

# AUTOREFERAT

**dr Anita CIESIELSKA**

**Molekularne badania środowiskowych i chorobotwórczych  
grzybów keratynofilnych izolowanych w Polsce**

**KATEDRA MIKROBIOLOGII MOLEKULARNEJ  
INSTYTUT MIKROBIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I IMMUNOLOGII  
WYDZIAŁ BIOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
UNIwersYTET ŁÓDZKI**

**ŁÓDŹ, 2023**

## Spis treści

1. Imię i nazwisko. ....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej. ....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych..	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). ....	4
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych.....	25
6. Wykaz cytowanej literatury w rozdz. 4 i 5.....	33
7. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. ....	34
8. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	36
9. Nagrody i wyróżnienia.....	40
10. Kursy i szkolenia .....	41

1. Imię i nazwisko.

**Anita CIESIELSKA**

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

**2008 r.** stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego  
Rozprawa doktorska pt.: *Badania genetyczne dermatofitów: molekularna identyfikacja i różnicowanie szczepów klinicznych, opracowanie wektorów plazmidowych oraz systemów transformacji Trichophyton sp.*  
Promotor: prof. dr hab. Adam Jaworski

**2003 r.** tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii - genetyki, Wydział Biologii Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Praca magisterska pt.: *Różnicowanie szczepów klinicznych grzybów chorobotwórczych przy wykorzystaniu techniki PCR.* Promotor: prof. dr hab. Antoni Różalski

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

**od 01.09 2020 r.** – adiunkt badawczo-dydaktyczny w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

**01.08. 2008 – 31.08. 2020 r.** – adiunkt naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Genetyki Drobnoustrojów, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

**01.09.2003 - 31.07.2008 r.** – asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Genetyki Drobnoustrojów, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

**Dłuższe przerwy w pracy naukowej:**

30.09.2010-16.05.2011 – zwolnienie lekarskie

17.05.2011-17.10.2011 – urlop macierzyński

18.10.2011-28.02.2012 – wykorzystanie zaległego urlopu wypoczynkowego

01.03.2012-31.08.2012 – urlop na poratowanie zdrowia

04.02.2014-09.04.2014 – zwolnienie lekarskie

10.04.2014-08.04.2015 – urlop macierzyński/rodzicielski

09.04.2015-20.08.2015 – wykorzystanie zaległego urlopu wypoczynkowego

łącznie przerwa w pracy naukowej wyniosła ok. 3,5 roku.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

*Udział habilitantki w niżej wymienionych publikacjach został wykazany w Załączniku nr 3a, l.2. oraz Załączniku nr 5 - Oświadczenia współautorów.*

H1.	<b>Anita Ciesielska</b> , Teresa Kornięłowicz-Kowalska, Ignacy Kitowski, Justyna Bohacz. <b>2017</b> . The dispersal of rodent-borne strains of <i>Aphanoascus keratinophilus</i> and <i>Chrysosporium tropicum</i> by pellets of predatory birds. <i>Avian Biology Research</i> , 10 (4), 218–230. (10.3184/175815617X15036806293529)				
	Punkty MNISW <sub>2017</sub>	Punkty MNIe <sub>2021</sub>	IF <sub>2017</sub> (JCR)	IF <sub>5-letni</sub> (JCR)	Liczba cytowań/ bez autocytaowań (Scopus)
	20	40	0.938	1.051	3/2
H2.	Ignacy Kitowski, Teresa Kornięłowicz-Kowalska, Justyna Bohacz, <b>Anita Ciesielska</b> . <b>2022</b> . Dispersal of <i>Aphanoascus keratinophilus</i> by the rook <i>Corvus frugilegus</i> during breeding in East Poland. <i>Scientific Reports</i> , Feb 8;12(1):2142. (10.1038/s41598-022-06227-2.)				
	-	Punkty MNIe <sub>2021</sub>	IF <sub>2021</sub> (JCR)	IF <sub>5-letni</sub> (JCR)	Liczba cytowań/ bez autocytaowań (Scopus)
	-	140	4.997	5.516	1/1
H3.	Justyna Bohacz, Teresa Kornięłowicz-Kowalska, Ignacy Kitowski, <b>Anita Ciesielska</b> . <b>2020</b> . Degradation of chicken feathers by <i>Aphanoascus keratinophilus</i> and <i>Chrysosporium tropicum</i> strains from pellets of predatory birds and its practical aspect. <i>International Biodeterioration and Biodegradation</i> , Volume 151, 104968. (10.1016/j.ibiod.2020.104968)				
	Punkty MNISW <sub>2020</sub>	Punkty MNIe <sub>2021</sub>	IF <sub>2020</sub> (JCR)	IF <sub>5-letni</sub> (JCR)	Liczba cytowań/ bez autocytaowań (Scopus)
	140	140	4.320	5.354	12/12
H4.	<b>Anita Ciesielska</b> , Justyna Bohacz, Teresa Kornięłowicz-Kowalska, Paweł Stączek. <b>2014</b> . Microsatellite-primed PCR for intra-species genetic relatedness in <i>Trichophyton ajelloi</i> strains isolated in Poland from various soil samples. <i>Microbes and Environments</i> , Jun; 29(2): 178–183. (10.1264/jsme2.ME13160)				
	Punkty MNISW <sub>2014</sub>	Punkty MNIe <sub>2021</sub>	IF <sub>2014</sub> (JCR)	IF <sub>5-letni</sub> (JCR)	Liczba cytowań/ bez autocytaowań (Scopus)
	25	70	2.231	3.185	4/4
H5.	Marek Gadzalski, <b>Anita Ciesielska</b> , Paweł Stączek. <b>2016</b> . Bioinformatic survey of ABC transporters in dermatophytes. <i>Gene</i> , 15;576(1 Pt 3):466-75. (10.1016/j.gene.2015.10.064.)				
	Punkty MNISW <sub>2016</sub>	Punkty MNIe <sub>2021</sub>	IF <sub>2016</sub> (JCR)	IF <sub>5-letni</sub> (JCR)	Liczba cytowań/ bez autocytaowań (Scopus)
	20	70	2.415	3.480	9/9
H6.	<b>Anita Ciesielska</b> , Paweł Stączek. <b>2020</b> . A new molecular marker for species-specific identification of <i>Microsporum canis</i> . <i>Brazilian Journal of Microbiology</i> , 51:1505–1508. (10.1007/s42770-020-00340-y)				
	Punkty MNISW <sub>2020</sub>	Punkty MNIe <sub>2021</sub>	IF <sub>2020</sub> (JCR)	IF <sub>5-letni</sub> (JCR)	Liczba cytowań/ bez autocytaowań (Scopus)
	70	70	2.476	3.496	2/2
H7.	<b>Anita Ciesielska</b> , Anna Kawa, Katarzyna Kanarek, Adrian Soboń, Rafał Szewczyk. <b>2021</b> . Metabolomic analysis of <i>Trichophyton rubrum</i> and <i>Microsporum canis</i> during keratin degradation. <i>Scientific Reports</i> , Feb 17;11(1):3959. (10.1038/s41598-021-83632-z.)				
	Punkty MNISW <sub>2021</sub>	Punkty MNIe <sub>2021</sub>	IF <sub>2021</sub>	IF <sub>5-letni</sub> (JCR)	Liczba cytowań/ bez autocytaowań (Scopus)
	140	140	4.997	5.516	9/8
Łącznie	555	670	22.374	27.598	40/38

Grzyby keratynolityczne to wyspecjalizowana grupa organizmów, zdolna do rozkładu keratyny, czyli białka występującego powszechnie w skórze oraz jej wytworach, takich jak: paznokcie, włosy, rogi, pióra. W środowisku, gatunkom keratynolitycznym, współtowarzyszą gatunki keratynofilne, które wykorzystują pośrednie produkty pochodzące z rozkładu keratyny. Zarówno grzyby keratynolityczne, jak i keratynofilne są chorobotwórcze, bądź potencjalnie chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt. Grzyby keratynofilne obejmują tzw. dermatofity, do których zalicza się według najnowszej molekularnej klasyfikacji<sup>1</sup>, aż dziewięć rodzajów: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Nannizia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Arthroderma*, *Guarromyces* oraz *Ctenomyces* oraz grzyby nie-dermatofityczne, reprezentujące głównie przedstawicieli grupy *Chrysosporium*, tj. grzyby reprezentujące rodzaj *Chrysosporium* i *Myceliophthora* i ich stadia doskonałe (płciowe).

Naturalnym środowiskiem bytowania dermatofitów są różne gleby, zawierające keratynę jako źródło węgla, azotu i energii, jednak w czasie filogenetycznego rozwoju grzyby te przystosowały się do życia w różnych środowiskach, w tym do życia pasożytniczego, z wykorzystaniem keratyny skóry i zwierząt. Ze względu na infekowanych gospodarzy wyróżnia się dermatofity antropofilne, zoofilne i geofilne. Pierwsze z nich infekują ludzi i są przenoszone z człowieka na człowieka, drugie powodują infekcje u zwierząt, ale mogą być także przenoszone na ludzi, trzecie są natomiast saprofitami żyjącymi w glebie, ale mogącymi powodować infekcje zarówno u ludzi, jak i zwierząt. Pod względem fizjologicznym dermatofity geofilne oraz grupa *Chrysosporium* są to grzyby keratynolityczne przeprowadzające całkowitą mineralizację C, N i S-organiczej natywnej keratyny. Jako końcowe produkty biodegradacji i biotransformacji natywnej keratyny, grzyby te uwalniają CO<sub>2</sub>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> i S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> przy niewielkiej ilości wytworzonej grzybni. Jak podaje Kunert i wsp.<sup>2</sup> degradacja natywnej keratyny przez grzyby keratynolityczne przebiega w trzech etapach. Pierwszy polega na dezaminacji i uwolnieniu amoniaku, co powoduje alkalizację podłoża i przygotowanie substratu do sulfitolizy i proteolitycznego ataku. W drugim procesie następuje denaturacja substratu w procesie sulfitolizy. Ostatni, trzeci etap polega na rozkładzie zdenaturowanego białka keratynowego do rozpuszczalnych produktów za pomocą zewnątrzkomórkowych proteaz keratynolitycznych, zwanych keratynazami.

Dermatofity geofilne oraz przedstawiciele *Chrysosporium* najliczniej zasiedlają środowiska naturalne o regularnym dopływie materii keratynowej, głównie gleby terenów zamieszkałych przez ludzi i zwierzęta oraz intensywnie uprawianych. Grzyby te izolowano także z gniazd i upierzenia ptaków, sierści ssaków, odchodów i nawozu zwierzęcego<sup>3</sup>. Okazjonalnie z powierzchni ciała, włosów ssaków i piór ptaków wolnożyjących izolowane są także dermatofity zoofilne: *Trichophyton gallinae* (ptaki), *T. mentagrophytes* (ssaki) i kilka innych, powodujących łuszczenie skóry, utratę piór i inne grzybice powierzchniowe<sup>4</sup>. Wtórnie, grzyby keratynofilne licznie pojawiają się w ściekach bytowo-gospodarczych, osadach ściekowych i zanieczyszczonych nimi wodach, odpadach komunalnych itp. Częstość występowania, skład gatunkowy i rozmieszczenie poszczególnych gatunków dermatofitów geofilnych i *Chrysosporium* w różnych środowiskach naturalnych (gleba, gniazda, powierzchnia ciała zwierząt), zależy nie tylko od obecności materii keratynowej, jako źródła pokarmu, ale także zawartości makro- i mikroelementów, odczynu, wilgotności, temperatury, poziomu próchnicy w glebie, jak również obecności różnych zanieczyszczeń, w tym metali ciężkich<sup>3,5-7</sup>. W ekologii grzybów keratynofilnych istotne znaczenie mają również ich właściwości morfologiczne. Typowe formy keratynolityczne wytwarzają struktury żłobiące substrat (pióra, włosy itp.) powierzchniowo oraz wrastające do jego wnętrza, jako tzw. organy perforacyjne<sup>8</sup>. W połączeniu z aktywnością enzymów keratynolitycznych, daje to tej grupie grzybów przewagę nad innymi drobnoustrojami, słabiej dostosowanymi do destrukcji natywnej keratyny.

Bardzo duże zainteresowanie badaczy grzybami keratynofilnymi, wynikało w głównej mierze z poszukiwania naturalnych rezerwuarów oportunistycznych gatunków chorobotwórczych dla ludzi

i zwierząt stałocielnych. Obecnie zakażenia grzybicze wciąż stanowią poważny problem epidemiologiczny, występują bowiem u około 40% ludności świata, w tym u 10-20 % populacji żyjącej w umiarkowanej strefie klimatycznej. Zjawisko to spowodowało ponowny wzrost zainteresowania środowiskami występowania grzybów keratynofilnych, źródłami i drogami ich zakażeń, gromadzeniu wiedzy na temat genów i molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za ich chorobotwórczość, identyfikowaniu nowych biomarkerów i ich ewentualnego udziału w procesach komórkowych związanych z patogennością, czy też poszukiwaniu nowych gatunkowo-specyficznych markerów molekularnych do identyfikacji tej grupy grzybów.

**W związku z powyższym, głównymi celami moich badań związanych z grzybami keratynofilnymi, będących podstawą przedstawionego osiągnięcia naukowego były:**

- **poznanie różnorodności gatunkowej i wewnątrzgatunkowej grzybów keratynofilnych występujących w glebach oraz w wyplawkach (niestrawionych resztkach pokarmu) ptaków Polski, które są rezerwuarem wielu patogennych i potencjalnie patogennych drobnoustrojów,**
- **ocena aktywności keratynolitycznej grzybów keratynofilnych izolowanych z wypluwek ptaków Polski, w kontekście ich potencjalnego wykorzystania do kompostowania odpadów keratynowych,**
- **analiza funkcjonalna genów grzybów keratynofilnych, biorących udział w przekazywaniu sygnału, aktywacji specyficznych szlaków metabolicznych, transporcie substancji odżywczych czy leków,**
- **identyfikacja nowych, gatunkowo-specyficznych, markerów molekularnych przydatnych do molekularnej identyfikacji grzybów keratynofilnych,**
- **analiza metabolomiczna patogennych dla człowieka i zwierząt grzybów keratynofilnych, jakimi są dermatofity.**

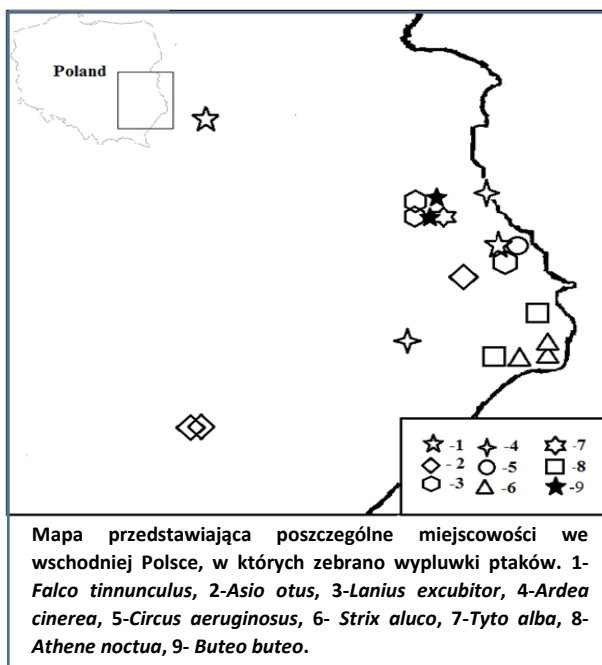
*Opisane poniżej wyniki w publikacjach H1-H4 powstały dzięki nawiązanej przeze mnie współpracy z Panią prof. dr hab. Teresą Kornitkiewicz-Kowalską, dr Justyną Bohacz (obecnie dr hab., prof. uczelni) z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz dr Ignacym Kitowskim (obecnie dr hab., prof. uczelni) z Państwowej Akademii Nauk Stosowanych w Chełmie. Badania były finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego własnego nr N N304 0990 39, którego byłam Kierownikiem. Wyniki opisane w publikacjach H5-H7 finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki: grant OPUS (2014/13/B/NZ7/02307), którego byłam Głównym Wykonawcą oraz grant SONATA (2016/23/D/NZ7/03964), którego jestem Kierownikiem.*

Ptaki wolnożyjące z uwagi na dużą mobilność oraz migracje odgrywają istotną rolę w rozprzestrzenianiu drobnoustrojów chorobotwórczych oraz potencjalnie chorobotwórczych, w tym grzybów<sup>3,7</sup>. Badania dotyczące mykobioty ptaków koncentrowały się głównie na grzybach zasiedlających upierzenie oraz gniazda ptaków<sup>3,5-7</sup>. **Dotychczas niewiele uwagi poświęcono natomiast tzw. wypluwkom (zrzutki) ptaków zawierającym niestrawione resztki pokarmu. Z ekologicznego punktu widzenia, bardzo dogodnym modelem w badaniach krążenia w środowiskach naturalnych są ptaki drapieżne, w tym gatunki szponiastych (*Falconiformes*) i sów (*Strigiformes*) oraz takie ptaki jak czaplowate (*Ardeidae*) oraz krukowate (*Corvidae*).** Wymienione rzędy i rodziny ptaków wypluwają tzw. **wypluwki (zrzutki) zawierające niestrawione resztki pokarmu, na ogół w postaci szczątków innych zwierząt.** Dla większości ptaków drapieżnych pokarm stanowią inne ptaki, zwłaszcza wróblowate, gołębie oraz drobne ssaki (*Micromammalia*), **które mogą być rezerwuarem potencjalnie chorobotwórczych grzybów keratynofilnych.** Z dotychczasowych, stosunkowo nielicznych badań mykologicznych niestrawionych resztek ofiar wypluwanych przez ptaki szponiaste i sowy<sup>3,6,7</sup> wynika, że zawierają one znaczne liczby jednostek propagacyjnych oraz dużą różnorodność gatunkową grzybów.

Skład wypluwek produkowanych przez ptaki szponiaste i sowy, odzwierciedla ich preferencje pokarmowe oraz preferencje siedliskowe ich ofiar.

Z przytoczonych wyżej danych wynikało, że **wypluwki mogą być ważnym źródłem keratynofilnych grzybów, a ptaki o określonych preferencjach pokarmowych mogą pełnić funkcję fizycznych wektorów, odpowiedzialnych za rozprzestrzenianie i transmisję na bardzo duże odległości**. Badania niestrawionych resztek pokarmu ptaków, wydalanych w formie wypluwek, mogły zatem wiele powiedzieć o relacjach między oportunistycznymi grzybami keratynofilnymi, ich pierwotnymi rezerwuarami (gleba, gryzonia i inne drobne kręgowce), a ptakami jako siewcami tych drobnoustrojów. Dodatkowo, **wzbogacenie tych badań o wyznaczniki genetyczne i metody, właściwe dla nowoczesnej identyfikacji tych grzybów na poziomie nie tylko gatunków, ale i genomowych genotypów, stwarzało po raz pierwszy szansę na ustalenie, w sposób bezpośredni, roli ptaków w transmisji oportunistycznych patogenów.**

**[Publikacja H1]** Badaniami objęto wypluwki pozyskane od 9 gatunków ptaków Polski z terenu Lubelszczyzny i częściowo Rzeszowszczyzny, występujących poza terenami chronionymi, w tym 3 gatunki ptaków szponiastych (*Falconiformes*) – błotniak stawowy (*Circus aeruginosus*) (8 wypluwek), myszołów zwyczajny (*Buteo buteo*) (20 wypluwek) oraz pustułka (*Falco tinnunculus*) (13 wypluwek); 4 gatunki sów (*Strigiformes*) – płomykówka zwyczajna (*Tyto alba*) (13 wypluwek), pójdzka zwyczajna (*Athene noctua*) (12 wypluwek), puszczyk zwyczajny (*Strix aluco*) (25 wypluwek) i sowa uszata (*Asio otus*) (24 wypluwki); jeden gatunek czaplowatych (*Ardeidae –Ciconiformes*) (17 wypluwek)– czapla siwa (*Ardea cinerea*); dzierzbowatych (*Laniidae – Passeriformes*) – dzierzba srokosz (*Lanius excubitor*) (21 wypluwek). Świeże wypluwki zbierano w okresie od lutego 2011 roku do maja 2013 roku, zgodnie z zaplanowaną wcześniej lokalizacją miejsc ich pozyskiwania, z niewielkimi wyjątkami jak np. pominięcie, będącego w rozbudowie, lotniska w Świdniku. Łącznie zebrano 153 wypluwki.



W toku przeprowadzonych badań wykazano, że **tradycyjna metoda identyfikacji grzybów keratynofilnych może często prowadzić do błędnego określenia przynależności gatunkowej** i wskazała na znaczenie metod molekularnych, jako technik uzupełniających do tradycyjnych procedur postępowania mykologicznego. **Identyfikacja molekularna polegająca na analizie restrykcyjnej amplikonów regionu ITS1-5.8S-ITS2 przeprowadzonej za pomocą endonukleazy *HinfI*, potwierdziła w 48% przynależność gatunkową grzybów oznaczonych metodą tradycyjną (212 z 439 szczepów).** **Najczęstsze błędy w tradycyjnej identyfikacji** odnotowano w przypadku 42 szczepów *Ch. pannicola*, które w oparciu o metodę PCR-RFLP zostały przypisane do profilu charakterystycznego dla

*Ch. tropicum*. Ponadto, 89% szczepów (105), które zostały fenotypowo opisane jako *A. fulvescens*, w wyniku molekularnej identyfikacji przypisano do gatunku *Ch. tropicum*. Tylko 21% szczepów *Ch. tropicum* zostało prawidłowo zidentyfikowanych przy użyciu tradycyjnych metod.



Głównym rodzajem pożywienia dla 9 gatunków ptaków (pustułka, myszołów zwyczajny, sowa uszata, czapla siwa, błotniak stawowy, puszczyk zwyczajny, pójdzka zwyczajna, płomykówka zwyczajna, dzierzba srokosz), będących ekologicznie drapieżnikami, były gryzonie, głównie *Microtus* (nornik), w szczególności *M. arvalis*. Udział drobnych ssaków (gryzonie, ssaki owadożerne) w diecie tych gatunków wynosił od 47% do 100%. Udział nornika wynosił od 13% (pójdzka) do 96% (uszatka). Dla 6 gatunków: błotniak stawowy, myszołów, pustułka, płomykówka, sowa uszata, czapla siwa, nornik stanowił więcej niż 50% składu pożywienia (52,4% - 97%). Drobne ptaki (wróblaki) stanowiły jedynie niewielkie uzupełnienie diety omawianych gatunków. Guimaraes i wsp.<sup>9</sup> wskazują, że gryzonie są nie tylko nosicielami grzybów keratynofilnych, ale także stanowią odpowiednie siedlisko dla ich przetrwania jako saprofitów. Dane zebrane przez Hubalek i wsp.<sup>3</sup> pokazują, że *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* kolonizują futra gryzoni. Z kolei, Thomas i wsp.<sup>10</sup> wykazali, że *Chrysosporium* stanowiły prawie 90% fauny i flory grzybów kolonizujących sierść szczurów wodnych (*Rattus norvegicus*) zamieszkujących plantacje palmowe w Indiach. Wydaje się więc, że **odporność na warunki termiczne jest jednym z czynników decydującym o przetrwaniu *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* w przewodzie pokarmowym ptaków drapieżnych.**

**Grzyby keratynofile** reprezentowane przez *Chrysosporium* zasiedlały **96 spośród 153 analizowanych wypluwek**, co odpowiada 63% zasiedlenia tego mikrośrodowiska. Najstabilniej przez *Chrysosporium* były kolonizowane wypluwki myszołowa zwyczajnego (35%), najsilniej uszatki (92%). **W żadnej z badanych wypluwek nie wykryto obecności dermatofitów.** Możliwe jest, że **antagonizm pomiędzy przedstawicielami dermatofitów i *Chrysosporium* może być czynnikiem ograniczającym występowanie tych pierwszych w wypluwkach i kolonizację przez te drugie.** Sugestia ta jest potwierdzona doniesieniami Gokulshankar i wsp.<sup>11</sup>, którzy wykazali aktywność przeciwdermatofitową *A. keratinophilus* wobec różnych gatunków *Trichophyton* i *Microsporium*. Należy jednak zauważyć, że obecność geofilnych dermatofitów odnotowywanych przez różnych autorów w piórach ptaków drapieżnych może być przynajmniej częściowo efektem wtórnej kolonizacji spowodowanej długotrwałym kontaktem ze środowiskiem, np. z glebą. Brak dermatofitów w badanych wypluwkach ptaków drapieżnych może być również spowodowany brakiem tych grzybów w futrze lub piórach ofiar.

**Stosunkowo duże zróżnicowanie stopnia kolonizacji grzybami keratynofilnymi wypluwek w obrębie gatunków będących ekologicznie drapieżnikami, odżywiających się drobnymi ssakami i ptakami, może mieć związek zarówno z ich nierównomiernym rozmieszczeniem w populacji, różnicami w fizjologii przewodu pokarmowego, jak i warunkami siedliskowymi ptaków.** Wyniki prowadzonych przeze mnie badań wraz z Zespołem Pani Profesor dr hab. Teresy Korniłowicz-Kowalskiej wskazują, że **istnieją różnice w dyspersji *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* w zależności od gatunku ptaka, od którego pochodzi wypluwka.** I tak wypluwki myszołowa zwyczajnego, sowy uszatej i czapli siwej okazały się być zasiedlone głównie przez *A. keratinophilus*. Udział powyższych gatunków ptaków w przenoszeniu *Ch. tropicum* był słabszy. Wykryto efekt odwrotny w przypadku pustułki pospolitej i dzierzby srokosz. Wypluwki wytwarzane przez te ptaki były kolonizowane głównie przez *Ch. tropicum*, niż w przypadku wypluwek myszołowa, sowy uszatej i czapli siwej, za co odpowiedzialne są przede wszystkim **różnice w poziomie wilgotności analizowanych wypluwek. *A. keratinophilus* jest gatunkiem hydrofilnym, natomiast *Ch. tropicum* preferuje bardziej suche siedliska.** Ptaki takie jak m.in. sowa uszata, myszołów zwyczajny porzucały wypluwki w zacienionych miejscach (np. pod drzewami) oraz w wilgotnych siedliskach, co miało miejsce w przypadku czapli siwej. Z kolei płomykówka zwyczajna, puszczyk zwyczajny czy pójdzka zwyczajna porzucały wypluwki w miejscach suchych, np. na strychach lub silnie eksponowanych na promienie słoneczne, co sprzyjało szybkiej utracie wody, co tym samym stwarzało warunki rozwoju dla *Ch. tropicum* ograniczając przeżywalność *A. keratinophilus*. Uzyskane wyniki były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami Zespołu Pani Profesor dr hab. Teresy Korniłowicz-Kowalskiej na temat występowania *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum*



w gniazdach ptaków wodnych i błotnych<sup>12</sup>. Występowanie *A. keratinophilus* wzrastało wraz z wzrostem wilgotności gniazda, nawet przekształcając się w monokulturę (gniazda perkozów zanurzone w wodzie).

Można przyjąć, że **zasięg rozprzestrzeniania *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* obejmuje obszar odpowiadający odległości lotu**. Ryzyko zagrożenia wywołane przez oportunistyczne szczepy *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* wzrasta, gdy ptaki te zbliżają się i osiedlają w miastach i na osiedlach mieszkaniowych. Dotyczy to w szczególności, w przypadku sowy uszatej, która tworzy grzędy w miastach, jak również czapli siwej, która coraz częściej zakłada kolonie lęgowe w pobliżu miast. Również gatunki ptaków drapieżnych, które żyją samotnie, (np. pustułka, krogulec zwyczajny, puszczyk, sowa uszata, sowa uszata) gnieźdzą się, polują i grzędzą w parkach, na cmentarzach, osiedlach mieszkaniowych w miastach i wsiach. Uzyskane wyniki badań wskazują, że **ptaki drapieżne są biologicznym wektorem szczepów *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum*, a wypluwki produkowane przez te ptaki są ich mechanicznymi nośnikami**.

**[Publikacja H2] Rozprzestrzenianie potencjalnie chorobotwórczego grzyba *Aphanoascus keratinophilus* badano również w przypadku gawrona *Corvus frugilegus***. Gawrony są wysoce społeczne, żyją i współdziałają w dużych grupach. Preferencje pokarmowe gawrona są różne w ciągu roku, jednak spożywany pokarm jest prawie zawsze związany z glebą, na której ptaki żerują. W okresie lęgowym w wyplawkach stwierdza się głównie resztki pokarmu pobranego przez dorosłe ptaki z gleby, co powoduje zanieczyszczenie pokarmu mikroorganizmami glebowymi. Jako wszystkożercy, gawrony często spożywają pokarm znaleziony w wyniku sondowania podłoża w poszukiwaniu dżdżownic i innych bezkręgowców, zwłaszcza owadów. Pokarm gawronów zawiera również ziarna zbóż i mniejsze ilości nasion innych roślin. **Epidemiologiczne, jak i ekologiczne aspekty rozprzestrzeniania grzybów potencjalnie chorobotwórczych przez gawrony, nie były w pełni poznane. Wypluwki gawronów zawierające niestrawione resztki pokarmu nie były analizowane pod tym kątem**.

Badania przeprowadzono w koloniach gawrona *Corvus frugilegus*, zlokalizowanych w następujących miejscach wschodniej Polski: Chełm, Chojno Nowe, Sielec, Siennica, Wierzbica i Wola Uhruska. W okresie od 20 kwietnia do 19 maja 2013 roku zebrano łącznie 83 wypluwki gawronów. W toku przeprowadzonych badań **ponownie wykazano, że tradycyjna metoda identyfikacji grzybów keratynofilnych może często prowadzić do błędnego określenia przynależności gatunkowej**. W 38 przypadkach ujawniono różnice pomiędzy tradycyjnymi, a uzyskanymi metodą PCR-RFLP, wynikami. Identyfikacja molekularna polegająca na analizie restrykcyjnej amplikonów regionu ITS1-5.8S-ITS2 przeprowadzonej za pomocą endonukleazy *HinfI* wykazała trzy wzory specyficzne dla *A. keratinophilus* (90 szczepów), *Ch. pannicola* (6 szczepów) oraz *Ch. tropicum* (3 szczepy). W następnych etapach badań skupiono się wyłącznie na 90 szczepach oznaczanych metodą molekularną, jako *A. keratinophilus*.

W rozprzestrzenianiu *A. keratinophilus* istotną rolę odgrywa wielkość populacji lęgowej gawrona. Ponadto, obecność kolonii gawronów w miejscach, takich jak szkoły, przedszkola czy szpitale, może zwiększać ryzyko epidemiczne zakażeń wywołanych przez *Aphanoascus keratinophilus*. **W opisanych badaniach po raz pierwszy wykorzystano metodę PCR-MP (PCR Melting-Profile) celem różnicowania wewnątrzgatunkowego *A. keratinophilus* wyizolowanego z wypluwek gawrona**. Metoda PCR MP pozwala na specyficzną, stopniową amplifikację genomowego DNA różniącego się termiczną stabilnością, począwszy od fragmentów DNA amplifikowanych przy niskiej temperaturze denaturacji (Td), a kończąc na fragmentach bardziej stabilnych, amplifikowanych przy wyższych Td. Metoda była wcześniej z powodzeniem stosowana do rozróżniania szczepów bakteryjnych, takich jak *S. aureus*, *E. coli* czy dermatofitów<sup>13,14</sup>.

Wybrano enzym restrykcyjny *Bam*HI i odpowiednią temperaturę denaturacji, aby uzyskać wysoką moc różnicowania. Wśród 90 szczepów *A. keratinophilus* pochodzących z wyplułek gawronów wyróżniono pięć (I-V) genotypów PCR-MP. Genotyp I był wyraźnie dominujący i reprezentowany przez trzydzieści jeden, dwa i trzy szczepy pochodzące odpowiednio z wyplułek gawrona bytującego w Chełmie, Woli Uhruskiej i Wierzbicy. Genotyp II był charakterystyczny dla siedmiu szczepów pochodzących z Woli Uhruskiej oraz trzech pochodzących z wyplułek gawrona bytującego w Siennicy i Sielcu. Genotyp III reprezentowany był przez jedenaście, jeden i dwa szczepy pochodzące z wyplułek gawrona bytującego odpowiednio w Chełmie, Woli Uhruskiej i Chojnie Nowym. Genotyp IV był specyficzny dla ośmiu szczepów *A. keratinophilus* izolowanych z wyplułek gawrona bytującego w mieście Chełm. Pozostałe dziewiętnaście szczepów zakwalifikowano do genotypu V, specyficznego dla pięciu, trzech i jedenastu pochodzących z wyplułek gawrona bytującego odpowiednio z Woli Uhruskiej, Siennicy i Chojna Nowego. Moc dyskryminacyjna metody PCR-MP była dobra, dając indeks różnorodności Simpsona (D) o wartości 0,750. Analiza PCR-MP okazała się odpowiednią techniką do wykrywania wewnątrzgatunkowego pokrewieństwa genetycznego u *A. keratinophilus*, co pozwoli na monitorowanie występowania i dystrybucji tych szczepów przez gawrona.

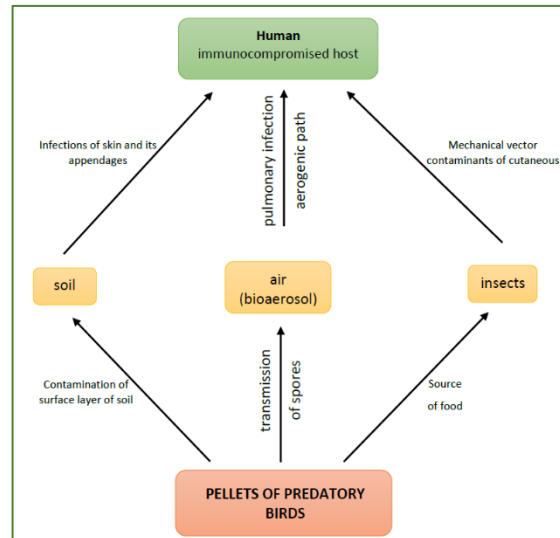
**Na podstawie czasu trwania okresu rozrodczego (107 dni) oraz wielkości poszczególnych kolonii gawrona oszacowano dyspersję *A. keratinophilus*. Gawrony w okresie rozrodu wyprodukowały średnio 2327,2-19761,7 wyplułek zawierających przynajmniej jeden szczep *A. keratinophilus*. Średnia geometryczna liczba wyprodukowanych wyplułek zawierających *A. keratinophilus* dla wszystkich badanych kolonii wyniosła co najmniej 8250,8. Tym samym gawrony, w zależności od kolonii, przyczyniły się do rozprzestrzenienia co najmniej 21,8-184,9 szczepów *Aphanoascus keratinophilus* dziennie (średnia geometryczna: co najmniej 77,2 szczepów/dzień).** Szczegółowe obliczenia dotyczące rozproszenia genotypów PCR-MP *A. keratinophilus* wyizolowanego z wyplułek gawrona przeprowadzono tylko dla stanowisk kolonii gawrona: Chojno Nowe, Wola Uhruska i Chełm, w których dostępnych było > 10 szczepów analizowanych grzybów.

Colony site	Pellets with at least one strain <i>A. keratinophilus</i>	PCR-MP/ <i>Bam</i> HI genotype				
		I	II	III	IV	V
Chojno Nowe	15635.3	-	-	2407.8	-	13227.5
Wola Uhruska	6435.7	855.9	3005.5	431.2	-	2143.1
Chełm	6396.2	3965.6	-	1407.2	1023.4	-
Total (N)	28467.2	4821.5	3005.5	4246.2	1023.4	15370.6
Total (%)	100	16.9	10.6	14.9	3.6	54.0

**Table 3.** PCR-MP/*Bam*HI genotype minimal dispersion of *A. keratinophilus* strains originating from colony sites where > 10 strains of analysed fungi were available.

Przeprowadzone badania wskazują, że gawron bierze czynny udział w rozprzestrzenianiu szczepów *A. keratinophilus*. Należy podkreślić, że duże nagromadzenie wyplułek gawrona występuje głównie na zacienionych powierzchniach bezpośrednio pod drzewami, na których znajdują się kolonie lęgowe i grzędy zbiorowe. Fakt ten ma duże znaczenie epidemiologiczne zwłaszcza w gęsto zaludnionych obszarach miejskich. Można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że przy dużej produkcji wyplułek we wspomnianych koloniach i sprzyjających warunkach do rozwoju grzybów (obecność piór i odchodów w zacienionych miejscach pod drzewami), liczba szczepów *A. keratinophilus* będzie się zwiększać. Lokalnie duże kolonie gawronów zlokalizowane w takich miejscach jak małe parki miejskie z dużą liczbą odwiedzających, okolice szpitali, centra handlowe mogą stanowić zagrożenie epidemiologiczne w kontekście rozprzestrzeniania *A. keratinophilus* przez gawrona.

Na podstawie uzyskanych wyników w publikacji H1 i H2 zaproponowano model rozprzestrzenia *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* z udziałem wypluwek ptaków drapieżnych, jako nowego ognia w łańcuchu epidemiologicznym. Wypluwki stanowią źródło zakażenia *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* biorąc pod uwagę trzy drogi transmisji tych patogenów: przez skażoną glebę, przez skażone powietrze, z dodatkową sugerowaną możliwością rozproszenia tych grzybów przez wektory biologiczne, takie jak owady żerujące na wyplawkach. Można też stwierdzić, że szczepy *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* wyizolowane z wypluwki ptaków są bardziej niebezpieczne dla zdrowia człowieka niż te wyizolowane np. bezpośrednio z gleby, gdyż są to wyselekcjonowane szczepy, które przeszły przez barierę żołądkowo-jelitową, a tym samym są bardziej odporne na warunki panujące w organizmie, takie jak podwyższona temperatura, warunki kwaśne (żołądek) lub zasadowe (jelita) oraz niski potencjał oksydoredukcyjny.



#### Podsumowanie wyników opisanych w Publikacji H1 i H2:

- **badania** składu gatunkowego grzybów keratynofilnych izolowanych z wypluwki (zrzutek) 10 gatunków ptaków (3 gatunków szponiastych, 4 gatunków sów oraz czapli siwej, dzierzby srokosz i gawrona) **ujawniły** obecność wyłącznie grzybów nie-dermatofitycznych reprezentujących *Chrysosporium*; nie wykazano obecności dermatofitów,
- głównym źródłem zanieczyszczenia wypluwki ptaków były drobne ssaki (głównie nornik *Microtus* sp.) oraz gleba (gawron),
- w oparciu o wyniki identyfikacji molekularnej **wykazano**, że wypluwki ptaków były głównie kolonizowane przez *A. keratinophilus* oraz *Ch. tropicum*, bardzo rzadko (gawron) przez *Ch. pannicola*
- **stwierdzono**, że wypluwki 2 gatunków szponiastych (pustułka, błotniak) i sów (z wyjątkiem sowy uszatej) oraz dzierzby srokosz były częściej kolonizowane przez *Ch. tropicum* niż *A. keratinophilus*; efekt odwrotny, czyli dominację *A. keratinophilus* zanotowano w odniesieniu do wypluwki gawrona, czapli siwej, sowy uszatej i myszołowa,
- **zastosowana po raz pierwszy metoda PCR-MP**, pozwoliła na wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie analizowanych szczepów *A. keratinophilus*, izolowanych z wypluwki gawrona,
- **ustalono** związek między gatunkiem ptaka i rodzajem ich ofiar a częstotliwością występowania poszczególnych gatunków grzybów keratynofilnych,
- **zaproponowano** modele rozprzestrzeniania grzybów keratynofilnych izolowanych z wypluwki ptaków drapieżnych.

[Publikacja H3] Keratyny, to białka z grupy skleroprotein, które nie są przyswajalne przez ludzi i zwierzęta ciepłokrwiste. Jest to uwarunkowane przede wszystkim wysokim poziomem wiązań dwusiarczkowych, które uniemożliwiają działanie endopeptydaz. Keratyny są głównym składnikiem rogowych struktur skóry, tj. piór, włosów, szczeciny, rogów, kopyt itp., które z kolei są produktem ubocznym przemysłu mięsnego i drobiarskiego. W skali globalnej są to ogromne ilości odpadów, zwłaszcza piór kurzych, co stanowi poważny problem środowiskowy. Spontaniczny rozkład mikrobiologiczny zachodzący podczas składowania piór prowadzi do wydzielania się toksycznych gazów, takich jak: amoniak, siarkowodór <sup>12</sup>. Skład chemiczny piór kurzych, tj. 90% białko, 50%

organicznego C, ~15% całkowitego N i ok. 4% całkowitej siarki<sup>15</sup> wyznacza dwa główne kierunki zagospodarowania odpadów piór: wykorzystanie w żywieniu zwierząt ze względu na skład aminokwasowy oraz jako nawozy roślinne ze względu na wysoką zawartość azotu i siarki<sup>8,12</sup>. W przypadku żywienia zwierząt gospodarskich najwłaściwszym sposobem jest solubilizacja natywnej keratyny, co powoduje uwolnienie peptydów i aminokwasów, a tym samym zwiększenie biodostępności tych składników odżywczych<sup>16</sup>. N- i S-organiczna mineralizacja piór jest wymagana do wykorzystania ich jako nawozów roślinnych. Oba sposoby biodegradacji i zagospodarowania odpadów piór, jak również innych odpadów keratynowych mogą być przeprowadzone przy udziale wyspecjalizowanych mikroorganizmów, np. bakterii i grzybów keratynolitycznych. Utylizacja bioodpadów przez grzyby prowadzi do uwolnienia dużych ilości produktów mineralnych, które są dobrze przyswajalne przez rośliny. Wcześniejsze badania przeprowadzone przez zespół Pani Profesor Teresy Kornitowicz-Kowalskiej wykazały, że **niektóre gatunki *Chrysosporium* wyizolowane z gleby charakteryzują się wysokim potencjałem mineralizacyjnym wobec keratyny. Wypluwki ptaków, składające się z niestrawionych szczątków, głównie pochodzenia zwierzęcego, są często bogate w materiał keratynowy<sup>17</sup>, nie były wcześniej wykorzystywane jako źródło szczepów grzybów keratynolitycznych. Dlatego też w dalszym toku badań oceniano aktywność keratynolityczną grzybów z grupy *Chrysosporium*: *Aphanoascus keratinophilus* i *Chrysosporium tropicum*, wyizolowanych z niestrawionych resztek pokarmowych, tj. wypluwki ptaków drapieżnych, w kontekście ich możliwego wykorzystania do kompostowania odpadów keratynowych.**

Badaniami objęto 59 szczepów *Chrysosporium* w tym 31 szczepów *A. keratinophilus* oraz 28 szczepów *Chrysosporium tropicum* wyizolowanych z wypluwki ptaków drapieżnych opisanych w publikacji H1 i H2. Zdolność badanych grzybów do rozkładu natywnej keratyny oceniano na podstawie stopnia wykorzystania surowych piór kurcząt jako podstawowego wskaźnika aktywności keratynolitycznej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że po 42 dniach hodowli badanych szczepów ubytek substratu wahał się od ok. 47% do ok. 76% w przypadku szczepów *A. keratinophilus* i od ok 44% do ok. 72% w przypadku *Ch. tropicum*.

**Solubilizacja natywnych piór przez różne szczepy *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* prowadziła do akumulacji rozpuszczalnego białka, jonów amonowych i siarczanowych w płynie pohodowlanym. Stężenie uwalnianego białka w pożywce wzrastało w czasie hodowli osiągając maksimum po 42 dniach. Do najefektywniejszych szczepów przeprowadzających transformację białka piór do formy rozpuszczalnej należały *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* pochodzące z wypluwki pustułki i myszołowa. Najniższe stężenie uwalnianego białka zanotowano w hodowlach *A. keratinophilus* wyizolowanych z wypluwki sowy uszatej, *Ch. tropicum* z wypluwki puszczyka. Ponadto badania wykazały, że uwalnianie białek w hodowlach grzybów rozkładających surowe pióra kurze może służyć jako wskaźnik aktywności keratynolitycznej tych drobnoustrojów, o czym świadczy dodatnia korelacja między stężeniem białek w podłożu a biomasą grzybni po 42 dniach hodowli (0,3731 \*\*\*) i z aktywnością keratynazy (0,399\*\*\*).**

Enzymatyczna liza natywnych białek piór, zachodzi z udziałem różnych enzymów proteolitycznych, zarówno niespecyficznych oraz specyficznych dla substratu, zwanych keratynazami. Ich obecność stwierdzono w przesączach pohodowlanych wszystkich badanych szczepów *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum*. Różnice w aktywności keratynaz i proteaz zależały zarówno od szczepu grzyba, jak i jego pochodzenia (wypluwki ptaka). Najwyższą aktywność keratynaz zaobserwowano w przypadku szczepów wyizolowanych z wypluwki puchacza i pustułki. Maksimum aktywności keratynaz towarzyszyło maksymalne uwalnianie białek, co obserwowano w końcowej fazie biodegradacji kurzych piór (42 dzień hodowli). Obecność niespecyficznych proteaz (aktywnych wobec kazeiny jako substratu) wykryto również w płynach pohodowlanych u wszystkich analizowanych



szczerpów *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum*. Stwierdzono, że aktywność proteaz ogólnie wzrastała w pierwszych dwóch tygodniach, po czym następował spadek ich aktywności utrzymujący się przez kolejne 2 lub 3 tygodnie, a następnie ponownie obserwowano wzrost ich aktywności w 6-tygodniowych hodowlach. Najwyższą aktywność niespecyficzných enzymów proteolitycznych (dzień 42) odnotowano w kulturach *Ch. tropicum* wyizolowanych z wypluwek pustułek. Najniższą aktywność stwierdzono w hodowlach *A. keratinophilus* izolowanych z wypluwek puszczyka.

Wąski stosunek C/N piór sprzyjał mineralizacji azotu zawartego w keratynie piór. Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że **badane szczepy grzybów pochodzące z wszystkich badanych wypluwek ptaków okresowo nagromadzały od ok. 300-600  $\mu\text{g N-NH}_4^+\cdot\text{cm}^{-3}$  płynu hodowlanego**. Uwalnianie  $\text{N-NH}_4^+$  w hodowlach badanych szczepów grzybów najszybciej wzrastało w pierwszych trzech tygodniach trwania hodowli. W kolejnym tygodniu poziom uwolnionych jonów amonowych na ogół spadał. Począwszy od 35 dnia zaznaczył się wzrost poziomu  $\text{N-NH}_4^+$  z wyjątkiem szczepów *Ch. tropicum* i *A. keratinophilus* pochodzących z wypluwek pójdzki. **Ilość uwalnianych jonów amonowych dla szczepów *A. keratinophilus* wyniosła od 20% do 53%, natomiast dla szczepów *Ch. tropicum* od 3% do 42%. Podobny zakres (30-60%) mineralizacji uzyskano podczas biodegradacji piór kurzych przez grzyby keratynolityczne izolowane z gleby<sup>8</sup>. Do najaktywniejszych amonifikatorów należały szczepy *A. keratinophilus* pochodzące z wypluwek sowy uszatej i pustułki oraz myszołowa. Do najslabszych amonifikatorów zaliczono szczepy *A. keratinophilus* pochodzące z wypluwek puszczyka oraz pójdzki.**

Mineralizacji azotu organicznego towarzyszyła mineralizacja organicznej siarki zawartej w kurzych piórach. Ilość uwalnianych  $\text{S-SO}_4^{2-}$  w hodowlach wszystkich badanych szczepów grzybów mieściła się w zakresie od 7% do 74%. Mineralizacja S zawartej w piórach z udziałem szczepów *A. keratinophilus* wyizolowanych z wypluwek myszołowa, pustułki, uszatki i czapli siwej wynosiła 8,11-36,6%. **Ilość uwolnionych siarczanów w trakcie hodowli *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* na piórach była najwyższa w przypadku szczepów pochodzących z wypluwek sowy uszatej, puszczyka i pójdzki. Najmniej uwolnionych siarczanów zanotowano podczas hodowli badanych szczepów grzybów pochodzących z wypluwek pustułki.**

Przeprowadzone badania wykazały również, że **degradacji surowych piór przez wszystkie badane szczepy grzybów towarzyszyła alkalizacja podłoża, najczęściej do 8,8-9,3 z maksymalną wartością 9,43**. Wzrost wartości pH podłoża zaznaczył się najwyraźniej w fazie szybkiej lizy, zwłaszcza między 7 a 14 dniem hodowli. W późniejszym okresie trwania doświadczenia tj. po ok. 28 dniach hodowli szczepów *Ch. tropicum* i *A. keratinophilus* pH podłoża stopniowo spadało, prawdopodobnie na skutek ulatniania gazowego amoniaku. **Wszystkie badane szczepy grzybów pochodzące z różnych wypluwek analizowanych ptaków drapieżnych charakteryzowały się podobnymi zmianami pH podłoża z wyjątkiem szczepów *Ch. tropicum* i *A. keratinophilus* pochodzącymi z wypluwek sowy uszatej.**

**Określono zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami keratynolizy piór, a pochodzeniem szczepów grzybów (wypluwki różnych gatunków ptaków drapieżnych).** Zaobserwowano trzy główne grupy: (1) obejmowała głównie wypluwki pustułki i myszołowa; (2) reprezentowana była przez wypluwki uszatki, błotniaka stawowego i czapli siwej; (3) reprezentowana przez wypluwki puszczyka i pójdzki. Wydzielanie siarczanów, jako wskaźnik keratynolizy grzybów, było związane z występowaniem grzybów keratynolitycznych w wypluwkach puszczyka i pójdzki. Zmiany w pH podłoża hodowlanego były skorelowane z występowaniem szczepów pochodzących z wypluwek sowy uszatej, błotniaka stawowego, czapli siwej i puszczyka. Analiza PCA nie przypisała żadnej z badanych cech keratynolitycznych związanych z występowaniem grzybów keratynolitycznych w wypluwkach pustułki i myszołowa. Z drugiej strony *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* wyizolowane

z wypluwek myszołowa i pustułki charakteryzowały się wyższą aktywnością w zakresie proteaz i keratynaz oraz wyższym poziomem uwalnianych bioproduktów niż w przypadku szczepów wyizolowanych z wypluwek sów. Być może szczepy wyizolowane z wypluwek drapieżników dziennych (myszołów i pustułka) podlegały większej selekcji wynikającej z bardziej ekstremalnych warunków (pH soku żołądkowego drapieżników dziennych wynosi ok. 1,6) panujących w przewodzie pokarmowym tych ptaków. Zaobserwowano, że stopień maceracji kości w wypluwkach myszołowa i pustułki był znacznie bardziej zaawansowany w porównaniu do wypluwek sów, u których pH soku żołądkowego wynosi ok. 2,35. Wydaje się zatem, że większe szanse na przeżycie mają szczepy bardziej odporne, idealnie przystosowane do warunków panujących w przewodzie pokarmowym takich ptaków szponiastych jak pustułka czy myszołów, co musi być również związane z ich aktywnością życiową, zwłaszcza enzymatyczną.

### **Podsumowanie wyników opisanych w Publikacji H3:**

Mechanizm biodegradacji piór kurzych opiera się na mechanicznym rozkładzie natywnej keratyny przez organy perforujące grzybów *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum*, które przypominają narządy perforujące dermatofitów. Organ te wraz z uwalnianymi przez grzybnię enzymami biorą udział w rozbijaniu mostków S-S (siarczyny) i proteolizie zdenaturowanych w ten sposób białek keratyny. Biodegradacja natywnej keratyny przez saprofityczne grzyby wyizolowane z niestrawionego pokarmu ptaków drapieżnych prowadzi do mineralizacji odpadów z piór kurzych. **Sugeruje to, że *A. keratinophilus* i *Ch. tropicum* wyizolowane z wypluwek ptaków drapieżnych mogły by być wykorzystane do kompostowania odpadów keratynowych, jakimi są produkty uboczne przemysłu mięsnego i drobiarskiego. Badania biodegradacji natywnej keratyny przez grzyby keratynofilne wyizolowane z wypluwek ptaków drapieżnych były prowadzone po raz pierwszy na świecie.**

**[Publikacja H4]** Naturalnym rezerwuarem grzybów keratynofilnych, takich jak dermatofity geofilne oraz pokrewne gatunki z rodzaju *Chrysosporium*, jest gleba. Wśród dermatofitów geofilnych wyróżnia się 3 grupy gatunków: i) gatunki niepatogenne reprezentowane przede wszystkim przez *Trichophyton terrestre* oraz *Trichophyton georgiae* ii) gatunki często patogenne, takie jak *Microsporium gypseum* oraz *Microsporium fulvum*, a także iii) gatunki incydentalnie patogenne, w tym m.in. *Microsporium cookei* i *Trichophyton ajelloi*. Geofilne dermatofity wykorzystują natywną keratynę obecną w glebie jako źródło węgla, azotu, siarki i energii, uwalniając - jako produkty końcowe - duże ilości N-NH<sub>4</sub> i S-SO<sub>4</sub><sup>18</sup>. Stanowią one zatem ważną grupę organizmów mających zdolność rozkładu resztek keratyny w glebie, która jest cennym substratem odżywczym dla tych grzybów, pozwalającym na ich przetrwanie w warunkach konkurencji pokarmowej z innymi grupami mikroorganizmów saprotroficznych występujących w glebie. **Gatunek *Trichophyton ajelloi* (dawniej *Keratinomyces ajelloi*) jest gatunkiem dominującym w Europie, stanowi 60% całej populacji dermatofitów geofilnych<sup>19</sup>.** Szczepy *T. ajelloi* charakteryzują się silnymi zdolnościami keratynolitycznymi. Stopień wykorzystania rodzimej keratyny (piór kurzych) przez *T. ajelloi* w 21-dniowych hodowlach z tym substratem, jako jedynym źródłem C, N i energii wahał się, w zależności od poszczególnych szczepów, od 50 do 76%. Wcześniejsze badania, prowadzone przez dr Justynę Bohacz wykazały zależność pomiędzy czynnikami fizyko-chemicznymi gleb a występowaniem grzybów keratynofilnych<sup>20</sup>, dlatego podjęto badania dotyczące różnicowania wewnątrzgatunkowego dermatofita geofilnego *T. ajelloi* w trzech typach gleb uprawnych takich jak; czarnoziem, gleba bielnicowa i gleba brunatna w oparciu o metodę MSP-PCR (ang. Microsatellite-primed PCR) przy użyciu startera (GACA)<sub>4</sub>.

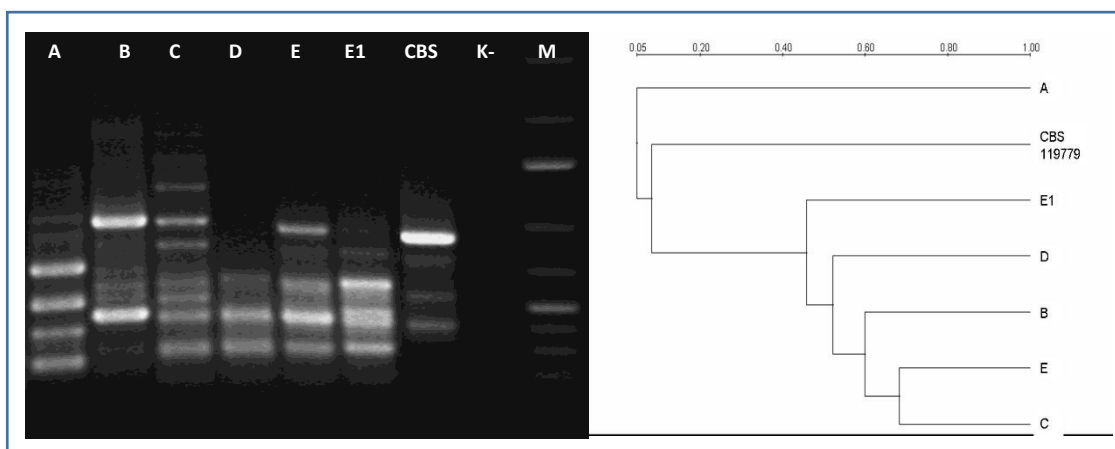
150 próbek glebowych, z których izolowano grzyby keratynofilne, pobrano jednorazowo, z 3 pól uprawnych na Lubelszczyźnie (środkowo-wschodnia Polska). Gleby: bielnicowa i brunatna położone były obok siebie (Sobieszyn 74,5 km od Lublina, 22°10'E 51°36'N). Czarnoziem występował w odległości 155 km od pozostałych dwóch gleb (Grabowiec 94,1 km od Lublina, 23°33'E 50°49'N).



Próbki gleby pobierano wiosną (w maju) z pól uprawnych zbóż. **Z ogólnej liczby 150 próbek glebowych 79% było zasiedlonych przez grzyby keratynofilne. Wśród wyizolowanych grzybów keratynofilnych zidentyfikowano 7 gatunków grzybów nie-dermatofilnych reprezentujących grupę *Chrysosporium* oraz jeden gatunek dermatofita geofilnego reprezentowanego przez *Trichophyton ajelloi*. Łącznie z analizowanych prób glebowych wyizolowano 75 szczepów *T. ajelloi*: 22 z gleb bielicowych, 38 z gleb brunatnych i 15 z czarnoziemem, co stanowi odpowiednio 61%, 100% i 34% ogółu grzybów keratynofilnych wyizolowanych z każdej z badanych gleb. Średnio stwierdzono, że *T. ajelloi* zasiedla 51% badanych próbek gleby. Populacja tego dermatofita stanowiła odpowiednio 15% (czarnoziem), 56% (gleba bielicowa) i 69% (gleba brunatna) zbiorowisk grzybów keratynofilnych tych gleb. W klasyfikacji ekologicznej grzybów keratynofilnych *T. ajelloi* zaliczany jest do grzybów acidofilnych. Cecha ta znalazła potwierdzenie również w niniejszych badaniach, które wykazały, że częstość występowania *T. ajelloi* wzrastała wraz ze wzrostem kwasowości gleby. Populacja tego geofilnego dermatofita była największa w kwaśnej i silnie kwaśnej ( $pH_{KCl}$  4,4; 3,4) glebie brunatnej i bielicowej, o czym świadczyła obecność tego grzyba odpowiednio w 100% i 83% próbek tych gleb.**

Wszystkie 75 szczepów *Trichophyton ajelloi* były analizowane przy użyciu metod molekularnych, takich jak PCR-RFLP wykorzystana do gatunkowej identyfikacji i MSP-PCR wykorzystana do wewnątrzgatunkowego różnicowania. Pierwsza metoda, opisana już wcześniej, polegała na amplifikacji regionu ITS metodą PCR przy użyciu zestawów starterów ITS1 i ITS4, a następnie analizie restrykcyjnej amplifikowanych produktów. **Identyfikacja molekularna w 100% potwierdziła wyniki identyfikacji szczepów *T. ajelloi* metodami tradycyjnymi.**

Aby sprawdzić, czy możliwe jest zróżnicowanie zebranej kolekcji 75 szczepów *T. ajelloi* do niższego poziomu wewnątrzgatunkowego, postanowiono zastosować technikę Microsatellite-primed PCR (MSP-PCR). Spośród wielu starterów opisanych w literaturze do typowania molekularnego wybrano starter (GACA)<sub>4</sub>, którego przydatność w molekularnym różnicowaniu dermatofitów została już wcześniej opisana w literaturze przedmiotu <sup>21</sup>. W przypadku badanej grupy dermatofitów geofilnych, które stanowiło 75 szczepów *T. ajelloi* odnotowano wysoki potencjał różnicujący startera (GACA)<sub>4</sub> (indeks różnorodności Simpsona  $D = 0,823$ ). Uzyskano pięć genotypów (A-E): genotyp A i D dla szczepów *T. ajelloi* izolowanych z gleb bielicowych, genotyp C i E (z podtypem E1) dla szczepów *T. ajelloi* izolowanych z gleb brunatnych oraz genotyp B dla szczepów *T. ajelloi* izolowanych z czarnoziemem.



Genotypowanie (A-E) szczepów *T. ajelloi* przy użyciu metody MSP-PCR z udziałem startera (GACA)<sub>4</sub> i analiza UPGMA; M, marker wielkości molekularnej (2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 75 bp). Elektroforezę amplikonów przeprowadzono na 1,2% żelu agarozowym.

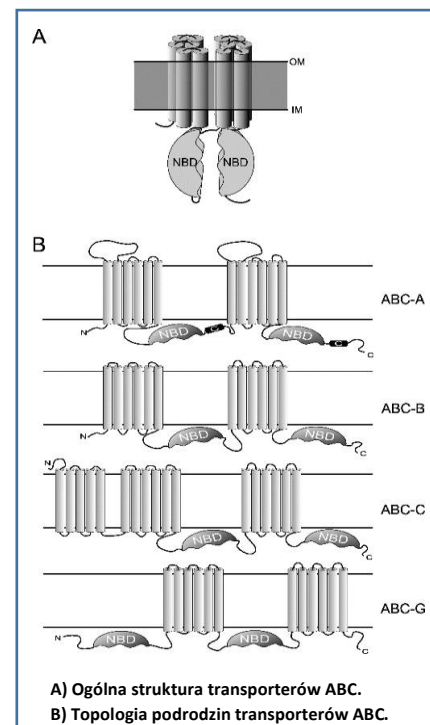
Co ciekawe, szczepy *T. ajelloi* pochodzące z gleb brunatnych i bielicowych, czyli gleb silnie kwaśnych i kwaśnych, wykazują różne wzorce genotypowe, co może sugerować, że różnorodność *T. ajelloi* wydaje się być wyższa niż w czarnoziemiu, czyli glebie o odczynie obojętnym. Uzyskane wyniki wykazały, że analizowane gatunki, oprócz bardzo wysokiej (100%) lub wysokiej częstotliwości (61%) występowania w glebach silnie kwaśnych, pojawiały się również w czarnoziemiu (w 34% prób glebowych), czyli glebie o odczynie obojętnym (pH<sub>KCl</sub> 7.15). **Może to sugerować selekcję szczepów *T. ajelloi*, które są bardziej tolerancyjne na zmiany pH, a więc ich genotyp różni się od tych, które są reprezentowane w populacjach wyizolowanych z gleb kwaśnych (gleba brunatna i bielicowa). Istnieje również możliwość, że homogeniczność genetyczna szczepów *T. ajelloi* zasiedlających czarnoziem może być związana z pierwotnym występowaniem na tych glebach *Micromammalia*, czyli drobnych zwierząt będących źródłem specyficznego rodzaju keratyny (keratyny włosowej).** Większa liczba genotypów w obrębie populacji *T. ajelloi* izolowanej z gleb brunatnych i bielicowych może wynikać z ogólnie niekorzystnych warunków dla grzybów keratynofilnych panujących na tych glebach. Większość grzybów keratynofilnych preferuje gleby charakteryzujące się znaczną zawartością materii organicznej, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego, o odczynie zbliżonym do obojętnego i korzystnych stosunkach powietrzno-wodnych. Do takich gleb należą np. czarnoziemy<sup>22</sup>. Natomiast gleby brunatne i bielicowe charakteryzują się dużym zakwaszeniem oraz nadmierną (gleby bielicowe) lub zbyt małą (gleby brunatne) przepuszczalnością, a w konsekwencji odpowiednio ujemnym bilansem wodnym lub niedostateczną ilością powietrza oraz niską lub bardzo niską (gleby bielicowe) zawartością materii organicznej. W tym kontekście większe zróżnicowanie genotypów w populacjach *T. ajelloi* izolowanych z obu tych gleb może być efektem adaptacji do niekorzystnych warunków. Z drugiej strony, brak korelacji pomiędzy zmiennością genetyczną szczepów *T. ajelloi*, a poszczególnymi parametrami fizykochemicznymi badanych gleb może wskazywać, że o zróżnicowaniu genetycznym gatunku decyduje ogół cech składających się na określony typ gleby, a nie poszczególne właściwości gleb.

#### **Podsumowanie wyników opisanych w Publikacji H4:**

- **wykazano** bardzo dobry potencjał różnicujący startera (GACA)<sub>4</sub>, który po raz pierwszy został zastosowany w typowaniu dermatofitów geofilnych,
- **wykazano** heterogeniczność genetyczną szczepów *T. ajelloi* w glebach bielicowych i brunatnych,
- **wykazano** homogeniczność genetyczną szczepów *T. ajelloi* zasiedlających czarnoziem,
- **oceniono**, że różnorodność genotypowa szczepów *T. ajelloi* izolowanych z gleb bielicowych, brunatnych i czarnoziemiu jest wypadkową wielu cech środowiska, charakteryzujących daną glebę

Jak już wcześniej napisano do grzybów keratynofilnych zalicza się dermatofity, które są odpowiedzialne za powierzchniowe mikozy skóry i jej wytworów przede wszystkim u ludzi, ale także i zwierząt. Współczesne warunki życia, zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia czynników, sprzyjających rozwojowi tego typu infekcji. Poznanie mechanizmów oddziaływania dermatofitów z komórkami gospodarza na poziomie molekularnym jest nadal mało poznane. Dlatego istnieje wyraźna potrzeba identyfikacji czynników związanych z patogennością dermatofitów, a logicznym punktem wyjścia jest identyfikacja genów, których ekspresja nasila się, bądź obniża na skutek odpowiedzi na różne bodźce zewnętrzne.

**[Publikacja H5]** Szczególną uwagę skoncentrowano na transporterach ABC, które są najważniejszymi białkami zaangażowanymi w transport poprzez błony biologiczne. Geny kodujące te transportery są ewolucyjnie stare i obecne są we wszystkich żywych organizmach, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Cechą charakterystyczną tych białek jest zdolność do wiązania i hydrolizy ATP, a energia uwolniona podczas tej reakcji wykorzystywana jest do aktywnego transportu substratu. Większość transporterów ABC zbudowana jest wyłącznie z dwóch rodzajów domen: domeny wiążącej ATP (Nucleotide Binding Domain, NBD), która odpowiedzialna jest za wiązanie i hydrolizę ATP oraz domeny transmembranowej (Trans Membrane Segment, TMS), warunkującej specyficzność w stosunku do substratu transportera, zbudowanej z 6 helis przechodzących przez błony komórkowe. Te dwie domeny stanowią jednostkę funkcjonalną, a większość transporterów ABC posiada dwie takie jednostki zorganizowane wg schematu (NBD-TMS)<sub>2</sub> bądź (TMS-NBD)<sub>2</sub> i ma wielkość około 1500 aminokwasów. W komórkach grzybów transportery ABC zaangażowane są między innymi w procesy infekcji i oporności na leki przeciwgrzybicze. **Do identyfikacji transporterów ABC użyto modeli GeneMark.hmm domeny transmembranowej (TMS) oraz domeny wiążącej nukleotydy (NBD) o numerach referencyjnych w bazie Pfam odpowiednio: PF00664 oraz PF00005.** Celem pierwszego etapu poszukiwań była identyfikacja białek o kanonicznej strukturze: (TMS-NBD)<sub>2</sub>, posiadających kompletne domeny. Następnie ustalano obecność znaczników charakterystycznych dla transporterów ABC – krótkich sekwencji aminokwasowych znajdujących się w obrębie domen wiążących nukleotydy: Walker A (fragment ma postać: GxxGxGKST z możliwymi odstępstwami i inwariantną lizyną pozycji siódmej) – fragment ten tworzy pętlę wiążącą fosforany alfa i beta di- i trinukleotydów; Walker B (zbudowany z dwóch negatywnie naładowanych reszt aminokwasowych poprzedzonych czterema resztami alifatycznymi, najczęściej ma on postać: ILLLDE bądź VLLLDE) – odcinek ten zaangażowany jest w wiązanie jonu Mg<sup>2+</sup>. Jedynie geny posiadające po dwa znaczniki Walker A i Walker B (po parze w każdej domenie NBD) były wykorzystane w dalszych badaniach. Ostatnim etapem było poszukiwanie wspólnych genów dla badanych gatunków dermatofitów. W tym celu porównano sekwencje nukleotydowe zidentyfikowanych genów ABC pochodzących z różnych gatunków przy użyciu programu NCBI BLAST.

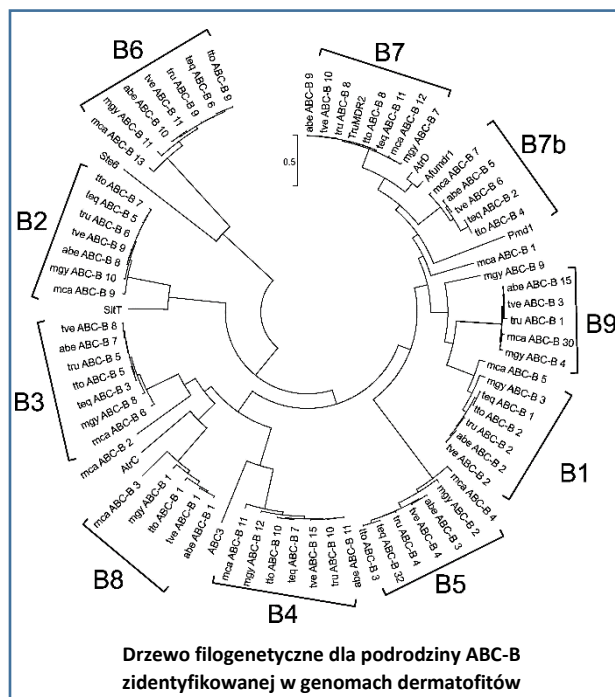


	<i>A. benhamiae</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. verrucosum</i>	Σ
ABC-A	0	1	1	1	1	1	1	6
ABC-B	10	12	10	8	8	9	10	67
hABC-B	2	2	3	3	2	1	2	15
ABC-C	9	12	9	6	6	7	8	57
hABC-C	3	2	3	2	2	2	3	17
ABC-G	3	4	5	4	4	4	4	28
hABC-G	2	1	1	2	1	2	2	11
NBD	6	7	6	6	8	6	6	45
Σ	35	41	38	32	32	32	36	246
genes per Mbp	1,57	1,76	1,63	1,33	1,42	1,39	1,60	

Liczba wykrytych genów kodujących transportery ABC, zawierających domenę wiążącą nukleotydy była podobna we wszystkich analizowanych genomach i wahała się od 32 w genomie *T. rubrum* do 41 w genomie, co stanowi od 1,33 do 1,76 genów na Mbp sekwencji genomu. Najliczniejszą podrodziną transporterów ABC była ABC-B, podczas gdy ABC-A była najmniej reprezentowana.

Podrodzina ABC-A była najslabiej reprezentowana w genomach dermatofitów. Pojedynczą kopię genu ABC-A znaleziono u każdego gatunku, z wyjątkiem *A. benhamiae*. Obecność genów ABC-A wśród grzybów nie jest ciągła, co sugeruje wielokrotne, niezależne utraty tych genów podczas ewolucji. Geny należące do tej podrodziny transporterów ABC są obecne w genomach wielu organizmów eukariotycznych, w tym zwierząt, roślin i grzybów. Transportery ABC-A składają się z dwóch NBD i dwóch TMD ułożonych w schemacie (TMD-NBD)<sub>2</sub>, z charakterystyczną dużą pętlą zewnątrzkomórkową pomiędzy dwoma pierwszymi transmembranami. Wszystkie zidentyfikowane w prowadzonych badaniach dermatofitowe transportery ABC-A były białkami o pełnej długości. Jedynym grzybowym transporterem ABC-A, który został eksperymentalnie przebadany był transporter ABC4 zidentyfikowany u *Magnaporthe grisea*, gdzie jest odpowiedzialny za oporność drobnoustroju na takie leki jak mikonazol i resweratrol<sup>23</sup>. Sekwencje aminokwasowe ABC-A dermatofitów wykazują stosunkowo wysokie, 50% podobieństwo z sekwencją ABC4 (podobieństwo jest większe w obrębie domen wiążących nukleotydy). Niska dywergencja ewolucyjna tych białek w analizowanych genomach

dermatofitów sugeruje ich istotną rolę w metabolizmie komórkowym.



Podrodzina ABC- B jest szeroko rozpowszechniona we wszystkich żywych organizmach. Białka te są m.in. związane z opornością wielolekową (MDR). Analiza bioinformatyczna wykazała, że u dermatofitów jest to najliczniejsza podrodzina transporterów ABC, zawierająca od 9 do 15 kopii genów pełnego transportera i od 1 do 4 genów półtransportera na każdy gen. Udało się dodatkowo wyróżnić dziesięć grup nazwanych od B1 do B9 natomiast 10 grupa ze względu na duże podobieństwo do B7, opisano jako B7b. Białka podrodziny ABC-B są zorganizowane w dwie połówki zawierające po jednej domenie TMD i NBD, rozdzielone łącznikiem. Zmienność sekwencji łącznika jest skorelowana ze zmiennością ogólnych sekwencji aminokwasowych. W większości grup

(z wyjątkiem 4, 6 i 7b) zmienność sekwencji nie jest związana z położeniem domen, natomiast w grupie B8 tylko domeny NBD wykazują ponadprzeciętne podobieństwo. Dlatego sekwencje oddzielające dwie domeny w obrębie każdej połówki są również kluczowe dla aktywności transportera, w przeciwieństwie do linkera łączącego dwie połówki, który prawdopodobnie pełni rolę czysto strukturalną. Ponad połowa transporterów ABC-B jest przypuszczalnie funkcyjnie powiązana transporterem Pmd1, który u *Schizosaccharomyces* zaangażowany jest w oporność na związki cytotoksyczne<sup>24</sup>. Można przypuszczać, że duża liczba transporterów ABC-B obecnych w komórkach dermatofitów również odgrywa rolę obronną przed czynnikami toksycznymi.

**Podrodzina ABC-C** jest również określana jako białka związane z opornością wielolekową. (MRP). Posiadają one podobną strukturę do tej, jaką mają transportery z podrodziny ABC-B z dodatkiem transmembranowej helisy (N-terminalne przedłużenie)<sup>25</sup>. Większość transporterów ABC-C zidentyfikowanych w genomach dermatofitów można podzielić na siedem grup (C1-C7). Fakt, że transportery ABC-C są najbardziej zróżnicowaną podrodziną można tłumaczyć tym, że białka tej podrodziny charakteryzują się różną funkcjonalnością<sup>26</sup>. Biorą one udział w transporcie szkodliwych związków endogennych i egzogennych. Drzewo filogenetyczne transporterów ABC-C przedstawia obraz podobny do tego, jaki obserwuje się w przypadku podrodziny ABC-B. Większość genów i ich produktów można podzielić na grupy posiadające jedną kopię w genomie. Z drugiej strony, dermatofitowe białka ABC-C nie można dokładnie porównać z transporterami ABC-C innych grzybów, gdyż dotychczas zbadano tylko kilka grzybowych transporterów ABC-C. Poza dermatofitami podrodzina ABC-C związana jest z trzema grzybowymi genami ABC-C, z których dwa są spokrewnione z białkami drożdżowymi: Ycf1p i Bpt1p<sup>27,28</sup>. Białka te zlokalizowane są w błonie wakuoli, a ich funkcja polega na detoksykacji z jonów metali ciężkich. Duża rozbieżność ewolucyjna dermatofitowych ABC-C wskazuje na rozległe zmiany w funkcjonalności tej klasy transporterów w toku ewolucji. Potwierdza to m.in. fakt, że nie udało nam się w prosty sposób połączyć sekwencji aminokwasowych dermatofitowych ABC-C ze znanymi odpowiednikami grzybowymi.

**Podrodzina ABC-G** charakteryzuje się odwrotną topologią domen: (NBD-TMD)<sub>2</sub>, a jej występowanie ograniczone jest do eukariontów<sup>29</sup>. Białka te zaangażowane są w tzw. plejotropową oporność na leki (PDR) i dlatego nazywane są transporterami PDR. Najwięcej zbadanych transporterów PDR pochodzi z drożdży, gdzie znaleziono dziewięć genów kodujących te białka<sup>29</sup>. Niektóre z drożdżowych transporterów PDR wraz z innymi białkami (w tym czynnikami transkrypcyjnymi) są połączone w sieci regulacyjne. Razem odpowiadają one za oporność na szerokie spektrum czynników toksycznych. Jeden gen obecny we wszystkich genomach dermatofitów jest związany z transporterem PDR *Cryptococcus neoformans* AFR1, który odpowiada za oporność na azole<sup>30</sup>. W analizowanych genomach dermatofitów podrodzina G transporterów ABC występuje mniej licznie, w ilości od 2 do 4 kopii na genom. Drzewo filogenetyczne wskazuje na istnienie trzech genów ABC-G, które są wspólne dla większości analizowanych genomów.

**Półtransportery** to transportery o niepełnej długości, które zidentyfikowano w genomach dermatofitów w dwóch podrodzinach ABC-B i ABC-G. **Półtransportery ABC-B są związane z błonami mitochondrialnymi i wakuolarnymi, gdzie są głównie odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy jonów metali u grzybów**<sup>31</sup>. Przykładem takiego białka jest Hmt1 obecne w drożdżach<sup>32</sup> i odpowiada ono za transport jonów kadmu. **Półtransportery ABC-B są również zaangażowane w odpowiedź na stres oksydacyjny**<sup>33</sup>. Przykładem takiego transportera jest białko Atm1p<sup>34</sup>. Większość półtransporterów ABC-B znalezionych w badanych genomach dermatofitów jest spokrewniona z wcześniej wymienionymi białkami, co sugeruje, że pełnią one podobną rolę w tej grupie grzybów. **Zidentyfikowano dziesięć półtransporterów wykazujących odwróconą orientację (NBD-TMD), co sugeruje, że należą do podrodziny ABC-G.** Pięć z nich jest spokrewnionych z drożdżowym transporterem Adp1p<sup>35</sup> o nieznannej funkcji. Składają się z pojedynczej domeny NBD zlokalizowanej w centralnej części białka oraz jednej domeny transbłonowej w pobliżu C-końca. Dodatkowo dwie helisy transbłonowe powyżej domeny NBD i krótki fragment wykazują podobieństwo do ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (EGF). Ponadto wykryto pojedynczą helisę transbłonową na samym N-końcu. **Co ciekawe, znaleziono geny kodujące ten półtransporter we wszystkich badanych genomach z wyjątkiem *M. canis*.**

**Podrodzina ABC-D** została wyodrębniona spośród innych półtransporterów ABC ze względu na specyficzną rolę. Białka te są związane z peroksysomami ułatwiając transport kwasów tłuszczowych.



Większość zidentyfikowanych transporterów ABC-D jest półtransporterami o orientacji TMD-NBD<sup>28</sup>. Niewiele wiadomo na temat grzybowych transporterów ABC związanych z peroksysomami, z wyjątkiem dwóch drożdżowych transporterów ABC Pxa1 i Pxa2, które okazały się działać jako heterodimery importujące długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Zidentyfikowano tylko jeden gen ABC-D na każdy gatunek dermatofita (z wyjątkiem *A. benhamiae*, gdzie nie znaleziono żadnych transporterów ABC-D). Pozwala to przypuszczać, że dermatofitowe transportery ABC-D działają jako homodimery.

**Podrodzina E** zawiera dwie domeny NBD, nie posiada domen transmembranowych. Białka z podrodziny ABC-E występują u archaebakterii i eukariontów<sup>28</sup>. Oprócz domeny NBD grzybowe ABC-E zawiera klaster żelazowo-siarkowy (Fe/S). Klastry Fe/S są pierwotnymi kofaktorami występującymi w białkach wszystkich organizmów, biorącymi udział w wielu reakcjach redoks<sup>36</sup>. Nasze badania wykazały, że istnieją pojedynczy członkowie tej podrodziny w każdym genomie dermatofitów, co jest zgodne z wcześniejszymi danymi uzyskanymi dla innych grup grzybów<sup>37</sup>. Dobrze opisane drożdżowe białko ABC-E Rli1p jest zaangażowane w tworzenie rybosomów, inicjację translacji i zarządzanie reaktywnymi formami tlenu<sup>38</sup>.

**Podrodzina F** również zawiera dwie domeny NBD, nie posiada domen transmembranowych. Jej członkowie zaangażowani są w regulację różnych etapów translacji. Dermatofitowe białka ABC-F, podobnie jak inne grzybowe można podzielić na 5 grup.

Transportery ABC odgrywają ważną rolę w patogenezie grzybic. Jak już wspomniano powyżej, biorą udział w oporności wielolekowej u różnych gatunków patogenów. Szybkie nabycie cechy oporności dotyczy również dermatofitów, gdyż przedstawiciele tej grupy mikroorganizmów stają się coraz bardziej powszechnymi patogenami i poddają się standardowym schematom terapii przeciwgrzybiczej. W związku z tym, dokładne badanie transporterów ABC stanowi ważne narzędzie w poszukiwaniu nowych leków przeciwgrzybiczych, a takim przypadkiem **zdobyta, poprzez przeprowadzoną przez Nas analizę bioinformatyczną, wiedza na temat dermatofitowych transporterów ABC będzie nieoceniona.**

#### Podsumowanie wyników opisanych w Publikacji H5:

- **wykazano** różnorodność transporterów ABC w genomach dermatofitów, co sugeruje, że wiele genów jest wspólnych dla wszystkich badanych gatunków,
- **porównano** dermatofitowe transportery ABC z ich odpowiednikami pochodzącymi z innych grzybów,
- **analiza** podrodziny ABC-B **wykazała**, że większość transporterów dermatofitów jest w jakiś sposób spokrewniona ze znanymi genami transporterów ABC z innych grzybów, co sugeruje podobną rolę tej grupy białek. Podobną sytuację można zaobserwować w przypadku podrodziny ABC-G.
- w podrodzynie ABC-C tylko kilka genów dermatofitów może być powiązanych z odpowiednikami z innych grzybów, co sugeruje, że ta grupa białek nadaje dermatofitom cechy specyficzne dla tej grupy patogenów grzybowych

**[Publikacja H6]** Analiza bioinformatyczna sekwencji genomów analizowanych gatunków dermatofitów wykazała również wyraźne różnice w częstości występowania powtórzeń mikrosatelitarnych. We wszystkich badanych genomach wykazano wyraźną presję selekcyjną eliminującą powtórzenia mikrosatelitarne z sekwencji genów, a szczególnie z sekwencji kodujących. **Podczas analizy sekwencji mikrosatelitarnych udało się zidentyfikować locus mikrosatelitarny charakterystyczny dla *Microsporum canis*.**

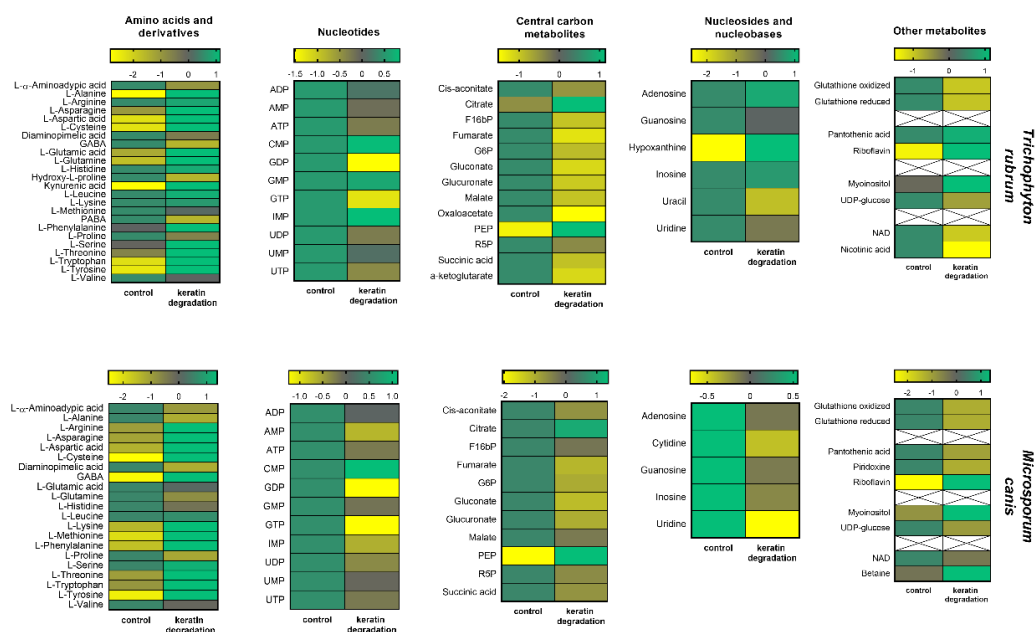




[Publikacja H7] Metabolomika, po transkryptomice i proteomicie, odgrywa ważną rolę w zrozumieniu mechanizmów patogenezы bakterii, grzybów lub wirusów i staje się bardzo użyteczna w naukach przyrodniczych. W porównaniu z genomem i transkryptomem, proteom i metabolom są znacznie bardziej złożone i dynamiczne. Transkrypcja genów nie zawsze odzwierciedla się bezpośrednio w ilości i aktywności związków, takich jak białka i metabolity w komórkach. Jednak porównując profile metabolitów czy białek próbek kontrolnych z próbkami rosnącymi w określonych warunkach, uzyskuje się informacje o zmianach jakościowych i ilościowych, wywołanych przez czynnik stymulujący. Spektrometria mas jest podstawową metodą omiczną z wyboru w przypadku badań metabolomicznych. To narzędzie analityczne jest bardzo przydatne dla lepszego zrozumienia biologii organizmów i ich odpowiedzi na różne bodźce środowiskowe. Procesy komórkowe charakteryzują się wytwarzaniem unikalnych, chemicznych "odcisków palców", czyli zestawu metabolitów o specyficznym składzie.

Keratyna jest niezwykle ważna i potrzebna do wzrostu dermatofitów w tkankach gospodarza, a zdolność do inwazji zrogowaciałych tkanek jest uważana za ich główny czynnik wirulencji. Interakcji na linii gospodarz-dermatofit towarzyszy adaptacja metabolizmu grzybów, która umożliwia im przyleganie do tkanki gospodarza, jak również wykorzystanie dostępnych składników odżywczych niezbędnych do ich przetrwania i wzrostu. **Ponieważ analiza metabolomiczna nie była, jak dotąd, wykorzystana do identyfikacji chemicznych „odcisków palców” dla *Trichophyton rubrum* i *Microsporum canis* w obecności keratyny, po raz pierwszy na świecie, podjęto taką analizę.**

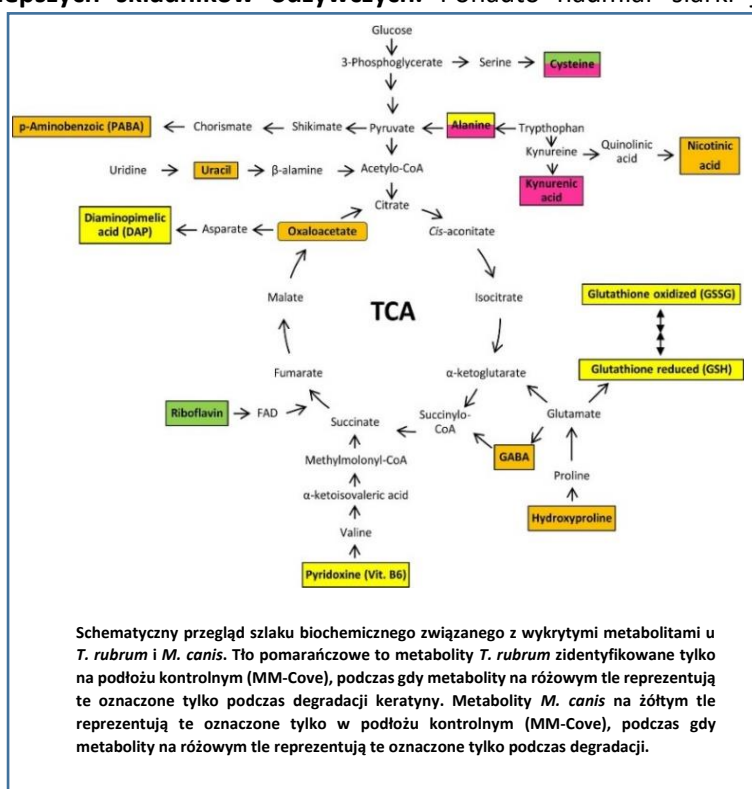
Związki takie jak L-alanina, kwas kynureninowy i cysteina w przypadku *T. rubrum* oraz cysteina i ryboflawina w przypadku *M. canis* były wykrywane tylko w podłożu uzupełnionym keratyną. Znaczący wzrost produkcji kwasu kynureninowego przez *T. rubrum* w podłożu promującym degradację keratyny jest interesujący. Kwas kynureninowy wykazuje silne właściwości immunosupresyjne wobec komórek odpornościowych kręgowców, prowadząc do wyciszenia ich działania zapalnego poprzez ograniczenie produkcji cytokin, w tym interleukin (IL) takich jak IL-4, IL-23 oraz czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ponadto hamuje różnicowanie limfocytów



Th17<sup>40</sup>. IL-17 produkowana przez komórki Th17, odgrywa ważną rolę w aktywacji odpowiedzi przeciwgrzybiczej. Doniesienia te wydają się szczególnie interesujące, gdyż *T. rubrum*, jako dermatofit antropofilny, opracował szereg strategii pozwalających na uniknięcie odpowiedzi immunologicznej

gospodarza, co bezpośrednio wpływa na czas trwania wywołanych infekcji oraz trudności w ich leczeniu. Z kolei, **L-alanina jest jednym z kluczowych aminokwasów tworzących białka**, a jej zwiększona obecność wewnątrzkomórkowa stwierdzona tylko w przypadku, gdy *T. rubrum* degradował keratynę może sugerować, że **L-alanina jest ważnym składnikiem białek odpowiedzialnych za proces patogenezy grzybów dermatofitowych**. W przypadku wysoce wirulentnego mutantu innego patogenu grzybowego, szczepu *Candida albicans* pir32 null, L-alanina wchodzi w skład sekwencji najlepiej zidentyfikowanych białek ściany komórkowej (CWP). Analizy przeprowadzone na innych grzybach patogennych wykazały, że **CWP odgrywają istotną rolę w biosyntezie i rearanżacji ściany komórkowej i są ważnymi czynnikami wirulencji**<sup>41,42</sup>.

Podczas analiz metabolomicznych *T. rubrum* i *M. canis* cysteina została wykryta tylko podczas degradacji keratyny przez te grzyby<sup>43</sup>. Cysteina, produkt degradacji keratyny, jest utleniana przez dioksygenazę cysteinową (CDO) do kwasu siarkowego. Związek ten jest prekursorem tauryny lub pirogronianu i siarczanu, które mogą być ponownie wykorzystane w degradacji keratyny. **Cysteina jest bardzo dobrym źródłem siarki i jest szybko zużywana z podłoża przez patogen, nawet w obecności lepszych składników odżywczych**. Ponadto nadmiar siarki jest wydalany na zewnątrz komórki



w postaci związków nieorganicznych<sup>43</sup>. Badania na mutantach *Trichophyton mentagrophytes*, które nie były zdolne do wytwarzania dioksygenazy cysteinowej, wykazały, że grzyb ten bardzo słabo rósł na włosach i paznokciach oraz był bardzo wrażliwy na cysteinę<sup>44</sup>. **Wykrycie wewnątrzkomórkowej cysteiny u *T. rubrum* i *M. canis* tylko w podłożu uzupełnionym keratyną, potwierdziło, że patogeny te degradowały keratynę obecną w podłożu, a następnie wykorzystywały ją jako substrat do tworzenia siarczynów**. **Ryboflawina (witamina B2) była drugim wewnątrzkomórkowym metabolitem, który obserwowano u *M. canis* tylko podczas degradacji**

keratyny. Dietl i wsp. wykazali, że **witamina B2 jest kluczowa dla patogenezy innego grzyba strzępkowego *Aspergillus fumigatus***. Badania wykazały, że usunięcie genu zaangażowanego w proces biosyntezy ryboflawiny (riboB) bezpośrednio skutkuje utratą wirulencji tego patogenu. Ryboflawina jest prekursorem mononukleotydu flawinowego (FMN), jak również dinukleotydu flawinowo-adeninowego (FAD), które są kofaktorami niezbędnymi w katabolicznych procesach oksydacyjnych. Flawoproteiny produkowane przez *A. fumigatus* odpowiadają za biosyntezę sideroforów czy asymilację żelaza<sup>45,46</sup>. **Zjadliwość patogenów jest często charakteryzowana na podstawie zdolności tych mikroorganizmów do pozyskiwania żelaza ze środowiska**<sup>46</sup>. Dlatego zwiększona produkcja ryboflawiny przez *M. canis* podczas degradacji keratyny może sugerować, że jest to jedna z adaptacji do procesu infekcji. Szlak biochemiczny syntezy tego metabolitu mógłby być proponowanym celem dla leku przeciwgrzybiczego.

**Zaobserwowano, że wzrost *T. rubrum* i *M. canis* w podłożu kontrolnym (podłoże minimalne zawierające glukozę jako jedyne źródło węgla), intensywnie wytwarzał główne produkty procesu oddychania wewnątrzkomórkowego.** Maranhão i wsp.<sup>47</sup> podali, że *T. rubrum* rosnący w obecności glukozy jako jedynego dostępnego źródła węgla zakwasza podłoże, jak również hamuje produkcję proteaz zewnętrznych. Metabolity glikolizy mogą być włączone do dalszych etapów procesu, ale mogą być alternatywnie wykorzystane w innych szlakach metabolicznych. Na przykład włączenie glukozo-6-fosforanu do szlaku fosforanu pentozy powoduje obecność rybozo-5-fosforanu i fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH), co zapewnia skuteczniejszą ochronę komórek w warunkach stresu oksydacyjnego<sup>48</sup>. **Zastosowane w badaniu podłoże minimalne (MM-Cove)<sup>49</sup> zawierające glukozę jako źródło węgla ze względu na ograniczoną dostępność składników odżywczych dla *T. rubrum*, jak również *M. canis* może prowadzić do zwiększonej produkcji specyficznych substancji.** Co więcej, zwiększona liczba metabolitów pełniących rolę transporterów energii, takich jak GTP, adenozyotrójfosforan (ATP) czy urydyno-5'-trifosforan (UTP) w pożywce kontrolnej może być przydatna do zwiększonej syntezy molekuł działających ochronnie na komórki *T. rubrum* i *M. canis*. W tym kontekście warto skupić się na hydroksy-L-prolinie wytwarzanej przez *T. rubrum* tylko w medium kontrolnym. W komórkach *Saccharomyces cerevisiae* wykazano, że L-prolina i hydroksy-L-prolina pełnią funkcję ochronną podczas stresu retikulum endoplazmatycznego (ER) w obecności niskiego poziomu aminokwasów, wywołanego niedoborem składników odżywczych. Stres ER powoduje nieprawidłowe składanie produkowanych białek, jak również zmniejszenie całkowitej produkcji białek w komórce<sup>50</sup>. **Interesujące jest to, że utleniony i zredukowany glutation wykryto tylko w medium kontrolnym, zarówno w przypadku *T. rubrum*, jak i *M. canis*.** Glutation odgrywa ważną rolę w ochronie przed ksenobiotykami, metalami ciężkimi i reaktywnymi formami tlenu wśród tlenowych prokariotów i eukariotów<sup>51</sup>. Ponadto, w obecności ograniczonych składników odżywczych w środowisku, glutation jest ważnym rezerwuarem azotu i siarki. Wcześniejsze doniesienia wskazywały również, że związki takie jak pirydoksyna (witamina B6), **metabolit oznaczany razem z glutationem u *M. canis* tylko w podłożu kontrolnym, jak również kwas para-aminobenzoowy (PABA)<sup>52</sup> i  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA)<sup>53</sup>, metabolity oznaczane u *T. rubrum* w podłożu kontrolnym, mogą pomóc komórce przetrwać w warunkach stresowych, takich jak ograniczona dostępność składników odżywczych.**

#### Podsumowanie wyników opisanych w Publikacji H7:

- degradacja keratyny powoduje zmiany w wewnątrzkomórkowej aktywności metabolicznej *T. rubrum* i *M. canis*,
- **metabolitowe "odciski palców" zidentyfikowane u *T. rubrum* i *M. canis* to związki biorące udział w metabolizmie aminokwasów, węglowodanów, uczestniczące w procesach takich jak glikoliza i cyklem kwasu trójkarboksylowego (TCA),**
- **metabolity** takie jak kwas kynureninowy, L-alanina i cysteina w przypadku *T. rubrum* oraz cysteina i ryboflawina w przypadku *M. canis* były wykrywane tylko podczas degradacji keratyny, co może sugerować, że związki te **mogą odgrywać kluczową rolę** w interakcjach *T. rubrum* i *M. canis* z tkanką gospodarza,
- **efekty przeprowadzonej po raz pierwszy na świecie, metabolomicznej analizy *T. rubrum* i *M. canis* podczas degradacji keratyny, które naśladują zakażenie dermatofitami komórek gospodarza, stwarzają możliwość poszerzenia dostępnej wiedzy na temat mechanizmów związanych z patogennością dermatofitów oraz innych właściwości biologicznych tej grupy patogenów.**

## PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW OPISANYCH W PUBLIKACJACH H1-H7:

- **po raz pierwszy wykorzystano** wypluwki ptaków drapieżnych Polski, celem zbadania możliwych dróg transmisji potencjalnie chorobotwórczych grzybów keratynofilnych,
- **po raz pierwszy zastosowano** metody molekularne (PCR-RFLP) do molekularnej identyfikacji grzybów keratynofilnych izolowanych z wypluwek ptaków drapieżnych Polski,
- **po raz pierwszy zastosowano** metody molekularne (PCR-MP) do wewnątrzgatunkowego różnicowania szczepów grzybów keratynofilnych izolowanych z wypluwek ptaków drapieżnych Polski oraz metodę MSP-PCR do wewnątrzgatunkowego różnicowania szczepów grzybów keratynofilnych izolowanych z gleb,
- **po raz pierwszy wykazano**, że wypluwki ptaków drapieżnych Polski istotnie przyczyniają się do krążenia grzybów keratynofilnych w środowisku, w związku z czym opracowano możliwe modele rozprzestrzeniania tych grzybów,
- **po raz pierwszy wykazano**, że grzyby keratynofilne izolowane z wypluwek ptaków drapieżnych Polski można z powodzeniem wykorzystywać do kompostowania odpadów keratynowych,
- **po raz pierwszy wykazano**, na podstawie analiz bioinformatycznych, różnorodność transporterów ABC w genomach grzybów keratynofilnych, takich jak dermatofity będących patogenami ludzi i zwierząt,
- **po raz pierwszy zidentyfikowano** nowy marker molekularny (gen *velB*), który będzie przydatny do gatunkowej identyfikacji grzyba keratynofilnego, *Microsporium canis*
- **po raz pierwszy przeprowadzono analizę metabolomiczną** grzybów keratynofilnych, *T. rubrum* i *M. canis* w warunkach degradacji keratyny, i **wykazano**, że zidentyfikowane metabolity mogą mieć bezpośredni wpływ na interakcje patogen-gospodarz.

### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

#### 5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora

Na III roku studiów magisterskich (2000 rok) na kierunku mikrobiologia zgłosiłam się do Zakładu Genetyki Drobnoustrojów, kierowanego przez prof. dr hab. Adama Jaworskiego, wyrażając chęć udziału w pracach badawczych Zakładu. Profesor Adam Jaworski, wskazał wówczas, że interesującą, ale zupełnie nową tematyką, którą można by realizować w kierowanym przez Niego Zakładzie, mogą być dermatofity, czyli grzyby chorobotwórcze dla człowieka i zwierząt. To właśnie wtedy rozpoczęła się moja naukowa przygoda z grzybami keratynofilnymi. W 2000 roku wiedza na temat tej ważnej z medycznego punktu widzenia, grupy grzybów, była raczej skromna. Gromadziłam dostępne wówczas dane literatury przedmiotu i podsumowałam je w postaci kilku prac przeglądowych:

- Łukasz Bojarski, **Anita Dobrowolska**, Michał Grabowski, Marek Czarnecki, Adam Jaworski. **2001**. Molekularna diagnostyka i epidemiologia zakażeń niektórymi gatunkami grzybów chorobotwórczych. *Post. Mikrobiol.* vol.40, no.3, 311-324.
- **Anita Dobrowolska**, Łukasz Bojarski i Paweł Stączek. **2002**. Metody i techniki molekularne stosowane w diagnostyce i epidemiologii zakażeń grzybami chorobotwórczymi. *Wiadomości Parazytologiczne*, Tom 48, Zeszyt 3, 241-255.



- **Anita Dobrowolska**, Adam Jaworski. **2008**. Genomika i inżynieria genetyczna dermatofitów. *Mikologia Lekarska*, 15, 223-227.
- **Anita Dobrowolska**, Paweł Stączek, Aleksandra Kaszuba, Adam Jaworski **2008**. Genetic studies of dermatophytes. *Advances in Dermatology and Allergology XXV* 79-81.

Początki pracy naukowej były trudne, polegały na opracowaniu, w oparciu o literaturę, metodyki izolacji genomowego DNA, co trwało ponad rok. Osiągając wreszcie ten krok milowy otworzył się przede mną szeroki wachlarz możliwości badań z wykorzystaniem genomowego DNA tej grupy grzybów keratynolitycznych. Tradycyjne metody diagnostyki mykologicznej dermatofitów, opierające się na analizie makro- i mikroskopowej oraz testach biochemicznych, nie pozwalały wówczas na uzyskanie jednoznacznych wyników, co było konsekwencją uwarunkowanej środowiskowo zmienności fenotypowej gatunków oraz szczepów badanej grupy grzybów chorobotwórczych. Dlatego jednym z pierwszych postawionych mi zadań badawczych była **molekularna identyfikacja i różnicowanie szczepów klinicznych dermatofitów izolowanych od pacjentów z regionu łódzkiego**, z zastosowaniem znanych metod molekularnych **PCR-RFLP**, **RAPD** i nowej metody **PCR MP**. Realizacja badań była możliwa m.in. dzięki nawiązaniu wieloletniej współpracy z zespołem prof. dr hab. Andrzeja Kaszuby, Kierownikiem Kliniki Dermatologii i Dermatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Specjalistycznych Gabinetów Lekarskich „DERMED” w Łodzi. W celu amplifikacji regionu ITS1-5.8S-ITS2 operonu rDNA zastosowano, uniwersalną parę starterów ITS1 i ITS4. Analizę restrykcyjną amplikonów regionu ITS1-5.8S-ITS2 przeprowadzono za pomocą endonukleazy *HinfI*, której przydatność w gatunkowej identyfikacji dermatofitów została opisana w literaturze przedmiotu. W oparciu o uzyskane fragmenty restrykcyjne, w obrębie badanej kolekcji, zidentyfikowano gatunki: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Microsporum canis* i *Epidermophyton floccosum*. Co więcej, **udało się** w wyniku analizy komputerowej, **zidentyfikować** w amplifikowanym regionie, **sekwencje docelowe dla nowych, nie stosowanych, jak dotąd, restryktaz *HhaI* i *MvuI***, które z powodzeniem **można stosować, odpowiednio, w gatunkowej i rodzajowej identyfikacji badanych dermatofitów metodą PCR-RFLP**. Wyniki opisane powyżej zostały opublikowane jako praca oryginalna:

- **Anita Dobrowolska**, Paweł Stączek, Aleksandra Kaszuba, Magdalena Kozłowska. 2006. PCR-RFLP analysis of the dermatophytes isolated from patients in Central Poland. *Journal of Dermatological Science*. 42 (1): 71-74.

Dla celów dochodzenia źródeł zakażeń oraz dróg transmisji patogenów w środowisku, konieczna jest dostępność metod pozwalających na głębokie różnicowanie genetyczne szczepów w obrębie gatunku. W przypadku dermatofitów, takich metod i technik, z wyjątkiem techniki RAPD, nie udało się opracować (stan wiedzy w roku 2007). W tym celu, podjęłam współpracę z Katedrą Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, kierowaną przez prof. dr hab. Józefa Kura. W trakcie 4-tygodniowego stażu naukowego **nauczyłam się**, stosunkowo **nowej techniki PCR MP** (PCR Melting Profiles), opartej o ligację adapterów oligonukleotydowych i różnicę w temperaturach topnienia fragmentów restrykcyjnych DNA. **Metoda ta okazała się być niezwykle użyteczna w genotypowaniu szczepów badanych dermatofitów** (pochodzących z Kliniki Dermatologii i Dermatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi), zwłaszcza *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Microsporum canis*. Efekty wspomnianej wyżej współpracy naukowej zostały opublikowane jako praca oryginalna:

- Justyna Leibner-Ciszak, **Anita Dobrowolska**, Beata Krawczyk, Aleksandra Kaszuba, Paweł Stączek. **2010**. Evaluation of PCR MP metod for inter-species differentiation of



*Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Medicinal Microbiology*. 59: 185-192 (praca ukazała się drukiem po uzyskaniu stopnia doktora).

Tym samym **po raz pierwszy w Polsce i na świecie udokumentowano przydatność ww. metody do wewnątrzgatunkowej analizy molekularnej dermatofitów.**

Metoda PCR-MP była również wykorzystana do wewnątrzgatunkowego różnicowania *Microsporum canis*, co było jednym z celów rozprawy doktorskiej, której byłam opiekunem naukowym, Pani mgr Joanny Dębskiej pt: "*Badania zróżnicowania struktury klonalnej szczepów Microsporum canis i niektórych, innych gatunków dermatofitów izolowanych od ludzi i zwierząt w Polsce.*"

W pierwszej dekadzie XXI wieku niewiele również było danych dotyczących mechanizmów patogenności dermatofitów. Badania możliwych czynników wirulencji wydawały się na tamten moment ułatwione dzięki systemom genetycznych transformacji dla ww. grzybów chorobotwórczych. Stąd kolejnym, niezwykle ważnym celem badawczym było **opracowanie systemu transformacji dla dermatofitów, które stworzyłyby szanse na zainicjowanie systematycznych badań poznawczych.** Realizacja tego projektu możliwa była po uzyskaniu środków finansowych, pochodzących z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w ramach grantu promotorskiego 2 P04C 044 30 – *Opracowanie układu szczep-gospodarz/wektor plazmidowy dla selekcji mutantów integracyjnych oraz konstrukcji transgenicznych szczepów dermatofitów z rodzaju Trichophyton i Microsporum.* Funkcjonujące wówczas systemy transformacji dla grzybów strzępkowych, polegały na wprowadzaniu DNA do ich protoplastów lub sferoplastów. Analizując dokładnie dane literaturowe, stwierdziłam, że jak dotąd nie wykorzystano, jako komórek kompetentnych, spor dermatofitów. Dlatego kolejnym etapem badań było **opracowanie metody otrzymywania kompetentnych spor i sposobu ich transformowania.** W badaniach wykorzystywałam wektory plazmidowe pochodzące z kolekcji Profesora Makimury z Teikyo University, Tokio, Japonia, u którego, w roku 2007, odbyłam również 4-tygodniowy staż naukowy w ramach stypendium przyznanego przez IUMS. Aby otrzymać kompetentne spory posłużyłam się protokołem doświadczalnym Sancheza i Aguierr'a dla *Aspergillus nidulans*<sup>54</sup>. Otrzymałam kilkanaście transformantów *T. rubrum*/pCHSH75-Pch/GFP/TtrpC. Ich analiza molekularna poprzez reakcję PCR z odpowiednią parą starterów, potwierdziła obecność, w ich komórkach, genu *egfp*, którego ekspresja widziana była w postaci silnej fluorescencji. Z kolei analiza transformantów metodą hybrydyzacji Southern blot dowiodła, że plazmid pCHSH75-Pch/GFP/TtrpC integruje się w różnych regionach genomu *Trichophyton rubrum* oraz, że gen *hph* i *egfp* występują w pojedynczej liczbie kopii. Uzyskane wyniki były porównywalne do rezultatów otrzymanych przez Yamada i wsp.<sup>55</sup>, którzy przeprowadzając analizę transformantów *T. mentagrophytes*/pCHSH75-Pch/GFP/TtrpC w oparciu o hybrydyzację Southern blot również dowiedli, że integracja DNA plazmidowego może zachodzić w różnych regionach genomu badanego gatunku, a liczba kopii genów *egfp* i *hph* wahała się od 1 do kilku. **Zaproponowana tym samym po raz pierwszy na świecie, metoda transformacji podkiełkowanych spor *Trichophyton rubrum* na drodze elektroporacji, jak również metoda selekcji transformantów, poprzez etap ich wczesnej germinacji, zakończyła się powodzeniem.** Uzyskane wyniki zostały opublikowane jako praca oryginalna

- **Anita Dobrowolska**, Paweł Stączek. 2009. Development of transformation system for *Trichophyton rubrum* by electroporation of germinated conidia. *Current Genetics* 55: 537-542 (praca ukazała się drukiem po uzyskaniu stopnia doktora),

a także zostały wyróżnione I nagrodą w konkursie im. Profesora Wacława Szybalskiego za najlepszą pracę Młodego Biotechnologa, pt: "*Badania genetyczne dermatofitów: wektory plazmidowe oraz*

systemy transformacji *Trichophyton rubrum*” Nagrodę wręczono podczas 26. Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w roku 2008 w Szczecinie.

Jako opiekun pracy magisterskiej Pani Joanny podjęłam również, z powodzeniem, próbę wykorzystania genu syntazy chitynowej 1 (*chs1*), jako markera genetycznego do molekularnej identyfikacji dermatofitów *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* metodą PCR-RFLP. Uzyskane wyniki zostały opublikowane jako praca oryginalna:

- **Anita Dobrowolska**, Joanna Dębska, Paweł Stączek. 2008. Molecular identification of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* by PCR-RFLP targeting of the DNA chitin synthase 1 gene. *Mikologia Lekarska*, Vol. 15 (4): 193-196 (praca ukazała się drukiem po uzyskaniu stopnia doktora).

## 5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora

Zapoczątkowana w roku 2005 współpraca z zespołem prof. dr hab. Andrzeja Kaszuby, Kierownika Kliniki Dermatologii i Dermatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Specjalistycznych Gabinetów Lekarskich „DERMED” w Łodzi, zaowocowała **wspólnym projektem badawczym**, finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N402 692640 - **Badanie struktury klonalnej klinicznych szczepów dermatofitów izolowanych od pacjentów w regionie łódzkim w latach 2000-2010**, którego Kierownikiem był prof. dr hab. Adam Jaworski, a ja byłam Głównym Wykonawcą. Głównym celem projektu było **zbadanie i ustalenie stopnia filogenetycznego zróżnicowania struktury genetycznej (klonalnej) dwóch dużych kolekcji szczepów należących do zidentyfikowanych gatunków dermatofitów, izolowanych od pacjentów z regionu łódzkiego w latach, odpowiednio, 2000 - 2005 oraz 2005-2010**. Zgromadzono kolekcję obejmującą **ponad 100 szczepów dermatofitów** izolowanych od pacjentów z regionu centralnej Polski w latach 2000-2010; przeprowadzono **weryfikację tradycyjnej gatunkowej identyfikacji** badanej kolekcji dermatofitów przy pomocy metody PCR-RFLP; przeprowadzono analizy preparatów genomowych DNA metodą **RAPD w oparciu o starter (GACA)<sub>4</sub> i (GTG)<sub>5</sub>**, **technikę PCR-MP** oraz podjęto próbę **konstrukcji dendrogramów** dla poszczególnych gatunków. Uzyskane wyniki pozwoliły na wewnątrzgatunkowe różnicowanie badanych gatunków dermatofitów zarówno przy zastosowaniu metody PCR MP oraz RAPD. W przypadku izolatów *M. canis* nie zaobserwowano ponownie różnicowania żadną z metod, czego przyczyną mogła być niska moc dyskryminacyjna zastosowanych markerów lub stabilność genetyczna tego gatunku dermatofitów, co sugerowałam już w jednej z opublikowanych przez mnie wcześniej pracy:

- **Anita Dobrowolska**, Joanna Dębska, Magdalena Kozłowska, Paweł Stączek. 2011. Strain differentiation of *Microsporum canis* by RAPD analysis using (GACA)<sub>4</sub> and (ACA)<sub>5</sub> primers. *Polish Journal of Microbiology*. 60: 145-148.

Wyniki badań uzyskanych w ramach realizowanego projektu zostały opublikowane jako praca oryginalna:

- **Anita Ciesielska**, Magdalena Kozłowska, Marek Gadzalski, Mariusz Worek, Adam Jaworski, Paweł Stączek. **2014**. Application of microsatellite-primed PCR (MSP-PCR) and PCR melting profile (PCR-MP) method for intraspecies differentiation of dermatophytes. *Polish Journal of Microbiology*. 2014;63(3):283-90

Równolegle do prac prowadzonych z zespołem Profesora Andrzeja Kaszuby, nawiązałam współpracę z prof. dr hab. Eugeniuszem Baranem z Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Zostałam zaangażowana w projekt polegający na **molekularnej identyfikacji (PCR-RFLP) i różnicowaniu (RAPD) klinicznych izolatów *Trichophyton***

**rubrum** izolowanych przede wszystkim od pacjentów z Dolnego Śląska (40 izolatów) oraz Krakowa (8 izolatów) i Niemiec (9 izolatów, Tübingen). Wyniki badań wykazały wysoką zgodność pomiędzy konwencjonalnymi i molekularnymi technikami identyfikacji *T. rubrum*. Tylko dwa izolaty zostały zidentyfikowane jako izolaty inne niż *T. rubrum*: jeden został zidentyfikowany jako *T. tonsurans* (po analizie restrykcyjnej z *MvaI*), a drugi został uznany za grzyb niedermatofitowy. Możliwe wyjaśnienie tego drugiego przypadku mogło być związane z zanieczyszczeniem laboratoryjnym próbki i/lub kultury. W wyniku połączenia profili z obu testów RAPD otrzymano 47 genotypów, a ogólny wskaźnik różnorodności genotypowej wyniósł 85,4%. Analiza dendrogramu przeprowadzona na profilach wygenerowanych przez RAPD ze starterem 1 wykazała, że większość izolatów (87,3%) jest genetycznie powiązana. Wyniki badań uzyskanych w ramach współpracy zostały opublikowane jako praca oryginalna:

- Anita Hryncewicz-Gwóźdź, Tomasz Jagielski, **Anita Dobrowolska**, Jacek Szepietowski, Eugeniusz Baran. **2011**. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 59: 185-192.

W 2013 roku prof. dr hab. Adam Jaworski nawiązał współpracę z dr Maciejem Wnukiem z Katedry Genetyki Uniwersytetu Rzeszowskiego z siedzibą w Kolbuszowej. W ramach tej współpracy, w której brałam czynny udział, **opracowano sposób identyfikacji dermatofitów w oparciu o genomową hybrydyzację *in situ* (GISH)**. Potrzeba opracowania narzędzia do molekularnej identyfikacji wynikała z faktu, że nie udało się nam się zidentyfikować dwóch spośród 47 izolatów dermatofitów za pomocą opisaną już wcześniej metody PCR-RFLP. W tym celu skonstruowano genomową sondę diagnostyczną znakowaną biotyną typu *in situ* znakującą DNA w jądrze komórkowym dermatofitów (*T. rubrum*, *T. interdigitale*, *M. canis*). Tym samym **wykazano po raz pierwszy, że GISH i specyficzne dla gatunków dermatofitów gatunkowo specyficzne genomowe sondy mogą być z powodzeniem stosowane do identyfikacji dermatofitów**. Wyniki badań uzyskanych w ramach współpracy zostały opublikowane jako praca oryginalna:

- Mariusz Worek, Aleksandra Kwiatkowska, **Anita Ciesielska**, Adam Jaworski, Jakub Kaplan, Beata Miedziak, Anna Deregowska, Anna Lewinska, Maciej Wnuk. **2014**. Identification of dermatophyte species using genomic *in situ* hybridization (GISH). *Journal of Microbiological Methods*, 100:32-41.

W 2013 roku **zostałam poproszona** przez Katedrę Chorób Zakaźnych i Hepatologicznych Collegium Medicum w Bydgoszczy **o ekspertyzę przypadku klinicznego**. Na oddział przyjęto wówczas 42-letniego mężczyznę z podejrzeniem promienicy (*actinomycosis*) wywoływanej przez promieniowca *Actinomyces bovis*. U pacjenta pojawiły się pojedyncze ogniska rumieniowo-złuszczające na skórze szyi i dolnej części twarzy. Pacjent był leczony miejscowymi środkami przeciwbakteryjnymi, w tym bacytracyną i neomycyną. Pomimo stosowanego leczenia, zmiany patogene poszerzały się obwodowo, a następnie przekształcały się w bolesne nacieki i guzy. Z wywiadu wiadome było, że pacjent pracując w gospodarstwie rolnym miał codzienny kontakt z bydłem, drobiem, kotami i psami. W 7. dniu hospitalizacji, stwierdzono obecność grzybów strzępkowych w posiewie. Pacjent otrzymał doustnie itraconazol w dawce 200 mg dziennie. Po 2 dniach leczenia itraconazolem zmiany skórne uległy poprawie jednak terapia została przerwana z powodu uogólnionego rumienia polekowego. W 15. dniu hospitalizacji zidentyfikowano w materiale pobranym od pacjenta dermatofit *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum*. **Skierowano do mnie wówczas prośbę o molekularną identyfikację wyizolowanego od pacjenta dermatofita**. Identyfikacja

w oparciu o metodę PCR-RFLP, **potwierdziła wynik uzyskany klasyczną metodą identyfikacji mykologicznej**. Pacjent miał grzybicę brody, a nie jak wcześniej przypuszczano, promienicę. **Pozwoliło to na wdrożenie właściwego leczenia**, czyli przyjmowania przez pacjenta terbinafiny w dawce 250 mg/dzień przez okres 6 tygodni. Omawiany powyżej przypadek kliniczny opublikowano jako *Case Report*:

- Dorota Kozielowicz, J. Wernik, Agnieszka Mikucka, **Anita Ciesielska**, E. Kruszyńska, Eugenia Gospodarek, Małgorzata Pawłowska, Waldemar Halota. **2015**. Problems in diagnosis of profound *trichophytosis barbrae*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, Vol. 33(3): 444-447.

Jedną z ciekawszych przygód naukowych, którą przeżyłam po uzyskaniu stopnia doktora była niewątpliwie współpraca jaką nawiązałam z prof. dr hab. Teresą Kornilowicz-Kowalską, dr Justyną Bohacz (obecnie dr hab., prof. uczelni) z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz dr Ignacym Kitowskim (obecnie dr hab., prof. uczelni) z Państwowej Akademii Nauk Stosowanych w Chełmie. Nasze spotkanie zaowocowało wspólnym projektem badawczym finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N304 0990 39: *Badania składu gatunkowego i zróżnicowania wewnątrzgatunkowej struktury klonalnej dermatofitów oraz innych grzybów keratynofilnych przenoszonych w środowiskach naturalnych przez wybrane gatunki ptaków Polski*, którego byłam Kierownikiem. Szczegóły dotyczące ww. współpracy oraz opublikowanych oryginalnych prac naukowych, zostały opisane w części, która związana jest z osiągnięciem habilitacyjnym.

W trakcie drugiego urlopu macierzyńskiego, który odbywałam w 2014 roku, wspólnie z dr hab. Pawłem Stączkiem, napisałam projekt badawczy, pt: „*Analiza dermatofitów pod kątem: identyfikacji polimorfizmów DNA przydatnych w molekularnej diagnostyce, epidemiologii i filogenetyce, ekspresji wybranych genów wirulencji oraz wrażliwości na tiosemikarbazydy*” w ramach konkursu NCN – OPUS, który ostatecznie otrzymał finansowanie (2014/13/B/NZ7/02307). Badania dermatofitów, z wykorzystaniem metod analizy molekularnej, były na tamten czas, stosunkowo słabo rozwinięte na świecie, w tym także w Polsce. Poznanie mechanizmów oddziaływania dermatofitów z komórkami gospodarza na poziomie molekularnym było nadal mało poznane. Dlatego **istniała wyraźna potrzeba identyfikacji czynników związanych z patogennością dermatofitów**, a logicznym punktem wyjścia była **identyfikacja genów, których ekspresja nasila się, bądź obniża na skutek odpowiedzi na różne bodźce zewnętrzne**. Do tego celu wybrano geny kodujące transportery ABC (ATP- binding cassette) Transportery ABC są najważniejszymi białkami zaangażowanymi w transport poprzez błony biologiczne. Geny je kodujące są ewolucyjnie stare i obecne są we wszystkich żywych organizmach, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. **Identyfikacja genów kodujących transportery ABC w genomach *T. rubrum*, *M. canis* i *T. mentagrophytes*, w oparciu o metody bioinformatyczne**, została szczegółowo opisana przez w części, która związana jest z osiągnięciem habilitacyjnym.

Zdolność do rozkładu keratyny jest uważana za główny czynnik wirulencji dermatofitów. Powiązanie pomiędzy aktywnością keratynolityczną i patogennością wynika z faktu, że dermatofity w czasie infekcji wydzielają endo- i egzo-proteazy, rozkładające struktury bogate w keratynę do oligopeptydów i wolnych aminokwasów, które następnie wykorzystują jako składniki pokarmowe (Mendes, 2012). Dermatofity reagują na zmianę pH środowiska poprzez zmianę profilu ekspresji genów. Adaptacją ewolucyjną jest zdolność syntetyzowania i uwalniania w czasie infekcji enzymów, których optimum aktywności ujawniają w kwaśnym pH, pokrywającym się z naturalnym pH skóry. Aby ocenić wpływ różnych źródeł węgla w podłożu wzrostowym na ekspresję genów kodujących

transportery ABC u gatunków *T. rubrum* i *M. canis*, prowadzono hodowle grzybów w podłożach minimalnych suplementowanych odpowiednio glukozą, keratyną, keratyną z białkiem sojowym, kolagenem, elastyną czy chityną, ale także w podłożach o różnym pH. Na regulację poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za wirulencję dermatofitów rzutują bowiem różne czynniki środowiskowe, w związku z tym zastosowane układy badawcze miały odzwierciedlać warunki jakie napotyka rozwijająca się grzybnia w trakcie zakażenia powierzchniowych warstw skóry. W pierwszej kolejności przeprowadzono doświadczenia mające na celu **wybór odpowiednich genów referencyjnych do ilościowej analizy ekspresji wybranych genów docelowych**, tj. genów kodujących transportery ABC i u *M. canis*, *T. interdigitale* i *T. rubrum* w różnych warunkach eksperymentalnych wspomnianych powyżej, metodą qRT-PCR. Wyboru dokonano spośród wybranych na podstawie analiz bioinformatycznych kandydatów, **analizując ich stabilność przy pomocy algorytmów geNorm, NormFinder, BestKeeper i RefFinder**. Porównanie wyników z doniesieniami literaturowymi potwierdza, że stabilność ekspresji kandydatów na geny referencyjne zmienia się w zależności od rodzaju badanych komórek czy tkanek, ale także zastosowanego układu eksperymentalnego, co potwierdza, że w celu uzyskania wiarygodnych wyników badań, geny do normalizacji wyników qRT-PCR należy dobierać indywidualnie do każdego eksperymentu. Omówione powyżej wyniki zostały opublikowane w trzech pracach oryginalnych:

- **Anita Ciesielska**, Paweł Stączek. **2018**. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR analysis of gene expression in *Microsporum canis* growing under different adhesion-inducing conditions. *Scientific Reports*, 8: 1197.
- **Anita Ciesielska**, Beata Oleksak, Paweł Stączek. **2019**. Reference genes for accurate evaluation of expression levels in *Trichophyton interdigitale* grown under different carbon sources, pH levels and phosphate levels. *Scientific Reports*, 9 : 5566.
- **Anita Ciesielska**, Paweł Stączek. **2021**. Selection and validation of reference genes for qPCR in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum* exposed to different carbon sources which promote adhesion-inducing conditions. *Mycoses*, 64 (3): 300-308.

Na podstawie analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki qRT-PCR wykazano, że zarówno transportery ABC u *T. rubrum* i *M. canis* mogą być zaangażowane w procesy infekcji u obu gatunków. Zaobserwowano bowiem nadekspresję kodujących je genów po inkubacji w podłożach minimalnych suplementowanych różnymi źródłami węgla, a także w podłożach o różnym wyjściowym pH (5.0; 8.0; 10). Przeprowadzono również badania mające na celu ustalenie, czy zidentyfikowane na podstawie analiz bioinformatycznych geny, kodujące niebadane do tej pory transportery rodziny ABC u *T. rubrum* i *M. canis*, rzeczywiście pełnią taką samą rolę jak dobrze poznane transportery TruMDR1 i TruMDR2, występujące m.in u *T. rubrum*. **Badania wykazały, że badane u *T. rubrum* i *M. canis* transportery ABC pełnią analogiczną do opisanych wcześniej TruMDR1 i TruMDR2 u *T. rubrum* funkcję<sup>56,57</sup>, a ekspresja genów białek zawierających motyw LysM jest modulowana przez zastosowane związki przeciwgrzybicze takie jak: amfoterycyna B, gryzeofulwina, itrakonazol, ketokonazol, terbinafina i flukonazol.**

Powyższe dane zostaną również opublikowane jako praca oryginalna, po przeprowadzeniu doświadczenia polegającego na analizie globalnego transkryptomu *T. rubrum* i *M. canis* hodowanego w obecności różnych źródeł węgla, za pomocą metody RNA-seq, co jest jednym z zadań badawczych projektu NCN-SONATA, który będzie opisany w dalszej części rozdziału. Planowany tytuł manuskryptu to: „Analysis of the expression level of the genes encoding multidrug ABC transporters and proteins



containing *LysM* motif from *Microsporium canis* and *Trichophyton rubrum* in response to different carbon sources in the culture medium”.

Po powrocie z drugiego urlopu macierzyńskiego, we wrześniu 2015, byłam przede wszystkim zaangażowana w realizację zadań badawczych projektu NCN-OPUS, który został przeze mnie opisany powyżej, ale postanowiłam poszerzyć badania dermatofitów o nowe analizy. Ponieważ wiedza na temat genów i molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za chorobotwórczość, a także za inne właściwości biologiczne dermatofitów była wciąż stosunkowo skromna, dlatego wydawało mi się, że **analizy metabolomiczne, proteomiczne, wraz z innymi metodami globalnej analizy ekspresji genów, będą odgrywały istotną rolę w zrozumieniu mechanizmów patogenezy**. W tym celu napisałam, już jako Kierownik, projekt pt: „*Analiza ekspresji czynników wirulencji dermatofitów w odpowiedzi na wybrane źródła węgla*”, tym razem w ramach konkursu NCN-SONATA. Projekt otrzymał finansowanie NCN 2016/23/D/NZ7/03964. **Po raz pierwszy na świecie** przeprowadzone zostały **analizy metabolomiczne dwóch gatunków dermatofitów: *T. rubrum* i *M. canis***. Szczegóły dotyczące tych analiz oraz opublikowanej pracy oryginalnej, zostały opisane w części, która związana jest z osiągnięciem habilitacyjnym.

### 5.3. Przyszłe kierunki badań

W ramach projektu badawczego NCN-SONATA, którego jestem Kierownikiem, prowadzone są obecnie równoległe badania z zakresu transkryptomiki i proteomiki *T. rubrum* i *M. canis*. Jest to możliwe, dzięki współpracy jaką nawiązałam, odpowiednio, z Panią mgr Dominiką Głowacką z firmy GENOMED sp. z o.o w Warszawie oraz Panią mgr Agatą Malinowską ze Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas IBB PAN. Bardzo wstępne wyniki analiz transkryptomu i proteomu *Trichophyton rubrum* i *Microsporium canis* w oparciu o metodę RNA-seq i spektrometrię masową LC-MS/MS, wykazały globalną modulację genów oraz zmiany profili białkowych w obecności keratyny. Prowadzone obecnie przeze mnie badania zmian profili białkowych w określonych warunkach wzrostu, w połączeniu z analizą globalnego transkryptomu (RNA-seq) oraz ilościowego qRT-PCR, pozwolą na dokładniejsze poznanie i uzupełnienie wiedzy na temat, m.in. mechanizmów związanych z patogennością dermatofitów jak i innych właściwości biologicznych tej grupy patogenów. Dopiero wtedy możliwe będzie wykorzystanie zdobytej wiedzy do poszukiwań nowych kierunków terapii i działań profilaktycznych. Według mojej wiedzy, jest to pierwsza tak kompleksowa analiza transkryptomiczna i proteomiczna dermatofitów.

Moje przyszłe badania zamierzam również koncentrować na poszukiwaniu nowych skutecznych chemioterapeutyków wykazujących aktywność przeciwgrzybiczą. Pierwsze efekty poszukiwań zostały już opracowane w formie manuskryptu:

- **Anita Ciesielska**, Aleksandra Kowalczyk, Agata Paneth, Paweł Stączek, pt: Evaluation of the antidermatophytic activity of potassium salts of N-acylhydrazinecarbodithioates and their aminotriazole-thione derivatives

i wysłane do czasopisma Scientific Reports (819d9526-7265-4b59-b8c1-4aea22a10d92), który obecnie (stan na 30 maja 2023 roku) jest w recenzji.

Ponadto jestem zaangażowana w realizację dwóch projektów, z których jeden dotyczy mechanizmu działania oraz potencjalnego wykorzystania nowych metaloorganicznych pochodnych fluorochinolonów w leczeniu przewlekłych infekcji bakteryjnych, a drugi na genotypowaniu "ECbiomu" i określeniu jego wpływu na rozwój raka endometrium. W obu projektach jestem odpowiedzialna za

przygotowanie materiału genetycznego do oceny transkryptomicznej oraz analizę uzyskanych wyników.

## 6. Wykaz cytowanej literatury w rozdz. 4 i 5.

1. Baert, F. et al. Updating the Taxonomy of Dermatophytes of the BCCM/IHEM Collection According to the New Standard: A Phylogenetic Approach. *Mycopathologia* **185**, 161–168 (2020).
2. Kunert, J. Physiology of keratinophilic fungi. *Rev Iberoam Micol* **17**, 77–85 (2000).
3. Hubálek, Z. Keratinophilic fungi associated with free-living mammals and birds. *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi* 93:1036 (2000).
4. Joseph, V. Aspergillosis in raptors. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **9**, (2000).
5. Garg, A. P., Gandotra, S., Mukerji, K. G. & Pugh, G. J. F. Ecology of keratinophilic fungi. *Proceedings: Plant Sciences* **94**, 149–163 (1985).
6. Hubálek, Z. Fungi associated with free living birds in Czechoslovakia and Yugoslavia. *ACTA SC.NAT.BRNO* **8**, (1974).
7. Hubálek, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis* **40**, 639–659 (2004).
8. Korniłowicz-Kowalska, T. Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. P. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. *Acta Mycol* **175**, 43–56 (1997).
9. Guimarães, A. O. et al. Parasitic and fungal infections in synanthropic rodents in an area of urban expansion, Aracaju, Sergipe State, Brazil. *Acta Sci Biol Sci* **36**, (2014).
10. Thomas, M., Abraham Samuel, K. & Kurian, P. Rodentborne fungal pathogens in wetland agroecosystem. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**, (2012).
11. Gokulshankar, S. , R. A. J. A. , R. M. S. , R. S. and P. R. Role Chrysosporium keratinophilum in the parasitic evolution of dermatophytes. *Mycoses* **48**, 442–446 (2005).
12. Korniłowicz-Kowalska, T. & Bohacz, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management* vol. 31 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024> (2011).
13. Krawczyk, B., Samet, A., Leibner, J., Śledzińska, A. & Kur, J. Evaluation of a PCR melting profile technique for bacterial strain differentiation. *J Clin Microbiol* **44**, 2327–2332 (2006).
14. Leibner-Ciszak, J., Dobrowolska, A., Krawczyk, B., Kaszuba, A. & Stączek, P. Evaluation of a PCR melting profile method for intraspecies differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J Med Microbiol* **59**, 185–192 (2010).
15. Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H. & Watanabe, K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J Biosci Bioeng* **102**, (2006).
16. Grazziotin, A., Pimentel, F. A., De Jong, E. V. & Brandelli, A. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Anim Feed Sci Technol* **126**, (2006).
17. Ciesielska, A., Korniłowicz-Kowalska, T., Kitowski, I. & Bohacz, J. The dispersal of rodent-borne strains of *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* by pellets of predatory birds. *Avian Biol Res* **10**, 218–230 (2017).
18. Korniłowicz, T. Studies on mycoflora colonizing raw keratin wastes in arable soil. *Mycologica* **27**, 231–245 (1991).
19. Otčenášek, M., Dvořák, J. & Kunert, J. Geographic distribution of the geophilic dermatophytes in the soil. *Mycopathol Mycol Appl* **31**, (1967).
20. Bohacz, J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J Microbiol Biotechnol* **33**, (2017).
21. Baeza, L. C., Matsumoto, M. T., Almeida, A. M. F. & Mendes-Giannini, M. J. S. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. *J Med Microbiol* **55**, (2006).
22. Korniłowicz-Kowalska, T. & Bohacz, J. Some correlations between the occurrence frequency of keratinophilic fungi and selected soil properties. *Acta Mycol* **37**, (2014).
23. Gupta, A. & Chattoo, B. B. Functional analysis of a novel ABC transporter ABC4 from *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett* **278**, (2008).
24. Nishi, K. et al. A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins. *Mol Microbiol* **6**, (1992).
25. Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* vol. 92 Preprint at <https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295> (2000).
26. Paumi, C. M., Chuk, M., Snider, J., Stagljar, I. & Michaelis, S. ABC Transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and Their Interactors: New Technology Advances the Biology of the ABCC (MRP) Subfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**, (2009).
27. Klein, M. et al. The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett* **520**, (2002).
28. Verrier, P. J. et al. Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* **13**, (2008).
29. Lamping, E. et al. Fungal PDR transporters: Phylogeny, topology, motifs and function. *Fungal Genetics and Biology* **47**, (2010).
30. Posteraro, B. et al. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Mol Microbiol* **47**, (2003).
31. Mikolay, A. & Nies, D. H. The ABC-transporter AtmA is involved in nickel and cobalt resistance of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **96**, (2009).
32. Huang, J. et al. Fission yeast HMT1 lowers seed cadmium through phytochelatin-dependent vacuolar sequestration in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **158**, (2012).
33. Chloupková, M., LeBard, L. S. & Koeller, D. M. MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: Evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J Mol Biol* **331**, (2003).
34. Miao, R. et al. Biophysical characterization of the iron in mitochondria from Atm1p-depleted *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **48**, (2009).

35. Bauer, B. E., Wolfger, H. & Kuchler, K. Inventory and function of yeast ABC proteins: About sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1461 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00160-1) (1999).
36. Rouault, T. A. Iron-sulfur proteins hiding in plain sight. *Nature Chemical Biology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nchembio.1843> (2015).
37. Kovalchuk, A. & Driessen, A. J. M. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. *BMC Genomics* **11**, (2010).
38. Kispal, G. *et al.* Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO Journal* **24**, (2005).
39. Bayram, Ö. & Braus, G. H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiology Reviews* Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x> (2012).
40. Wirthgen, E., Hoeflich, A., Rebl, A. & Günther, J. Kynurenic Acid: The Janus-faced role of an immunomodulatory tryptophan metabolite and its link to pathological conditions. *Frontiers in Immunology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01957> (2018).
41. Kantún-Moreno, N. *et al.* Genome-Wide in silico identification of gpi proteins in mycosphaerella fijiensis and transcriptional analysis of two GPI-anchored  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferases. *Mycologia* **105**, 285–296 (2013).
42. Muszewska, A., Piśtyk, S., Perlińska-Lenart, U. & Kruszewska, J. S. Diversity of cell wall related proteins in human pathogenic fungi. *Journal of Fungi* **4**, (2018).
43. Kasperova, A., Kunert, J. & Raska, M. The possible role of dermatophyte cysteine dioxygenase in keratin degradation. *Medical Mycology* vol. 51 449–454 Preprint at <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.794310> (2013).
44. Grumbt, M. *et al.* Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *Journal of Investigative Dermatology* **133**, 1550–1555 (2013).
45. Dietl, A. M., Meir, Z., Shadkchan, Y., Oshero, N. & Haas, H. Riboflavin and pantothenic acid biosynthesis are crucial for iron homeostasis and virulence in the pathogenic mold aspergillus fumigatus. *Virulence* **9**, 1036–1049 (2018).
46. Stahmann, K. P. *et al.* Riboflavin, overproduced during sporulation of *Ashbya gossypii*, protects its hyaline spores against ultraviolet light. *Environ Microbiol* **3**, 545–550 (2001).
47. Maranhão, F. C. A., Paião, F. G. & Martinez-Rossi, N. M. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microb Pathog* **43**, (2007).
48. Konieczna, A., Łyżeń, R. & Węgrzyn, G. Powiązanie glikolizy z regulacją replikacji DNA w komórkach eukariotycznych. *Postępy biochemii* vol. 61 444–460 Preprint at (2015).
49. Cove, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation* **113**, 51–56 (1966).
50. Liang, X., Dickman, M. B. & Becker, D. F. Proline biosynthesis is required for endoplasmic reticulum stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 27794–27806 (2014).
51. Bakti, F. *et al.* Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus *aspergillus nidulans*. *Acta Microbiol Immunol Hung* **64**, (2017).
52. Lu, Z. *et al.* Para-aminobenzoic acid (PABA) synthase enhances thermotolerance of mushroom *agaricus bisporus*. *PLoS One* **9**, (2014).
53. Mead, O., Thynne, E., Winterberg, B. & Solomon, P. S. Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *PLoS One* **8**, (2013).
54. Sánchez, O. & Aguirre, J. Efficient Transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of Germinated Conidia. *Fungal Genet Rep* **43**, (1996).
55. Yamada, T. *et al.* Itraconazole resistance of *Trichophyton rubrum* mediated by the ABC transporter TruMDR2. *Mycoses* **64**, (2021).
56. Monod, M. *et al.* *Trichophyton rubrum* azole resistance mediated by a new ABC transporter, TruMDR3. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, (2019).

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

Jeszcze jako studentka V roku na kierunku mikrobiologia, specjalność genetyka, pracowałam jako wolontariusz, w zespole prof. dr hab. Jacka Kuźnickiego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej, w Laboratorium Neurodegeneracji. Przez okres 4 miesięcy (od lutego do maja 2003 roku), co dwa tygodnie poznawałam różne techniki, które Laboratorium wykorzystywało do swoich badań. Wolontariat miał również przybliżyć mi tematykę badawczą, którą chciałam realizować w ramach studium doktoranckiego Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN. W czerwcu 2003 roku na drodze rekrutacji zostałam przyjęta na studia doktoranckie. W między czasie otrzymałam również propozycję realizacji doktoratu w mojej macierzystej jednostce, Zakładzie Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Jaworskiego, którego propozycję ostatecznie przyjąłem i od 1 października 2003 rozpocząłem studia doktoranckie.

W trakcie trwania mojego doktoratu miałam możliwość uczestnictwa w wyjeździe naukowym dla doktorantów, który odbył się w terminie 24.08 - 12.09. 2005, dzięki współpracy Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ z francuskim Uniwersytetem Claude Bernard'a w Lyonie. Prowadzone były badania związane z ekotoksykologią Zatoki Tulońskiej. Badane były fizykochemiczne czynniki środowiskowe będące źródłem stresu w ekosystemach wodnych Zatoki.

Pod koniec 2006 roku nawiązałam współpracę z zespołem prof. dr hab. Józefa Kura z Katedry Mikrobiologii, Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, który specjalizował się w nowoczesnych metodach genetycznych wykorzystywanych do szeroko pojętego genotypowania różnych patogenów człowieka. W czerwcu 2007 roku odbyłam 4-tygodniowy staż w Katedrze Profesora Józefa Kura, gdzie pod opieką dr Beaty Krawczyk nauczyłam się jednej z metod do różnicowania genetycznego, jaką była PCR-MP (PCR-Melting Profile). Efektem mojego stażu w Katedrze Mikrobiologii PG, była realizacja jednego z celów mojej pracy doktorskiej, jaką było zastosowanie techniki PCR MP do ustalania struktury klonalnej w obrębie gatunków *Trichophyton rubrum* i *Microrosporum canis*. Dodatkowo współpraca ta zaowocowała publikacją w roku 2010 autorstwa: Justyna Leibner-Ciszak, **Anita Dobrowolska**, Beata Krawczyk, Aleksandra Kaszuba, Paweł Stączek., pt: „Evaluation of PCR MP metod for inter-species differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*” J. Med. Microbiol. 59: 185-192.

W roku 2007 aplikowałam w konkursie IUMS-Fellowship organizowanym przez The International Union of Microbiological Societies (IUMS), światowej federacji krajowych i międzynarodowych towarzystw oraz innych organizacji mających wspólny interes w naukach mikrobiologicznych. Krótkoterminowe stypendium IUMS jest programem mającym na celu umożliwienie młodym mikrobiologom zdobycia wiedzy teoretycznej lub technicznej w laboratoriach w krajach uprzemysłowionych lub rozwiniętych. Na 4-tygodniowy staż (31.08-30.09.2007) w ramach stypendium IUMS wybrałam laboratorium Profesora Koichi Makimury - Institute of Medical Mycology, Teikyo University, Tokio, Japonia. Zespół Profesora Makimury prowadził m.in. badania nad dermatofitami, którymi zajmowałam się w ramach mojej pracy doktorskiej. Celem mojego stażu było zapoznanie się merytoryczne i praktyczne z systemami transformacji grzybów strzępkowych. Efektem mojego pobytu w Japonii, była realizacja jednego z celów mojej rozprawy doktorskiej jakim było opracowanie układu szczep-gospodarz/wektor plazmidowy dla wydajnej transformacji genetycznej oraz selekcji stabilnych, integracyjnych mutantów *Trichophyton rubrum*. Wyniki tej części badań zostały opublikowane w 2009 roku (**Anita Dobrowolska**, Paweł Stączek. 2009. Development of transformation system for *Trichophyton rubrum* by electroporation of germinated conidia. Curr. Genet. 55: 537-542.). Inną metodą, którą poznałam w trakcie stażu w laboratorium Profesora Makimury był system transformacji z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*. Zdobytą wiedzę przekazałam jednej z moich przyszłych magistrantek (p. Kamila Wypyszczak), nad którą sprawowałam merytoryczną opiekę naukową, co zaowocowało, pomimo mojej nieobecności z powodu urlopu macierzyńskiego, realizacją pracy magisterskiej w roku 2011 pt: „Transformacja wybranych szczepów dermatofitów za pomocą metody ATMT”. Dodatkowo wyniki pracy magisterskiej były prezentowane w sesji plakatowej w 2011 roku na międzynarodowej konferencji naukowej Trends in Medical Mycology (TIMM-5), która odbyła się w Walencji (Hiszpania). Tytuł doniesienia: Transformation of *Agrobacterium tumefaciens* strains using vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi”; autorzy: Joanna Dębska, Kamila Wypyszczak i **Anita Ciesielska**. Na moją aktywność naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni po uzyskaniu stopnia doktora składają się również współprace opisane w poprzednim rozdziale.

8. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

8.1. Działalność dydaktyczna

8.1.1. Wykaz zajęć dydaktycznych realizowanych przeze mnie w czasie zatrudnienia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, na kierunku Biologia, Genetyka, Mikrobiologia, Biotechnologia I i II<sup>o</sup>:

- Genetyka ogólna i drobnoustrojów – prowadzenie wykładów i ćwiczeń (od roku 2003/2004 do 2018/2019)
- Genetyka drobnoustrojów – (od roku 2004/2005)
- Techniki mikrobiologiczne (rok 2008/2009, 2009/2010)
- Metody instrumentalne (rok 2009/2010)
- Genetyka ogólna – prowadzenie wykładów i ćwiczeń (od roku 2019/2020)
- Biologia molekularna – prowadzenie wykładów i ćwiczeń (od roku 2013/2014)
- Molekularna identyfikacja i różnicowanie grzybów chorobotwórczych i środowiskowych - pracownia specjalistyczna w ramach bloku Metody zaawansowanych technik w badaniach naukowych i w diagnostyce (od roku 2019/2020)
- Identyfikacja grzybów chorobotwórczych za pomocą techniki PCR-RFLP – pracownia specjalistyczna (od roku 2013/2014)
- Analiza ekspresji genów za pomocą techniki qPCR – pracownia specjalistyczna w ramach: bloku Metody zaawansowanych technik w badaniach naukowych i w diagnostyce oraz bloku Metody zaawansowanych technik w badaniach naukowych i w praktyce (od roku 2019/2020)
- Podstawy genetyki dla biotechnologów – prowadzenie wykładów (od roku 2020/2021)
- Dziedziczenie cech człowieka – opracowanie treści kształcenia (od roku 2020/2021)
- Molekularne podstawy dziedziczenia cech - opracowanie treści kształcenia (od roku 2020/2021)
- Pracownie magisterskie (od roku 2009/2010)
- Seminarium licencjackie (od roku 2012/2013)
- Seminarium magisterskie (od roku 2021/2022)

W roku akademickim 2020/2021 byłam opiekunem Studenckiego Grantu Badawczego IDUB UŁ „Analiza poziomu ekspresji genów kodujących wielolekowe transportery ABC u *Microsporium canis* w odpowiedzi na wybrane leki przeciwgrzybicze w podłożu wzrostowym” – studentka II roku biotechnologii medycznej II stopnia, Marcela Łaszkiwicz.

8.1.2. Wykaz prac doktorskich, magisterskich, licencjackich, w których pełniłam rolę opiekuna naukowego/kierującego pracą.

W latach 2003-2023 była opiekunem naukowym **1** pracy doktorskiej i **16** prac magisterskich oraz kierującym **2** prac magisterskich i **9** prac licencjackich.

<b>Opiekun naukowy prac doktorskich:</b>	
1.	<b>Joanna Dębska</b> - <i>Badania różnicowania struktury klonalnej szczepów <i>Microsporium canis</i> i niektórych, innych gatunków dermatofitów izolowanych od ludzi i zwierząt w Polsce.</i> Data obrony: 18 września 2012



<b>Opiekun naukowy prac magisterskich:</b>	
1.	<b>Wioletta Wujcicka</b> – <i>Badania genetyczne dermatofitów.</i> Data egzaminu dyplomowego: 23 czerwca 2006
2.	<b>Joanna Dębska</b> - <i>Zastosowanie genu syntezy chitynowej 1 (chs1) jako wyznacznika genetycznego w molekularnej identyfikacji dermatofitów.</i> Data egzaminu dyplomowego: 26 czerwca 2008
3.	<b>Kamila Wypyszczak</b> - <i>Transformacja wybranych szczepów dermatofitów za pomocą metody ATMT.</i> Data egzaminu dyplomowego: 29 czerwca 2011
4.	<b>Agnieszka Kuleta</b> - <i>Molekularna identyfikacja i różnicowanie grzybów środowiskowych z rodzaju Chrysosporium sp. izolowanych z wypluwek gawrona zwyczajnego (Corvus frugilegus frugilegus) na terenie Lubelszczyzny.</i> Data egzaminu dyplomowego: 26 czerwca 2014 Praca finansowana z projektu badawczego MNiSW N304 0990 39, Kierownik projektu: Anita Ciesielska
5.	<b>*Beata Siurek</b> - <i>Lokalizacja polimorfizmów w obrębie genów kodujących transportery ABC oraz genów kodujących białka zawierające domeny LysM Trichophyton rubrum.</i> Data egzaminu dyplomowego: 20 czerwca 2016 Praca finansowana z projektu badawczego NCN-OPUS 2014/13/B/NZ7/02307, Kierownik projektu: Paweł Stączek, Główny Wykonawca projektu – Anita Ciesielska
6.	<b>*Agnieszka Staniszewska</b> - <i>Lokalizacja polimorfizmów w obrębie genów kodujących transportery ABC, oraz genów kodujących białka z domenami LysM Microsporum canis.</i> Data egzaminu dyplomowego: 20 czerwca 2016 Praca finansowana z projektu badawczego NCN-OPUS 2014/13/B/NZ7/02307, Kierownik projektu: Paweł Stączek, Główny Wykonawca projektu – Anita Ciesielska
7.	<b>*Ewelina Lechowicz</b> - <i>Analiza aktywności antydermatofitowej wybranych pochodnych tiosemikarbazydów.</i> Data egzaminu dyplomowego: 28 czerwca 2017 Praca finansowana z projektu badawczego NCN-OPUS 2014/13/B/NZ7/02307, Kierownik projektu: Paweł Stączek, Główny Wykonawca projektu – Anita Ciesielska
8.	<b>Paulina Tkacz</b> - <i>Analiza poziomu ekspresji genów kodujących wielolekowe transportery ABC oraz genów kodujących białka zawierające motywy LysM u Trichophyton rubrum w odpowiedzi na leki przeciwgrzybicze w podłożu wzrostowym.</i> Data egzaminu dyplomowego: 26 czerwca 2017 Praca finansowana z projektu badawczego NCN-OPUS 2014/13/B/NZ7/02307, Kierownik projektu: Paweł Stączek, Główny Wykonawca projektu – Anita Ciesielska
9.	<b>*Ewelina Lechowicz</b> - <i>Analiza poziomu ekspresji genów kodujących wielolekowe transportery ABC oraz genów kodujących białka zawierające motywy Lys M u Trichophyton rubrum w odpowiedzi na różne źródła węgla w podłożu wzrostowym.</i> Data egzaminu dyplomowego: 29 października 2018 Praca finansowana z projektu badawczego NCN-OPUS 2014/13/B/NZ7/02307, Kierownik projektu: Paweł Stączek, Główny Wykonawca projektu – Anita Ciesielska
10.	<b>Beata Oleksak</b> - <i>Wybór genów referencyjnych do ilościowego oznaczenia ekspresji genów Trichophyton interdigitale metodą real-time PCR.</i> Data egzaminu dyplomowego: 22 czerwca 2018 Praca finansowana z projektu badawczego NCN-SONATA 2016/23/D/NZ7/03964, Kierownik projektu: Anita Ciesielska oraz z projektu badawczego NCN-OPUS 2014/13/B/NZ7/02307, Kierownik projektu: Paweł Stączek, Główny Wykonawca projektu – Anita Ciesielska
11.	<b>Karolina Jakubanis</b> - <i>Proteomiczna analiza zmian profili białek frakcji wewnątrzkomórkowej u Trichophyton rubrum pod wpływem działania pochodnej tiosemikarbazydu.</i> Data egzaminu dyplomowego: 19 czerwca 2019 Praca finansowana z projektu badawczego NCN-OPUS 2014/13/B/NZ7/02307, Kierownik projektu: Paweł Stączek, Główny Wykonawca projektu – Anita Ciesielska

12.	<p><b>*Katarzyna Kanarek</b> - <i>Proteomiczna analiza zmian profili białek ściany komórkowej u <i>Microsporium canis</i> hodowanego na podłożu minimalnym o kwaśnym pH i suplementowanym keratyną.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 19 czerwca 2019          Praca finansowana z projektu badawczego NCN-SONATA 2016/23/D/NZ7/03964,          Kierownik projektu: Anita Ciesielska</p>
13.	<p><b>*Anna Kawa</b> - <i>Proteomiczna analiza zmian profili białek ściany komórkowej u <i>Trichophyton rubrum</i> hodowanego na podłożu minimalnym o kwaśnym pH i suplementowanym keratyną.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 19 czerwca 2019          Praca finansowana z projektu badawczego NCN-SONATA 2016/23/D/NZ7/03964,          Kierownik projektu: Anita Ciesielska.</p>
14.	<p><b>Ewelina Iskra</b> - <i>Analiza poziomu ekspresji genów kodujących subtylizyny i metaloproteazy u <i>Trichophyton rubrum</i> w odpowiedzi na leki przeciwgrzybicze w podłożu wzrostowym.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 2 lipca 2020</p>
15.	<p><b>Olga Głuśniewska</b> - <i>Wybór genów referencyjnych do ilościowego oznaczania ekspresji genów <i>Trichophyton rubrum</i> metodą qPCR.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 2 lipca 2020          Praca finansowana z projektu badawczego NCN-SONATA 2016/23/D/NZ7/03964,          Kierownik projektu: Anita Ciesielska</p>
16.	<p><b>Marcela Łaszkiwicz</b> - <i>Analiza poziomu ekspresji genów kodujących wielolekowe transportery ABC u <i>Microsporium canis</i> w odpowiedzi na wybrane leki przeciwgrzybicze w podłożu wzrostowym.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 9 lipca 2021</p>
<b>Kierujący pracą magisterską:</b>	
1.	<p><b>Daria Kaidash</b> - <i>Rola białek szoku cieplnego w adaptacji komórek <i>Trichophyton rubrum</i>.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 1 lipca 2022</p>
2.	<p><b>Marta Kowalska</b> - <i>Rola pomp wyrzutowych w adaptacji komórek <i>Trichophyton rubrum</i>.</i></p> <p>Planowana data egzaminu dyplomowego: czerwiec/lipiec 2023</p>
<b>Kierujący praca licencjacką:</b>	
1.	<p><b>Olga Józwiak</b> - <i>Podobieństwa i różnice w funkcjonowaniu i strukturze operonów organizmów prokariotycznych i eukariotycznych.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 2 lipca 2010</p>
2.	<p><b>Ewa Kępka</b> - <i>Amplifikacja DNA in vitro (PCR) - mechanizm reakcji oraz przykłady zastosowań w diagnostyce i epidemiologii.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 2 lipca 2010</p>
3.	<p><b>Joanna Wojciechowska</b> - <i>Bakteriofagi - cenne narzędzie współczesnej biotechnologii i medycyny.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 1 lipca 2016</p>
4.	<p><b>Joanna Klimecka</b> - <i>Zjawisko rekombinacji w świecie bakterii.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 24 września 2018</p>
5.	<p><b>Izabela Gulbas</b> - <i>CRISPR-Cas9- metoda inspirowana prokariotycznym systemem obrony przed obcym DNA, jako nowe narzędzie w inżynierii genetycznej.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 5 lipca 2017</p>
6.	<p><b>Aleksandra Tomaszewska</b> - <i>Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF i LC-MS/MS w badaniu drobnoustrojów.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 3 czerwca 2019</p>
7.	<p><b>Marta Kowalska</b> - <i>Hydrofobiny – charakterystyka, funkcje oraz zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 6 lipca 2021</p>
8.	<p><b>Agnieszka Sobieszek</b> - <i>Rola białek szoku termicznego u dermatofitów.</i></p> <p>Data egzaminu dyplomowego: 1 lipca 2022</p>
9.	<p><b>Marta Świerkosz</b> - <i>Alternatywne metody dla stosowania antybiotyków w leczeniu zakażeń bakteryjnych.</i></p> <p>Planowana data egzaminu dyplomowego: czerwiec/lipiec 2023</p>

\*studentki, które były Wykonawcami w projektach naukowych pozyskanych ze źródeł NCN w ramach konkursu OPUS (2014/13/B/NZ7/02307, Kierownik projektu: Paweł Stączek, Główny Wykonawca projektu – Anita Ciesielska) i SONATA (2016/23/D/NZ7/03964, Kierownik projektu: Anita Ciesielska).

### 8.1.3. Publikacje i doniesienia konferencyjne opracowane z udziałem studentów

- **Publikacja stanowiąca pozostały dorobek habilitantki:** Anita Ciesielska, **Beata Oleksak**, Paweł Stączek. **2019**. *Reference genes for accurate evaluation of expression levels in *Trichophyton interdigitale* grown under different carbon sources, pH levels and phosphate levels*. **Scientific Reports**, 9 : 5566.  
**Wkład własny studentki:** współudział w przeprowadzeniu reakcji RT-qPCR z wykorzystaniem cDNA i 3 starterów komplementarnych do genów referencyjnych (łącznie zaprojektowano 9 starterów komplementarnych do genów referencyjnych, pozostałe amplifikacje z udziałem 6 starterów zostały przeprowadzone przez habilitantkę).
- **Publikacja stanowiąca osiągnięcie habilitantki:** Anita Ciesielska, **Anna Kawa**, **Katarzyna Kanarek**, Adrian Soboń, Rafał Szewczyk. **2021**. *Metabolomic analysis of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* during keratin degradation*. **Scientific Reports**, Feb 17;11(1):3959.  
**Wkład własny studentek:** ekstrakcja metabolitów wewnątrzkomórkowych *Trichophyton rubrum* i *Microsporum canis*
- **Plakat:** Anita Ciesielska, Adrian Soboń, **Karolina Jakubanis**, Rafał Szewczyk, Aleksandra Kowalczyk, Paweł Stączek (20-24.06.2019) **ASM Microbe 2019, San Francisco, USA**. *Evaluation of the Morphological and Proteomic Effects of the Thiosemicarbazide Derivative on *Trichophyton rubrum* In Vitro*.  
**Wkład własny studentki:** izolacja białek wewnątrzkomórkowych *Trichophyton rubrum* po ekspozycji na badany związek, przygotowanie rycin do plakatu.
- **Plakat:** **Anna Kawa**, **Katarzyna Kanarek**, Adrian Soboń, Anita Ciesielska (26-28.06.2019) Łódź, Poland. **8th International Weigl Conference**. *Metabolomic profiling of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* growing under keratin condition*.  
**Wkład własny studentek:** ekstrakcja metabolitów wewnątrzkomórkowych *Trichophyton rubrum* i *Microsporum canis*, przygotowanie plakatu.
- **Plakat:** **Katarzyna Kanarek**, **Anna Kawa**, Adrian Soboń, Anita Ciesielska (26-28.06.2019) Łódź, Poland. **8th International Weigl Conference**. *Comparison of cell surface and cell wall proteins of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* growing under keratin condition*.  
**Wkład własny studentek:** ekstrakcja białek powierzchniowych i związanych ze ścianą komórkową *Trichophyton rubrum* i *Microsporum canis*, przygotowanie plakatu.
- **Prezentacja ustna:** **Daria Kaidash**, Anita Ciesielska. (27.05.2022) **59 Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej, Łódź, Polska**. *Rola białek szoku cieplnego w adaptacji komórek *Trichophyton rubrum**.  
**Wkład własny studentki:** zebranie literatury i przygotowanie pierwszej wersji prezentacji na konferencję.

## 8.2. Działalność organizacyjna

Od momentu zatrudnienia w Zakładzie Genetyki Drobnoustrojów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego jestem odpowiedzialna za koordynowanie prac związanych z planowaniem zajęć dydaktycznych, zamówieniami publicznymi, prowadzeniem ewidencji wykorzystania funduszy Zakładu Genetyki Drobnoustrojów, a od 1 września 2020 roku Katedry Mikrobiologii Molekularnej. W kadencji 2016-2020 oraz bieżącej 2020-2024 jestem członkinią Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska reprezentującą niesamodzielną pracowników badawczo-dydaktycznych. W kadencji 2016-2020 oraz 2020-2024 członkini Wydziałowej Komisji Oceniającej Nauczycieli Akademickich. W kadencji 2020-2024 zostałam powołana przez JM Rektora prof. dr hab. Elżbietę Żądzińską do pełnienia funkcji Pełnomocnika Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska ds. kierunku biotechnologia i mikrobiologia. W kadencji 2020-2024 jestem również członkinią: (i) Wydziałowej Komisji ds. jakości kształcenia, (ii) Wydziałowej Komisji Dydaktycznej dla kierunku Biotechnologia, (iii) Wydziałowej Komisji Dydaktycznej dla kierunku Mikrobiologia, (iv) Komisji Rektorskiej ds. regulaminu studiów.

## 8.3. Działalność popularyzująca naukę

Od 2008 roku jestem członkinią Wydziałowej Komisji ds. Promocji WBiOŚ UŁ. Brałam udział w licznych imprezach związanych z popularyzacją nauki oraz mających na celu pozyskanie nowych kandydatów na studia, m.in.: (i) Targi Edukacyjne, Salon Maturzystów organizowany przez PERSPEKTYWY w latach 2008, 2009 i 2010; (ii) współorganizator Dni Otwartych dla kandydatów na studia biologiczne, mikrobiologiczne i biotechnologiczne w latach 2008, 2009 i 2010; (iii) współorganizator Dni Otwartych dla kandydatów na studia w Piotrkowie Trybunalskim w roku 2009; (iv) Główny Koordynator odpowiedzialny za organizację Pikniku Naukowego Uniwersytetu Łódzkiego w roku 2010; w 2006 roku wraz z opiekunami Sekcji Mikrobiologicznej Studenckiego Koła Naukowego Biologów brałam udział w letnim obozie naukowym w Jarcewie w Stacji Terenowej w Treście Rządowej. Podczas wymienionych obozów naukowych studenci doskonalili swoje umiejętności prowadząc badania czystości mikrobiologicznej wód okolicznych zbiorników (vi) od 2011 roku jestem Głównym Wydziałowym Koordynatorem Ogólnopolskiej Akcji „Noc Biologów”.

## 9. Nagrody i wyróżnienia

- **Nagroda naukowa JM Rektora UŁ** za cykl publikacji związany z rozprawą doktorską pt. *Badania genetyczne dermatofitów: molekularna identyfikacja i różnicowanie szczepów klinicznych, opracowanie wektorów plazmidowych oraz systemów transformacji Trichophyton sp., rok 2008*
- **I Nagroda w konkursie im. Profesora Wacława Szybalskiego za najlepszą pracę młodego biotechnologa** uzyskana w **2008 roku** na 26 Kongresie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego w Szczecinie za prezentację wyników pt. *Genetic studies of dermatophytes: plasmid vectors and transformation systems for Trichophyton rubrum.*
- **Laureatka Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju pod patronatem Prezes Urzędu Patentowego RP, w kategorii „Naukowiec Przyszłości”** za prace związane z realizacją grantu badawczego SONATA-12 pt. *Analiza ekspresji czynników wirulencji dermatofitów w odpowiedzi na wybrane źródła węgla., rok 2019*

- **Nagroda indywidualna JM Rektora UŁ** za działalność organizacyjną na rzecz Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska i Uniwersytetu Łódzkiego – rok 2019, rok 2021, rok 2022
- **Nagroda Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska indywidualna I stopnia** za osiągnięcia dydaktyczne istotne dla zapewnienia wysokiego poziomu procesu dydaktycznego i jakości kształcenia w roku akademickim 2020/2021
- **Nagroda JM Rektor UŁ**, przyznana w grudniu 2022 roku, za istotny wkład w ewaluację jakości działalności naukowej w Uniwersytecie Łódzkim w latach 2017-2021.

## 10. Kursy i szkolenia

- **Zastosowanie techniki Real Time PCR w analizie ekspresji genów i detekcji mikroorganizmów** (17-19.01.2017) – szkolenie organizowane przez firmę Amplicon, Wrocław.
- **Podstawy technik LC-MS/MS w oznaczeniach ilościowych** (05-07.03.2018) – szkolenie organizowane przez MS Ekspert i MASDIAG, Warszawa
- **Wysokorozdzielcza spektrometria mas dla każdego** (03.2019) – szkolenie organizowane przez firmę SCIEX
- **MS EXCEL w pracy dydaktyka** 7.02.2020 (Nowe Kształcenie UŁ)
- **Pomiar dydaktyczny zadania zamknięte.** 23-30.04.2020 (EDUKAMP) - zapoznanie uczestników z wybranymi formami pomiaru dydaktycznego, jakimi są zadania zamknięte; tworzenie różnych typów zadań zamkniętych i ich ocena. Zwiększenie kompetencji dydaktycznych i informatycznych.
- **Zdalne nauczanie w MS Teams od podstaw** 03.04.2020 (darmowe szkolenie UŁ)
- **Moodle podstawowe narzędzia** 30.04.2020 (Nowe Kształcenie UŁ) - nauczanie zdalne z wykorzystaniem platformy e-learningowej Moodle
- **Innowacyjne metody pracy z wykorzystaniem TI.** 12.10-16.10.2020 (EDUKAMP) - zapoznanie z metodyką prowadzenia zajęć dydaktycznych wspomaganych użyciem narzędzi/aplikacji TI oraz nabycie umiejętności ich wykorzystania we własnej dydaktyce. Zwiększenie kompetencji dydaktycznych i informatycznych.
- **Kształcenie kompetencji menadżerskich. Zarządzanie zespołem pracowniczym.** 29.10-17.12.2020 (EDUKAMP) - pozyskanie praktycznych umiejętności pozwalających na sprawne zarządzanie zasobami ludzkimi i finansowymi, zwiększenie miękkich kompetencji z zakresu kierowania, organizacji pracy, jak również strategicznych aspektów zarządzania.
- **Zakończenie sesji w Moodle** – 14.01.2021 (darmowe szkolenie UŁ)
- **Zarządzanie wielokulturowością.** 20 stycznia 2021 (BUILD UP UŁ) – wsparcie integracji i efektywnej komunikacji w zróżnicowanym kulturowo środowisku uczelni.
- **Metodyka kształcenia online.** 22-23 marca 2021 (BUILD UP UŁ) - budowanie kompetencji kadry akademickiej i administracyjnej oraz podnoszenie zdolności instytucjonalnej w zakresie umiędzynarodowienia Uniwersytetu Łódzkiego
- **Quantitative methods for Biology.** 22.03-26.07.2021 kurs on-line realizowany przez Harvard University obejmował podstawy oprogramowania MATLAB®, które jest środowiskiem programistycznym przeznaczonym do rozwijania algorytmów, wizualizacji i analizy danych.



Autoreferat - Załącznik nr 2a

- **Szkolenie z zakresu radzenia sobie ze stresem i emocjami** organizowane przez Uniwersytet Łódzki w ramach projektu „(Nie) Pełnosprawny Student UŁ” (08.12.2022)
- **Szkolenie z kompetencji emocjonalnych z empatią** organizowane przez Uniwersytet Łódzki w ramach projektu „(Nie) Pełnosprawny Student UŁ” (17.11.2022)
- **Szkolenie z komunikacji interpersonalnej z elementami asertywności** organizowane przez Uniwersytet Łódzki w ramach projektu „(Nie) Pełnosprawny Student UŁ” (31.01.2023 r.)



(podpis wnioskodawcy)