

Marta Palusińska-Szysz

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie

*Struktura chemiczna i biologiczna rola składników lipidowych bakterii  
Legionella oraz Acanthamoeba castellanii - ich naturalnego gospodarza*

Autoreferat

Lublin 2014

Dr Marta Palusińska-Szysz  
Zakład Genetyki i Mikrobiologii  
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin  
[marta.szysz@poczta.umcs.lublin.pl](mailto:marta.szysz@poczta.umcs.lublin.pl)  
tel.: 81 537-50-58

## **Autoreferat**

### **1. Imię i nazwisko**

**Marta Palusińska-Szysz**

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania**

#### **Dyplom magistra biologii, specjalność mikrobiologia**

praca magisterska pt. „Modulacja wytwarzania bydłowego TNF w obecności jonów metali (selen i ołów)” wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Zakład Wirusologii i Immunologii); czerwiec 1994 roku.

Promotor: Prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń

#### **Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii**

praca doktorska pt. „Charakterystyka lipopolisacharydu *Sarcobium lyticum* – *Legionella lytica* comb. nov.” wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii); luty 2003 roku.

Promotor: Prof. dr hab. Wincenty J. Drożański

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych**

W latach 1994-2003 - **asystent** w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Od 1.07.2003 do chwili obecnej - **adiunkt** w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (od 2007 roku Zakład Genetyki i Mikrobiologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

**Przebieg pracy naukowo-badawczej**

Studia biologiczne ukończyłam w 1994 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii), gdzie na podstawie pracy magisterskiej zatytułowanej „Modulacja wytwarzania bydlęcego TNF w obecności jonów metali (selen i ołów)” uzyskałam tytuł magistra biologii specjalność mikrobiologia. Wykonane przeze mnie badania w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej (obecnie Zakład Wirusologii i Immunologii) pod kierunkiem prof. dr hab. Martynty Kandefery-Szerszeń dotyczyły roli jonów metali (selenu i ołowiu) oraz immunomodulatorów w wytwarzaniu bydlęcego czynnika martwicy nowotworów (BovTNF) przez leukocyty krwi bydlęcej i komórki EC (śródbłónka aorty bydlęcej). W obecności jonów ołowiu następował wzrost syntezy BovTNF w leukocytach krwi i w komórkach endotelium po indukcji zymozanem (1000µg/ml) lub izoprynozyną (10µg/ml; 0,001µg/ml), natomiast spadał pod wpływem lipopolisacharydu (LPS, 1µg/ml). Obecność jonów selenu wzmacniała wytwarzanie BovTNF zarówno w leukocytach krwi jak i w komórkach EC, jeśli jako induktora użyto zymozanu (100µg/ml) lub lewamisolu (10µg/ml) lecz nie wpływała na jego syntezę po indukcji TFX (wyciąg z grasic cielęcych, 10µg/ml; 0,001µg/ml) oraz izoprynozyną (0,001µg/ml). Określałam również wpływ jonów cynku i selenu (mikroelementów) oraz jonów ołowiu i kadmu (metali ciężkich) na zdolność komórek śródbłónka naczyń krwionośnych i leukocytów krwi obwodowej bydła do wytwarzania interferonu (IFN). Badania nad wytwarzaniem IFN wykazały, że jony  $Zn^{2+}$  i  $Se^{4+}$  użyte w stężeniach 10µM - 1mM indukowały produkcję IFN zarówno w komórkach śródbłónka jak i leukocytach krwi. Natomiast jony  $Cd^{2+}$  i  $Pb^{2+}$  w stężeniach 100pM - 1µM indukowały wydzielanie IFN tylko w leukocytach bydlęcych.

Wyniki badań prowadzonych w ramach pracy magisterskiej zostały zaprezentowane na XXIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Łodzi (załącznik nr 3, III.B.1).

Prowadzenie interesujących badań nad biologicznymi właściwościami TNF – wielofunkcyjnej glikoproteiny, która w organizmie człowieka uczestniczy zarówno w prawidłowej odpowiedzi immunologicznej jak i zapalnej, a przede wszystkim powoduje martwicę nowotworów litych, rozbudziło we mnie zamiłowanie do pracy naukowej. Zdobyte doświadczenie w planowaniu i wykonywaniu eksperymentów biologicznych oraz wyjątkowa atmosfera i życzliwość panująca w Zakładzie Wirusologii i Immunologii skłoniła mnie do podjęcia pracy na uczelni. W październiku 1994 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii) UMCS kierowanym przez prof. dr Zbigniewa Lorkiewicza. Moim opiekunem naukowym był prof. dr hab. Wincenty Drożański, który prowadził pionierskie badania biochemiczne

i cytologiczne nad infekcją bakteryjną pełzaków. Badania te w 1954 roku doprowadziły do wyizolowania i opisanie nowego gatunku bakterii *Sarcobium lyticum* (obecnie *Legionella lytica*), na wiele lat przed odkryciem w Stanach Zjednoczonych, blisko spokrewnionego czynnika etiologicznego nietypowego zapalenia płuc - *Legionella pneumophila*. Bakterie *L. lytica* były badane pod względem struktury peptydoglikanu, składu kwasów tłuszczowych oraz ubichinonów, jak również ich potencjalnego znaczenia w chorobotwórczości. Podjęłam badania nad ustaleniem pokrewieństwa antygenowego *L. lytica* z bakteriami z rodziny *Legionellaceae* oraz oznaczeniem fenotypowych cech diagnostycznych, umożliwiających różnicowanie legionelopodobnych patogenów ameb. Równoległe zajmowałam się badaniem składu chemicznego lipopolisacharydu *L. lytica* i jego biologicznego znaczenia, jako endotoksyny. W Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii prowadzone były od lat badania tego ważnego czynnika chorobotwórczości bakterii Gram-ujemnych, dzięki czemu mogłam skorzystać z wypracowanych i sprawdzonych metod analitycznych.

Do głównych osiągnięć mojej pracy doktorskiej można zaliczyć: **1/** ustalenie, że ogólny plan budowy LPS *L. lytica* był charakterystyczny dla bakterii z rodziny *Legionellaceae*. **2/** LPS *L. lytica* był pozbawiony O-acetylowych podstawników w części polisacharydowej. Łańcuch O-swoisty nie zawierał w swoim składzie kwasu legionaminowego. **3/** Rdzeń cukrowy lipidu A zbudowany był z 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukozy, a w skład tego lipidu wchodziły kwasy tłuszczowe zawierające od 14 do 28 atomów węgla w cząsteczce. 3-hydroksykwasy tłuszczowe, wśród których dominowały: 3-hydroksytetradekanowy (3-OH-14:0), 3-hydroksyheksadekanowy (3-OH-16:0), 3-hydroksyoktadekanowy (3-OH-18:0) oraz 3-hydroksyzooktadekanowy (3-OH-18:0) były przyłączone do szkieletu lipidu A wyłącznie wiązaniami amidowymi. Profile 3-hydroksykwasów wskazały na bardzo bliskie pokrewieństwo *L. lytica* z grupą gatunków *Legionella (Fluoribacter)* autofluoryzującą na kolor biało-niebieski. Obecne w lipidzie A estrowo związane kwasy tłuszczowe: kwas *cis*-9,10-metylenoheksadekanowy (17:0 cykliczny); 27-okso-oktakozanowy [28:0(27-okso)] oraz heptakozanodiowy (27:0-diowy) stanowią chemotaksonomiczne markery przynależności *L. lytica* do rodziny *Legionellaceae*. **4/** Analiza metylacyjna octanów alditoli cukrów uzyskanych z wysokocząsteczkowego polisacharydu oraz wstępna analiza widm magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) przy wykorzystaniu metody TOCSY i NOESY pozwoliły zaproponować strukturę fragmentów łańcucha O-swoistego. Wykazano, że wysokocząsteczkowy łańcuch polisacharydowy złożony był z dwóch reszt  $\beta$ -galaktozy ( $\beta$ -Gal), do których dołączone były cukry w pozycji 3, takie jak:  $\beta$ -glukoza ( $\beta$ -Glc), 3-O-Me- $\beta$ -glukoza (3-O-Me- $\beta$ -Glc) oraz dwucukier  $\alpha$ -Glc (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ -Gal. **5/** LPS *L. lytica* wykazywał

porównywalną zdolność indukcji interleukiny 6 (IL-6) w mononuklearnych komórkach krwi ludzkiej do LPS izolowanego z *Salmonella* Minnesota.

#### 4. Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

##### 4.1. Prace oryginalne opublikowane w czasopismach naukowych:

**Palusińska-Szysz M.**, Choma A., Russa R., Drożański W.J. **2001**. Cellular fatty acid composition from *Sarcobium lyticum* (*Legionella lytica* com. nov.) - an intracellular bacterial pathogen of amoebae. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 507-509.

(IF - 2,054; 11 pkt MNiSW)

##### 4.2. Prezentacje konferencyjne

Przedstawiłam 8 prezentacji konferencyjnych (załącznik nr 3, III.B.1-8).

Wstęp przybliżający środowisko życia i biologię pałeczek *Legionella* oraz uzasadniający podjęcie badań, które stanowią monotematyczny cykl publikacji został opracowany na podstawie moich prac przeglądowych (**prace P1, P2, P3, P4, P5**), rozdziału w monografii (**P12**) oraz jednej pracy doświadczalnej (**P6**) wymienionych w spisie prac stanowiących inne osiągnięcia naukowo-badawcze. Odnośniki do badań innych autorów znajdują się w tekstach moich prac przeglądowych i w pracy doświadczalnej.

#### Wstęp

Bakterie należące do rodziny *Legionellaceae* to Gram-ujemne pałeczki, które stanowią naturalną mikroflorę środowisk wodnych i glebowych. Z mikrobiologicznego punktu widzenia ekologia pałeczek *Legionella* jest bardzo złożona. Bakterie *Legionella* przeżywają w temperaturze od 5°C do 65°C oraz pH 7-9, jednak ze względu na specyficzne wymagania pokarmowe oraz wyjątkowo wąski zakres warunków środowiskowych niezbędnych do podtrzymania ich wzrostu, nie są w stanie konkurować z innymi bakteriami. Do wzrostu wymagają ściśle określonych warunków fizykochemicznych możliwych do spełnienia tylko wewnątrz komórki gospodarza.

Pierwotniaki powszechnie występujące w naturalnych ekosystemach są ważnym ogniwem w łańcuchu pokarmowym i mają istotny wpływ na populację bakterii. Nie wszystkie jednak bakterie są pobierane, zabijane i trawione przez pierwotniaki. Interakcje między fagotroficznym gospodarzem, a jego wewnątrzkomórkowym pasożytem mają istotne znaczenie w patogenezie i ekologii bakterii *Legionella*. Naturalnym gospodarzem

*L. pneumophila* są wolnożyjące ameby z rodzaju *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmanella* oraz orzęski z rodzaju *Tetrahymena* [praca P3]. Komórka pierwotniaka zapewnia bakteriom ochronę oraz stały dopływ substancji pokarmowych, dzięki czemu pałeczki *Legionella* mogą intensywnie namnażać się. Wyczerpanie się puli składników odżywczych indukuje morfologiczne i biochemiczne zmiany w komórkach bakterii, które umożliwiają im ucieczkę z wyeksploatowanego gospodarza, dyspersję do otaczającego środowiska, przetrwanie w nim i ponowną inwazję [praca P3]. Bakterie *Legionella* uwolnione z komórek gospodarza do wody są w stanie anabiozy i mogą przetrwać w tym krańcowo odmiennym środowisku przez długi czas, tworząc z innymi mikroorganizmami biofilmy [praca P2]. Przejście bakterii z fazy anabiozy do fazy replikacyjnej zachodzi wyłącznie wewnątrz komórki gospodarza. W toku ewolucji z pierwotniakami, bakterie *Legionella* nabyły cechy wirulencji, które pozwalają im na infekcję komórek eukariotycznych, w tym również człowieka [Hoffmann i wsp., 2014]. Do zakażenia ludzi dochodzi najczęściej na drodze inhalacji skażonej bakteriami wody rozprowadzanej w formie wodno-powietrznego aerozolu przez systemy klimatyzacyjne, wieże chłodnicze, urządzenia przemysłowe i medyczne [praca P3]. Badania przeprowadzone w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Lublinie wykazały, że 50% próbek wody pobranych na oddziałach: intensywnej terapii, pulmonologii, hematologii, transplantologii skażone było pałeczkami *L. pneumophila* serogrupy od 2 do 14 w liczbie przekraczającej  $10^2$  jednostek tworzących kolonie na 100 ml wody. Do izolacji bakterii zastosowano trzy różne metody diagnostyczne w tym hodowlę bakterii z amebami (*Acanthamoeba castellanii*), która dała pozytywne wyniki w 80% badanych próbek [praca P6].

Badania epidemiologiczne wskazują, że pałeczki *Legionella* nie przenoszą się przez kontakt z chorym. 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 zwanego chorobą legionistów, która może prowadzić do śmierci. Przyczyna takiej dychotomii jest wciąż nieznana. Najczęstszą formą manifestacji klinicznej podczas infekcji pałeczkami *Legionella* jest zapalenie płuc, które nie wymaga hospitalizacji. W obrazie radiologicznym klatki piersiowej widoczne są nacieki i guzki, ale zmiany te nie są na tyle charakterystyczne by na ich podstawie można odróżnić legionelozowe zapalenie płuc od pneumonii o innym pochodzeniu. Badania laboratoryjne oraz histopatologiczne płuc mogą jedynie sugerować etiologię, ale podstawę rozpoznania choroby dają testy mikrobiologiczne [praca P12]. Trudności w diagnozowaniu infekcji pałeczkami *Legionella* wynikają z faktu, że bakterie te

mają wysokie wymagania odżywcze i nie rosną na standardowych podłożach. Bakterie *Legionella* do wzrostu *in vitro* wymagają pożywki bogatej w aminokwasy, w tym L-cysteinę oraz zawierającej duże ilości przyswajalnego żelaza (podłoże BCYE). Istotny wpływ na wzrost tych bakterii ma też wąski zakres pH (6,8-7,0) pożywki [**praca P2**]. Podłoże do izolacji niektórych gatunków *Legionella* wymaga wzbogacenia w dodatkowe składniki takie jak: selenian, pirogronian, guanidyna oraz albumina. Pomimo wielu modyfikacji, jakie wprowadzono w składzie pożywki, skuteczność wykrywania bakterii metodą posiewu i ocena liczby komórek zdolnych do tworzenia kolonii jest utrudniona ze względu na długi czas hodowli (około 1 tygodnia) oraz występowanie żywych, ale niehodowlanych form bakterii (VBNC, ang. viable but nonculturable). Jednym ze sposobów zainicjowania wzrostu pałeczek *Legionella* na sztucznym podłożu jest wspólna hodowla bakterii z wybranym gatunkiem pierwotniaków. Sposób hodowli na sztucznym podłożu *L. lytica* – gatunku należącego do rodziny *Legionellaceae*, a wyizolowanego z gleby z okolic Lublina został opatentowany (**nr patentu PL218636**).

Przypadki legionelozy rozpoznaje się na podstawie obecności termostabilnego antygeny w moczu (LPS). Zaletą tej metody jest jej wysoka czułość i swoistość oraz łatwość pozyskania materiału i krótki czas oczekiwania na wynik, wadą zaś, że identyfikacja ogranicza się wyłącznie do *L. pneumophila* serotyp 1 i 6. Metody serologiczne oparte na pomiarze znamionowego wzrostu poziomu przeciwciał, oznaczonych w stanie ostrym i zdrowienia w teście ELISA oraz metody oznaczania poziomu swoistych przeciwciał w klasie immunoglobulin IgA, IgM, IgG metodą pośredniej immunofluorescencji (IFA) mogą dawać fałszywie dodatnie wyniki ze względu na występowanie licznych reakcji krzyżowych z bakteriami z rodzaju *Pseudomonas*, *Haemophilus*. Ponadto niezbędny jest odpowiedni czas na rozwinięcie odpowiedzi humoralnej u pacjenta i wytworzenie mierzalnego poziomu przeciwciał. W bioptatach tkankowych poszukuje się antygeny *Legionella* techniką immunofluorescencji bezpośredniej (DFA), ale i ta metoda może dawać wynik fałszywie dodatni, dlatego jest rzadko stosowana. Obecnie identyfikację pałeczek *Legionella* można wykonywać poprzez amplifikację wybranych fragmentów genomowego DNA przy użyciu starterów specyficznych dla genów: *mip* (ang. macrophage infectivity potentiator), genów dla rRNA, oraz genów kodujących białko DnaJ lub podjednostkę  $\beta$  polimerazy RNA. Metody te nie są rutynowo stosowane w diagnostyce legionelozy ze względu na brak dobrej standaryzacji i wysokie koszty badań z wykorzystaniem specjalistycznej aparatury.

Dostępne metody diagnostyki w kierunku legionelozy mają pewne ograniczenia, dlatego uzasadnione jest stosowanie kilku różnych metod identyfikacji tych pałeczek, co jednak nie

zawsze gwarantuje postawienie jednoznacznej diagnozy. W dalszym ciągu istnieje potrzeba opracowywania nowych, szybkich, tanich i uniwersalnych testów, które mogłyby być stosowane na różnych etapach choroby.

W terapii legionelozy stosuje się antybiotyki, które mają zdolność wnikania do wnętrza makrofagów i osiągają w nich wysokie stężenie (makrolidy, fluorochinolony, tetracykliny, ketolidy). Azytromycyna, należąca do makrolidów, jest dobrze tolerowanym lekiem, który stosuje się u pacjentów leczonych ambulatoryjnie, zaś fluorochinolony są skuteczne w chorobie legionistów u dzieci z immunosupresją [praca P12]. Brak leczenia lub włączenie go zbyt późno prowadzi do szeregu powikłań, a w konsekwencji do zgonu. U osób z supresją immunologiczną śmiertelność może wynosić 60%.

Główną cechą, która determinuje patogenność pałeczek *Legionella* dla ludzi jest zdolność tych bakterii do życia i rozmnażania się w makrofagach płucnych, czyli w komórkach predysponowanych do zabijania drobnoustrojów. Wirulentne szczepy *Legionella* pobrane w procesie klasycznej lub spiralnej fagocytozy wywołują daleko idące modyfikacje w składzie białek i lipidów membrany fagosomów, co w konsekwencji prowadzi do zmiany procesów związanych z dojrzewaniem wakuoli trawiennej i jej transformację w mikroniszę umożliwiającą namnażanie się patogena [praca P2]. Biogeneza wakuoli replikacyjnej *L. pneumophila* (LCV – ang. *Legionella* containing vacuole) jest sterowana przez geny IV systemu sekrecji *dot/icm* (ang. defect in organelle trafficking/intracellular multiplication). Geny te kodują ponad 300 różnych białek efektorowych, które wykazują strukturalną i funkcjonalną mimikrę do białek eukariotycznych odzwierciedlając tym samym różnorodność szlaków gospodarza, które są wykorzystywane przez bakterie *Legionella* podczas infekcji [Allombert i wsp., 2014]. Poza białkami, w wysoce specyficznych interakcjach z komórkami eukariotycznymi uczestniczą lipidowe struktury powierzchniowe *Legionella* takie, jak: lipopolisacharydy (LPS) i fosfolipidy.

Budowa chemiczna LPS *L. pneumophila* jest odmienna, od endotoksyn innych Gram-ujemnych bakterii, pomimo podobnej architektury [praca P1]. Ta wielofunkcyjna makromolekuła złożona jest z części polisacharydowej: łańcucha O-swoistego, zewnętrznego i wewnętrznego rdzenia oraz części lipidowej – lipidu A. Łańcuch O-swoisty LPS *L. pneumophila* jest homopolimerem złożonym z 10 do 75 podjednostek kwasu legionaminowego, który ze względu na obecność grup acetylowych i acetyloamidowych jest wysoce hydrofobowy. Charakter hydrofobowy ma również oligosacharydowy rdzeń. Wysoka hydrofobowość warstwy powierzchniowej *L. pneumophila* zwiększa ich przeżywalność w aerozolu i ułatwia adhezję do membrany komórek gospodarza. Szkielet cukrowy lipidu A

*Legionella* zbudowany jest z 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy z przyłączonymi wiązaniem amidowym hydroksykwasami, które są acylowane przez liniowe i rozgałęzione (*izo* i *anteizo*) oraz rzadko spotykane w przyrodzie długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Duża różnorodność kwasów tłuszczowych lipidu A znalazła zastosowanie w odróżnianiu pałeczek *Legionella* od innych Gram-ujemnych bakterii, a także w różnicowaniu między sobą gatunków. Kwas 27-okso-oktakozanowy występuje we wszystkich zbadanych gatunkach *Legionella* i uważany jest za chemotaksonomiczny marker tej grupy bakterii. LPS *L. pneumophila* jest ponad 1000-krotnie słabszym induktorem prozapalnych cytokin wytwarzanych zarówno przez makrofagi MonoMac6 jak i granulocyty szpiku kostnego w porównaniu z wysokotoksycznym LPS *Salmonella* Minnesota. Wynika to ze słabego wiązania LPS przez występujące w osoczu białko wiążące LBP (ang. lipopolysaccharide binding protein) oraz przez receptor CD14 związany zarówno z błoną makrofagów jak i jego rozpuszczalną formą sCD14. W proces rozpoznania LPS, połączony z rozwojem stanu zapalnego, zaangażowane są dwa Toll-podobne receptory (TLR4 i TLR2). LPS jak i żywe oraz zabite formaldehydem komórki *L. pneumophila* stymulowały komórki szpiku kostnego myszy linii C3H/HeJ wyłącznie za pośrednictwem TLR2. Makrofagi i komórki dendrytyczne pozbawione TLR2 po indukcji *L. pneumophila* charakteryzowały się obniżoną produkcją IL-10, TNF- $\alpha$ . Nietypowe pobudzenie TLR2 przez LPS *L. pneumophila*, przypuszczalnie jest konsekwencją zwiększonej stabilności membrany zewnętrznej, uwarunkowanej obecnością długołańcuchowych, rozgałęzionych kwasów tłuszczowych. LPS *L. pneumophila* po kontakcie z powierzchnią komórki żernej uruchamia szlak sygnałny zależny od białka adaptorowego MyD88. Mutanty myszy pozbawione białka MyD88 nie są zdolne do wytwarzania IL-6, IFN- $\gamma$  oraz chemokin odpowiedzialnych za szybką migrację leukocytów do ogniska infekcji. W konsekwencji u myszy rozwija się ostra infekcja w obrębie płuc, której towarzyszy rozsianie się bakterii do naczyń limfatycznych i śledziony [**praca P5**].

Niezwykła struktura LPS i wynikająca z niej obniżona toksyczność wskazuje, że bakterie *Legionella* rozwinęły w toku ewolucji specyficzne mechanizmy, istotne do przeżycia wewnątrz komórki gospodarza. LPS *L. pneumophila* uruchamia zarówno klasyczną, jak i alternatywną drogę aktywacji dopełniacza, zwiększając w ten sposób szansę wychwycenia bakterii przez komórki żerne i utworzenia w nich środowiska wewnątrzkomórkowego namnażania. Uwolnione z membrany zewnętrznej bakterii pęcherzyki (OMV, ang. outer membrane vesicles), zbudowane z LPS, fosfolipidów oraz białek, po wbudowaniu się do błony fagosomalnej doprowadzają do czasowo-przestrzennej blokady fuzji fagosomów z lizosomami, niezależnie od systemu sekrecji *dot/icm*. Budowa LPS bakterii występujących

jedynie w fazie transmisyjnej (inwazyjnej), a nie replikacyjnej, indukowana warunkami środowiska, determinuje brak łączenia się wakuoli trawiennej z lizosomami [**praca P4**].

Pomimo ogromnego postępu nauk medycznych w zakresie diagnostyki, leczenia i epidemiologii, zapalenie płuc jest jedną z ważnych przyczyn śmiertelności, szczególnie u osób starszych w krajach rozwiniętych. Pełne spektrum czynników etiologicznych odpowiedzialnych za pneumonię u ludzi jest wciąż nieznane, a blisko połowa przypadków zapalenia płuc nabytego w środowisku zamieszkania i 75% przypadków szpitalnego zapalenia płuc ma nierozpoznaną etiologię, pomimo odkrycia nowych bakterii z rodziny *Legionellaceae* i *Parachlamydiaceae*. Skłania to do ciągłych poszukiwań nieznanymi patogenów oraz do opracowania bardziej skutecznych metod ich izolacji i diagnostyki.

Na legionelozę chorują ludzie na całym świecie, a zakażeniu ulegają przede wszystkim osoby z osłabionym układem immunologicznym. Choroba rzadko występuje u dzieci, co potwierdziły również badania na obecność antygenu w moczu u 57 młodych pacjentów leczonych w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Lublinie, pomimo skażenia bakteriami *Legionella* szpitalnej sieci wodociągowej [**praca P6**]. Do infekcji ludzi dochodzi zarówno w środowisku zamieszkania (CAP, ang. community-acquired pneumonia), jak i podczas pobytu w szpitalu (ang. nosocomial acquired pneumonia). Wyniki badań etiologii pneumonii wskazują, że pałeczki *Legionella* są odpowiedzialne za 2%-16% zachorowań, a w zachorowaniach o ciężkim przebiegu od 14% do 37% przypadków, w których śmiertelność przekracza 25%. Wysoki odsetek niepowodzeń terapeutycznych może być spowodowany obniżoną wrażliwością pałeczek *Legionella* na  $\beta$ -laktamy oraz niewielką skutecznością antybiotyków najczęściej stosowanych w terapii zapaleń płuc. Brak szybkich i specyficznych metod detekcji pałeczek *Legionella* opóźnia włączenie odpowiedniego leczenia. Do chwili obecnej wyizolowano zarówno z naturalnych jak i klinicznych źródeł 58 gatunków bakterii należących do rodziny *Legionellaceae*. W USA i Europie najczęstszą przyczyną legionelozy jest *L. pneumophila* serotyp 1, odpowiedzialna za około 70%-80% przypadków potwierdzonych laboratoryjnie. Inne gatunki takie jak: *L. micdadei*, *L. bozemanae*, *L. dumoffii* zajmują odpowiednio drugie, trzecie i czwarte miejsce pod względem częstości wywoływanych zakażeń. W Polsce legionelozę podlega rejestracji od 1 stycznia 2002 roku (Dz. U. 2001, Nr 126, poz.1384), a *L. pneumophila* została uznana za drobnoustrój alarmowy na mocy Rozporządzenia MZ w sprawie rejestrów zakażeń zakładowych (Dz. U. 2005, Nr 54, poz. 484). W 2013 roku odnotowano 11 zachorowań na legionelozę [www.pzh.gov.pl]. Liczby zgłoszonych zachorowań nie obrazują sytuacji epidemiologicznej w Polsce, są znacznie zaniżone i niereprezentatywne dla całego kraju. Znikomy stan wiedzy na temat

częstości występowania zakażeń pałeczkami *Legionella* w Polsce wynika z jednej strony z braku wystarczającej liczby ośrodków prowadzących badania w kierunku legionelozy, z drugiej zaś z braku odpowiednich testów mikrobiologicznych.

Opracowanie nowych metod diagnostycznych staje się możliwe dzięki szczegółowym badaniom struktur komórkowych bakterii oraz poznaniu złożonych mechanizmów interakcji *Legionella* z komórką gospodarza. U bakterii oportunistycznych, do których należą *Legionella* nie stwierdzono klasycznych czynników wirulencji, stąd interdyscyplinarne badania mają na celu poszukiwanie tych cech zjadliwości bakterii, które związane są z metabolizmem komórki.

## 5. 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])

### 5a. Tytuł

Osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl publikacji naukowych (**8 oryginalnych prac eksperymentalnych i 1 praca przeglądowa**) przedstawiony pod tytułem:

***Struktura chemiczna i biologiczna rola składników lipidowych bakterii Legionella oraz Acanthamoeba castellanii - ich naturalnego gospodarza***

### 5b. Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

1. **Palusińska-Szys M.\***, Kalityński R., Russa R., Dawidowicz A.L., Drożański W.J. **2008**. Cellular envelope phospholipids from *Legionella lytica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 283:239-246. (IF - **2,021**, **15 pkt MNiSW**)
2. **Palusińska-Szys M.\***, Turska-Szewczuk A., Karaś M., Russa R., Drożański W.J. **2009**. Occurrence of new polyenoic very long chain acyl residues in lipids from *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Protozool.* 48:63-72. (IF - **0,775**, **10 pkt MNiSW**)
3. **Palusińska-Szys M.\***, Janczarek M., Kalityński R., Dawidowicz A.L., Russa R. **2011**. *Legionella bozemanae* synthesizes phosphatidylcholine from exogenous choline. *Microbiol. Res.* 166:87-98. (IF - **2,308**, **20 pkt MNiSW**)

4. **Palusińska-Szysz M.\***, Zdybicka-Barabas A., Pawlikowska-Pawłęga B., Mak P., Cytryńska M. **2012**. Anti-*Legionella dumoffii* activity of *Galleria mellonella* defensin and apolipoprotein III. *Int. J. Mol. Sci.* 13:17048-17064. **(IF - 2,464, 30 pkt MNiSW)**
5. **Palusińska-Szysz M.\***, Szuster-Ciesielska A., Kania M., Janczarek M., Chmiel E., Danikiewicz W. **2014**. *Legionella dumoffii* utilizes exogenous choline for phosphatidylcholine synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 15:8256-8279.  
**(IF - 2,339, 30 pkt MNiSW)**
6. **Palusińska-Szysz M.**, Kania M., Turska-Szewczuk A., Danikiewicz W., Russa R., Fuchs B\*. **2014**. Identification of unusual phospholipid fatty acyl compositions of *Acanthamoeba castellanii*. *PLoS One*, 9;9(7):e101243. **(IF - 3,534, 40 pkt MNiSW)**
7. Zdybicka-Barabas B., **Palusińska-Szysz M.**, Gruszecki WI., Mak P., Cytryńska M.\* **2014**. *Galleria mellonella* apolipoprotein III - an apolipoprotein with anti-*Legionella pneumophila* activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1838:2689-97.  
**(IF - 3,431, 35 pkt MNiSW)**
8. **Palusińska-Szysz M.\***, Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., Wdowiak-Wróbel S., Chmiel E., Gruszecki WI. **2014**. Analysis of cell surface alterations in *Legionella pneumophila* cells treated with human apolipoprotein E. *Pathog. Dis.*, doi: 10.1111/2049-632X.12214. **(IF - 2,554, 25 pkt MNiSW)**
9. **Palusińska-Szysz M.\***, Cendrowska-Pinkosz M. **2009**. Pathogenicity of the family *Legionellaceae*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 4:96-107. **(IF - 1,989, 10 pkt MNiSW)**  
**(\*autor korespondencyjny)**

Sumaryczny *impact factor* – IF ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **21,415**.

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: **215 pkt**.

## **5c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

### **Cel i zakres badań**

Celem badań, których wyniki składają się na monotematyczny cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą postępowania habilitacyjnego była analiza strukturalna fosfolipidów wybranych, chorobotwórczych gatunków *Legionella* oraz naturalnego gospodarza dla tych bakterii, *Acanthamoeba castellanii*.

Patogenność wewnątrzkomórkowych bakterii, a szczególnie *Legionella*, które nie tworzą otoczek, ani nie syntetyzują zewnątrzkomórkowych polisacharydów, zależy przede

wszystkim od struktur powierzchniowych takich jak: białka, LPS oraz lipidy. Białka *Legionella* są obiektem intensywnych badań, natomiast znikomy jest stan wiedzy na temat roli fosfolipidów *Legionella* i *Acanthamoeba castellanii* we wzajemnych interakcjach między patogenem a gospodarzem. Fosfolipidy pełnią nie tylko pasywną rolę, jako elementy budujące dwuwarstwę lipidową, ale wspomagają takie funkcje komórki jak ukierunkowany transport białek, replikację DNA czy przekazywanie sygnałów. Skład i rozmieszczenie fosfolipidów w błonie, ich zdolność do ulegania hydrolizie oraz modyfikacje „head-groups” fosfolipidów stanowią swoisty „język molekularny” w oddziaływaniu z innymi cząsteczkami komórki oraz środowiskiem [Bohdanowich i Grinstein, 2013]. Zmiany w składzie fosfolipidów wpływają na aktywność białek cytoplazmatycznych i peryplazmatycznych związanych z adaptacją bakterii do otoczenia. Struktura i dynamika fosfolipidów błony plazmatycznej odgrywa ważną rolę w procesach penetracji antybiotyków do wnętrza komórki. Dlatego istotnym celem badań było określenie znaczenia struktur lipidowych we wrażliwości komórek *Legionella* na substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyizolowane z hemolimfy *Galleria mellonella*. Ważną część badań stanowi również wykazanie metodami biochemicznymi i genetycznymi zdolności tych pałeczek do wykorzystywania egzogennej choliny w syntezie fosfatydylocholiny (PC) – ważnego dla przeżywalności oraz patogenności składnika błon komórkowych bakterii. Możliwość wykorzystania przez *Legionella* zewnątrzkomórkowych prekursorów syntezy PC, takich jak cholina może odzwierciedlać poziom adaptacji tych bakterii do komórek gospodarza i może być celem molekularnym wspomagającym leczenie legionelozy.

### Opis uzyskanych wyników

**Prace 1, 3, 5.** W membranach *L. lytica*, *L. bozemanae*, *L. dumoffii* zidentyfikowano następujące klasy fosfolipidów: fosfatydylocholinę (PC), fosfatydyloetanolaminę (PE), fosfatydylo-*N*-monometyloetanolaminę (MMPE), fosfatydylo-*N-N*-dimetyloetanolaminę (DMPE), fosfatydyloglicerol (PG) i difosfatydyloglicerol (DPG). Zastosowanie chromatografii cieczowej (LC) sprzężonej ze spektrometrią mas (MS), umożliwiającą wieloetapową fragmentację otrzymanych jonów (LC/MS<sup>n</sup>) pozwoliło na rozdzielenie poszczególnych lipidów, określenie ich klasy, masy cząsteczkowej, rodzaju przyłączonych reszt kwasów karboksylowych, a także ich lokalizacji w cząsteczkach. Technika LC/MS<sup>n</sup> umożliwiła uzyskanie informacji o strukturze fosfolipidów, bez konieczności chemicznej modyfikacji próbek, odzwierciedlając tym samym ich „skład fizjologiczny” w komórkach. Skorelowanie tych informacji z wynikami uzyskanymi innymi metodami (chromatografii

gazowo-cieczowej połączonej ze spektrometrią mas GC/MS; spektrometrii MALDI/TOF) pozwoliło ustalić możliwie pełny obraz amfipatycznych, fosfolipidowych składników membran wybranych gatunków *Legionella*. Względną zawartość lipidów w poszczególnych frakcjach oznaczono metodą densytometryczną uwzględniając współczynniki absorpcji wyznaczone dla fosfolipidów wzorcowych oraz techniką magnetycznego rezonansu jądrowego  $^{31}\text{P}$  NMR (dane niepublikowane).

Głównymi fosfolipidami *Legionella* są PC i PE. Analiza składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów wykazała obecność cyklicznego heptadekanowego kwasu (7%-12%) oraz wysoką zawartość rozgałęzionych (*izo* i *anteizo*) kwasów tłuszczowych (55%-62%), co zdecydowanie odróżnia badane *Legionella* od innych Gram-ujemnych bakterii. Poza składnikami, które były wspólne dla *L. bozemanae*, *L. lytica* i *L. dumoffii* takimi, jak: PC16:0/15:0, PE15:0/15:0, gatunki różniły się składem kwasów tłuszczowych związanych z poszczególnymi klasami fosfolipidów. Dla *L. bozemanae* w klasie fosfatydylocholin charakterystyczne były PC17:0/15:0, zaś dla *L. lytica* PC16:0/14:0, PC18:0/16:1, a dla *L. dumoffii* PC16:0/17:1 (lub 17:0 cykliczny). PE16:1/15:0 dominują u *L. bozemanae*, a u *L. lytica* PE14:0/14:0 i PE15:0/14:0, zaś u *L. dumoffii* PE15:0/15:1. (Dla *L. dumoffii* struktura PE nie została jeszcze opublikowana). Różnice w składzie kwasów tłuszczowych zawartych w fosfolipidach stanowią ich ważną cechę chemotaksonomiczną i mogą mieć praktyczne znaczenie w diagnostyce tej grupy bakterii na poziomie gatunku. Ponadto badane *Legionella* obok rozgałęzionych, syntetyzowały kwasy o prostym łańcuchu w odróżnieniu od *L. pneumophila*, której cząsteczki fosfolipidów zawierały wyłącznie rozgałęzione kwasy tłuszczowe. Cecha ta może być pomocna w różnicowaniu bakterii odmiennych pod względem stopnia patogenności [**prace 1, 3, 5**].

Obecność PC i PE, jako głównych fosfolipidów zdecydowanie odróżnia membrany komórkowe badanych *Legionella* od innych bakterii Gram-ujemnych. U większości organizmów prokariotycznych zarówno Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich wśród fosfolipidów dominuje PE i zaledwie 15% bakterii syntetyzuje PC. Do tej grupy należą bakterie, których cykl życiowy jest ściśle związany z komórką eukariotyczną. W komórce bakteryjnej PC może być syntetyzowana z wykorzystaniem dwóch różnych szlaków. W pierwszym ze szlaków (PMT), występującym również w komórkach eukariotycznych, zachodzi trzykrotna *N*-metylacja PE przy udziale *N*-metylotransferazy (PmtA), która wykorzystuje *S*-adenozynometioninę, jako źródło grup metylowych. Związkami pośrednimi w tym procesie są monometylo-*N*-etanoloamina (MMPE) i dimetylo-*N,N*-etanoloamina (DMPE). Drugi szlak polega na przemianie wolnej choliny, która ulega bezpośredniej

transfosforylacji z diacyloglicerolo-5'-difosfocytidyny do fosfatydylocholiny (tzw. szlak metaboliczny CDP-choliny, PCS). Reakcję katalizuje występująca wyłącznie u bakterii syntaza fosfatydylocholiny. Aktywność tego enzymu umożliwia bakteriom syntezę PC z choliny pobieranej z komórki gospodarza.

Bakterie *L. bozemanae* i *L. dumoffii* hodowane na podłożu BCYE wzbogaconym chlorkiem *N*-nonadeuterotrimetylo-choliny syntetyzowały znakowaną PC. Występowanie znakowanych PC w fosfolipidach *L. bozemanae* takich, jak: d<sub>9</sub>-PC16:0/15:0, d<sub>9</sub>-PC15:0/15:0, d<sub>9</sub>-PC17:0/15:0, d<sub>9</sub>-PC16:1/15:0, d<sub>9</sub>-PC17:0/17:0 cykliczny, d<sub>9</sub>-PC15:1/15:0 oraz w fosfolipidach *L. dumoffii*: d<sub>9</sub>-PC14:0/16:0, d<sub>9</sub>-PC16:0/17:1 (lub 17:0 cykliczny), d<sub>9</sub>-PC15:0/15:0 świadczyło o wykorzystywaniu przez te bakterie egzogennej choliny. Analiza rozmieszczenia znakowanej PC w błonie zewnętrznej (OM) oraz wewnętrznej (IM) *L. dumoffii* wykazała, że fosfatydylocholiny pochodzące ze szlaku PCS lokalizują się w obu błonach. Zastosowanie selektywnej metody oznaczeń MRM (ang. multiple reaction monitoring) pozwoliło wykazać, że więcej PC znajduje się w błonie wewnętrznej. Porównanie intensywności jonów na widmach masowych (MALDI-TOF) PC (pochodzącej ze szlaku PCS) do nieznakowanej PC (pochodzącej ze szlaku PMT) wykazało, że w komórkach *L. bozemanae* i *L. dumoffii* funkcjonują równocześnie oba szlaki syntezy PC, przy czym szlak PCS jest szlakiem dominującym, prawdopodobnie korzystniejszym pod względem energetycznym [prace 3, 5]. Badania ilościowe zawartości PC wykonane metodą <sup>31</sup>P NMR pokazały, że *L. dumoffii* hodowana na cholinie syntetyzuje o 12% więcej PC niż bakterie hodowane bez dodatku choliny (dane niepublikowane).

Zdolność pałeczek *Legionella* do wykorzystywania zewnątrzkomórkowych źródeł choliny ułatwia bakteriom przetrwanie wewnątrz komórki gospodarza. Szlak syntezy PC (PCS) może odgrywać rolę sensora środowiska szczególnie dla bakterii wywołujących pneumonię, gdyż prekursor biosyntetyczne obecne w tkankach płucnych mogą wpływać na wirulencję mikroorganizmu poprzez szlaki wbudowywania PC do osłon bakteryjnych. Wykorzystywanie zewnątrzkomórkowych prekursorów PC przez gatunki *Legionella* odzwierciedla poziom adaptacji badanych bakterii do komórek gospodarza, a selektywne blokowanie syntazy fosfatydylocholiny może stać się celem specyficznego działania terapeutycznego, wspomagającego leczenie legionelozy. Pałeczki *Legionella* mogą syntetyzować PC na drodze dwóch niezależnych szlaków, dlatego potencjalne leki, które będą blokowały aktywność syntazy fosfatydylocholiny mogą przyczynić się do osłabienia tej cechy zjadliwości.

Badania strukturalne z wykorzystaniem znakowanej choliny wykazały, że badane bakterie mają zdolność do pobierania zewnątrzkomórkowej choliny, syntezy PC i wbudowywania tego fosfolipidu do zewnętrznej i wewnętrznej membrany. Dlatego, kolejnym etapem badań była identyfikacja genów *pcs* (kodującego syntazę PC) i *pmtA* (kodującego *N*-metylotransferazę) zaangażowanych w syntezę PC.

**Prace 3, 5.** Analiza porównawcza sekwencji nukleotydowych znanych genów *pcs* i *pmtA* bakterii *Legionella* pozwoliła na zaprojektowanie zdegenerowanych starterów komplementarnych do najbardziej konserwatywnych regionów tych genów, które posłużyły do amplifikacji różnych fragmentów genów *pmtA* i *pcs* *L. bozemanae*, *L. dumoffii*, *L. micdadei* i porównania z amplikonami otrzymanymi dla najbardziej wirulentnego gatunku *L. pneumophila*. W oparciu o analizę sekwencji nukleotydowej produktów PCR ustalono, że w genomach tych trzech gatunków *Legionella* występują geny homologiczne do genu *pcs* kodującego syntazę PC *Legionella*, przy czym zaobserwowano znaczne różnice w wielkościach uzyskanych amplikonów. W analizie PCR z zastosowaniem starterów dla genu *pmtA* kodującego *N*-metylotransferazę uzyskano pozytywne wyniki dla *L. bozemanae* i *L. micdadei*, co potwierdziło obecność genów homologicznych do *pmtA* w genomach tych bakterii. Dla *L. dumoffii* nie uzyskano produktów PCR o odpowiedniej wielkości dla kilku układów starterów, co może wskazywać na bardzo niski poziom podobieństwa sekwencji genu *pmtA* tego gatunku z pozostałymi bakteriami *Legionella*. Wyniki uzyskane na podstawie różnych technik molekularnych (hybrydyzacja metodą Southerna, reakcja PCR, sekwencjonowanie, analiza filogenetyczna na poziomie DNA i białka) potwierdziły znaczące zróżnicowanie bakterii z rodziny *Legionellaceae* pod względem analizowanych genów. Gen *pcs* *L. bozemanae* wykazuje największą identyczność sekwencji (80%) do *pcs* *L. longbeachae*, nieco niższą do *pcs* *L. drancourtii* (75,5%), a najniższą do *pcs* kilku szczepów *L. pneumophila* (71-72%) [**praca 3**]. Również w przypadku genu *pmtA* *L. bozemanae* najwyższy poziom homologii zaobserwowano do *pmtA* *L. longbeachae* (79,3%), a znacznie niższy do *pmtA* *L. pneumophila* (72%-73,6%). Natomiast w genomie *L. drancourtii* nie wykryto genu homologicznego do *pmtA* *L. pneumophila*. Gen *pcsA* *L. dumoffii* posiada największą identyczność sekwencji (82%) do *pcsA* *L. bozemanae* i 81% do *pcsA* *L. longbeachae*, niższą zaś identyczność sekwencji (78%) do *pcsA* *L. drancourtii* i (71%) *L. pneumophila*. W genie *pcsA* *L. dumoffii* powyżej sekwencji kodującej (w pozycji -136 do -86 pz) zidentyfikowano region promotorowy [**praca 5**].

Analiza porównawcza sekwencji genów zaangażowanych w syntezę PC: *pcs* i *pmtA* różnych gatunków *Legionella* wykazała, że najbardziej konserwatywne są centralne regiony tych

genów, które kodują funkcjonalne domeny białek Pcs oraz PmtA, a region 5' tych genów jest wysoce zmienny.

Biorąc pod uwagę trudności diagnozowania legionelozy, zaprojektowany został zestaw 21 starterów opracowanych na podstawie genów 16S rRNA, *pcs*, *pmtA* *Legionella* oraz sposób ich użycia do identyfikacji i różnicowania tych bakterii w reakcji multiplex-PCR. Zastosowanie do analizy jednocześnie 3 markerów genetycznych o różnym stopniu konserwatywności sekwencji i różnych kombinacji starterów istotnie zwiększa specyficzność, wiarygodność i selektywność metody. Ponadto, ten sposób identyfikacji pałeczek *Legionella* jest uniwersalny i pozwala zarówno na wykrywanie różnych gatunków tej grupy jak i na odróżnienie wysoce patogennego szczepu *L. pneumophila* od innych, mniej patogennych gatunków. Test ten jest przedmiotem zgłoszenia patentowego (**nr zgłoszenia P.406879**).

Różnice w zawartości PC między bakteriami hodowanymi na cholinie i bez choliny oraz różnice w strukturze fosfatydylocholin pochodzących z różnych szlaków syntezy nasunęły przypuszczenie, że zmienna struktura PC może mieć wpływ na zdolność bakterii do indukcji prozapalnych cytokin (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  odgrywa kluczową rolę w prozapalnej odpowiedzi gospodarza na zakażenie pałeczkami *Legionella*.

**Praca 5.** W celu określenia korelacji między zawartością PC bakterii a odpowiedzią komórki eukariotycznej, mierzoną poziomem TNF- $\alpha$ , makrofagi linii THP-1 stymulowano żywymi bakteriami oraz błonami (zewnętrzną i wewnętrzną) *L. dumoffii* hodowanymi z dodatkiem i bez choliny. Bakterie wyrosłe na podłożu wzbogaconym w cholinę indukowały w dawce 10 i 100 MOI ponad trzykrotnie niższy poziom TNF- $\alpha$  niż bakterie hodowane bez dodatku choliny. Podobnie, błona wewnętrzna *L. dumoffii* wyizolowana z bakterii wyrosłych na podłożu z choliną była słabszym induktorem TNF- $\alpha$  w porównaniu do membrany bakterii hodowanych bez choliny. Istotnie statystycznie wyniki uzyskano w obecności 100ng/ml błony wewnętrznej. Natomiast ta sama dawka błony zewnętrznej bakterii hodowanych na cholinie była lepszym induktorem cytokiny niż błony zewnętrznej uzyskanej z bakterii hodowanych bez suplementacji choliną.

Różnice w zawartości PC między bakteriami hodowanymi bez oraz z dodatkiem choliny i/lub różnice strukturalne w rozmieszczeniu kwasów acylujących rdzenie glicerolowe fosfatydylocholin mogą mieć znaczenie w interakcji bakterii z komórką makrofaga mierzoną poziomem TNF- $\alpha$ . Zmiany w strukturze PC błon mogą wpływać na zawartość i aktywność innych składników komórki (np. pozostałych klas fosfolipidów, białek), a obserwowany spadek indukcji TNF- $\alpha$  może być efektem działania różnych czynników na makrofagi. Słabsza indukcja TNF- $\alpha$  pod wpływem bakterii hodowanych na cholinie w stosunku do

bakterii hodowanych bez choliny może być jednym ze sposobów ucieczki bakterii spod kontroli układu immunologicznego gospodarza. Bakterie *L. dumoffii* hodowane na cholinie łatwiej ulegały internalizacji przez makrofagi linii THP1 niż bakterie hodowane bez choliny [praca 5].

Pałeczki *Legionella* wnikają do komórek eukariotycznych na drodze fagocytozy. Na sprawne działanie tego procesu ma wpływ skład kwasów tłuszczowych fosfolipidów błony komórki fagocytującej, a szczególnie obecność nienasyconych kwasów, które zapewniają jej płynność. Kolejnym etapem badań była szczegółowa analiza fosfolipidów *Acanthamoeba castellanii* - naturalnego gospodarza *Legionella*.

**Prace 2, 6.** Jakościową i ilościową ocenę składu fosfolipidów ameb wykonano metodą spektroskopowej analizy widm magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^{31}\text{P}$  NMR). Dominującymi fosfolipidami były: fosfatydylocholina PC (47,5±2%), fosfatydyloetanolamina PE (29±2%), kardiolipina CL (6,9±0,3) oraz fosfatydyloseryna PS (5,6±0,2%). Pozostałe fosfolipidy to lizofosfatydylocholina LPC (1,8±0,1%), fosfatydyloinozytol PI (1,2±0,05%), lizofosfatydyloetanolamina LPE (1,5±0,05%), eterowe glicerofosfolipidy etanolaminowe GPE (1,7±0,08%). Dodatkowo wykazano obecność kwasu fosfatydowego (PA). Badane fosfolipidy zawierały kwasy o długości łańcucha od 14 do 20 atomów węgla z dominacją kwasów: C16:1  $\Delta^7$ , C18:1  $\Delta^9$ . W badanym materiale zidentyfikowano również długołańcuchowe, wielonienasycone kwasy: oktakozenowy (28:1), oktakozenowy (28:2), triakontadienowy (30:2) oraz triakontatrienowy (30:3). Oznaczono położenie podwójnych wiązań w wielonienasyconych, długołańcuchowych kwasach (C28:2  $\Delta^{5,21}$ ; C28:1  $\Delta^{21}$ ; 30:3  $\Delta^{5,21,24}$ ; 30:2  $\Delta^{21,24}$ ) na podstawie charakterystycznych jonów na widmach masowych pochodnych metyloioeterowych (DMDS) oraz piroolidków [praca 2]. Wykazano, że długołańcuchowe kwasy występują tylko w określonych klasach fosfolipidów tj. w: **PE** (30:2/20:4, 30:3/20:3); **PS** (30:2/20:2, 30:3/20:4), **PA** (18:1/30:2, 28:1/20:2), **CL** (18:0/18:2/28:0/30:2) [praca 6]. Poza wartością poznawczą występowanie nietypowych kwasów tłuszczowych tylko w określonych klasach fosfolipidów może mieć praktyczne znaczenie w diagnostyce zarówno wolnożyjących ameb jak i w materiale pochodzącym od pacjenta.

Zmiany składu fosfolipidów wpływają na fizyko-chemiczne właściwości błon komórki, co może mieć znaczenie w sposobie oddziaływania bakterii z różnymi czynnikami zewnętrznymi.

**Praca 4.** Następnym etapem prac eksperymentalnych było zbadanie, czy wbudowywanie PC do błon *L. dumoffii* wpływa na ich wrażliwość na antybakteryjne substancje działające na

blony komórkowe. W tym celu zastosowano apolipoforynę III (apoLp-III) i defensynę (peptyd o strukturze stabilizowanej mostkami dwusiarczkowymi), cząsteczki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, których źródłem była hemolimfa gąsienic *Galleria mellonella*. W tej części badań współpracowałam z Zakładem Immunobiologii UMCS, który od lat prowadzi badania nad peptydami obronnymi owadów, które mogą stać się obiecującą alternatywą dla antybiotyków. Ważnym składnikiem hemolimfy owadów jest apolipoforyna III – wielofunkcyjne białko wiążące lipidy, które uczestniczy w transporcie lipidów, rozpoznawaniu determinant molekularnych drobnoustrojów i aktywacji układu immunologicznego. Synergistyczne działanie apoLp-III z peptydami odpornościowymi hemolimfy prowadzi do wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej i zwiększenia skuteczności zwalczania drobnoustrojów. ApoLp-III jest białkiem o masie 18 kDa, złożonym z pięciu naprzemianległych, amfipatycznych  $\alpha$  – helis połączonych krótkimi regionami zawiasowymi. Charakter hydrofobowy i zdolność do wiązania lipidów sprawia, że apoLp-III jest dogodnym modelem do badania oddziaływań białek ze strukturami lipidowymi błon i pęcherzyków membrany zewnętrznej bakterii.

W pierwszym etapie badań sprawdzano przeżywalność bakterii *L. dumoffii* inkubowanych z ekstraktem hemolimfy. Ekstrakt hemolimfy najefektywniej działał na badane bakterie po 1 godzinnej inkubacji w stężeniu 0,8 mg/ml. W dalszym etapie badań sprawdzano wrażliwość *L. dumoffii* na apoLp-III oraz defensynę. Bakterie *L. dumoffii* były wrażliwe zarówno na apoLp-III jak i defensynę, ale wystąpiły różnice w reakcji na te cząsteczki w zależności od sposobu hodowli bakterii. Pałeczki *L. dumoffii* hodowane na podłożu z choliną wykazywały trzykrotnie większą wrażliwość na apoLp-III oraz defensynę w porównaniu do bakterii hodowanych bez dodatku choliny, co może sugerować, że wzrost zawartości PC (i/lub struktura fosfatydylocholin) w ścianie komórkowej *L. dumoffii* odpowiada za silniejszą interakcję apoLp-III z powierzchnią bakterii. Obserwacje w mikroskopie elektronowym komórek *L. dumoffii* po zadziałaniu apoLp-III wykazały obecność licznych wakuoli w cytoplazmie, jej zagęszczenie oraz zmiany w strukturze ściany komórkowej, które były szczególnie wyraźne u bakterii hodowanych na cholinie. Niektóre komórki hodowane na cholinie pod wpływem apoLp-III miały znacznie poszerzoną przestrzeń periplazmatyczną. Po zadziałaniu defensyny zmianie uległa przede wszystkim morfologia komórek, które utraciły typową subkomórkową organizację. W cytoplazmie występowały duże, jasne-elektronowo obszary, które przypominały przestrzenie wakuolarne. Bakterie hodowane na cholinie pod wpływem defensyny, utraciły integralność osłony komórkowej, a w cytoplazmie pojawiły się wakuole otoczone przez elektronowo-gęste membrany. Różnice w ultrastrukturze komórek

powstałe pod wpływem apoLp-III i defensyny wskazują na ich odmienny mechanizm działania na komórki *Legionella* [praca 4].

**Praca 7.** Badania przeprowadzone na *L. pneumophila*, który również był wrażliwy na apoLp-III, nie wykazały zależności między hodowlą bakterii na cholinie a wzrostem ich wrażliwości na to białko. Wyniki te mogą sugerować, że różnice w budowie struktur wchodzących w skład osłon komórkowych *L. dumoffii* i *L. pneumophila* decydują o odmiennej wrażliwości bakterii na apoLp-III. Wiązanie apoLp-III do lipopolisacharydu oraz innych składników lipidowych *L. pneumophila* wykazano na podstawie zmian w widmie różnicowym absorpcji w podczerwieni (spektrometria FTIR w połączeniu z metodą całkowitego wewnętrznego odbicia, ATR, ang. Attenuated Total Reflection). Tworzenie się silnych kompleksów apoLp-III z LPS potwierdziły różnice w migracji na żelu (SDS-PAGE) wyizolowanego z bakterii natywnego LPS-u, apoLp-III i LPS inkubowanego z białkiem oraz immunoblotting z przeciwciałami *anty*-apoLp-III. Efektem interakcji apoLp-III ze strukturami lipidowymi *L. pneumophila* były zmiany w topografii powierzchni komórki monitorowane w mikroskopie sił atomowych (AFM), który daje możliwość badania ultrastruktury powierzchni komórki i pozwala na jednoczesny pomiar sił uczestniczących w oddziaływaniach międzycząsteczkowych [praca 7].

ApoLp-III wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do badanych *Legionella* najprawdopodobniej wiążąc się z powierzchnią bakterii za pośrednictwem ich struktur powierzchniowych: głównie PC *L. dumoffii* lub LPS *L. pneumophila*, które odgrywają istotną rolę na różnych etapach infekcji makrofagów gospodarza.

**Praca 8.** Apolipoproteina III *Galleria mellonella* jest homologiczna do domeny N ludzkiej apolipoproteiny E (apoE), która jest między innymi zaangażowana w modulowanie odpowiedzi zapalnej. Sprawdzone czy również apoE może oddziaływać z komórkami *L. pneumophila*. Do badań została wybrana izoforma 4 ludzkiej apoE, która jest mniej efektywna w regulacji odpowiedzi prozapalnej niż izoforma 3, ale wpływa na poziom indukcji cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$  i IL-6) po stymulacji LPS transgenicznych myszy APOE4. Cytokiny TNF- $\alpha$  i IL-6 odgrywają decydującą rolę w odpowiedzi na zakażenie pałeczkami *Legionella*. Występowanie silnych oddziaływań estrowej grupy karbonylowej LPS z apoE 4 wykazano na podstawie analizy widm w podczerwieni. Konsekwencją tych oddziaływań były istotne zmiany powierzchni komórek *L. pneumophila* monitorowane w mikroskopie AFM. Nanomechaniczne zmiany właściwości powierzchni komórek *L. pneumophila* polegały na 2,5-krotnym obniżeniu wartości modułu Young'a oraz 2,5-krotnym obniżeniu adhezji w stosunku do bakterii nietraktowanych apoE 4. Wszystkie te

wartości zmierzone w AFM wskazują, że pod wpływem apoE 4 dochodzi do zaburzeń prawidłowej struktury powierzchni komórki, czego efektem może być upośledzona zdolność bakterii do adhezji i penetracji komórek gospodarza [**praca 8**].

W organizmie człowieka apoE 4 występuje głównie w osoczu, jako składnik lipoprotein oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym. W wytwarzaniu tego białka uczestniczy wiele rodzajów komórek, na przykład: hepatocyty, komórki mięśni gładkich oraz makrofagi. ApoE 4 poza istotną rolą w regulacji metabolizmu lipidów, reguluje funkcje płytek krwi, proces apoptozy, stres oksydacyjny oraz zaangażowana jest w modulowanie odpowiedzi zapalnej. Uzyskane wyniki wskazują, że apoE 4 może również uczestniczyć w eliminacji *L. pneumophila* z organizmu człowieka. Pomimo, że ten drobnoustrój może wywoływać zapalenie płuc to większość infekcji jest zwalczana przez sprawnie działający system immunologiczny człowieka, a jedyną konsekwencją infekcji jest pojawienie się przeciwciał w zakażonym organizmie. Wiązanie LPS *L. pneumophila* przez apoE 4 może być jednym z mechanizmów obronnych uruchamianych w trakcie zakażenia.

**Praca 9** jest artykułem przeglądowym, w którym zostały zebrane informacje na temat występowania i chorobotwórczości pałeczek *Legionella*.

### **Podsumowanie najważniejszych wyników**

Postawiony cel badań zrealizowałam w oparciu o nowoczesne metody analityczne, które umożliwiły poznanie złożonej struktury i funkcji składników lipidowych patogennych dla człowieka gatunków *Legionella* oraz ich naturalnego gospodarza *A. castellanii*. Przeprowadzone badania pozwoliły również na przedstawienie biologicznej roli badanych struktur w patogenezie *Legionella*.

1. Głównymi fosfolipidami *Legionella* spp. są fosfatydylocholina – fosfolipid charakterystyczny dla komórek eukariotycznych oraz fosfatydyloetanolamina.
2. Analiza kwasów tłuszczowych fosfolipidów wykazała, że poza składnikami, które są wspólne dla badanych *Legionella*, poszczególne gatunki różnią się składem kwasów tłuszczowych związanych z poszczególnymi klasami fosfolipidów. Może to mieć praktyczne znaczenie w diagnostyce tej grupy bakterii na poziomie gatunku oraz w różnicowaniu bakterii o odmiennym stopniu patogenności.
3. *L. bozemanae* i *L. dumoffii* hodowane na podłożu BCYE wzbogaconym chlorkiem deuterowanej choliny syntetyzują znakowaną PC, co świadczy o wykorzystywaniu przez

te bakterie egzogennej choliny. Synteza PC odbywa się na drodze dwóch równocześnie funkcjonujących szlaków syntezy PMT oraz PCS, przy czym szlak PCS jest szlakiem dominującym. Zdolność bakterii do wykorzystywania zewnątrzkomórkowej choliny może ułatwiać bakteriom przeżywanie wewnątrz komórki gospodarza.

4. Zidentyfikowano geny *pcs* (kodujący syntazę fosfatydylocholiny) oraz *pmtA* (kodujący *N*-metylotransferazę) zaangażowane w syntezę PC. Na podstawie sekwencji genów 16S rRNA, *pcs*, *pmtA* *Legionella* zaprojektowany został zestaw 21 starterów oraz sposób ich użycia do identyfikacji i różnicowania bakterii *Legionella* w reakcji multiplex-PCR (zgłoszenie patentowe). Test ten może zostać wykorzystany do identyfikacji zarówno patogennego gatunku *L. pneumophila* jak i innych gatunków *Legionella* w próbkach środowiskowych i klinicznych.
5. Zawartość PC w błonach *L. dumoffii* oraz różnice strukturalne w rozmieszczeniu kwasów acylujących rdzenie glicerolowe fosfatydylocholin mogą mieć istotne znaczenie w interakcji bakterii z komórką makrofaga określoną na podstawie pomiaru poziomu TNF- $\alpha$ . Cytokina ta odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi na zakażenie pałeczkami *Legionella*.
6. Struktury lipidowe *Legionella* (fosfolipidy i LPS) są zaangażowane w mechanizm oddziaływania bakterii z apolipoporyną III *Galleria mellonella* oraz ludzką apolipoproteiną E 4. ApoE 4 może być zaangażowana w odpowiedź na zakażenie wywołane przez *L. pneumophila*.
7. Pierwotniaki *A. castellanii* syntetyzują unikalne w przyrodzie, długołańcuchowe, wielonienasycone kwasy tłuszczowe (C28:1  $\Delta^{21}$ , C28:2  $\Delta^{5,21}$ ; 30:3  $\Delta^{5,21,24}$ ; 30:2  $\Delta^{21,24}$ ), które występują tylko w określonych klasach fosfolipidów. Identyfikacja kwasów tłuszczowych związanych z poszczególnymi fosfolipidami może być przydatna w diagnozowaniu występowania zarówno wolnożyjących ameb, jak i w materiale pochodzącym od pacjenta.

Realizacja kolejnych etapów badań przedstawiona w poszczególnych pracach składających się na monotematyczny cykl publikacji, które stanowią osiągnięcie naukowe pozwoliła wykazać, że struktura składników lipidowych *Legionella* odgrywa istotną rolę w oddziaływaniach z komórkami gospodarza. Patogeneza infekcji jest ciągłą walką pomiędzy gospodarzem i patogenem, a struktury lipidowe (PC, LPS) *Legionella* są elementami, które uczestniczą w tych oddziaływaniach. Z jednej strony pozyskiwanie zewnątrzkomórkowych

prekursorów syntezy PC ułatwia bakteriom namnażanie się wewnątrz komórek eukariotycznych i ucieczkę spod kontroli układu immunologicznego gospodarza. Z drugiej zaś strony wiązanie LPS *L. pneumophila* przez ludzką apolipoproteinę E 4 może wpływać na eliminację bakterii z organizmu.

Badania przedstawione w opisanym cyklu publikacji stanowiących **osiągnięcie monotematyczne** zostały sfinansowane ze środków kierowanych przeze mnie 2 grantów Rektora UMCS i 1 grantu MNiSW.

#### Literatura

1. Allombert J., Fuche F., Michard C., Doublet P. Molecular mimicry and original biochemical strategies for the biogenesis of a *Legionella pneumophila* replicative niche in phagocytic cells. *Microb. Infect.* 15:981-988, 2013.
2. Bohdanowich M., Grinstein S. Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol. Rev.* 93:69-106, 2013.
3. Hoffmann C., Harrison C., Hilbi H. The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell. Microbiol.* 16:15-25, 2014.

#### 6. Inne osiągnięcia naukowo-badawcze

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

##### 6.1. Publikacje

- P1. Palusińska-Szys M., Drożański W. 2006.** Struktura chemiczna i aktywność biologiczna lipopolisacharydu pałeczek z rodziny *Legionellaceae*. *Postępy Mikrobiol.* 45:287-301. (IF – brak, 4 pkt MNiSW)
- P2. Palusińska-Szys M., Drożański W. 2006.** Patogeneza i czynniki wirulencji pałeczek z rodziny *Legionellaceae*. *Post. Hig. Med. Dośw.* 60:24-44. (IF – brak, 5 pkt MNiSW)
- P3. Palusińska-Szys M., Cendrowska-Pinkosz M. 2008.** Występowanie i chorobotwórczość bakterii z rodziny *Legionellaceae*. *Post. Hig Med Dośw.* 62:337-53. (IF – brak, 4 pkt MNiSW)
- P4. Palusińska-Szys M., Russa R. 2009.** Chemical structure and biological significance of lipopolysaccharide from *Legionella*. *Recent Pat Anti Infect Drug Discov.* 4:96-107. (czasopismo nie znajduje się na liście JCR)
- P5. Palusińska-Szys M., Janczarek M. 2010.** Innate immunity to *Legionella* and Toll-like receptors. *Folia Microbiol.* 55:508-11. (IF - 0,977, 20 pkt MNiSW)
- P6. Koziół-Montewka M., Magrys A., Palusińska-Szys M., Danielak M., Wojtowicz M., Niewiedziol J., Koncewicz R., Niedźwiadek J., Paluch-Oles J., Trzeciak H., Drożański**



interactions. *Appl. Soil Ecol.* 85:94-113, 2014.

**(IF - 2,206, 35 pkt MNiSW)**

Inne badania, w których brałam udział, dotyczyły budowy O-swoistego wielocukru warunkowych patogenów ryb z rodzaju *Aeromonas*. Analiza jakościowa i ilościowa cukrów O-swoistego łańcucha LPS *Aeromonas veroni* bt. sobria K49 wykazała, że dominującymi składnikami były: L-ramnoza (Rha), 3-amino-3,6-dideoksy-D-glukoza (Qui3N) i 2-amino-2,6-dideoksy-D-galaktoza (FucN). Ustalono strukturę pięciocukrowej powtarzającej się podjednostki OPS szczepu K49 na podstawie widm jedno i dwuwymiarowych NMR:

→2)-β-D-Quip3NAc-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→2)-α-L-Rhap-(1→3)-α-D-FucpNAc-(1→

Wyniki tych badań opublikowane zostały w pracy:

- P9.** Turska-Szewczuk A, Lindner B, Pękała A, **Palusińska-Szysz M**, Choma A, Russa R, Holst O. **2012**. Structural analysis of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Aeromonas veronii* bv. sobria strain K49. *Carbohydr. Res.* 353:62-68. **(IF - 2,044, 25 pkt MNiSW)**

Uczestniczyłam również w badaniach, które miały na celu określenie czystości mikrobiologicznej polskich monet i banknotów. Wyizolowane z monet i banknotów bakterie identyfikowano na podstawie wzrostu na specyficznych podłożach oraz analiz biochemicznych i genetycznych. Najczęściej izolowano bakterie z rodzajów: *Staphylococcus* i *Enterococcus*. Grzyby rozpoznawane na podstawie cech morfologicznych i właściwości biochemicznych należały do rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium* oraz *Candida*. Występujące w naszym kraju w obiegu banknoty kontaminowane były głównie mikroorganizmami, które stanowią naturalną mikroflorę człowieka, a nielicznie występowały bakterie, które należą do oportunistycznych patogenów: *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri* i *Candida albicans*. Wyniki tych badań zostały przedstawione w pracy:

- P10.** Kalita M., **Palusińska-Szysz M.**, Turska-Szewczuk A., Wdowiak-Wróbel S., Urbanik-Sypniewska T. **2013**. Isolation of cultivable microorganisms from Polish notes and coins. *Pol. J. Microbiol.* 62:281-286. **(IF - 0,871, 15 pkt MNiSW)**

Badalam również wpływ ekstraktu hemolimfy *G. mellonella* oraz apoLp-III na komórki *L. gormanii*. Bakterie *L. gormanii* zajmują drugie miejsce po *L. pneumophila* pod

względem częstości wywoływanych zakażeń w miejscu zamieszkania. Pomimo tego, że pałeczki *Legionella* rzadko wywołują infekcje u dzieci ten gatunek izoluje się również od młodych pacjentów chorych na zapalenie płuc. Cechą charakterystyczną *L. gormanii* jest zdolność do niebiesko-białej autofluorescencji po naświetlaniu promieniami UV o długości 365 nm oraz synteza enzymu metalo- $\beta$ -laktamazy, która wykazuje wysoki stopień hydrolizy wszystkich badanych cefalosporyn i cefamycyn. Stąd potrzeba poszukiwania nowych substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych, szczególnie uzasadniona w przypadku zakażeń wywołanych przez *L. gormanii*. W pracy wykazano bakteriobójczy wpływ ekstraktu hemolimfy *G. mellonella* oraz apoLp-III na komórki *L. gormanii*. Bakteriobójcze stężenie apoLp-III w stosunku do *L. gormanii* było 8-krotnie niższe od stężenia wywołującego ten sam efekt w przypadku *L. dumoffii*. Różnice we wrażliwości badanych gatunków *Legionella* na apoLp-III są prawdopodobnie wynikiem różnic w budowie struktur powierzchniowych odpowiedzialnych za oddziaływanie z badanym białkiem. Szczegółowe wyniki doświadczeń nad wpływem apoLp-III na komórki *L. gormanii* oraz opis zmian powstałych w morfologii komórek, jako konsekwencja tych oddziaływań zostały zawarte w publikacji:

- P11.** Chmiel E., Palusińska-Szys M., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., Mak P. 2014. The effect of *Galleria mellonella* hemolymph polypeptides on *Legionella gormanii*. *Acta Biochim. Pol.* 61: 123-127. (IF - 1,389, 15 pkt MNiSW)

**P12. Rozdziały w monografiach**

1. Palusińska-Szys M. "Legionella" Chapter 81. Manual of Childhood Infections. The Blue Book (3 ed.). Sharland M., Cant A., Shingadia D., Davies E.G. (Eds). Oxford University Press, Oxford, UK, 2011. (5 pkt MNiSW)
2. Palusińska-Szys M. "Legionella" Chapter 81. Manual of Childhood Infections. The Blue Book (4 ed). Oxford University Press, Oxford, UK, 2014. Wydanie poprawione i uzupełnione, w druku

**Sumaryczny IF** ww. publikacji niewliczanych do osiągnięcia naukowego zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **10,89**. Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: **167 pkt**.

## Plany na przyszłość

W przyszłości planuję przeprowadzić charakterystykę molekularną fosfolipidów wybranych gatunków *Legionella* namnożonych w komórkach naturalnego gospodarza *A. castellanii* i porównać uzyskane wyniki z tymi dla bakterii namnożonych na sztucznym podłożu. Wstępne wyniki wskazują na wyraźne różnice w składzie jakościowym i ilościowym kwasów tłuszczowych związanych z poszczególnymi fosfolipidami. Przypuszcza się, że bakterie uwolnione z komórek żernych są opłaszczane lipidami i fosfolipidami gospodarza, co może mieć istotny wpływ na ich żywotność i wirulencję. Badania porównawcze nad składem lipidów i fosfolipidów bakterii hodowanych *in vivo* i *in vitro* umożliwią rozstrzygnięcie tej hipotezy.

## 7. Komunikaty Zjazdowe

Zaprezentowałam 37 komunikatów zjazdowych (20 na konferencjach krajowych, 17 na konferencjach międzynarodowych). Szczegółowy wykaz komunikatów umieściłam w załączniku nr 3 (III.B.9-45).

## 8. Prace badawcze

Brałam udział w następujących projektach badawczych:

### 8.1. Projekty finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego:

1. Genetyczne i biochemiczne badanie szlaków syntezy fosfatydylocholiny *Legionella* spp. **grant MNiSW N303 822640** – czas realizacji 2011-2014 **Kierownik**, miejsce realizacji UMCS
2. Mutanty *Bradyrhizobium* pozbawione długołańcuchowych hydroksykwasów – wpływ zmiany struktury lipidu A na właściwości fizyko-chemiczne membrany zewnętrznej (OM), zdolność bakterii do brodawkowania i ich przeżywalności wewnątrz komórek eukariotycznych - **grant MNiSW N303 822840**, czas realizacji 2011-2014 – **Wykonawca**, miejsce realizacji UMCS
3. Zróżnicowanie strukturalne lipopolisacharydu bakterii z rodzaju *Aeromonas* - korelacja między budową LPS, wirulencją szczepów i zdolnością do przeżywania w amebach, naturalnym rezerwuarze bakterii w środowisku wodnym. **Grant NCN 2011/03/B/NZ1/1203**, czas realizacji 2012-2015 - **Główny wykonawca**, miejsce realizacji UMCS

## 8.2. Projekty finansowane z badań własnych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej:

1. Porównawcza analiza lipidów ściany komórkowej patogennej bakterii - *Legionella lytica*, namnażanej na sztucznym podłożu i wewnątrz komórek pierwotniaka - **grant indywidualny** Prorektora UMCS ds. Badań i Współpracy Międzynarodowej, czas realizacji 01.12.2006-31.12.2006
2. Charakterystyka lipidów patogennej dla człowieka bakterii – *Legionella bozemanae* – grant zespołowy Prorektora UMCS ds. Badań i Współpracy Międzynarodowej, czas realizacji 01.12.2007- 31.12.2007 – **Kierownik**

## 9. Współpraca naukowa

W trakcie działalności naukowej współpracowałam z indywidualnymi naukowcami oraz grupami badawczymi z ośrodków w kraju i z zagranicy:

- Instytutem Chemii Organicznej PAN w Warszawie, Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Lekarskiej oraz Katedrą i Zakładem Anatomii Prawidłowej Człowieka, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Oddziałem Alergologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Lublinie oraz Zakładami: Metod Chromatograficznych, Immunobiologii, Biofizyki, Wirusologii i Immunologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej.
- Instytutem Fizyki Medycznej i Biofizyki, Wydziału Medycznego, Uniwersytetu w Lipsku, Niemcy; Wydziałem Chemii Bioanalitycznej oraz Wydziałem Mikrobiologii Komórkowej, Centrum Badawczego Borstel, Niemcy.

Efektom współpracy z Wydziałem Chemii Bioanalitycznej był **mój 6 tygodniowy staż naukowy w Centrum Badawczym Borstel** w okresie od 15.03.2014 do 30.04.2014. Podczas mojego pobytu wygłosiłam referat zatytułowany ”Characteristics of *Legionella micdadei* phospholipids”.

## 10. Uzyskane patenty i złożone wnioski patentowe

Uzyskane patenty i złożone wnioski patentowe:

**Patent:** Marta Palusińska-Szysz, Teresa Urbanik-Sypniewska, Elżbieta Chmiel. Sposób hodowli bakterii *Legionella lytica* na sztucznym podłożu – **nr patentu PL218636**

**Zgłoszenie patentowe:** Monika Janczarek, Marta Palusińska-Szysz. Zestaw starterów do identyfikacji i różnicowania bakterii z rodziny *Legionellaceae* oraz sposób zastosowania tych starterów w łańcuchowej reakcji polimerazy - **nr zgłoszenia P.406879**

## 11. Udział w Radach Redakcyjnych czasopism

Jestem członkiem Rad Redakcyjnych w następujących czasopismach:

1. American Journal of Medicine and Medical Sciences
2. International Journal of Environmental Monitoring and Analysis
3. International Journal of Advanced Nursing Studies

Zostałam zaproszona przez Radę Redakcyjną czasopisma Air & Water Borne Diseases do pełnienia funkcji Edytora Wydania Specjalnego (Guest Editor) zatytułowanego „Lung Infections” 2014.

## Recenzje wydawnicze prac dla redakcji czasopism naukowych

Opracowałam **14 recenzji** prac do publikacji w czasopismach:

1. Infection and Immunity (1)
2. International Journal of Infectious diseases (1)
3. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (1)
4. Annals of Agricultural and Environmental Medicine (1)
5. Air and Water Borne Diseases (2)
6. American Journal of Medicine and Medical Sciences (4)
7. Journal of Basic Microbiology (1)
8. Polish Journal of Microbiology (1)
9. Journal of Microbiology Research (1)
10. British Microbiology Research Journal (1)

## Omówienie pracy dydaktycznej i społeczno-organizacyjnej

W ramach obowiązków dydaktycznych prowadziłam wykłady i ćwiczenia z protozoologii dla studentów III roku Biologii specjalność mikrobiologia oraz ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej dla studentów II roku Biologii, Biotechnologii, Ochrony Środowiska. Prowadziłam również ćwiczenia z mikrobiologii lekarskiej dla studentów Chemii Kosmetyków i Środków Bioaktywnych. Moja działalność dydaktyczna obejmowała również prowadzenie seminariów licencjackich dla studentów III roku Biologii i Biotechnologii. Prowadziłam wykłady i ćwiczenia z protozoologii oraz ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej w języku angielskim dla studentów z zagranicy studiujących biologię w ramach programu Erasmus (w latach 2010/2011; 2011/2012; 2012/2013).

Po uzyskaniu stopnia doktora byłam promotorem **13 prac licencjackich** oraz opracowałam **14 recenzji prac licencjackich**, sprawowałam opiekę nad **11 studentami wykonującymi część eksperymentalną prac magisterskich**. Zostałam promotorem pomocniczym **jednej rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Chmiel**. Byłam opiekunem praktyki studenckiej Iriny

Bolyukh, studentki II roku biotechnologii UMCS (6.08-28.08.2014) oraz opiekunem roku studentów biologii (w latach 1995 do 2000) oraz biotechnologii (w latach 2009-2012).

W ramach działalności organizacyjnej brałam udział w wydarzeniach promujących naukę i kształcenie (Noc Biologów, Festiwal Nauki, Drzwi Otwarte Uczelni). W maju 2007 roku pełniłam z ramienia uczelni funkcję obserwatora egzaminu maturalnego w części pisemnej z biologii w III LO im. Unii Lubelskiej w Lublinie.

Ukończyłam studia podyplomowe na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, które dały mi uprawnienia **diagnosty laboratoryjnego**.

### **Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora w tym 9 prac stanowiących osiągnięcie naukowe – podsumowanie**

	Prace w języku		Łącznie	Liczba punktów MNiSW
	angielskim	polskim		
Publikacje naukowe				
• prace oryginalne	13	0	13	299
• prace przeglądowe	4	3	7	78
• rozdziały w monografii	2	0	2	5
• prezentacje konferencyjne			37	
- krajowe		20		
- międzynarodowe	17			
Patent			1	25
Zgłoszenie patentowe			1	2
Łącznie:			61	409
<i>Impact Factor</i> (łącznie)				
- zgodnie z rokiem opublikowania	32,305	0	32,305	

### **Dane bibliometryczne z całości dorobku naukowego (stan na 1.12.2014):**

- Liczba opublikowanych prac: **17** prac z listy JCR, **4** prace spoza listy JCR, **2** rozdziały w monografiach, **45** komunikatów zjazdowych oraz **1** patent i **1** zgłoszenie patentowe.
- Sumaryczny *Impact Factor* wszystkich prac zgodnie z rokiem opublikowania IF - **34,359**
- Sumaryczna liczba cytowań wg bazy Web of Science: **55** (**42** bez autocytowań)
- Indeks Hirscha wg bazy Web of Science: **5**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **420**

M. Palusim'ska-Szyz