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M. A different repertoire of <i>Galleria mellonella</i> antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. <i>Developmental and Comparative Immunology</i> 34: 1129-1136	2010	3,293	32
Rahnamaeian M., Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A. , Dobszlaff K., Wiesner J., Twyman R.M., Zuchner T., Sadd B.M., Regoes R.R., Schmid-Hempel P., Vilcinskis A. Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against gram-negative bacteria. <i>Proceedings B, Royal Society</i> 282:1-10	2015	5,292	40
Sowa-Jasilek A., Zdybicka-Barabas A. , Stączek S., Wydrych J., Mak P., Jakubowicz T., Cytryńska M. Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: <i>Galleria mellonella</i> anionic peptide 2 and lysozyme. <i>Peptides</i> 53: 194-201	2014	2,618	25
Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M. Phenoloxidase activity in hemolymph of <i>Galleria mellonella</i> larvae challenged with <i>Aspergillus oryzae</i> . <i>Annales UMCS Sectio C (Biologia)</i> LXV 2(C): 49-57	2010	-	4
Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M., Jakubowicz T. A kinetic study on antibacterial peptides of <i>Galleria mellonella</i> larvae and pupae synthesized in response to challenge with <i>Escherichia coli</i> lipopolysaccharide. <i>Annales UMCS Sectio C (Biologia)</i> LXV 2(C):18-25	2010	-	4
Zdybicka-Barabas A.* , Cytryńska M., Wojda I., Andrejko M., Stączek S., Jakubowicz T. Mikroskopia sił atomowych jako narzędzie do analizy oddziaływań peptydów i białek odpornościowych <i>Galleria mellonella</i> z komórkami drobnoustrojów. W: Kierunki rozwoju patologii owadów w Polsce (red. Skrzecz I., Sierpińska A), Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, str. 343-356 (rozdział w monografii)	2012 a	-	4
Zdybicka-Barabas A. , Mak P., Cytryńska M., Jakubowicz T. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in <i>Galleria mellonella</i> . <i>Archives of Insect Biochemistry and Physiology</i> 87: 1-12	2014	1,021	20
Zdybicka-Barabas A. , Mak P., Klys A., Skrzypiec K., Mendyk E., Fiolka M.J., Cytryńska M. Synergistic action of <i>Galleria mellonella</i> anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria. <i>Biochimica Biophysica Acta</i> , 1818:2623-2635	2012 b	3,389	35
RAZEM		19,134	206

II. *Galleria mellonella* jako organizm modelowy w badaniach nad patogennością i czynnikami wirulencji *Pseudomonas aeruginosa*

W ostatnich latach zwrócono uwagę na duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne pomiędzy niektórymi elementami odporności wrodzonej ssaków i owadów [Scully i Bidochka, 2006; Uvel i Engström, 2007]. Można sądzić, że poznanie mechanizmów regulujących funkcjonowanie układu immunologicznego owadów, dostarczy ważnych informacji na temat działania wrodzonej odporności u ssaków, a w tym także człowieka. Dzięki poznaniu interakcji pomiędzy układem immunologicznym gospodarza a organizmem patogennym, istnieje możliwość znalezienia nowych i skutecznych metod walki z mikroorganizmami. Barciak większy często wykorzystywany jest jako model doświadczalny zarówno w badaniach wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, jak i czynników warunkujących zjadliwość organizmów patogennych, również chorobotwórczych dla człowieka, m.in. *P. aeruginosa*. Bakteria ta jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie i należy do groźnych oportunistycznych patogenów człowieka. Podczas rozwoju infekcji w organizmie owada bakterie wykorzystują prawdopodobnie te same czynniki wirulencji, co w przypadku infekcji u człowieka [Wojda i in. 2012].

Czynnikami warunkującymi zjadliwość entomopatogennych szczepów *Pseudomonas* są m.in. enzymy proteolityczne. Proteinazy modulują mechanizmy odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz aktywują toksyny bakteryjne. *Pseudomonas* wytwarza cztery proteazy zewnątrzkomórkowe: elastazę B (LasB), elastazę A (LasA), serynową proteazę IV oraz alkaliczną proteazę. Umożliwiają one rozprzestrzenianie się bakterii w organizmie poprzez degradację tkanek oraz lizę komórek gospodarza [Wojda i in. 2012].

W przeprowadzonych badaniach profil enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez *P. aeruginosa* zależał od szczepu oraz składu podłoża, w którym prowadzi się hodowlę bakterii [Andrejko i in. 2013a]. Szczep ATCC 27853 wytwarzał w podłożu bulionowym (LB) trzy proteazy: proteazę IV, elastazę B i elastazę A, a w podłożu minimalnym (M9) jedynie alkaliczną proteazę. Wykazano, że LD₅₀ płynów pohodowlanych pochodzących z podłoża M9 było kilkudziesięciokrotnie niższe niż z LB, co może wskazywać na istotną rolę alkalicznej proteazy w przełamywaniu mechanizmów obronnych owada [Andrejko i in. 2013a]. Obecność elastazy B oraz alkalicznej proteazy w homogenatach otrzymanych z owadów *G. mellonella*

zakażonych przez szczepy *P. aeruginosa* wskazuje na ich istotną rolę podczas infekcji [Andrejko i in. 2014]. Zakażenie gąsienic bakteriami prowadziło do pobudzenia układu immunologicznego, obserwowano m.in. aktywację układu oksydazy fenolowej, zmiany poziomu lizozymu oraz aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie. **Kinetyka oraz poziom aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie owadów był wyraźnie zróżnicowany i zależał od szczepu i podłoża, w którym prowadzono hodowlę bakterii.** Należy jednak zaznaczyć, że we wczesnym etapie infekcji miała miejsce aktywacja układu immunologicznego, a po 30 godzinach od zakażenia nie wykrywano już aktywności anty- *E. coli* związanej z obecnością peptydów odpornościowych, co może być spowodowane degradacją peptydów przez enzymy proteolityczne *P. aeruginosa*. Również hamowanie aktywności PO oraz degradacja apoLp-III wskazuje na udział enzymów proteolitycznych w przełamaniu odpowiedzi immunologicznej gąsienic *G. mellonella* [Andrejko i in. 2014]. Potwierdzono to w badaniach *in vitro*, w których wykazano całkowite zahamowanie aktywności przeciwbakteryjnej oraz zmiany we wzorze białek i peptydów zachodzące pod wpływem płynów pochodzących zawierających enzymy proteolityczne. **Wykazano również, że apoLp-III jest całkowicie degradowana przez proteazy obecne w płynie pochodzącym z LB, [Andrejko i in. 2013b] w tym proteazę IV [Andrejko i in. 2013a].**

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF	MNiSW
Andrejko M., Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M. Diverse effects of <i>Galleria mellonella</i> infection with entomopathogenic and clinical strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Journal of Invertebrate Pathology 115: 14-25	2014	2,11	40
Andrejko M., Zdybicka-Barabas A. , Janczarek M., Cytryńska M. Three <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains with different protease profiles. Acta Biochimica Polonica 60: 83-90	2013	1,389	15
Andrejko M., Zdybicka-Barabas A. , Wawrzoszek M., Cytryńska M. Diverse susceptibility of <i>Galleria mellonella</i> humoral immune response factors to the exoproteinase activity of entomopathogenic and clinical strains of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Zoological Science 30: 345-351	2013	0,876	20
Wojda I., Andrejko M., Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A. , Stączek S., Taszłow P., Jakubowicz T. Przełamywanie mechanizmów odporności gąsienic <i>Galleria mellonella</i> przez entomopatogeny. W: Kierunki Rozwoju Patologii Owadów w Polsce, (red. Skrzecz I., Sierpińskiej A.), Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, str. 334-342 (rozdział w monografii)	2012	-	4
RAZEM		4,375	79

III. Udział kinazy A w odpowiedzi immunologicznej gąsienic *Galleria mellonella*

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych moje zainteresowania naukowe skupiły się na poznaniu mechanizmów uczestniczących w regulacji procesów odpornościowych gąsienic *G. mellonella*. Sprawne działanie układu odpornościowego owadów zależy od współdziałania mechanizmów odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Z danych literaturowych wiadomo było, że kinaza zależna od cAMP (kinaza A, PKA) bierze udział w regulacji aktywności komórek układu immunologicznego u ssaków (limfocytów T). Dlatego postanowiono sprawdzić, czy kinaza A jest również zaangażowana w regulację procesów odpornościowych u barciaka większego. PKA jest kluczowym enzymem uczestniczącym w regulacji wielu procesów komórkach *Eucaryota*. Rola PKA związana jest z modyfikacją wielu białek cytoplazmatycznych, co warunkuje zmiany ich aktywności biologicznej oraz możliwości oddziaływania z innymi cząsteczkami, jak również z regulacją ekspresji genów przez modyfikację czynników transkrypcyjnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano aktywność PKA w komórkach ciała tłuszczowego oraz hemocytach *G. mellonella*. Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno kinetyka jak i poziom aktywności kinazy A ulega zmianom w zależności od rodzaju immunogenu (bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, LPS), którym traktowano gąsienice [Cytryńska i in. 2006, 2007a, 2007b]. Podanie bakterii *M. luteus* indukowało wzrost aktywności enzymu w ciele tłuszczowym utrzymujący się aż do 24 godz., a zakażenie bakterią *E. coli* powodowało niewielki i krótkotrwały wzrost aktywności PKA [Cytryńska i in. 2007b]. Natomiast w hemocytach bezpośrednio po iniekcji bakterii Gram-dodatnich poziom aktywności kinazy A wzrastał, a po podaniu bakterii Gram-ujemnych aktywność enzymu spadała się by później przejściowo (0,5-1 godz.) wzrosnąć [Cytryńska i in. 2007a]. **Uzyskane wyniki wskazują, że układ odpornościowy *G. mellonella* odróżnia zakażenie wywołane różnymi rodzajami bakterii oraz sugerują, iż kinaza A jest zaangażowana w przebieg odpowiedzi immunologicznej.** Do określenia roli PKA w odpowiedzi humoralnej wykorzystano specyficzny inhibitor Rp-8-Br-cAMPS. Podanie gąsienicom inhibitora przed iniekcją immunogenów obniżało aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy w porównaniu do owadów, którym go nie podawano. Obserwowano również wzrost poziomu lizozymu w ciele tłuszczowym owadów zakażonych *M. luteus*,

a u gąsienic immunizowanych *E. coli* widoczny był początkowo wzrost poziomu lizozymu, a potem jego spadek [Cytryńska i in. 2006, 2007b].

Otrzymane wyniki wskazują na zaangażowanie kinazy A w regulację poziomu lizozymu w odpowiedzi na pobudzenie/infekcję, co może być związane z regulacją syntezy i/lub wydzielania go z komórek ciała tłuszczowego. Ponadto, sugerują udział PKA w regulacji odpowiedzi układu odpornościowego *G. mellonella* w stosunku do różnych gatunków bakterii. **Wykazano również, że obniżenie aktywności kinazy A przy użyciu inhibitora Rp-8-Br-cAMPS, prowadzi do zmian morfologicznych hemocytów, które były podobne do tych, wywoływanych przez żywe bakterie** [Cytryńska i in. 2007a]. Wydaje się, że PKA jest zaangażowana także w regulację reakcji komórkowych, poprzez hamowanie adhezji hemocytów, co może zapobiegać nadmiernej agregacji komórek hemolimfy.

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF	MNiSW
Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A. , Jakubowicz T. Studies on the role of protein kinase A in humoral immune response of <i>Galleria mellonella</i> larvae. <i>Journal Insect Physiology</i> 52: 744-753	2006	2,019	24
Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A. , Jakubowicz T. Protein kinase A activity and protein phosphorylation in the haemocytes of immune-challenged <i>Galleria mellonella</i> larvae. <i>Comparative Biochemistry Physiology B</i> 148: 4-83	2007 a	1,651	20
Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A. , Jakubowicz T. The involvement of protein kinase A in the immune response of <i>Galleria mellonella</i> larvae to bacteria. <i>Acta Biochimica Polonica</i> 54: 74-83	2007 b	1,261	15
RAZEM		4,931	59

IV. Pozostałe publikacje

ApoLp-III owadów wykazuje homologię do ludzkiej apoproteiny E (apoE), N-końcowa domena apoE przypomina swoją budową cząsteczkę apoLp-III. Na podstawie analizy widm w podczerwieni wykazano występowanie silnych oddziaływań estrowej grupy karbonylowej LPS z apoE. Konsekwencją tych oddziaływań były zmiany we właściwościach nanomechanicznych i strukturze powierzchni komórek *L. pneumophila*. Zaburzenie prawidłowej struktury powierzchni komórki może prowadzić do upośledzenia zdolności bakterii do adhezji i penetracji komórek gospodarza, co może ułatwiać eliminację bakterii z organizmu człowieka. Wiązanie LPS *L. pneumophila* przez apoE może być jednym z mechanizmów obronnych uruchamianych w trakcie zakażenia.

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF	MNiSW
Palusińska-Szys M., Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M., Wdowiak-Wróbel S., Chmiel E., Gruszecki W.I. Analysis of cell surface alterations in <i>Legionella pneumophila</i> cells treated with human apolipoprotein E. FEMS Pathogens and Disease 73(2):1-8	2015	2,403	25

Ponadto wykazaliśmy po raz pierwszy, że zarówno ekstrakty z hemolimfy oraz hemolimfa nieimmunizowanych i immunizowanych gąsienic *G. mellonella* zawiera czynniki, które indukują apoptozę i/lub nekrozę komórek nowotworowych linii ludzkiego glejaka wielopostaciowego T98G.

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF	MNiSW
Januszani B., Stączek S., Zdybicka-Barabas A. , Bądziul D., Jakubowicz-Gil J., Langner E., Rzeski W., Cytryńska M. The effect of <i>Galleria mellonella</i> hemolymph polypeptides on human brain glioblastoma multiforme cell line-a preliminary study. Annales UMCS Sectio C (Biologia) LXVII 2(C): 53-62	2012	-	4

Komercyjnie dostępny probiotyk (*Lactobacillus rhamnosus*) i prebiotyk (inulina) są rutynowo podawane pszczołom w celu wzmocnienia ich odporności. W naszych badaniach wykazaliśmy, że podawanie samego probiotyku lub probiotyku w kombinacji z prebiotykiem, nie wzmacnia odpowiedzi immunologicznej *Apis mellifera*, ale ją wyraźnie osłabia. Pszczoły karmione preparatami miały obniżoną aktywność oksydazy fenolowej, a czas życia był bardzo krótki, ponieważ infekcja *Nosema cerana* rozwijała się znacznie szybciej niż u pszczoł, którym nie podawano preparatów przed zakażeniem lub podczas infekcji.

Publikacja, dane bibliograficzne	Rok	zgodnie z rokiem opublikowania	
		IF ₂₀₁₄	MNiSW ₂₀₁₄
Ptaszyńska AA., Borsuk G., Zdybicka-Barabas A. , Cytryńska M., Małek W. Are commercial probiotics and prebiotics in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? Parasitology Research DOI: 10.1007/s00436-015-4761-z	2015	2,098	30

6. PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

Moje przyszłe badania będą się koncentrować na:

- 1) immunolokalizacji apoLp-III, podczas odpowiedzi immunologicznej w hemocytach i innych tkankach owada po zakażeniu drobnoustrojami, przy użyciu wyznakowanych FITC przeciwciał przeciwko apoLp-III *G. mellonella*
- 2) określeniu poziomu ekspresji genu dla apoLp-III, w hemocytach i ciele tłuszczowym po immunizacji bakteriami i grzybami, przy pomocy Real Time PCR
- 3) identyfikacji w hemolimfie białkowych składników kompleksów tworzonych przez apoLp-III
- 4) określeniu z którymi peptydami odpornościowymi *G. mellonella* apoLp-III działa synergistycznie i jaki jest ich mechanizm działania (badania będą przeprowadzone we współpracy z Zakładem Biochemii Analitycznej, UJ z którym od lat prowadzimy wspólne badania).

ApoLp-III jest dogodnym modelem stosowanym w badaniach oddziaływań apolipoprotein ze sztucznymi błonami lipidowymi o ściśle zdefiniowanym składzie tworzonych monowarstw, dwuwarstw lub liposomów. Brak jest natomiast danych o zmianach strukturalnych i dynamicznych właściwościach błon zachodzących pod wpływem apoLp-III. Dlatego, za pomocą techniki EPR (elektronowy rezonans magnetyczny), stosując odpowiednie sondy (znaczniki spinowe) penetrujące błonę na różnej głębokości, planuję sprawdzić jak głęboko apoLp-III penetruje błonę (rejon głów polarnych czy hydrofobowy rdzeń fosfolipidów) oraz jak wpływa na uporządkowanie łańcuchów acylowych w regionie hydrofobowym przyległym do głów polarnych (we współpracy z Zakładem Biofizyki, UMCS oraz Zakładem Anatomii i Antropologii Porównawczej, UMCS).

W ostatnich latach poważnym problemem są zakażenia wywoływane przez drobnoustroje cechujące się wieloraką opornością na antybiotyki. Dlatego możliwość zwalczania zakażeń wywoływanych przez tego typu drobnoustroje wiąże się z koniecznością poszukiwania nowych, skutecznych leków. Duże nadzieje pokładane są m.in. w antybiotykach peptydowych. Mają one olbrzymie zalety w porównaniu z klasycznymi antybiotykami, ze względu na selektywność, szybkość oraz szerokie spektrum ich działania. Ponadto, co jest najbardziej istotne z punktu widzenia walki z drobnoustrojami lekoopornymi, mechanizm działania wielu peptydów kationowych nie pozwala na wykształcenie oporności w stosunku do tego typu peptydów.

Nasze badania jednoznacznie wskazują, że hemolimfa immunizowanych gąsienic *G. mellonella* jest bogatym źródłem białek i peptydów odpornościowych o zróżnicowanych właściwościach biochemicznych i różnym spektrum działania. Dlatego planuję prowadzić badania, które pozwolą poznać sposób oddziaływania wybranych peptydów odpornościowych *G. mellonella* (m.in. AP2, P2) na błony oraz zmiany w ich właściwościach zachodzące pod wpływem tych oddziaływań na poziomie molekularnym. Zdolność oddziaływania peptydów z błonami komórkowymi jest istotna z biologicznego i medycznego punktu widzenia co związane jest z zastosowaniem ich jako leków przeciwbakteryjnych wobec rosnącej liczby lekoopornych szczepów. Doświadczenia będą przeprowadzone na modelowych błonach lipidowych i naturalnych błonach lipidowych. W kolejnych etapach mojej pracy zajmę się badaniami oddziaływania peptydów na błony za pomocą technik ^1H NMR (jądrowy rezonans magnetyczny), EPR (elektronowy rezonans paramagnetyczny) oraz czasowo-rozdzielczej techniki fluorescencyjnej włączając mikroskopię typu FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy).

Peptydy odpornościowe *G. mellonella* zostały częściowo przebadane pod względem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ale nie został wyjaśniony mechanizm ich działania. Dlatego peptydy o największej aktywności przeciwdrobnoustrojowej przebadam przy pomocy techniki mikroskopii elektronowej transmisyjnej (TEM), skaningowej (SEM) oraz mikroskopii sił atomowych (AFM). W celu poznania molekularnego mechanizmu interakcji pomiędzy komórkami mikroorganizmów a peptydami zastosuję spektroskopię absorpcyjną w podczerwieni (FTIR), która umożliwia analizę oddziaływań molekularnych między cząsteczkami.

7. PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

Dane bibliometryczne		IF ^a	MNiSW ^a
Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe			
• prace eksperymentalne	= 7	20,701	222
• prace przeglądowe	= 1	1,059	20
Autorstwo/współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia):			
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora	= 1	2,019	24
B\ po uzyskaniu stopnia doktora	= 15	32,941	383
Autorstwo/współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie lub na liście JCR:			
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora	= 4	-	13
B\ po uzyskaniu stopnia doktora			
• prace eksperymentalne	= 3	-	12
• prace przeglądowe	= 1	-	-
• monografie	= 2	-	8
Liczba komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych:			
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora	= 14		
B\ po uzyskaniu stopnia doktora	= 33		
Łączna liczba publikacji	34	56,72	682
Łączna liczba cytowań (wg. Bazy Web of Science)	269		
Liczba cytowań (WoS) z wyłączeniem autocytowań	164		
Ineks Hirscha (h) (wg. Bazy Web of Science)	9		
Liczba projektów badawczych			
• finansowane przez MNiSW	6		
• finansowane przez Rektora UMCS	2		

^a zgodnie z rokiem opublikowania

Agnieszka Toylechio-Barabas