

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko

Agata Krawczyk-Balska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego z dnia 04.10.2004r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Współdziałanie fosfolipazy A oraz białka p60 z listeriolizyną O w procesie patogenezы *Listeria monocytogenes*”. Promotorem w przewodzie doktorskim był dr hab. Jacek Bielecki, prof. UW (Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski), a recenzentami prof. dr hab. Antoni Różalski (Zakład Immunobiologii Bakterii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki) oraz prof. dr hab. Zdzisław Markiewicz (Zakład Fizjologii Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski).

Rozprawa doktorska uzyskała wyróżnienie Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, została również wyróżniona nagrodą indywidualną III^o Rektora Uniwersytetu Warszawskiego za osiągnięcie naukowe.

- Tytuł magistra biotechnologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego 14.07.1999r. Tytuł pracy magisterskiej; „Współdziałanie fosfolipazy *Listeria monocytogenes* z innymi determinantami patogenezы”. Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Jacka Bieleckiego, prof. UW.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 18.03.2009r. do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej, Instytutu Mikrobiologii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 15.10.2004r. – 17.03.2009r.: adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, Instytutu Mikrobiologii, Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 01.10.1999r. – 04.10.2004r.: studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Jacka Bieleckiego, prof. UW.
- 01.10.1994r. – 14.07.1999r.: studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Podłoże genetyczne wrodzonej oporność na cefalosporyny oraz tolerancji na antybiotyki β -laktamowe *Listeria monocytogenes* oraz jego związek z odpowiedzią na stres

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy

1. Krawczyk-Balska A, Popowska M, Markiewicz Z. 2012. Re-evaluation of the significance of penicillin binding protein 3 in the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to β -lactam antibiotics. BMC Microbiol. 12(1):57.

IF₂₀₁₂ – 3,104; punkty MNISW – 30; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – 5

Wkład habilitantki: 85 %; autor korespondencyjny; współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie większości doświadczeń; wykonanie większości doświadczeń; analiza i interpretacja wyników badań; przygotowanie tabel i rycin; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów

2. Krawczyk-Balska A, Marchlewicz J*, Dudek D*, Wasiak K*, Samluk A*. 2012. Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator of β -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins. BMC Microbiol 12:278.

IF₂₀₁₂ – 3,104; punkty MNISW – 30; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – 7

Wkład habilitantki: 80 %; autor korespondencyjny; autorstwo koncepcji badań i zaplanowanie wszystkich doświadczeń; opieka nad studentkami (Marchlewicz J, Dudek D, Samluk A i Wasiak K) podczas wykonywania badań, które weszły w skład publikacji; wykonanie części doświadczeń; analiza i interpretacja wyników badań; przygotowanie tabel i rycin; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie funduszy na finansowanie badań (granty N N302 229738 i N303 033 31/0938)

3. Krawczyk-Balska A, Lipiak M*. 2013. Critical role of a ferritin-like protein in the control of *Listeria monocytogenes* cell envelope structure and stability under β -lactam pressure. PLoS One. 8(10):e77808.

IF₂₀₁₃ – 3,534; punkty MNISW – 40; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – 5

Wkład habilitantki: 90 %; autor korespondencyjny; autorstwo koncepcji badań i zaplanowanie wszystkich doświadczeń; opieka nad studentką (Lipiak M) podczas wykonywania badań, które weszły w skład publikacji; wykonanie części doświadczeń; analiza i interpretacja wyników badań; przygotowanie tabel i rycin; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie funduszy na finansowanie badań (N N302 229738)

4. Krawczyk-Balska A, Korsak D, Popowska M. 2014. The surface protein Lmo1941 with LysM domain influences cell wall structure and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to cephalosporins. FEMS Microbiol Lett. 357(3): 175-183.

IF₂₀₁₄ - 2,121; punkty MNISW – 20; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – 1

Wkład habilitantki: 85 %; autor korespondencyjny; autorstwo koncepcji badań i zaplanowanie wszystkich doświadczeń; wykonanie większości doświadczeń; analiza i interpretacja wyników badań; przygotowanie tabel i rycin; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie funduszy na finansowanie badań (N303 033 31/0938)

5. Milecka D*, Samluk A*, Wasiak K*, **Krawczyk-Balska A.** 2015. An essential role of a ferritin-like protein in acid stress tolerance of *Listeria monocytogenes*. Arch Microbiol.197: 347-351.

IF₂₀₁₄ - **1,667**; punkty MNISW – **20**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - **2**

Wkład habilitantki: **85 %**; autor korespondencyjny; autorstwo koncepcji badań i zaplanowanie wszystkich doświadczeń; opieka nad studentkami (Milecka D, Samluk A i Wasiak K) podczas wykonywania badań, które weszły w skład publikacji; wykonanie części doświadczeń; analiza i interpretacja wyników badań; przygotowanie tabeli i rycin; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów; pozyskanie funduszy na finansowanie badań (N N302 229738 i N303 033 31/0938)

6. **Krawczyk-Balska A**, Markiewicz Z. 2016. The intrinsic cephalosporin resistome of *Listeria monocytogenes* in the context of stress response, gene regulation, pathogenesis and therapeutics. J Appl Microbiol. 2016. 120(2):251-265.

IF₂₀₁₄ – **2,479**; punkty MNISW – **30**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - **0**

Wkład habilitantki: **90 %**; autor korespondencyjny; autorstwo koncepcji pracy; współautorstwo (udział w analizie i interpretacji danych literaturowych) rozdziałów dotyczących białek PBP; analiza i interpretacja danych literaturowych do pozostałej części pracy; przygotowanie tabel i rycin; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów

* *studenci wykonujący prace magisterskie w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego), których byłam opiekunem oraz promotorem prac dyplomowych. Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie każdej z powyższych prac zamieszczono w załączniku nr 8. Nie przewiduje się wykorzystania którejkolwiek z wymienionych prac jako osiągnięcia w innym postępowaniu awansowym.*

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem publikacji (w przypadku prac, które ukazały się w latach 2015 i 2016, zgodnie z ostatnią dostępną wartością IF₂₀₁₄) – **16,009**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z załącznikiem do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa wyższego z dnia 23 grudnia 2015r.– **170**

Sumaryczna liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **20**

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

Wstęp

Listeria monocytogenes jest oportunistycznym, wewnątrzkomórkowym patogenem ludzi i zwierząt. Zespół objawów chorobowych wywoływanych przez tę Gram-dodatnią bakterię nosi wspólną nazwę listerioz. Szeroki zakres tolerancji *L. monocytogenes* na szereg warunków środowiskowych sprawia, iż występuje ona powszechnie w środowisku naturalnym (zarówno w wodach powierzchniowych, ściekach, glebie jak i w rozkładających się szczątkach roślinnych oraz na powierzchni roślin), a co za tym idzie, często jest obecna także na surowcach wykorzystywanych

w przemyśle spożywczym. Bakteria ta jest także doskonale przystosowana do przetrwania zabiegów stosowanych w obróbce żywności tj. dobrze toleruje wysokie stężenia soli i niskie wartości pH, a co gorsza, jest zdolna do namnażania się w temperaturach chłodniczych i przetrwania w produktach mrożonych. To sprawia, że *L. monocytogenes* stanowi poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności (Gandhi i Chikindas, 2007).

Przypadki listerioz u ludzi wiążą się ze spożyciem pożywienia zanieczyszczonego *L. monocytogenes*. Miejscem przenikania tej bakterii do organizmu człowieka jest przewód pokarmowy, gdzie dociera wraz z treścią pokarmową. Infekcja komórek gospodarza rozpoczyna się od interakcji bakteryjnych białek powierzchniowych InlA i InlB, które oddziałując ze specyficznymi receptorami komórek człowieka powodują wymuszenie internalizacji bakterii do wnętrza komórek gospodarza. Bakteria po wnikięciu do wnętrza komórki zostaje przejściowo zamknięta w fagosomie. Dzięki produkcji listeriolizyny O (hemolizyna *L. monocytogenes*) oraz fosfolipazy A, bakteria jest zdolna do degradacji błony fagosomu, co umożliwia jej przenikanie na teren cytoplazmy zainfekowanej komórki. W cytozolu bakteria zaczyna się namnażać. W tym samym czasie na wolnym biegunie komórki bakteryjnej dochodzi do rekrutacji aktywny cytoszkieletu komórki gospodarza, a w procesie tym niezbędne jest bakteryjne białko ActA. Przyłączanie kolejnych podjednostek aktywny powoduje wytworzenie specyficznej struktury nazywanej "kometą listeryjną", dzięki której bakteria przemieszcza się i dociera do błony komórkowej zainfekowanej komórki. Dalszy ruch powoduje wytworzenie wypustki która, wraz z bakterią znajdującą się wewnątrz, podlega internalizacji przez sąsiadującą komórkę gospodarza, co umożliwia międzykomórkowe rozprzestrzenianie *L. monocytogenes*. W nowo zainfekowanej komórce bakteria znajduje się zamknięta wewnątrz fagosomu. Dzięki degradacji podwójnej błony fagosomu wtórnego, do której dochodzi na skutek aktywności listeriolizyny O, fosfolipazy A i fosfolipazy B, *L. monocytogenes* przenika na teren cytoplazmy, a następnie ponownie przechodzi cykl wewnątrzkomórkowego namnażania i rozprzestrzeniania. Po pokonaniu bariery jelita, *L. monocytogenes* z krwioobiegami dociera do wątroby i śledziony. Kolonizacja tych narządów ma kluczowe znaczenie dla dalszego rozwoju choroby. Jeżeli bakterii uda się przetrwać i namnożyć w zainfekowanych organach, to po około 20 - 30 dniach następuje uwalnianie *L. monocytogenes* do krwioobiegu. Z prądem krwi bakterie roznoszone są po całym organizmie człowieka. *L. monocytogenes* jest patogenem, który może infekować szerokie spektrum tkanek gospodarza, jednakże główne formy kliniczne listeriozy wskazują na tropizm tego patogena w kierunku komórek centralnego układu nerwowego oraz, w przypadku kobiet ciężarnych, w kierunku komórek łożyska i płodu (Vazquez-Boland i wsp., 2001). W związku z powyższym, do najczęstszych objawów klinicznych listerioz należy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, posocznica (sepsa) oraz zakażenia okołoporodowe.

Nie jest znana minimalna dawka wywołująca objawy kliniczne listeriozy, jakkolwiek w zarejestrowanych przypadkach zachorowań stwierdzono obecność *L. monocytogenes* w ilości 10^6 komórek na gram skażonej żywności. Wziąwszy jednak pod uwagę długi okres ujawniania się choroby oraz zdolność *L. monocytogenes* do namnażania się w niskich temperaturach (np.: pomieszczeń chłodniczych czy lodówek) dawka infekcyjna może być znacznie niższa (Vazquez-Boland i wsp., 2001). Do grupy osób o podwyższonym ryzyku zapadnięcia na listeriozę należą osoby z upośledzoną odpornością typu komórkowego tj.: kobiety ciężarne, noworodki, osoby starsze (po sześćdziesiątym roku życia), a także osoby przyjmujące leki immunosupresyjne. Kondycja układu immunologicznego ma również istotne znaczenie dla przebiegu i wyniku choroby. Pomimo, że wydaje się, iż spożycie pokarmów skażonych *L. monocytogenes* może nie należeć do rzadkości (wziąwszy pod uwagę częstotliwość jej występowania), to do rozwoju choroby dochodzi relatywnie rzadko. Z drugiej strony wskaźnik śmiertelności jest wysoki - listeriozy są jedną z najważniejszych przyczyn śmierci noworodków na skutek infekcji w krajach uprzemysłowionych (EFSA 2012). Szacuje się że, *L. monocytogenes* powoduje 1600 zachorowań rocznie w Stanach Zjednoczonych, z czego ponad 1400 przypadków wymaga hospitalizacji, a 250 kończy się śmiercią pomimo antybiotykoterapii (Scallan i wsp., 2011). W Unii Europejskiej w 2010 roku wskaźnik

zachorowań na listeriozę wynosił średnio 0,35 przypadków na 100 000 ludności, a średni wskaźnik śmiertelności 17 % (EFSA 2012).

L. monocytogenes jest uznawana na podstawie niskich wartości MIC (minimal inhibitory concentration - minimalne stężenie hamujące wzrost) za bakterię wrażliwą na wiele ważnych klinicznie grup antybiotyków, m.in. penicyliny, karboksypenicyliny, aminopenicyliny, karbapenemy, ryfamycyny, tetracykliny i aminoglikozydy. Natomiast w przypadku pierwszej generacji chinolonów, fosfomycyny, monobaktamów i części cefalosporyn, zwłaszcza o szerokim spektrum działania np.: cefotaksymu czy ceftazydymu *L. monocytogenes* wykazuje wrodzoną (naturalną) oporność (Hof i wsp., 1997, Hof, 2003). Biorąc pod uwagę wrażliwość *L. monocytogenes* na antybiotyki, a także zdolność antybiotyków do przenikania bariery krew-mózg oraz efekty uboczne stosowania poszczególnych antybiotyków zalecaną terapią w leczeniu listerioz jest stosowanie antybiotyków β -laktamowych takich jak penicylina G i ampicylina lub jednocześnie stosowanie tych β -laktamów w skojarzeniu z gentamicyną, z uwagi na zaobserwowane w testach *in vitro* wzmożone działanie bakteriobójcze kombinacji tego aminoglikozydu i β -laktamu (Hof i wsp., 1997, Hof, 2003). Aczkolwiek, wyniki ostatnich badań epidemiologicznych nie potwierdzają synergistycznego efektu stosowania gentamicyny w skojarzeniu z ampicyliną w terapii inwazyjnej listeriozy (Muñoz i wsp., 2012). Stosowaną dotychczas terapię antybiotykową listerioz trudno uznać za wysoce skuteczną biorąc pod uwagę wysoki wskaźnik śmiertelności pomimo podjęcia terapii antybiotykowej, który w przypadku osób z niewydolnością układu immunologicznego może wynosić nawet do 30% (EFSA, 2012; Muñoz i wsp., 2012).

Biorąc pod uwagę samą wrażliwość *L. monocytogenes* na różne klasy antybiotyków, na pierwszy rzut oka trudno zrozumieć przyczynę niepowodzenia terapeutycznego antybiotykoterapii listerioz. Rozważając to zagadnienie należy stwierdzić, że antybiotykoterapia listerioz jest problemem złożonym. Leczenie jest trudne ze względu na fakt, iż *L. monocytogenes* jest patogenem wewnątrzkomórkowym. Sukces antybiotykoterapii listerioz jest więc w dużej mierze zależny od zdolności antybiotyku do przenikania do wnętrza komórek, osiągnięcia odpowiedniego stężenia, a także zachowania aktywności w odpowiednim kompartmentie wewnątrzkomórkowym zainfekowanego organizmu gospodarza. Antybiotyki β -laktamowe zalecane w terapii listerioz wydają się spełniać wspomniane powyżej kryteria (Hof, 2003). Niewątpliwie negatywnie na wynik leczenia wpływa również długi okres utajenia infekcji, co powoduje, że antybiotykoterapia włączana jest dopiero w momencie pełnej manifestacji objawów klinicznych choroby. Innym czynnikiem obniżającym skuteczność terapii jest fakt, iż przypadki listeriozy dotyczą często osób z zaburzeniami odporności, co powoduje, że system immunologiczny osoby chorej nie współdziała wydajnie z zastosowaną antybiotykoterapią w eradykacji patogenu. Warto wspomnieć, że w przypadku takich osób zaleca się stosowanie antybiotyków o działaniu bakteriobójczym w celu zwiększenia szansy na powodzenie terapii.

Generalnie antybiotyki β -laktamowe, takie jak penicylina G czy ampicylina, wykazują działanie bakteriobójcze w stosunku do drobnoustrojów klasyfikowanych jako wrażliwe na podstawie niskich wartości MIC. Właściwość ta jest związana z mechanizmem działania β -laktamów, który polega na blokowaniu ostatniego etapu biosyntezy peptydoglikanu (mureiny) będącego głównym składnikiem ściany komórkowej bakterii. Peptydoglikan zapewnia integralność komórki bakteryjnej dzięki ochronie komórki przed zmianami ciśnienia osmotycznego oraz szkodliwymi czynnikami środowiska zewnętrznego. Peptydoglikan jest wielowarstwową makromolekułą zbudowaną z powtarzających się podjednostek disacharydopentapeptydów. Podjednostki te tworzą łańcuchy cukrowe zbudowane z N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego połączonych wiązaniem β 1 \rightarrow 4 glikozydowym. Do kwasu N-acetylmuraminowego przyłączony jest amidowo krótki peptyd zbudowany z ułożonych naprzemiennie izomerów L i D aminokwasów. Łańcuchy cukrowe peptydoglikanu połączone są ze sobą wiązaniami peptydowymi tworzonymi pomiędzy pentapeptydami sąsiadujących łańcuchów cukrowych, co zapewnia odpowiednie usieciowanie, spójność strukturalną i wytrzymałość peptydoglikanu (Volmer i wsp., 2008a). W procesie biosyntezy peptydoglikanu kluczową rolę odgrywają dwie klasy enzymów. Pierwszą z nich stanowią białka wiążące penicylinę (PBP -

penicillin-binding proteins), które dzięki aktywności transglikozydazowej włączają nowo zsyntetyzowane podjednostki disacharydopentapeptydów do istniejących łańcuchów mureiny, natomiast dzięki aktywności transpeptydazowej wytwarzają wiązania peptydowe pomiędzy pentapeptydami nowo wprowadzanych podjednostek a peptydami obecnymi w istniejącej strukturze mureiny. Białka PBP zapewniają więc wzrost woreczka mureinowego oraz jego prawidłowe usieciowanie (Sauvage i wsp., 2008). Drugą klasę enzymów stanowią hydrolazy mureiny (autolizyny), które są odpowiedzialne za hydrolizę wiązań w istniejącej strukturze peptydoglikanu dostarczając w ten sposób miejsca akceptorowe dla nowych podjednostek peptydoglikanu. Obie klasy enzymów współdziałają ze sobą w procesie wzrostu woreczka mureinowego (Volmer i wsp., 2008b). Mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych polega na wiązaniu się antybiotyku z centrum aktywnym domeny transpeptydazowej białek PBP, co powoduje utratę ich aktywności, a w efekcie prowadzi do spadku usieciowania peptydoglikanu. Utrata aktywności transpeptydazowej białek PBP, przy jednoczesnym zachowaniu aktywności hydrolaz mureiny prowadzi do autolizy komórek bakterii, co pozwala klasyfikować antybiotyki β -laktamowe jako antybiotyki bakteriobójcze.

Jednakże w przypadku *L. monocytogenes* antybiotyki β -laktamowe stosowane w terapii listerioz wywierają jedynie efekt bakteriostatyczny a nie bakteriobójczy, a zjawisko to nosi nazwę tolerancji (Hof i wsp., 1997, Hof, 2003). W praktyce więc, pomimo zastosowania penicyliny G lub ampicyliny w stężeniu wielokrotnie wyższym niż wartość MIC dla tych antybiotyków nie obserwuje się zadawalającej redukcji liczby bakterii, a część populacji, która nie ginie w obecności antybiotyku, trwa nie rosnąc i nie dzieląc się. Niedzielące się bakterie mogą teoretycznie trwać w stanie bakteriostazy przez nieokreślony czas i stanowić rezerwuuar żywych komórek, prowadząc do utrzymującej się infekcji. Co ciekawe, nietypowa dla bakterii jest również reakcja komórek *L. monocytogenes* na działanie tych antybiotyków tj. śmierci komórek nie towarzyszy ewidentna autoliza (Popowska i wsp., 1999). Tolerancja *L. monocytogenes* na antybiotyki β -laktamowe jest czynnikiem niewątpliwie negatywnie wpływającym na skuteczność leczenia, zwłaszcza, że jest ona uznawana za przyczynę nawrotów choroby po zakończeniu antybiotykoterapii (Hof, 2003). Kolejnym czynnikiem negatywnie wpływającym na skuteczność antybiotykoterapii listerioz, a który wynika z właściwości samego patogenu, jest naturalna oporność *L. monocytogenes* na cefalosporyny o szerokim spektrum działania. Wydaje się to być szczególnie istotne w praktyce klinicznej, ponieważ antybiotyki z tej grupy należą do najczęściej stosowanych w przypadkach sepsy o nieznannej etiologii. Wrodzona oporność na antybiotyki jest zjawiskiem stosunkowo często występującym wśród wielu gatunków bakterii. Oporność tego typu jest zjawiskiem niezależnym od presji antybiotykowej i cechą stałą dla danego gatunku. Różni się w sposób ewidentny od oporności nabytej, gdyż jej przyczyną nie jest horyzontalny transfer genów, ani mutacje zachodzące spontanicznie w genach chromosomowych (Cox i Wright, 2013; Olivares i wsp., 2013). Podłoże genetyczne zjawiska tolerancji *L. monocytogenes* na antybiotyki β -laktamowe oraz wrodzonej oporności na cefalosporyny jeszcze kilka lat temu były stosunkowo słabo poznane. Za główną przyczynę oporności na cefalosporyny uznawano niskie powinowactwo tej grupy antybiotyków do białka PBP3 (Vicente i wsp., 1990). Ponadto wiadomo było, że 2 systemy dwuskładnikowe tj. LisRK i CesRK (Cotter i wsp., 2002; Kallipolitis i wsp., 2003), a także pompa oporności wielolekowej MdrL (Mata i wsp., 2000) zaangażowane są w kształtowanie naturalnej oporności na cefalosporyny. Jeszcze mniej wiadomo było o podłożu tolerancji *L. monocytogenes* na penicylinę G i ampicylinę. Jedynym wówczas znanym czynnikiem warunkującym tolerancję był alternatywny czynnik transkrypcyjny SigB (Begley i wsp., 2006), który jest odpowiedzialny za adaptację *L. monocytogenes* do życia w różnych warunkach stresowych i kontroluje ekspresję około 200 genów (Raengpradub i wsp., 2008).

Biorąc powyższe pod uwagę, celem naukowym przedstawionego osiągnięcia było lepsze poznanie podłoża genetycznego wrodzonej oporności na cefalosporyny i tolerancji na antybiotyki β -laktamowe *L. monocytogenes*. W publikacjach stanowiących podstawę wskazanego osiągnięcia naukowego skupiono się zwłaszcza na identyfikacji i charakterystyce nieznanych genów *L. monocytogenes* zaangażowanych w kształtowanie tych zjawisk, a także analizie ich związku z

odpowiedzią na stres. Wyniki prezentowanych badań mogą w dalszej perspektywie stać się punktem wyjścia do opracowania nowych antylisteriowych strategii terapeutycznych, ponieważ białka kodowane przez geny pełniące istotną rolę w analizowanych zjawiskach stanowią atrakcyjne cele dla opracowania nowych chemioterapeutyków, których zastosowanie z dużym prawdopodobieństwem przyczyni się bardziej efektywnej eradykacji *L. monocytogenes*.

Najważniejsze wyniki badań

Publikacja: Krawczyk-Balska A, Popowska M, Markiewicz Z. 2012. **Re-evaluation of the significance of penicillin binding protein 3 in the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to beta-lactam antibiotics.** BMC Microbiol. 12(1):57

W erze pre-genomowej badań nad *L. monocytogenes* białko PBP3 uznawane było za letalny cel działania dla antybiotyków β -laktamowych. Pogląd ten wynikał z faktu, iż spośród wszystkich białek PBP *L. monocytogenes*, jedynie w przypadku białka PBP3 obserwowano doskonałą korelację pomiędzy wrażliwością na różne klasy β -laktamów a ich powinowactwem do białka PBP3. Ponadto, jedynie białko PBP3 produkowane przez różne izolaty *L. monocytogenes*, czy nawet różne gatunki należące do rodzaju *Listeria*, charakteryzowało się stałą masą cząsteczkową oraz podobnym poziomem ekspresji (Hakenbeck i Hof, 1991; Vicente i wsp., 1990). W erze post-genomowej, a więc gdy dostępna stała się pełna sekwencja genomowa *L. monocytogenes*, możliwa stała się bardziej szczegółowa analiza funkcjonalna białek PBP. Wykonane wówczas badania wrażliwości szczepów mutantów w genach kodujących białka PBP *L. monocytogenes* wykazały, że 3 spośród 6 analizowanych genów mają znaczenie dla wrażliwości *L. monocytogenes* na antybiotyki β -laktamowe (Guinane i wsp., 2006). Wykonana przeze mnie analiza wskazywała, że białko PBP3 kodowane jest przez gen *lmo1438*. Jednakże wyniki badań Guinane i współpracowników (2006) wykazały, że mutacja w genie *lmo1438* nie zmienia wrażliwości *L. monocytogenes* na β -laktamy. Biorąc pod uwagę te sprzeczne dane postanowiłam zbadać czy białko PBP3 jest rzeczywiście kodowane przez gen *lmo1438*. W tym celu postanowiłam przeprowadzić nadekspresję genu *lmo1438* w *L. monocytogenes*. Aby przeprowadzić nadekspresję skonstruowałam wektor pAKB wykorzystując 2 wektorowy system NICE (nisin-controlled expression) z *Lactococcus lactis* (de Ruyter i wsp., 1996). W systemie tym, dwuskładnikowy system transdukcji sygnału NisRK w odpowiedzi na obecność nizyny w środowisku reguluje pozytywnie ekspresję genów z promotora P_{nisA} . Konstrukcja wektora pAKB obejmowała sklonowanie genów *nisRK* poniżej promotora genu *hly* *L. monocytogenes*, a następnie sklonowanie uzyskanego modułu do wektora pNZ8048 niosącego promotor P_{nisA} . Do wektora pAKB, poniżej promotora P_{nisA} , sklonowałam następnie gen *lmo1438*, a uzyskany wektor wykorzystywałam do nadekspresji genu *lmo1438* w *L. monocytogenes*. Analiza białek błonowych szczepu z nadekspresją *lmo1438* wykazała obecność dodatkowego białka o masie około 80 kDa i była to masa zgodna z przewidywaną dla produktu białkowego analizowanego genu. Wykonana następnie analiza autoradiograficzna białek PBP oraz analiza densytometryczna uzyskanych autoradiogramów wykazała ponad trzykrotnie wyższą zawartość białka PBP3 w szczepie z nadekspresją *lmo1438*. Wynik ten stanowił bezpośredni dowód, iż białko PBP3 jest kodowane gen *lmo1438*. Zaobserwowano, że nadekspresji PBP3 towarzyszył niewielki, ale istotny statystycznie, wzrost ekspresji białka PBP4, o którym wiadomo, że kodowane jest przez gen *lmo2229* (Zawadzka-Skomiał i wsp., 2006). Ponadto szczep z nadekspresją PBP3 wykazywał opóźnienie tempa wzrostu oraz zredukowaną długość komórek w stacjonarnej fazie wzrostu, co sugeruje zaangażowanie tego białka w proces podziału komórek *L. monocytogenes*. W badaniach wrażliwości szczep z nadekspresją PBP3 wykazywał zwiększoną wrażliwość na subinhibitorowe stężenia niektórych antybiotyków β -laktamowych oraz spadek przeżywalności w stężeniu penicyliny G powyżej wartości MIC. Jednakże wartości MIC testowanych β -laktamów (będące wyznacznikiem wrażliwości) nie uległy zmianie na skutek nadekspresji PBP3. Uzyskane wyniki razem z wynikami badań Guinane i współpracowników (2006) pozwoliły zweryfikować hipotezę o kluczowej roli

białka PBP3 w kształtowaniu wrażliwości *L. monocytogenes* na antybiotyki β -laktamowe. Wyniki te wskazują, że białko PBP3 nie jest letalnym celem działania dla β -laktamów w komórkach *L. monocytogenes*.

Główne osiągnięcia poznawcze

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy pozwoliły na stwierdzenie, że białko PBP3 *L. monocytogenes* nie jest letalnym celem działania dla antybiotyków β -laktamowych, a tym samym wykazanie, że dotychczasowa hipoteza na ten temat jest błędna

Publikacja: Krawczyk-Balska A, Marchlewicz J, Dudek D, Wasiak K, Samluk A. 2012. **Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator of β -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins.** BMC Microbiol 12:278.

Wiele genów bakteryjnych, których ekspresja wzrasta w obecności antybiotyku, pełni również ważną rolę we wrażliwości na ten antybiotyk. Zależność taką obserwuje się również w przypadku niektórych genów *L. monocytogenes*. Biorąc pod uwagę tę obserwację postanowiłam, w kolejnym etapie badań nad wrażliwością *L. monocytogenes* na antybiotyki β -laktamowe, przeprowadzić identyfikację genów *L. monocytogenes*, których ekspresja wzrasta pod wpływem presji penicyliny G. W tym celu skonstruowałam system do identyfikacji promotorów *L. monocytogenes*. System ten składał się wektora pAT28, do którego sklonowałam gen *hly* (kodujący listeriolizynę O) bez sekwencji promotora oraz z szczepu mutanta delecyjnego *L. monocytogenes* w genie *hly*, który w wyniku wprowadzonej mutacji stał się szczepem niehemolitycznym. Do wektora pAT28/*hly*, powyżej bezpromotorowego genu *hly* zostały sklonowane fragmenty DNA genomowego *L. monocytogenes* uzyskane w wyniku nebulizacji lub enzymatycznego trawienia. W ten sposób przygotowano 4 biblioteki genów *L. monocytogenes*, które następnie wprowadzono do szczepu *L. monocytogenes* Δ *hly*. W puli uzyskanych komórek zidentyfikowano 259 klonów hemolitycznych tj. tworzących strefy β -hemolizy na podłożu uzupełnionym krwią i penicyliną G w stężeniu subinhibitorowym. Klony te niosły wektor pAT28/*hly* ze sklonowanym powyżej genu reporterowego fragmentem DNA zawierającym funkcjonalny promotor *L. monocytogenes*. Uzyskaną pulę klonów hemolitycznych replikowano na podłożu uzupełnione krwią i penicyliną G oraz podłożu uzupełnione krwią i niezawierające antybiotyku. W ten sposób wyselekcjonowano klony, które na podłożu uzupełnionym penicyliną G tworzyły strefy hemolizy o większej średnicy. Zwiększoną aktywność hemolityczną tych klonów potwierdzono metodą spektrofotometryczną. Następnie przeprowadzono sekwencjonowanie DNA fragmentów sklonowanych powyżej genu *hly* w wyselekcjonowanych klonach wykazujących wzmożoną aktywność hemolityczną pod wpływem presji penicyliny G. Analizy uzyskanych sekwencji pozwoliły na wytypowanie 10 genów, których ekspresja jest indukowana w odpowiedzi na presję penicyliny G. Indukowalny charakter ekspresji zidentyfikowanych genów w obecności tego β -laktamu w szczepie dzikim *L. monocytogenes* potwierdzono wykonując pół-ilościowe analizy RT-PCR.

Trzy spośród zidentyfikowanych genów tj. *phoP*, *axyR* oraz *fri* zostały wybrane do dalszej analizy, ponieważ geny te kodują białka o charakterze regulacyjnym. Gen *phoP* koduje regulator transkrypcji dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału PhoPR. W przypadku *B. subtilis* wykazano, że system PhoPR jest zaangażowany w kontrolę biosyntezy kwasów teichojowych, kluczowego komponentu ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich (Qi i Hulett, 1998). Gen *axyR* koduje regulator transkrypcji z rodziny AraC/XylS. Niektóre regulatory należące do rodziny AraC/XylS warunkują tolerancję antybiotykową (Gallegos i wsp., 1997). Gen *fri* koduje listeryjną ferrytynę, która należy do rodziny bakteryjnych białek Dps (DNA-binding proteins from starved cells) chroniących DNA w warunkach stresowych (Haikarainen i Papageorgiou, 2010). Białka Dps dzięki zdolności utleniania i przechowywania żelaza zapobiegają powstawaniu wolnych rodników hydroksylowych. Pełnią więc one w komórkach bakteryjnych ważną funkcję w przeciwdziałaniu szkodliwemu działaniu żelaza w warunkach tlenowych. Ferrytyna *L. monocytogenes* pełni istotną

rolę w wirulencji i ochronie komórek *L. monocytogenes* przed wieloma czynnikami stresowymi i jakkolwiek nie jest *sensu stricto* białkiem regulatorowym, to pośrednio wywiera istotny wpływ na globalny metabolizm komórkowy. Świadczą o tym zmiany zawartości regulatorów CcpA (catabolite control protein A) i czynnika anty-sigma B - białka RsbW obserwowane w szczepie mutanta *L. monocytogenes*Δ*fri*, które wskazują na wpływ ferrytyny na globalną sieć regulacyjną (Dussurget i wsp., 2005; Olsen i wsp., 2005).

W toku dalszych prac badawczych skonstruowano szczepy mutantów delecyjnych *L. monocytogenes* w genach *phoP* i *axyR* (szczep mutanta *L. monocytogenes*Δ*fri* otrzymano od prof. H. Ingmer), a następnie poddano je analizie. Badania wykazały, iż brak funkcjonalnych genów *phoP* i *axyR* nie skutkuje zmianą wrażliwości i tolerancji *L. monocytogenes* na β-laktamy. Jedyną zaobserwowaną różnicą w przypadku mutantów Δ*phoP* i Δ*axyR* było szybsze tempo wzrostu tych szczepów w obecności subinhibitorowego stężenia β-laktamów, co wskazuje iż, geny *phoP* i *axyR* nie odgrywają znaczącej roli w kształtowaniu fenotypu oporności i tolerancji *L. monocytogenes* na antybiotyki β-laktamowe. Analogiczne badania wykonane dla mutanta *L. monocytogenes* Δ*fri* pozwoliły zaobserwować dwukrotny wzrost wrażliwości szczepu mutanta *L. monocytogenes* Δ*fri* na dwie cefalosporyny tj. cefalotynę oraz cefradynę. Porównanie tempa wzrostu szczepu mutanta Δ*fri* i szczepu dzikiego w subinhibitorowych stężeniach penicyliny G i ampicyliny wykazało, że szczep mutanta charakteryzuje się wyraźnie spowolnionym tempem wzrostu. Badanie tolerancji wykazało natomiast, że brak funkcjonalnego genu *fri* skutkuje całkowitą utratą zdolności komórek *L. monocytogenes* do przeżycia w obecności letalnych stężeń wspomnianych antybiotyków. Wyniki te wskazują, że ferrytyna pełni ważną rolę w kształtowaniu fenotypu tolerancji oraz oporności *L. monocytogenes* na antybiotyki β-laktamowe.

Główne osiągnięcia poznawcze

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy pozwoliły na:

- Identyfikację 10 genów *L. monocytogenes*, których ekspresja wzrasta pod wpływem presji penicyliny G
- Identyfikację ferrytyny *L. monocytogenes* jako białka pełniącego ważną rolę we wrodzonej oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny oraz tolerancji na β-laktamy

Publikacja: Krawczyk-Balska A, Lipiak M. 2013. **Critical role of a ferritin-like protein in the control of *Listeria monocytogenes* cell envelope structure and stability under β-lactam pressure.** PLoS One. 8(10):e77808.

Zaobserwowana istotna rola ferrytyny w tolerancji *L. monocytogenes* na penicylinę G oraz ampicylinę stała się punktem wyjścia do dalszych badań. Powszechnie przyjmuje się, że zjawisko tolerancji bakterii na β-laktamy jest związane z brakiem odpowiedniej aktywności hydrolaz mureiny (autolizyn), których kontrola w komórkach bakteryjnych jest niezwykle złożona (Rice i Bayles, 2008). W przypadku bakterii Gram-dodatnich uważa się, że kluczową rolę w kontroli aktywności hydrolaz mureiny pełnią kwasy tejchojowe (będące, obok mureiny, głównym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich), które hamują aktywność hydrolaz w zależności od stopnia D-alanylationi oraz poziomu uprotonowania estrowo związanych D-alanin (Rice i Bayles, 2008). Mechanizmy tolerancji *L. monocytogenes* na β-laktamy nie były jednak przedmiotem wcześniejszych badań i w związku z powyższym pozostają nieznanymi. Wcześniejsze badania pozwoliły mi ustalić, że ferrytyna *L. monocytogenes* pełni kluczową rolę w tolerancji β-laktamów, ale rola tego białka w samym procesie pozostawała nieznaną. W związku z powyższym, aby poznać podłoże tolerancji *L. monocytogenes* na β-laktamy oraz rolę ferrytyny w tym zjawisku przeprowadzono szczegółowe badania wpływu mutacji w genie *fri* na strukturę i stabilność osłon komórkowych *L. monocytogenes*. Wykonane analizy porównawcze szczepu dzikiego *L. monocytogenes* i szczepu mutanta Δ*fri* pozwoliły zaobserwować, że pod wpływem presji penicyliny G ściana komórkowa szczepu dzikiego staje się mniej podatna na działanie lizozymu,

podczas gdy ściana komórkowa mutantu Δfri staje się bardziej podatna na działanie tego enzymu murolitycznego. Przyczyną zaobserwowanych zmian stabilności ściany komórkowej mogły być zmiany w budowie peptydoglikanu np. niższy stopień usieciowania lub zmiany w poziomie acetylacji N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego. Aby zweryfikować tę hipotezę, wykonano analizę porównawczą wzoru muropeptydowego peptydoglikanu badanych szczepów. Badanie to nie wykazało istotnych zmian w składzie muropeptydowym badanych szczepów, co pozwoliło stwierdzić, że obniżona stabilność ściany komórkowej mutantu Δfri nie wynika ze zmian w budowie peptydoglikanu. W kolejnym etapie badań wykonano analizę zawartości kwasów tejchojowych, która wykazała, że pod wpływem presji penicyliny G zawartość tych polianionowych polimerów w ścianie komórkowej szczepu dzikiego *L. monocytogenes* wzrasta, natomiast w przypadku mutantu Δfri wzrostu zawartości kwasów tejchojowych nie zaobserwowano. Zbadano również wpływ mutacji w genie *fri* na morfologię komórek oraz strukturę ściany komórkowej *L. monocytogenes*. Analiza zdjęć wykonanych w skaningowym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazała, że pod wpływem presji penicyliny G komórki szczepu dzikiego *L. monocytogenes* ulegają skróceniu, a grubość ściany komórkowej wzrasta. W przypadku szczepu mutantu Δfri zaobserwowano natomiast, że pod wpływem presji tego β -laktamu komórki ulegają wydłużeniu czemu towarzyszy znaczne zmniejszenie grubości ściany komórkowej oraz wyraźne zaburzenia strukturalne w obrębie sept podziałowych. Biorąc pod uwagę istotny wpływ hydrolaz mureiny na integralność osłon komórkowych oraz strukturę ściany komórkowej, w kolejnym etapie badań zdecydowano się zbadać wpływ ferrytyny na transkrypcję genów kodujących znane hydrolazy mureiny *L. monocytogenes* tj. *auto*, *ami*, *murA*, *iap* i *spl*. Aktywność hydrolaz mureiny często podlega kontroli posttranslacyjnej np. poprzez kontrolę sekrecji tych enzymów. W przypadku *L. monocytogenes* wykazano, że hydrolazy mureiny MurA i Iap podlegają sekrecji przy udziale białka SecA2 (Lenz i wsp., 2003). Ponadto, u wielu gatunków bakterii Gram-dodatnich aktywność hydrolaz mureiny jest kontrolowana przez poziom D-alanylationi kwasów tejchojowych. Za D-alanylationi kwasów tejchojowych odpowiedzialne są białka kodowane przez operon *dlt*. W związku z powyższym zdecydowano również zbadać potencjalne zaangażowanie ferrytyny w regulację transkrypcji genów *secA2* oraz *dlt*. Analizę wpływu ferrytyny na poziom transkrypcji wykonano konstruując fuzje transkrypcyjne promotorów badanych genów z genem reporterowym *lacZ*, a następnie określając poziom aktywności β -galaktozydazy w komórkach szczepu dzikiego oraz szczepu mutantu Δfri . Badania transkrypcji wykazały, że pod wpływem presji penicyliny G w obu szczepach następuje obniżenie poziomu transkrypcji genów kodujących hydrolazy mureiny MurA i Iap, a także genu kodującego białko SecA2, odpowiedzialnego za sekrecję tych właśnie hydrolaz. Wynik ten wskazuje, iż obniżenie ekspresji wspomnianych genów następuje w odpowiedzi na presję penicyliny G i jest niezależne od obecności funkcjonalnego genu *fri*. Badania transkrypcji wykazały ponadto, że poziom transkrypcji operonu odpowiedzialnego za D-alanylationi kwasów tejchojowych (której poziom reguluje aktywność hydrolaz mureiny w obrębie ściany komórkowej) był znacząco niższy w szczepie mutantu Δfri w czasie wzrostu w warunkach presji antybiotykowej. Wynik ten wskazuje, że ferrytyna jest niezbędna do utrzymania odpowiedniego poziomu D-alanylationi kwasów tejchojowych w warunkach presji β -laktamu. Biorąc pod uwagę, że regulacja aktywności hydrolaz mureiny jest niezwykle złożona i często kontrolowana na poziomie posttranslacyjnym, prosta analiza transkrypcji genów kodujących te enzymy jest niewystarczająca do oceny ich aktywności. Aby lepiej poznać posttranslacyjną regulację hydrolaz mureiny w komórkach *L. monocytogenes*, a także ocenić potencjalną rolę ferrytyny oraz wpływ presji β -laktamu na tę regulację, przeprowadzono ilościową analizę porównawczą białek o aktywności hydrolaz mureiny, wyizolowanych z różnych przedziałów komórkowych *L. monocytogenes*. Zaobserwowano, że szczep dziki w warunkach presji penicyliny G wykazywał znacząco zmniejszoną zawartość hydrolaz mureiny we frakcji białek związanych z błoną cytoplazmatyczną oraz ścianą komórkową, czemu towarzyszyła zwiększona zawartość hydrolaz mureiny uwalnianych do podłoża. W przypadku mutantu Δfri podobnie zaobserwowano, że w warunkach presji β -laktamu zawartość hydrolaz mureiny uległa zmniejszeniu we frakcji białek związanych z błoną cytoplazmatyczną oraz zwiększeniu w supernatancie hodowlanym, natomiast szczep ten, w

przeciwieństwie do szczepu dzikiego, nie wykazywał zmniejszenia zawartości tych enzymów w obrębie ściany komórkowej. Wyniki te wskazują, że w odpowiedzi na presję penicyliny G następuje, niezależnie od obecności funkcjonalnego genu *fri*, zmniejszenie zawartości hydrolaz mureiny związanych z błoną cytoplazmatyczną oraz zwiększenie zawartości tych enzymów w supernatancie hodowlanym. Natomiast brak redukcji zawartości tych enzymów w obrębie ściany komórkowej zaobserwowany w przypadku mutanta Δfri wskazuje, że w warunkach presji penicyliny G ferrytyna jest niezbędna w procesie kontroli zawartości hydrolaz mureiny w miejscu ich działania.

Główne osiągnięcia poznawcze

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy pozwoliły na poznanie zmian zachodzących pod wpływem presji penicyliny G w osłonach komórkowych *L. monocytogenes*. Zmiany te powodują zwiększenie stabilności ściany komórkowej, co umożliwia *L. monocytogenes* zachowanie integralności komórki, która jest warunkiem *sine qua non* tolerancji na β -laktamy. Za szczególnie istotne w tym względzie uważam wykazanie:

- zmniejszenia podatności ściany komórkowej na działanie enzymów murolitycznych (lizozymu) w warunkach presji penicyliny G
- wzrostu zawartości kwasów tejchojowych w ścianie komórkowej w warunkach presji penicyliny G
- obniżenia w warunkach presji penicyliny G poziomu transkrypcji genów kodujących hydrolazy mureiny MurA i Iap, a także genu kodującego białko SecA2, odpowiedzialnego za sekrecję tych właśnie hydrolaz
- obniżenia w warunkach presji penicyliny G zawartości hydrolaz mureiny w frakcji białek związanych z błoną cytoplazmatyczną oraz w obrębie ściany komórkowej

Wyniki prezentowanych badań umożliwiły również lepsze poznanie roli ferrytyny w zjawisku tolerancji *L. monocytogenes* na β -laktamy. Wyniki te wskazują, że ferrytyna odgrywa kluczową rolę w kontroli stabilności i struktury osłon komórkowych *L. monocytogenes* w warunkach presji penicyliny G. Za szczególnie istotne w tym względzie uważam wykazanie, że ferrytyna jest niezbędna w procesie kontroli:

- zawartości hydrolaz mureiny w ścianie komórkowej
- zawartości kwasów tejchojowych w ścianie komórkowej
- stopnia D-alanylationi kwasów tejchojowych

Publikacja: Krawczyk-Balska A, Korsak D, Popowska M. 2014. **The surface protein Lmo1941 with LysM domain influences cell wall structure and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to cephalosporins.** FEMS Microbiol Lett. 357(3): 175-183.

Spośród 10 zidentyfikowanych przeze mnie genów, których ekspresja wzrasta w obecności penicyliny G (Krawczyk-Balska i wsp., 2012), wybrałam kolejne tj. *lmo0944*, *lmo0945*, *lmo1065* oraz *lmo1941*, w przypadku których zdecydowałam się przeprowadzić analizę funkcjonalną pod kątem ich potencjalnej roli w oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny oraz tolerancji na β -laktamy. W tym celu skonstruowałam szczepy mutantów delecyjnych w analizowanych genach i wykonałam badania wrażliwości. W przypadku jednego z analizowanych genów tj. *lmo1941* dokonałam interesujących obserwacji, które stały się podstawą do przygotowania publikacji.

Gen *lmo1941* koduje białko powierzchniowe *L. monocytogenes* o nieznannej funkcji. Analiza sekwencji aminokwasowej wskazuje na obecność w rejonie C-końca białka Lmo1941 domeny LysM, która jest odpowiedzialna za niekowalencyjne wiązanie białek z peptydoglikanem (Visweswaran i wsp., 2011). Wykonane badania wrażliwości wykazały, że inaktywacja genu *lmo1941* nie ma wpływu na wrażliwość i tolerancję *L. monocytogenes* na penicylinę G i ampicylinę. Zaobserwowano natomiast, że mutacja genu *lmo1941* spowodowała wzrost wrażliwości na niektóre cefalosporyny, najwyższy - dwukrotny, w przypadku cefuroksymu. Biorąc pod uwagę potencjalną zdolność oddziaływania Lmo1941 z peptydoglikanem wysnuto przypuszczenie, że zaobserwowany

wzrost wrażliwości mutantu $\Delta lmo1941$ na niektóre cefalosporyny może wynikać z wpływu Lmo1941 na budowę peptydoglikanu. Aby zweryfikować tę hipotezę wykonano analizę porównawczą wzoru muropeptydowego peptydoglikanu szczepu dzikiego oraz mutantu $\Delta lmo1941$. Analiza budowy peptydoglikanu wyizolowanego z hodowli w stacjonarnej fazie wzrostu dostarczyła ciekawych danych. Zaobserwowano, że chociaż skład muropeptydowy obu szczepów jest taki sam, to ilości niektórych muropeptydów w badanych szczepach różnią się. Szczegółowa analiza ilościowa wykazała, że w szczepie mutantu $\Delta lmo1941$ zawartość 2 muropeptydów jest o połowę mniejsza niż w szczepie dzikim. Biorąc pod uwagę, że peptydoglikan jest głównym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, w kolejnym etapie badań zdecydowano zbadać, czy zaobserwowane zmiany we wzorze muropeptydowym w szczepie mutantu $\Delta lmo1941$ są skorelowane ze zmianami w strukturze ściany komórkowej *L. monocytogenes*. Analiza zdjęć komórek szczepu dzikiego i mutantu $\Delta lmo1941$ pochodzących ze stacjonarnej fazy wzrostu (wykonanych w transmisyjnym mikroskopie elektronowym) wykazała, że grubość ściany komórkowej obu szczepów jest taka sama. Natomiast analiza gęstości strefy w ścianie komórkowej charakteryzującej się dużym zagęszczeniem materiału (strefa ta jest uznawana za funkcjonalny rejon ściany o wysokim stopniu usieciowania peptydoglikanu oraz zawierający liczne białka (Rice i Bayles, 2008)) wykazała, że w przypadku szczepu mutantu $\Delta lmo1941$ gęstość tej strefy jest o połowę mniejsza niż w szczepie dzikim. Na podstawie tej obserwacji można zatem stwierdzić, że białko Lmo1941 wpływa na strukturę ściany komórkowej *L. monocytogenes* w stacjonarnej fazie wzrostu.

Główne osiągnięcia poznawcze

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy pozwoliły wykazać, że:

- gen *lmo1941* jest zaangażowany w kształtowanie wrodzonej oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny
- białko Lmo1941 wpływa na budowę peptydoglikanu *L. monocytogenes* w stacjonarnej fazie wzrostu
- białko Lmo1941 wpływa na strukturę ściany komórkowej *L. monocytogenes* w stacjonarnej fazie wzrostu

Publikacja: Milecka D, Samluk A, Wasiak K, Krawczyk-Balska A. 2015. **An essential role of a ferritin-like protein in acid stress tolerance of *Listeria monocytogenes***. Arch Microbiol.197: 347-351.

Dane literaturowe wskazują na kluczową rolę białek o charakterze regulatorowym w odpowiedzi *L. monocytogenes* na różnorakie czynniki stresowe. Co ciekawe, poszczególne regulatory często odgrywają istotną rolę w adaptacji *L. monocytogenes* do życia w różnych warunkach stresowych. Badania transkryptomyczne wskazują natomiast, że wiele genów należących do stymulonów cefuroksymowego *L. monocytogenes* ulega również wzmożonej ekspresji w czasie wzrostu wewnątrz zainfekowanych komórek oraz we krwi. Wyniki te sugerują, że zmiany transkrypcji genów *L. monocytogenes* związane ze stresem osłon komórkowych pokrywają się ze zmianami obserwowanymi w innych warunkach stresowych (Nielsen i wsp., 2012). W oparciu o powyższe przesłanki postanowiono zbadać jak transkrypcja zidentyfikowanych poprzednio genów, charakteryzujących się wzmożoną ekspresją w obecności penicyliny G, zmienia się w warunkach stresu temperaturowego, osmotycznego oraz wynikającego z zakwaszenia środowiska. Ponadto ocenie poddano zaangażowanie zidentyfikowanych genów o charakterze regulatorowym tj. *fri*, *phoP* i *axyR* w adaptacji *L. monocytogenes* do wspomnianych warunków stresowych. Wyniki badań transkrypcji wykonane metodą pół-ilościowych analiz RT-PCR pozwoliły zaobserwować, że transkrypcja 4 z badanych genów wzrasta w warunkach stresu temperaturowego, 7 w warunkach niskiego pH, a wszystkich w warunkach stresu osmotycznego. Badanie udziału genów *fri*, *phoP* i *axyR* w adaptacji do życia w warunkach stresu temperaturowego, niskiego pH oraz stresu osmotycznego wykazały, że brak funkcjonalnych genów *phoP* i *axyR* nie skutkuje zmianą zdolności

L. monocytogenes do wzrostu w tych warunkach. W przypadku mutanta *L. monocytogenes* Δ *fri* zaobserwowano natomiast niewielkie spowolnienie tempa wzrostu w warunkach stresu osmotycznego i wyraźne spowolnienie tempa wzrostu w warunkach stresu związanego z zakwaszeniem środowiska.

Główne osiągnięcia poznawcze

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy pozwoliły wykazać, że:

- zidentyfikowane poprzednio geny *L. monocytogenes*, charakteryzujące się wzmożoną ekspresją w obecności penicyliny G, podlegają wzmożonej transkrypcji w różnych warunkach stresowych, a zatem należą do ogólnego stymulonu stresowego *L. monocytogenes*
- ferrytyna pełni ważną rolę w adaptacji *L. monocytogenes* do życia w środowisku o niskim pH

Publikacja: Krawczyk-Balska A, Markiewicz Z. 2016. **The intrinsic cephalosporin resistome of *Listeria monocytogenes* in the context of stress response, gene regulation, pathogenesis and therapeutics.** J Appl Microbiol. 2016. 120(2):251-265.

Aby lepiej zrozumieć zjawisko wrodzonej oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny, a także lepiej ocenić wyniki moich badań nad tym zjawiskiem z perspektywy istniejącego stanu wiedzy w tym temacie, postanowiłam przeanalizować istniejące dane literaturowe na temat podłoża genetycznego wrodzonej oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny. Do tej pory zidentyfikowano 17 genów, których inaktywacja powoduje wzrost wrażliwości *L. monocytogenes* na antybiotyki należące do grupy cefalosporyn. Poza 3 białkami PBP do rezystomu cefalosporynowego należą transportery typu MDR (multidrug resistance transporters), białka zaangażowane w biosyntezę i modyfikację peptydoglikanu, białka osłon komórkowych o funkcji strukturalnej bądź związanej z detoksyfikacją, białka cytoplazmatyczne o nieznannej funkcji oraz białka regulatorowe. Inaktywacja zdecydowanej większości tych genów skutkuje relatywnie niewielkim wzrostem wrażliwości, z reguły 2- lub 4-krotnym. Jedynie inaktywacja 3 spośród analizowanych genów tj. *lmo0441* kodującego białko PBPB3 oraz 2 niebędących genami kodującymi białka PBP tj. *mdrL* i *oatA* skutkowało ponad ośmiokrotnym wzrostem wrażliwości *L. monocytogenes* na cefalosporyny. Aby uzyskać bardziej pełny obraz sytuacji, w analizie nie ograniczyłam się tylko do wyszukania informacji na temat jakie geny i w jakim stopniu są zaangażowane w kształtowanie tego zjawiska, ale także czy poszczególne geny tego naturalnego rezystomu są zaangażowane w adaptację *L. monocytogenes* do życia w innych warunkach stresowych. Spośród 17 analizowanych genów aż 13 jest zaangażowanych w odpowiedź na różne czynniki stresowe lub wirulencję. Ponadto analizie poddałam również regulację ekspresji tych genów, zarówno pod kątem białek regulatorowych zaangażowanych w kontrolę ich ekspresji, jak i zmian poziomu ekspresji tych genów w warunkach, w których mogą mieć szczególne znaczenie tj. w warunkach presji antybiotyku z grupy cefalosporyn oraz w czasie infekcji *in vivo*. W regulację ekspresji genów należących do rezystomu cefalosporynowego *L. monocytogenes* zaangażowanych jest 8 regulatorów tj. LisR, CesR, LiaR, VirR, σ B, σ H, σ L i PrfA, z których najważniejszą rolę odgrywają LisR, CesR i σ B. Poszczególne regulatory często wywierają przeciwstawny efekt na transkrypcję konkretnych genów rezystomu cefalosporynowego, tak więc poziom ekspresji tych genów jest wypadkową złożonej sieci powiązań regulacyjnych. Z 17 analizowanych genów, ekspresja 10 wzrasta w warunkach presji cefuroksymu, a 6 w czasie infekcji *in vivo*. Te dane sugerują, że w zainfekowanym organizmie poziom oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny jest wysoki. Można przypuszczać, że nawet wyższy niż ten obserwowany w testach *in vitro*, ponieważ transkrypcja niektórych genów zaangażowanych w oporność na cefalosporyny (a które nie należą do stymulonu cefuroksymowego tj. *fri* i *oatA*) wzrasta w czasie infekcji *in vivo*. Wrodzona oporność *L. monocytogenes* na cefalosporyny obecnie wyklucza stosowanie tych

antybiotyków w leczeniu listeriozy. Jednak ta grupa antybiotyków posiada wiele zalet, takich jak niska toksyczność oraz zdolność przenikania bariery krew-mózg. Ponadto, presja cefalosporynowa negatywnie wpływa na ekspresję genów kodujących kluczowe czynniki wirulencji *L. monocytogenes* tj. Hly, PlcA, PlcB, ActA, InlA i InlB (Nielsen i wsp., 2012). To wskazuje, że chociaż działanie cefalosporyny w zainfekowanym organizmie jest nieefektywne, to te antybiotyki mogą negatywnie wpływać na rozwój infekcji. Biorąc powyższe pod uwagę, celowe wydaje się zidentyfikowanie białek w komórkach *L. monocytogenes*, które byłyby atrakcyjnymi celami dla opracowania chemioterapeutyków, które zastosowane w kombinacji z cefalosporynami poprawiałyby aktywność antylisteryjną tych antybiotyków. Kompleksowe podejście do prowadzonej analizy danych pozwoliło mi również ocenić potencjał rezystomu cefalosporynowego *L. monocytogenes* pod kątem terapeutycznym. Najbardziej wartościowymi kandydatami są te białka, których inaktywacja prowadzi do możliwie największego wzrostu wrażliwości na cefalosporyny i jednocześnie obniża wirulencję. Ponadto, biorąc pod uwagę korzyść wynikającą z łatwego dostępu chemioterapeutyku do celu działania, preferencyjnie powinno to być białko osłon komórkowych. Biorąc pod uwagę te cechy najlepszymi kandydatami wydają się białka MdrL, ferrytyna oraz OatA, a spośród nich najlepszą kombinacją pożądaných cech charakteryzuje się O-acetylotransferaza OatA. Warto również zauważyć, że strategie oparte na celowanej inaktywacji niektórych białek kodowanych przez geny należące do rezystomu cefalosporynowego *L. monocytogenes* mogą znaleźć zastosowanie w opracowaniu bardziej skutecznych metod prewencji listerioz, np. poprzez opracowanie bardziej efektywnych metod konserwacji żywności.

Główne osiągnięcia poznawcze

Wyniki analiz przedstawionych w tej pracy pozwoliły stwierdzić, że:

- wrodzona oporność *L. monocytogenes* na cefalosporyny jest cechą wielogenową, której poszczególne determinanty mają podobny udział w kształtowaniu poziomu oporności.
- zdecydowana większość genów rezystomu cefalosporynowego pełni również istotną rolę w odpowiedzi na różne czynniki stresowe i/lub wirulencji *L. monocytogenes*, co wskazuje na istnienie wyraźnego związku pomiędzy podłożem genetycznym tych zjawisk.
- fenotyp wrodzonej oporności na cefalosporyny podlega niezwykle złożonej kontroli, w którą zaangażowane są liczne białka regulatorowe.
- liczne geny rezystomu cefalosporynowego, które nie należą do stymulonów cefalosporynowego, podlegają wzmożonej ekspresji w czasie infekcji *in vivo*, co sugeruje, że poziom oporności *L. monocytogenes* na tę grupę antybiotyków w zainfekowanym organizmie może być wyższy niż ten obserwowany w testach wrażliwości *in vitro*.
- najlepszymi celami dla chemioterapeutyków, które zastosowane w kombinacji z cefalosporynami poprawiałyby aktywność antylisteryjną tych antybiotyków, wydają się białka MdrL, ferrytyna oraz OatA, a spośród nich najlepszą kombinacją pożądaných cech charakteryzuje się O-acetylotransferaza OatA.

Na przeprowadzenie analizy zjawiska tolerancji *L. monocytogenes* na β -laktamy (analogicznej do przedstawionej powyżej analizy zjawiska wrodzonej oporności na cefalosporyny) jest jeszcze za wcześnie, ponieważ dotychczas zidentyfikowano tylko 2 geny pełniące ważną rolę w kształtowaniu tego zjawiska tj. gen *sigB* kodujący alternatywny czynnik transkrypcyjny SigB (Begley i wsp., 2006) oraz gen *fri* kodujący ferrytynę (Krawczyk-Balska i wsp., 2012). Podobnie do zdecydowanej większości genów rezystomu cefalosporynowego, geny *sigB* i *fri* są również odpowiedzialne są za adaptację *L. monocytogenes* do życia w różnych warunkach stresowych (Dussurget i wsp., 2005; Milecka i wsp., 2015; Olsen i wsp., 2005; Raengpradub i wsp., 2008). Warto zauważyć, że ferrytyna stanowi atrakcyjny cel dla działania chemioterapeutyków, które zastosowane w kombinacji z penicyliną G lub ampicyliną niwelując zdolność tolerancji *L. monocytogenes* dawałyby szansę na bakteriobójcze działanie tych antybiotyków.

Podsumowanie

Przedstawione w niniejszym wniosku prace obejmują badania z pogranicza fizjologii bakterii i mikrobiologii medycznej, genetyki oraz biologii molekularnej. Stanowią one nie tylko istotny wkład w wiedzę na temat zjawisk wrodzonej oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny i tolerancji na β -laktamy, ale mogą również stać się punktem wyjścia do opracowania nowych strategii skutecznych w walce z tą chorobotwórczą bakterią. Wyniki przedstawionych prac kryją w sobie zatem nie tylko aspekt poznawczy, ale również potencjalnie aplikacyjny, co wydaje się szczególnie istotne w świetle niezadawalającej skuteczności stosowanej obecnie antybiotykoterapii listerioz.

Realizacja niniejszego osiągnięcia, u którego podstaw leżało pytanie natury bardzo ogólnej dotyczące podłoża genetycznego zjawisk wrodzonej oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny i tolerancji na β -laktamy, nie byłaby możliwa bez wykorzystania różnorodnych metod z dziedziny genetyki, biologii molekularnej, biochemii oraz mikrobiologii. Wymagało to ode mnie pozyskiwania oraz tworzenia nowych narzędzi (wektorów), implementowania metod wcześniej nie stosowanych w ówczesnym Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (np. izolacji i analizy RNA), dostosowania znanych metod do bieżących potrzeb badawczych oraz pozyskiwania funduszy na badania. Przeprowadzone badania pozwoliły nie tylko zidentyfikować wcześniej nieznanne geny zaangażowane w kształtowanie zjawisk wrodzonej oporności *L. monocytogenes* na cefalosporyny i tolerancji na β -laktamy, ale wykazać również ich związek z odpowiedzią na różne czynniki stresowe oraz określić wpływ jaki wywierają białka kodowane przez te geny na strukturę i budowę ściany komórkowej *L. monocytogenes*.

Plany naukowe

W najbliższych latach planuję realizację projektów badawczych związanych z następującymi zagadnieniami:

- Analizą funkcjonalną nieznanych czynników wirulencji, oporności na antybiotyki oraz odpowiedzi stresowej kodowanych przez geny operonu ferrytyny *Listeria monocytogenes* - badania te są kontynuacją już rozpoczętych prac i dotyczą kompleksowej charakterystyki funkcjonalnej genów wchodzących w skład zidentyfikowanego przeze mnie operonu, w którym poza genem *fri*, znajdują się jeszcze 4 geny, a których funkcja i rola w szeroko pojętych warunkach stresowych oraz wirulencji *L. monocytogenes* jest nieznaną.
- Wyjaśnieniem mechanizmu regulacji ekspresji genów operonu ferrytyny przy udziale chaperonu RNA - białka Hfq *Listeria monocytogenes* i jego roli w metabolizmie żelaza hemowego i adaptacji do różnych czynników stresowych - badania te są kontynuacją już rozpoczętych prac, które prowadzę we współpracy z prof. B. Kallipolitis (Dania). Badania te dotyczą szczegółowej analizy posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów tworzących operon ferrytyny. Stanowią one uzupełnienie oraz rozwinięcie analizy funkcjonalnej tego operonu i będą realizowane w ramach grantu NCN, którego jestem kierownikiem, a który został zakwalifikowany do finansowania w konkursie Sonata Bis 5.

Literatura

- Begley M, Hill C, Ross RP (2006) Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB. *Appl Environ Microbiol* 72: 2231–2234.
- Cotter PD, Guinane CM, Hill C (2002) The LisRK signal transduction system determines the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to nisin and cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2784–2790.
- Cox G, Wright GD (2013) Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 303: 287–292.
- de Ruyter PG, Kuipers OP, de Vos WM (1996) Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* 62: 3662–3667.
- Dussurget O, Dumas E, Archambaud C, Chafsey I, Chambon C, Hébraud M, Cossart P (2005) *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiol Lett* 250: 253–261.

- EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2010. *EFSA J* 10: 2597.
- Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL (1997) Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 393–410.
- Gandhi M, Chikindas ML (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* 113: 1-15.
- Guinane CM, Cotter PD, Ross RP, Hill C (2006) Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2824-2828.
- Haikarainen T, Papageorgiou AC (2010) Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family. *Cell Mol Life Sci* 67: 341–351.
- Hakenbeck R, Hof H (1991) Relatedness of penicillin-binding proteins from various *Listeria* species. *FEMS Microbiol Lett* 84: 191-196.
- Hof H (2003) Listeriosis: therapeutic option. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35: 203–205.
- Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M (1997) Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10: 345–357.
- Kallipolitis BH, Ingmer H, Gahan CG, Hill C, Søgaard-Andersen L (2003) CesRK, a two-component signal transduction system in *Listeria monocytogenes*, responds to the presence of cell wall-acting antibiotics and affects β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3421–3429.
- Krawczyk-Balska A, Marchlewicz J, Dudek D, Wasiak K, Samluk A (2012) Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator of β -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins. *BMC Microbiol* 12:278.
- Lenz LL, Mohammadi S, Geissler A, Portnoy DA (2003) SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12432–12437.
- Mata MT, Baquero F, Perez-Diaz JC (2000) A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 187: 185–188.
- Milecka D, Samluk A, Wasiak K, Krawczyk-Balska A (2015) An essential role of a ferritin-like protein in acid stress tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Arch Microbiol* 197: 347-351.
- Muñoz P, Rojas L, Bunsow E, Saez E, Sanchez-Cambronero L, Alcalá L, Rodríguez-Creixems M, Bouza E (2012) Listeriosis: an emerging public health problem especially among the elderly. *J Infect* 64: 19–33.
- Nielsen PK, Andersen AZ, Mols M, van der Veen S, Abee T, Kallipolitis BH (2012) Genome-wide transcriptional profiling of the cell envelope stress response and the role of LisRK and CesRK in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 158: 963–974.
- Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, Sanchez B, Martinez JL (2013) The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol* 4: 103.
- Olsen KN, Larsen MH, Gahan CG, Kallipolitis B, Wolf XA, Rea R, Hill C, Ingmer H (2005) The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology* 151: 925–933.
- Popowska M, Kloszewska M, Gorecka S, Markiewicz Z (1999) Autolysis of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Pol* 48: 141–152.
- Qi Y, Hulett FM (1998) Role of Pho-P in transcriptional regulation of genes involved in cell wall anionic polymer biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180: 4007–4010.
- Raengpradub S, Wiedmann M, Boor KJ (2008) Comparative analysis of the σ B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 74: 158–171.
- Rice KC, Bayles KW (2008) Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 85–109.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 32(2): 234-258.

- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM (2011) Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17: 7-15.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J i wsp. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14: 584-640.
- Vicente MF, Perez-Daz JC, Baquero F, Angel de Pedro M, Berenguer J (1990) Penicillin-binding protein 3 of *Listeria monocytogenes* as the primary lethal target for beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 539-542.
- Visweswaran GR, Dijkstra BW, Kok J (2011) Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea – a comparative view. *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 921-928.
- Vollmer W, Blant D, de Pedro MA (2008a) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32(2): 149-167.
- Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S (2008b) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32(2): 259-286.
- Zawadzka-Skomial J, Markiewicz Z, Nguyen-Disteche M, Devreese B, Frere JM, Terrak M (2006) Characterization of the bifunctional glycosyltransferase/acyltransferase penicillin-binding protein 4 of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 188: 1875-1881.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć badawczych

Moją pracę naukowo-badawczą rozpoczęłam od oceny wpływu warunków środowiska reakcji oraz obecności listeriolizyny O (LLO) oraz białka p60 na aktywność fosfolipolityczną fosfolipazy A (PI-PLC) *L. monocytogenes*. Badania te były prowadzone w ramach pracy magisterskiej wykonywanej pod opieką Pana dr hab. Jacka Bieleckiego, prof. UW w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej Uniwersytetu Warszawskiego. W ramach badań prowadzonych w czasie studiów doktoranckich, a stanowiących kontynuację badań prowadzonych w czasie studiów magisterskich, skupiałam się na określeniu współdziałania czynników wirulencji tj. PI-PLC i białka p60 z LLO we wczesnych etapach procesu patogenezy *L. monocytogenes*. Badania te obejmowały konstrukcję rekombinowanych szczepów *Bacillus subtilis* eksprymujących LLO oraz jednocześnie LLO i PI-PLC, a także LLO i białko p60. Uzyskane zrekombinowane szczepy *B. subtilis* wykorzystywałam następnie do oceny współdziałania PI-PLC oraz białka p60 z LLO w procesie hemolizy, a także do zbadania wpływu badanych czynników na zdolność adhezji i inwazji ludzkich komórek nabłonkowych linii Int407 oraz mysich komórek makrofagopodobnych linii J774A.1. Przeprowadzone badania wykazały, że PI-PLC współdziała z LLO w procesie hemolizy błon erytrocytów oraz adhezji do komórek nabłonka, przy czym procesy te są uwarunkowane całkowicie przez LLO, a PI-PLC A odgrywa rolę pomocniczą i całkowicie zależną od aktywności LLO. Przeprowadzone badania wykazały również, że aktywność hemolityczna szczepu *B. subtilis* produkującego LLO i p60 jest nieco niższa niż szczepu *B. subtilis* produkującego jedynie LLO, co sugeruje modulowanie aktywności LLO przez p60. Ponadto wykazałam, że białko p60 promuje adhezję oraz inwazję zarówno komórek nabłonkowych jak i makrofagopodobnych. Wyniki prowadzonych badań posłużyły do przygotowania cyklu 3 publikacji oryginalnych i jednej przeglądowej (Krawczyk-Balska i Bielecki, 2004; Krawczyk-Balska i Bielecki, 2005; Krawczyk-Balska i wsp., 2005; Wiśniewski i wsp., 2006). Artykuły te zostały opublikowane lub zaakceptowane do publikacji w ciągu kilku miesięcy od daty uzyskania przez mnie stopnia doktora.

Po uzyskaniu stopnia doktora, w październiku 2004 roku, zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta najpierw w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, a po rozwiązaniu tego Zakładu w związku z przejściem Pana prof. dr hab. Z. Markiewicza na emeryturę, w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej (od 2009 r.). Zespół, do którego dołączyłam w 2004 roku specjalizował się w badaniach dotyczących struktury i funkcji osłon bakteryjnych. Rozpoczęcie pracy w nowej grupie wiązało się więc ze zmianą tematyki badawczej. W nowym zespole skupiałam się na badaniach, których wyniki stanowią podstawę wskazanego osiągnięcia naukowego. Badania te prowadziłam w ramach 2 grantów MNiSW, których byłam kierownikiem. Ponadto, uczestniczę

również w badaniach dotyczących oporności bakterii środowiskowych na antybiotyki stosowane w medycynie, hodowli zwierząt i rolnictwie. Rozpoczęcie realizacji tych badań wiązało się z moim aktywnym uczestnictwem w akcji TD0803 pt. „Detecting evolutionary hot spots of antibiotic resistances in Europe” realizowanej w ramach programu COST (European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (<http://www.cost.esf.org>)) oraz realizacji badań w ramach grantu międzynarodowego, niewspółfinansowanego MNiSW, którego byłam głównym wykonawcą. W ramach tych badań przeprowadzono izolację szczepów bakterii opornych (ze szczególnym uwzględnieniem bakterii potencjalnie patogennych lub oportunistycznych wskazanych w założeniach Akcji TD0803 tj. *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio* spp., *Salmonella* spp.) na makrolidy, β -laktamy, aminoglikozydy, tetracykliny i sulfonamidy ze ścieków komunalnych i przemysłowych, gleb uprawnych oraz stawów hodowlanych. W ramach zaplanowanych badań analizie poddano częstotliwość występowania izolatów antybiotykoopornych, poziom ich antybiotykooporności i wielooporności, a także przeprowadzono ocenę rozpowszechnienia genów oporności na antybiotyki, a także genów charakterystycznych dla ruchomych elementów genetycznych wśród analizowanych izolatów. Wykonane badania oporności na erytromycynę, tetracyklinę i streptomycynę bakterii wyizolowanych z gleby uprawianej z zastosowaniem nawozów zwierzęcych, w hodowli których stosowano erytromycynę, streptomycynę i tetracyklinę, a także gleby leśnej i nawożonej wolnym od antybiotyków kompostem wykazały, że we wszystkich analizowanych glebach występują bakterie posiadające geny oporności. W badanych próbach wykryto obecność genów oporności na tetracyklinę *tet(B)*, *tet(D)*, *tet(O)*, *tet(T)*, i *tet(W)*, oporności na streptomycynę *str(A)*, *str(B)*, i *aac* oraz oporności na erytromycynę *erm(C)*, *erm(V)*, *erm(X)*, *msr(A)*, *ole(B)* i *vga*. Wartości MIC izolatów opornych na tetracyklinę wynosiły od 8 do >256 $\mu\text{g/ml}$, opornych na streptomycynę od 6 do >1,024 $\mu\text{g/ml}$ i opornych na erytromycynę od 0.094 do >256 $\mu\text{g/ml}$. W badanych izolatach wykryto również obecność transpozonów Tn916, TnI549, TnB1230, Tn445I i Tn5397. Badania te wykazały również istnienie związku pomiędzy poziomem oporności, wielooporności i częstotliwością występowania genów oporności na wspomniane antybiotyki, a stosowaniem w uprawach analizowanych gleb nawozów z udokumentowaną historią stosowania antybiotyków. Przeprowadzone analizy danych literaturowych wskazują natomiast na duży potencjał plazmidów z rodziny IncP w rozprzestrzenianiu się genów oporności na antybiotyki zarówno wśród bakterii klinicznych, jak i środowiskowych, co może mieć szczególne znaczenie dla zdrowia publicznego. Wyniki badań i analiz przeprowadzonych z moim udziałem w tym projekcie stały się podstawą do przygotowania 2 publikacji naukowych, których jestem współautorem (Popowska i wsp., 2012; Popowska i Krawczyk-Balska, 2013). Obecnie przygotowywana jest publikacja dotycząca wyników badań nad opornością na sulfonamidy bakterii wyizolowanych na różnych etapach oczyszczania ścieków, a badania dotyczące oporności na antybiotyki β -laktamowe są kontynuowane. Uczestniczę również w prowadzeniu badań nad mechanizmami oporności na ryfampicynę oraz trimetoprim szczepów *L. monocytogenes* izolowanych z żywności, realizowanych w ramach grantu MniSW, którego jestem głównym wykonawcą. Badania w tym temacie, dotyczące oporności na ryfampicynę pozwoliły zidentyfikować wcześniej nieopisane w przypadku *L. monocytogenes* mutacje w genie *rpoB*. Wyniki te posłużyły do przygotowania publikacji, która jest obecnie w recenzji.

Prowadzę również badania dotyczące kompleksowej charakterystyki funkcjonalnej i transkryptomicznej genów wchodzących w skład zidentyfikowanego przeze mnie operonu ferrytyny *L. monocytogenes*. Wstępne wyniki badań w tym temacie skłoniły mnie do nawiązania współpracy naukowej z prof. B. Kallipolitis (University of Southern Denmark, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Odense, Dania), która zaowocowała w 2013 roku odbyciem przeze mnie stażu naukowego EMBO (European Molecular Biology Organization) Short Term Fellowship for Young Scientists w tymże ośrodku. Badania, które wówczas wykonałam pozwoliły mi zaobserwować wpływ białka Hfq na zawartość transkryptów badanego operonu w komórkach *L. monocytogenes* w czasie wzrostu w warunkach presji penicyliny G oraz oddziaływanie białka Hfq z niektórymi transkryptami tego operonu. Badania te będą kontynuowane. W związku z

zaobserwowanymi efektami mutacji w genach analizowanego operonu, w ostatnim okresie moje zainteresowanie wzbudziła również tematyka metabolizmu żelaza u *L. monocytogenes*. Wykonane przeze mnie analizy danych literaturowych zaowocowały przygotowaniem publikacji przeglądowej, w której zawarłam informacje dotyczące mechanizmów transportu, metabolizmu i regulacji żelaza ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia tych mechanizmów w wirulencji *L. monocytogenes*.

Badania z moim udziałem zostały trzykrotnie wyróżnione Nagrodami J.M. Rektora Uniwersytetu Warszawskiego (dwie nagrody indywidualne, jedna zespołowa) oraz dwukrotnie Nagrodą Naukową im. prof. Edmunda Mikulaszka przyznawaną przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów.

6. Dane bibliometryczne

Na mój dorobek składa się 13 publikacji naukowych oraz 16 doniesień konferencyjnych. W 10 manuskryptach pełnię rolę autora korespondencyjnego. Łączny Impact Factor moich prac wynosi 31,326, punktacja MniSW – 345, indeks Hirscha 5, cytowania 85 (wg bazy Web of Science). Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych i innych osiągnięć naukowo-badawczych znajduje się w Załączniku nr 4. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacje o współpracy międzynarodowej znajdują się w Załączniku nr 6.

