

Załącznik nr 2A
do Wniosku z dn. 11.07.2016
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr n. biol. Joanna Homa

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, czerwiec 2016

1. Imię i nazwisko

Joanna Homa

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Magister biologii środowiska: tytuł uzyskany w dn. 09.06.2000 na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego

praca magisterska pt. "Wpływ metali ciężkich na celomocyty dżdżownic"

promotor: Prof. dr hab. Barbara Płytycz

recenzent: Prof. dr hab. Józefa Styrna

Doktor nauk biologicznych: stopień uzyskany w dn. 20.06.2005 na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego

rozprawa doktorska pt. "Wpływ metali ciężkich na organizm i celomocyty dżdżownicowatych"

promotor: Prof. dr hab. Barbara Płytycz

recenzenci:

Prof. dr hab. Skowron-Cendrzak

dr hab. Teresa Szklarzewicz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1.10.2000 – 31.10.2004: studia doktoranckie, doktorat wykonywany w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

01.12.2004 – 30.09.2007 – asystent naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

Od 01.10.2007 – adiunkt w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Mechanizmy obronne dżdżownic zaangażowane w odpowiedź na patogeny i czynniki środowiskowe.

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autorzy, rok wydania, tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa):

Współczynnik cytowalności - Impact factor (IF) podano wg Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania pracy, punkty MNiSW wg wykazu czasopism naukowych MNiSW (lista A) opublikowanego w dniu 23.12.2015; liczbę cytowań wg Web of Science (dane z dnia 28.06.2016).

1. **Homa J.**, Klimek M., Kruk J., Cocquerelle C., Vandembulcke F., Plytycz B. 2010. Metal-specific effects on metallothionein gene induction and riboflavin content in coelomocytes of *Allolobophora chlorotica*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73:1937–1943. **IF₂₀₁₀=2.34; MNiSW=30; liczba cytowań: 14, liczba cytowań bez autocytowań: 7**
2. **Homa J.**, Zorska A., Wesolowski D., Chadzinska M., 2013. Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*. *J Comp Physiol B.*, 183:313-322. **IF₂₀₁₃=2.53; MNiSW=30; liczba cytowań: 6, liczba cytowań bez autocytowań: 5**
3. **Homa J.**, Rorat A., Kruk J., Cocquerelle C., Plytycz B., Vandembulcke F., 2015. Dermal exposure of *Eisenia andrei* earthworms: Effects of heavy metals on metallothionein and phytochelatin synthase gene expressions in coelomocytes. *Environ Toxicol Chem.* 34:1397-1404. **IF₂₀₁₅=3.225, MNiSW=35; liczba cytowań: 3, liczba cytowań bez autocytowań: 1**
4. **Homa J.**, Stürzenbaum S.R., Kolaczowska E. 2016a. Metallothionein 2 and heat shock protein 72 protect *Allolobophora chlorotica* from cadmium but not nickel or copper exposure: body malformation and coelomocyte functioning. *Arch Environ Contam Toxicol.* 71:267-277. **IF₂₀₁₅=2.039, MNiSW=25; liczba cytowań: 0, liczba cytowań bez autocytowań: 0**
5. **Homa J.**, Stalmach M., Wilczek G., Kolaczowska E. 2016b. Effective activation of antioxidant system by immune-relevant factors reversely correlates with apoptosis of *Eisenia*

andrei coelomocytes. J Comp Physiol B.186: 417-430. IF₂₀₁₅=2.619, MNiSW=30; liczba cytowań: 0, liczba cytowań bez autocytowań: 0

6. **Homa J.**, Ortmann W., Kolaczowska E. 2016c. Conservative mechanisms of extracellular trap formation by Annelida *Eisenia andrei*: serine protease activity requirement. PLoS One DOI: 10.1371/journal.pone.0159031. IF₂₀₁₅=3.057, MNiSW=40; liczba cytowań: 0, liczba cytowań bez autocytowań: 0

Sumaryczny: IF = 14.613; punkty MNiSW =190; liczba cytowań: 23; liczba cytowań bez autocytowań: 13

4.3. Omówienie celu naukowego i wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Ponad 95% gatunków zwierząt to zwierzęta bezkręgowce. Wszystkie one w obronie przeciwko patogenom wykorzystują mechanizmy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (Little i wsp. 2005; Bilej i wsp. 2010). Sam ten fakt potwierdza znaczenie tego typu mechanizmów odpornościowych, ale paradoksalnie nawet u ssaków wiemy o nich znacznie mniej niż o odporności nabytej. Jeszcze mniej wiadomo na temat odporności zwierząt z niższych grup systematycznych. Z tego powodu, w moich badaniach skupiłam się na organizmach bezkręgowych, posiadających dobrze rozwinięty układ odpornościowy i stanowiących ważny element ekosystemu glebowego, jakimi są dżdżownice. Dżdżownice posiadają bardzo efektywnie funkcjonujące komórkowe i humoralne mechanizmy odpornościowe pozwalające przetrwać im w ich naturalnym, bogatym w patogeny środowisku. Układ odpornościowy dżdżownic zlokalizowany jest we wtórnej jamie ciała – celomie (Bilej i wsp. 2010). Płyn celomatyczny, którym jest wypełniona, nie tylko tworzy stabilny hydroszkielet, ale także zawiera liczne komórki układu odpornościowego – celomocyty oraz składniki humoralne (Bilej i wsp. 2010). Populacja celomocytów dzieli się na dwie główne grupy: amebocyty (hialinowe i granularne) oraz eleocyty/chloragocyty, wywodzące się z otaczającej jelito, tkanki chloragogenowej (Kurek i wsp. 2007; Bilej i wsp. 2010). Amebocyty mają zdolność do przeprowadzania procesu fagocytozy oraz wykazują aktywność przypominającą aktywność komórek NK (ang. *natural killers*), naturalnych komórek cytotoksycznych występujących u kręgowców. Eleocyty natomiast syntetyzują i

uwalniają między innymi aglutyniny i opsoniny (Bilej i wsp. 2010), które prowadzą do unieruchomienia patogenu, jak również są ważnymi czynnikami wpływającymi na proces enkapsulacji, czyli zamykania patogenów w strukturach zwanych "ciałami brunatnymi" (Bilej i wsp. 2010). W ziarnistościach eozynofili magazynowana jest między innymi ryboflawina (witamina B2), odpowiedzialna za autofluorescencję tych komórek (np. Cholewa i wsp. 2006; Plytycz i wsp. 2006). W celomiej dżdżownic obecne są również liczne enzymy, takie jak proteazy, mające właściwości antybakteryjne i biorące udział w aktywacji, podobnego do układu dopełniacza kręgowców, systemu profenoloksydazy (pro-PO) (Valembois i wsp. 1994). Końcowym etapem aktywacji układu profenoloksydazy jest melanizacja i eliminacja patogenów. Eliminacja zachodzi dzięki usunięciu z organizmu, powstałych w wyniku enkapsulacji, „ciał brunatnych”, które stopniowo przesuwane są w tylne partie ciała i usuwane wraz z segmentami na drodze naturalnej amputacji, autotomii (Kalać i wsp. 2002; Kauschke i wsp. 2007; Homa i wsp. 2016b).

W najnowszym modelu sekwencyjnej odpowiedzi immunologicznej tzw. modelu SIR (ang. *sequential immune responses*) (Mills i wsp. 2015), proponuje się podział odpowiedzi immunologicznej na 4 grupy: i) SIR1, w którym do obrony przeciwko patogenom wykorzystywane są, powstające w wyniku aktywacji kompleksu oksydazy NADPH, reaktywne formy tlenu ROS (z ang. *reactive oxygen species*) oraz dochodzi do aktywacji enzymów, ii) SIR2, gdzie odpowiedź bazuje na komórkach fagocytyzujących podobnych do makrofagów, iii) SIR3, której odpowiedź związana jest z receptorami TLR (ang. *Toll-like receptors*), rozpoznającymi wzorce molekularne patogenów oraz jeszcze efektywniej działających cząsteczek bójących, w tym tlenku azotu, natomiast ostatnia odpowiedź, iv) SIR4, związana jest z odpowiedzią nabytą i możliwością prezentowania przez makrofagi antygenów limfocytom T. Okazuje się, że dżdżownice w walce z patogenami wykorzystują aż 3 z czterech wymienionych mechanizmów SIR tzn. zdolne są do produkcji ROS (Homa i wsp. 2013; Bernard i wsp. 2015; Homa i wsp. 2016b) i tlenku azotu (Homa i wsp. 2013; Bernard i wsp. 2015), w ich płynie celomatycznym dochodzi do szybkiej aktywacji enzymów, a także posiadają komórki fagocytyzujące - amebocyty (Valembois i Lassègues, 1995, Homa i wsp. 2013, 2016b) wykazujące ekspresję receptorów TLR (Škanta i wsp. 2013; Fjøsne i wsp. 2015).

Mimo, że odporność dżdżownic jest przedmiotem zainteresowania różnych grup badawczych, jednak ciągle wiele pytań dotyczących przebiegu reakcji odpornościowej tych

zwierząt pozostaje bez odpowiedzi. W moich badaniach dotyczących tego zjawiska udało się scharakteryzować niektóre z mechanizmów aktywowanych w układzie odpornościowym dżdżownic w odpowiedzi na zagrożenie, jakim może być pojawienie się patogenu, ale także obecność metali ciężkich (Homa i wsp. 2010; Homa i wsp. 2013; Homa i wsp. 2015; Homa i wsp. 2016abc). Do badań wpływu czynników środowiskowych wybrałam dwa gatunki dżdżownic: *Eisenia andrei* i *Allobophora chlorotica*, należących do dwóch różnych grup ekologicznych i różniące się wrażliwością na metale ciężkie. Z kolei w badaniach związanych z analizą mechanizmów odpowiedzi na czynniki patogenne skupiałam się tylko na *E. andrei*.

Pierwszym celem badań składających się na prezentowane osiągnięcie naukowe była jak wspomniano charakterystyka mechanizmów uruchamianych przez dżdżownice w odpowiedzi na czynniki środowiskowe, takie jak skażenia metalami ciężkimi. Ta część stanowiła naturalną kontynuację badań prowadzonych przeze mnie wcześniej, podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej. Jednak w badaniach wykonywanych po uzyskaniu stopnia doktora, skupiałam się na wpływie metali ciężkich na przebieg reakcji odpornościowej dżdżownic. W ramach tych badań ściśle współpracowałam z zespołem profesora Francka Vandenbulcke z Uniwersytetu w Lille we Francji. W ośrodku tym odbyłam 3-miesięczny staż naukowy finansowany przez Rząd Francuski. Badania prowadzone we współpracy z francuskim zespołem skupiały się na wpływie metali ciężkich, w tym miedzi (Cu), cynku (Zn), niklu (Ni), ołowiu (Pb) i kadmu (Cd) na ekspresję genów kodujących metalotioneinę 2 (MT-2) i fitochelatyny (PCs). Warto w tym miejscu przypomnieć, że MT-2 jest jednym z niskocząsteczkowych białek zawierających reszty cysteinowe, wiążących metale ciężkie (izoforma MT-2 odpowiedzialna jest przede wszystkim za wiązanie kadmu), a fitochelatyny są polipeptydami należącymi do III grupy metalotionein i również mającymi znaczenie w wychwytywaniu metali ciężkich (Homa i wsp. 2015). Badania prowadzone były na dwóch gatunkach dżdżownic *Eisenia andrei* oraz *Allobophora chlorotica* i zaowocowały powstaniem 2 pracy naukowo-badawczych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Homa J.**, Klimek M., Kruk J., Cocquerelle C., Vandenbulcke F., Plytycz B. 2010. Metal-specific effects on metallothionein gene induction and riboflavin content in coelomocytes of *Allobophora chlorotica*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73:1937–1943. IF₂₀₁₀=2.34, MNiSW=30
2. **Homa J.**, Rorat A., Kruk J., Cocquerelle C., Plytycz B., Vandenbulcke F., 2015. Dermal exposure of *Eisenia andrei* earthworms: Effects of heavy metals on metallothionein and phytochelatin synthase gene expressions in coelomocytes. *Environ Toxicol Chem.* 34:1397-1404. IF₂₀₁₅=2.763, MNiSW=35

W pierwszej z nich określiłam fragment sekwencji cDNA MT-2 (HM014116) i β -aktyny (HM014115) (używanej jako gen referencyjny (HKG, ang. *housekeeping gene*) do standaryzacji danych RT-PCR) *Allolobophora chlorotica* oraz stwierdziłam, że miedź powoduje u tego gatunku silny spadek liczby celomocytów/eleocytów z równoczesnym spadkiem poziomu ryboflawiny w lizatach pozyskanych celomocytów. Mniej nasiloną redukcję liczby tych komórek oraz mniejszy spadek poziomu ryboflawiny obserwowano u dżdżownic potraktowanych Ni, Zn, Cd, ale nie Pb. Jednak tylko ekspozycja zwierząt na działanie kadmu spowodowała bardzo duży (ponad 250-krotny) wzrost ekspresji genu *mt-2*. W przypadku zastosowania pozostałych metali obserwowane wzrosty ekspresji genu *mt-2* były niższe.

Podsumowując, trzeba podkreślić, że ważnym molekularnym bioindykatorem skażeń kadmem jest podniesienie ekspresji genu *mt-2*, natomiast obniżenie poziomu magazynowanej ryboflawiny w eleocytach oraz spadek liczby komórek stanowi dobry wskaźnik zanieczyszczenia miedzią. W przypadku badań genu *mt-2* moja praca pozwoliła przede wszystkim na stwierdzenie, po raz pierwszy u gatunku *A. chlorotica*, obecności tej izoformy metalotioneiny.

W drugiej z wymienionych prac opisano wyniki dotyczące wpływu metali ciężkich na ekspresję genów dla MT-2 i PCs u *E. andrei*. Analizę ekspresji genów w tym wypadku poprzedziło zsekwencjonowanie większych fragmentów cDNA kodującego *mt* i *pcs* tego gatunku (odpowiednie sekwencje zdeponowano w GenBank, pod nr akcesyjnymi: KP770991 dla *mt* i KP770990 dla *pcs*). W tych badaniach ważnym punktem było także zweryfikowanie przynależności badanych osobników do jednego z dwóch bardzo spokrewnionych gatunków z rodzaju *Eisenia*: *E. andrei* lub *E. fetida*. W tym celu wykonano analizy DNA kodującego sekwencję rybosomalnego białka 16S rRNA. Porównanie tych sekwencji pomiędzy gatunkami pozwoliło stwierdzić dokładnie przynależność badanych dżdżownic do gatunku *E. andrei*, (fragmenty sekwencji dla 16S zostały zdeponowane w GenBank pod nr akcesyjnymi: KP768177 do KP768189). Stwierdziłam ponadto, że w przypadku tego gatunku dżdżownic metale ciężkie nie wpływały na obniżenie liczby pozyskiwanych celomocytów oraz zawartej w nich ryboflawiny, natomiast ekspresja genów dla białek MT-2 i PCs ulegała zmianie. Co więcej w przypadku genu *mt-2* wykazałam jego najwyższą ekspresję po zadziałaniu Cd, potwierdzając duże znaczenie metalotioneiny 2 w wiązaniu tego metalu. Wykazałam ponadto, że po zadziałaniu Cu, Zn, Ni i Pb także dochodzi do podniesienia ekspresji *mt-2*, ale wzrost

ten jest słabszy niż w przypadku Cd. Co ciekawe ekspresja genu dla PCs była podwyższona tylko w przypadku zadziałania metali będących mikroelementami, czyli Cu, Zn oraz Ni, natomiast Cd i Pb nie wpłynęły na indukcję tego genu.

Podsumowując tą część uzyskanych wyników, zwracam szczególną uwagę na wykazanie różnic w sposobie reagowania organizmu dżdżownic na metale ciężkie należące do ksenobiotyków i do mikroelementów. Ekspresja metalotioneiny MT-2 jest ważna dla regulowania głównie wiązania Cd, podczas gdy fitochelatyny są aktywowane pod wpływem mikroelementów.

W kolejnej pracy dotyczącej wpływu metali ciężkich na celomocyty dżdżownic wykazałam korelację pomiędzy ekspresją białek szoku cieplnego, w tym MT-2 oraz HSP72 (ang. *heat shock protein*), a zdolnościami organizmu dżdżownic *A. chlorotica* do ochrony przed toksycznością metali ciężkich. Wyniki tych badań przedstawiłam w pracy:

3. Homa J., Stürzenbaum S.R., Kolaczowska E. 2016a. Metallothionein 2 and heat shock protein 72 protect *Allolobophora chlorotica* from cadmium but not nickel or copper exposure: body malformation and coelomocyte functioning. Arch Environ Contam Toxicol. 71:267-277. IF₂₀₁₅=2.039, MNiSW=25

Wykazałam w niej, że już niskie stosowane stężenia Cu i Ni wywoływały większe uszkodzenia organizmu (np. zmiany w morfologii ciała, obniżoną liczbę pozyskiwanych celomocytów), a także powodowały wyższą śmiertelność osobników, niż w przypadku użycia tych samych stężeń ksenobiotyków (Cd i Pb). Podobnie do omówionych powyżej badań wykazałam, że za najwyższą indukcję ekspresji białek MT-2 odpowiedzialny jest kadm. W przypadku kadmu podwyższona ekspresja białek MT-2, ale również indukowanych białek HSP72 była związana z mniejszym obniżeniem liczby komórek oraz brakiem śmiertelności osobników, podczas gdy te same stężenia miedzi były już letalne. W przypadku miedzi wykazałam mniejszą ochronę organizmu wynikającą ze słabszej indukcji białek szoku cieplnego. Podsumowując, *A. chlorotica* jest gatunkiem wrażliwym na metale ciężkie, dysponuje jednak silnym mechanizmem obronnym w postaci metalotionein, które stanowią szczególną obronę przed toksycznością ksenobiotyków np. kadmu, natomiast nie chronią wystarczająco skutecznie przed niefizjologicznymi stężeniami metali należących do mikroelementów np. miedzi. Uzyskane w wyniki wskazują na dużą zdolność tolerancji dżdżownic w stosunku do zanieczyszczeń metalami ciężkimi, podczas gdy stężenia metali biologicznie aktywnych nie są regulowane tak efektywnie.

Podsumowując, wyniki uzyskane w ramach badań wpływu czynników środowiskowych jakimi są metale ciężkie, wykazały u dwóch gatunków dżdżownic obecność podobnych elementów związanych z odpowiedzią organizmu na skażenie metalami ciężkimi, ale pokazały również inną wrażliwość na te same metale, pomiędzy różnymi gatunkami tej samej grupy systematycznej, jaką są pierścienice.

Późniejszy etap mojej pracy stanowiły badania zmian w funkcjonowaniu układu odpornościowego dżdżownic po kontakcie z patogenami. Do stymulacji dżdżownic (badania *in vivo*) jak i w modelach *in vitro* i *ex vivo* badających aktywność celomocytów użyłam: zymosan A, będący składnikiem ściany komórkowej drożdży (*Z. Saccharomyces cerevisiae*), lipopolisacharyd (LPS), będący integralnym składnikiem zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, *Escherichia coli*. Ponadto do stymulacji używałam również syntetycznego związku, estru forbolu (PMA) oraz mitogenu pochodzenia roślinnego, konkanawaliny A (ConA) i bakterii *Micrococcus luteus* (M.1).

Wyniki tych badań zostały opublikowane w dwóch niezależnych oryginalnych pracach naukowo-badawczych:

4. Homa J., Zorska A., Wesolowski D., Chadzinska M., 2013. Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*. J Comp Physiol B. 183: 313-322. IF₂₀₁₃=2.619, MNiSW=30

5. Homa J., Stalmach M., Wilczek G., Kolaczowska E. 2016b. Effective activation of antioxidant system by immune-relevant factors reversely correlates with apoptosis of *Eisenia andrei* coelomocytes. J Comp Physiol B.186: 417-430. IF₂₀₁₅=1.884, MNiSW=30

W pierwszej z nich opisano wpływ immunostymulantów na zmiany w aktywności oraz na proliferację celomocytów. Wykazałam, że podobnie jak fagocyty ssaków, celomocyty mogą zabijać patogeny poprzez uruchomienie produkcji ROS i tlenku azotu. Ponadto działanie immunostymulantów przejawiało się w zmianie liczby oraz składu pozyskiwanych komórek. Co ciekawe, wszystkie użyte immunostymulanty (PMA, LPS, ConA) wpływały na zwiększoną proliferację celomocytów, szczególnie silnie indukowaną przez PMA. Natomiast apoptoza komórek była najwyższa po zastosowaniu LPS. Wyniki wyraźnie wskazują na zdolność układu immunologicznego dżdżownic do reakcji na klasyczne immunostymulanty. Reakcja ta angażuje elementy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w sposób podobny, jak to jest obserwowane na przykładzie komórek kręgowców.

W drugiej z wymienionych prac, pokazałam skuteczną aktywację systemu antyoksydacyjnego, jakim dysponują dżdżownice i korelację jego aktywacji z ochroną organizmu przed stresem oksydacyjnym. Wykazałam wpływ zastosowanych stymulantów (PMA, LPS, M.1, Z) na zmianę w liczbie i składzie celomocytów, a także ich wpływ na żywotność i apoptozę pozyskiwanych komórek. W uzyskanych wynikach szczególnie interesująca jest aktywacja systemu antyoksydacyjnego, w tym katalazy i peroksydaz (seleno-zależnej i niezależnej). Naturalne stymulanty tj. LPS, M.1 czy Z, powodowały silną aktywację enzymów antyoksydacyjnych, podczas gdy syntetyczny PMA pomimo bardzo silnej aktywacji komórek, w tym stymulacji wybuch tlenowego, nie wpływał na aktywność badanych enzymów. Brak sprawnie funkcjonującego systemu antyoksydacyjnego w przypadku PMA przejawiał się w zwiększonej apoptozie komórek. W wynikach pokazanych w niniejszej pracy zwracam również uwagę na wykazaną aktywację układu proPO, prowadzącą do ważnej w eliminacji patogenów, melanizacji.

W ramach prowadzonych badań, opublikowałam również artykuł przeglądowy dotyczący układu profenoloksydazy u zwierząt bezkręgowych, który ukazał się w czasopiśmie Kosmos.

Banaś J., **Homa J.**, 2016. Układ profenoloksydazy (pro-PO) u zwierząt bezkręgowych – mechanizm wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Kosmos, 65:33-41. MNiSW=12

Kolejnym ważnym punktem pracy jest wykazanie zdolności celomocytów do ponownej reakcji związanej z generowaniem ROS po powtórnej stymulacji tym samym lub innym immustymulantem, co świadczy o zdolności dżdżownic do ciągłej gotowości do odpowiedzi immunologicznej na pojawienie się w organizmie różnych patogenów.

Na szczególne zainteresowanie w tym kontekście zasługują wyniki opisane przeze mnie w pracy:

6. Homa J., Ortmann W., Kolaczowska E. 2016c. Conservative mechanisms of extracellular trap formation by Annelida *Eisenia andrei*: serine protease activity requirement. PLoSOne DOI: 10.1371/journal.pone.0159031. IF₂₀₁₅=3.057, MNiSW=40

Pokazałam, bowiem po raz pierwszy, że celomocyty dżdżownic zdolne są do wytwarzania zewnątrzkomórkowych sieci (ET, ang. *extracellular trap*) zaangażowanych w wychwyt i prawdopodobnie również w zwalczanie patogenów. Zjawisko tworzenia tego typu sieci zostało po raz pierwszy opisane w 2004 roku w Science (Brinkmann i wsp. 2004) dla neutrofili ssaków. Autorzy stwierdzili wówczas, że po stymulacji bakteriami Gram-dodatnimi

(*Staphylococcus aureus*) lub Gram-ujemnymi (*Salmonella typhimurium* i *Shigella flexneri*) jak również pod wpływem PMA i LPS neutrofile są w stanie wytworzyć zewnątrzkomórkowe sieci, NET (ang. *neutrophil extracellular trap*) w skład, których wchodzi DNA oraz cytoplazmatyczne ziarnistości. Od tego odkrycia wyniki badań prowadzonych na komórkach kręgowców, dodały liczne informacje dotyczące zarówno składowych zewnątrzkomórkowych sieci oraz mechanizmów, jakie są konieczne do uruchomienia ich wytworzenia (Brinkmann i wsp. 2004, Neeli i wsp. 2009, Papayannopoulos i wsp. 2010, Kolaczkowska i wsp. 2015). Kolejne lata przyniosły doniesienia o możliwości tworzenia ET także przez inne populacje leukocytów ssaków, tzn. monocyty/makrofagi, eozynofile i mastocyty (Chow i wsp. 2010, Yousefi i wsp. 2008), a także przez neutrofile i makrofagi innych kręgowców np. ryb doskonałokostnych (Pijanowski i wsp. 2013, 2015) Wytwarzanie zewnątrzkomórkowych pułapek ma znaczenie w obronie przed patogenami, ale nie ma obecnie jednoznacznej oceny całego wachlarza skutków ich działalności. Mimo, że od odkrycia struktur ET minęło już 12 lat, publikacji opisujących wytwarzanie zewnątrzkomórkowych sieci przez komórki bezkręgowców jest bardzo niewiele. Dotychczas stwierdzono, że ET wytwarzane są przez hemocyty krewetek (Ng i wsp. 2013, 2015; Koiwai i wsp. 2016), kraba *Carcinus maenas* (Robb i wsp. 2014) i małży *Crassostrea gigas* (Poirier i wsp. 2014). Z najnowszych doniesień wynika, że również komórki prostszych organizmów np. socjalnej ameby *Dictyostelium discoideum* mogą wyrzucać zewnątrzkomórkowe DNA, tworząc struktury podobne do sieci NET (Zhang i wsp. 2016).

W związku z tym niezwykle interesujące wydawało mi się zbadanie pod tym kątem celomocytów dżdżownic. Opierając się na wiedzy pozyskanej dzięki badaniom komórek kręgowców, wiadomo, że mechanizm tworzenia sieci składa się z kilku podstawowych etapów: i) produkcji ROS; ii) transportu proteaz, w tym odpowiedzialnych za dekondensację chromatyny elastazy neutrofilowej, z ziarnistości cytoplazmatycznych do jądra komórkowego, iii) transportu do jądra komórkowego mieloperoksydazy. Kolejnym etapem tworzenia ET jest iv) cytrulinacja histonów i w efekcie końcowym wytworzenie sieci, czyli wyrzucenie rozplecionego DNA wraz ze składnikami ziarnistości na zewnątrz komórki (Brinkmann i wsp. 2004; Kolaczkowska i wsp. 2015).

W swoich badaniach wykazałam pojawienie się, podobnych do NET, struktur w wyniku stymulacji celomocytów LPS, zymosanem, PMA, a także bakteriami *M. lysodeikis* oraz *Xenorhabdus bovienii* (symbiotyczne bakterie pochodzące z nicieni). Stwierdziłam, że w

skład celomatycznych zewnątrzkomórkowych sieci (ET, ang. *extracellular trap*) wchodzi
jądrowe DNA wraz z histonami H3 oraz, że do zewnątrzkomórkowego DNA przyłączone są
białka pochodzenia cytoplazmatycznego, w tym białka szoku cieplnego -HSP27. Uzyskane
wyniki wskazują na duże podobieństwo ET do pierwotnie opisanych sieci tworzonych przez
neutrofile kręgowców. Z kolei to, jaki mechanizm odpowiedzialny jest za uruchamianie
wyrzutu ET badałam sprawdzając między innymi wpływ na przebieg tego procesu
inhibitorów proteaz, elastazy neutrofilowej i oksydazy NADPH. Stwierdziłam, że do
zahamowania tworzenia sieci dochodzi po zastosowaniu inhibitorów proteaz, w tym dla
proteaz serynowych i elastazy, ale nie po zastosowaniu inhibitorów autofagii i inhibitorów dla
biorących udział w apoptozie kaspaz. Zaobserwowałam ponadto, że inhibitor oksydazy
NADPH, hamujący wybuch tlenowy, powoduje zahamowanie tworzenia sieci, ale tylko w
przypadku stymulacji komórek PMA, natomiast podobnego efektu nie ma po stymulacji
tworzenia ET bakteriami. Wyniki te potwierdziły, że produkcja sieci nie zawsze jest zależna
od ROS, co zostało pokazane już wcześniej u kręgowców (Kolaczowska i wsp. 2015,
Pijanowski i wsp., 2013). Jak wspomniano powyżej, w skład ET wchodzi histony, co jednak
ciekawe część z nich to histony cytrulinowane. Z literatury wiadomo, że upakowanie
chromatyny jądrowej związane z obecnością histonów oraz jej dekondensacja jest po części
zależna od odpowiedniej modyfikacji tych białek. Dowiedziono również, że histony podlegają
wielu modyfikacjom potranslacyjnym, z których istotną dla tworzenia NET jest właśnie
cytrulinacja (deiminacja reszt guanidynowych arginin) w histonach. U kręgowców za
cytrulinację histonów odpowiada enzym PAD4 (ang. *peptidylarginine deiminase 4*)
(Rohrbach i wsp. 2012), jednak enzym ten nie został do tej pory wykryty u niższych
organizmów, a zatem mechanizm cytrulinacji histonów wchodzących w skład ET nie jest do
końca jasny. W prowadzonych badaniach wykazałam jednak zaskakujący hamujący wpływ
znanego inhibitora PAD4 (Cl-amidine) na tworzenie sieci oraz obecność cytrulinowanych
histonów H3 w obrębie ET i ich brak po zastosowaniu inhibitora. Wyniki te wyraźnie
wskazują na zdolność do zachodzenia u dżdżownic cytrulinacji histonów H3 oraz na
możliwość występowania enzymu o podobnej roli, a podatnego również na działanie
klasycznego inhibitora PAD4. Na poparcie tego wniosku warto zwrócić uwagę na to, że
mechanizm tworzenia ET u bezkręgowców, w tym u dżdżownic wykazuje liczne
podobieństwa w stosunku do mechanizmu opisanego u kręgowców. Podobieństwa te odnaleźć
można chociażby w przypadku obecności i aktywności proteaz serynowych, produkcji
reaktywnych form tlenu oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Prowadzone dotychczas badania pozwalają na wskazanie dużych podobieństw w tworzeniu i budowie sieci ET dżdżownic i struktur tworzonych przez neutrofile kręgowców. Warto jednak zaznaczyć, że wiele punktów związanych z ET nie zostało jeszcze zweryfikowanych. W związku z tym moje dalsze plany badawcze zakładają szczegółowe zbadanie mechanizmów odpowiedzialnych za wytwarzanie sieci oraz zweryfikowanie ich roli w odporności dżdżownic. Jednym z tematów badawczych, który chciałabym kontynuować jest sprawdzenie czy zewnątrzkomórkowe sieci mogą mieć udział w wychwytywaniu metali ciężkich. W wcześniejszych pracach prowadzonych nad wpływem czynników środowiskowych, w tym metali ciężkich wykazałam dużą zdolność dżdżownic do akumulacji metali zarówno w tkankach jak i celomocytach. Obecne, wstępne wyniki wskazują, że preinkubacja organizmu dżdżownic z kadmem, a następnie indukcja wytworzenia sieci przez immunostymulację PMA wpłynęła na pojawienie się białek MT2 w zewnątrzkomórkowych sieciach ET.

Drugim istotnym elementem planowanych i już rozpoczętych eksperymentów jest zbadanie udziału ET w formowania „ciał brunatnych”. Enkapsulacja i „ciała brunatne” pełnią bardzo ważną rolę w organizmach dżdżownic w usuwaniu większych patogenów (np. nicieni) ale również w eliminowaniu bakterii, jak również komórek wchodzących w skład kapsuły (Valembos i wsp. 1994). Sama enkapsulacja prowadzi do otoczenia patogenów i zamknięcia ich w skupisku komórek immunokompetentnych. W obrębie agregatów, aktywowane celomocyty wytwarzają ROS, co przyczynia się do zwiększenia zdolności bójczych komórek. Aktywacja układu profenoloksydazy (proPO) jest zależna od działania proteaz, które mają znaczenie w wytwarzaniu sieci. Z kolei w obrębie ciał brunatnych dochodzi do odkładania melaniny, która bierze udział w oddzielaniu patogenów od środowiska celomy dżdżownic, a zewnątrzkomórkowe DNA może prowadzić do ułatwienia zlepiania się powstających agregatów komórkowych.

Zbadanie procesu enkapsulacji w odniesieniu do tworzenia zewnątrzkomórkowych sieci może stanowić ważne zagadnienie w określeniu silnych połączeń różnych mechanizmów obronnych dżdżownic.

Podsumowując, uzyskane w trakcie badań wyniki, stanowiące opisane osiągnięcie naukowe, przedstawiają szereg nowych informacji dotyczących odporności bezkręgowców i poszerzają wiedzę z zakresu ewolucji układu odpornościowego. W szczególności znaczenie

ma włączenie do aktualnej wiedzy, nowych informacji dotyczących obecności u dżdżownic genów kodujących białka odpowiedzialne za wiązanie metali ciężkich (dla metalotioneiny MT2 i fitochelatyny PCs) oraz badania wykazujące zdolność celomocytów do proliferacji pod wpływem, znanymi dla kręgowców, immunostymulantów (PMA, LPS, Z). **Moim zdaniem na szczególne podkreślenie, zasługują wyniki pokazujące po raz pierwszy u dżdżownic możliwość tworzenia przez celomocyty zewnątrzkomórkowych sieci – ET, określenie ich potencjalnej roli w odpowiedzi przeciwko patogenom. Wytworzenie zewnątrzkomórkowych sieci i połączenie ich z fagocytozą oraz mechanizmem zaangażowanym w enkapsulację i tworzeniem „ciał brunatnych” wydaje się bardzo efektywnym elementem możliwej obrony przed wnikałymi do organizmu dżdżownic patogenami.**

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo –badawczych

Oprócz omówionych powyżej badań nad odpornością dżdżownic uczestniczyłam i uczestniczę także w pracach badawczych dotyczących wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w innych grupach zwierząt bezkręgowych (pająki, ślimaki, owady) a także kręgowców (ryby, ptaki i ssaki).

Immunologia bezkręgowców stanowi zagadnienie, którym zajmuję się, od kiedy jeszcze, jako studentka rozpoczęłam prace doświadczalne w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej, pod kierunkiem Prof. dr hab. Barbary Płytycz. Na początkowym etapie badań skupiałam się głównie nad zagadnieniami związanymi z ekotoksykologią i badaniami nad użyciem dżdżownic, jako biowskaźników skażeń środowiska. Zainteresowania moje wynikały z podjętego kierunku studiów, jakim była Ochrona Środowiska. W 2000 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej, kontynuując badania podjęte jeszcze w trakcie studiów magisterskich.

W trakcie doktoratu prowadziłam badania nad wpływem metali ciężkich na organizm i komórki immunokompetentne dżdżownic. Tematyka tych badań wpisywała się bardzo mocno w prowadzone w tym czasie szerokie badania nad potencjalnym zastosowaniem organizmów bezkręgowych w biomonitoringu skażeń środowiska. Moje eksperymenty dotyczyły przede wszystkim badań związanych z wpływem skażeń gleb, pochodzących z terenów o różnym zanieczyszczeniu metalami ciężkimi na organizm dżdżownic.

Po uzyskaniu stopnia doktora, w latach 2007-2010 uczestniczyłam również jako główny wykonawca w projekcie badawczym kierowanym przez Prof. dr hab. Barbarę Plytycz (N304 088 32/3502) pt: Zastosowanie celomocytów dżdżownic jako bioindykatorów skażenia gleby, opracowanie i praktyczne zastosowanie rutynowych testów do monitoringu w oparciu o komórki immunokompetentne nieinwazyjnie pobrane z celomy dżdżownicy.

Badania miały na celu opracowanie zarówno metodyki badań, jak również wykazania potencjalnego znaczenia dżdżownic w biomonitoringu skażeń środowiska. Wykazano między innymi, zależność pomiędzy biodostępnością metali ciężkich i ich akumulacji w organizmie dżdżownicy a rodzajem gleby, w tym składem mechanicznym (frakcje ziarniste, pyłowe oraz ilowe), jej pH oraz zawartością materii organicznej. Stwierdzono, że im niższe pH i bardziej uboga gleba tym większa biodostępność i toksyczność metali ciężkich. Natomiast obecna w glebie materia organiczna zmniejszała ich dostępność, obniżając toksyczność skażeń. Analizując liczne parametry, w tym śmiertelność, masę ciała osobników, produkcję kokonów oraz liczbę pozyskiwanych celomocytów, wykazano, iż osobniki narażone na silne skażenie przeznaczały całą energię na przetrwanie, rezygnując z kosztownego energetycznie rozmnażania, natomiast liczba komórek immunokompetentnych, u tych osobników, które przeżyły eksperyment była podobna do osobników kontrolnych i dawała potencjalnie możliwość walki tych osobników z patogenami.

Wyniki powyżej omówionych badań, łączących eksperymenty związane z opracowaniem technik i zastosowaniem dżdżownic w biomonitoringu skażeń metalami ciężkimi opublikowane zostały w 5 pracach oryginalnych oraz w opracowaniach zbiorczych, wydanych, jako 2 rozdziały oraz książka, a dotyczących zastosowania dżdżownic w biomonitoringu zanieczyszczeń gleby.

Homa J., Niklinska M., Plytycz B., 2003. Effects of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allobophora chlorotica*. *Pedobiologia* 47:640-645. IF₂₀₀₅= 0,711; MNiSW=25

Homa J., Olchawa E., Stürzenbaum S.R., Morgan A.J., Plytycz B., 2005. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ Pollut.*135:275-280. IF₂₀₀₅= 2,451; MNiSW=40.

Homa J., Stürzenbaum S.R., Morgan A.J., Plytycz B., 2007. Disrupted homeostasis in coelomocytes of *Eisenia fetida* and *Allolobophora chlorotica* exposed dermally to heavy metals. *Europ J Soil Biol.* 43:273-280. IF₂₀₀₇=0,5; MNiSW=30

Kurek A., **Homa J.**, Plytycz B., 2002. Earthworm coelomocytes: convenient model for basic and applied sciences. In: A new model for analyzing antimicrobial peptides with biomedical applications, (eds E.L. Cooper, A. Beschin, M. Bilej), IOS Press, Ohmsha, pp. 38-46.
Plytycz B., **Homa J.**, Azwady nor Aziz, Molnár L., Kille P., Morgan A.J., 2007. Earthworms for monitoring metal contamination: from cells to molecules. In: Environmental Pollution, New Research, (ed. R.H. Plattenberg), Nova Science Publishers, New York, pp. 47-98.
Plytycz B., **Homa J.**, nor Aziz A., Molnar L., Kille P., Morgan A.J., 2009. Earthworms for monitoring metal contamination. Nova Science Publishers, Inc., New York.
Plytycz B., Klimek M., **Homa J.**, Mazur A.I., Kruk J., Morgan A.J., 2011. Species-specific sensitivity of earthworm coelomocytes to dermal metal (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) exposures: Methodological approach. *Pedobiologia*, 54S: 5203-5210. **IF₂₀₁₁=1,816; MNiSW=25**
Plytycz B., Klimek M., **Homa J.**, Tylko G., Kolaczowska E., 2007. Flow cytometric measurement of neutral red accumulation in earthworm coelomocytes. *Europ J Soil Biol.* 43:116-120. **IF₂₀₀₇=0,5; MNiSW=30**

W latach 2001 i 2002 odbyłam dwa staże w ramach stypendium German Academic Exchange Service (DAAD) na Uniwersytecie Ernst-Moritz-Arndt Greiswald (Niemcy). W trakcie pobytu włączyłam się do badań dotyczących komórek immunokompetentnych dżdżownic gatunku *A. chlorotica*. W literaturze gatunek ten nie został opisany wcześniej, a stanowił bardzo ciekawy przykład dżdżownic edogenicznych, żyjących w naturalnym środowisku. Charakterystyka układu odpornościowego tego gatunku została opublikowana w artykule Kurek i wsp. (2007), w której jestem współautorem:

Kurek A., **Homa J.**, Plytycz B., 2007. Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *Europ J Soil Biol.* 43:121-126. **IF₂₀₀₇=0,5; MNiSW=30**

Wyniki wykazały obecność w celomie tych dżdżownic trzech typów komórek, w tym amebocytów hialinowych i granularnych oraz komórek chloragogenowych/eleocytów, jak również zdolność tych ostatnich do autofluorescencji, pochodzącej z magazynowanej w chloragosomach ryboflawiny. Charakterystyki poszczególnych populacji komórek dokonano przy pomocy mikroskopii świetlnej, transmisyjnej (TEM) oraz skaningowej (SEM) mikroskopii elektronowej, jak również przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej. Wyniki badań wpisują się w stosunkowo nieliczne prace dotyczące komórek immunokompetentnych dżdżownic.

Uczestniczyłam także w badaniach dotyczących, wspomnianej wcześniej, autofluorescencji komórek chloragogenowych/eleocytów dżdżownic. Badania te prowadzone były na celomocytach kilku gatunków dżdżownic (*Eisenia andrei*, *Allolobophora chlorotica*, *Aporectodea caliginosa*, *Dendrobaena veneta*, *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus castaneus*,

Lumbricus rubellus, *Octolasion sp.*), u których wykazaliśmy różnice zarówno w składzie pozyskiwanych komórek, jak również zmienności w obrębie eleocytów i ich zdolności do autofluorescencji. W badaniach stwierdzono ponadto, że za autofluorescencję, w głównej mierze odpowiada, magazynowana w ziarnistościach eleocytów ryboflawina (witamina B2) (np. Cholewa i wsp. 2006; Plytycz i wsp. 2006). Wyniki uzyskane w trakcie badań wykazały zmienność międzygatunkową związaną z obecnością w celomie eleocytów. Stwierdzono, że komórki te, wywodzące się z tkanki chloragogenowej, występują w płynie celomatycznym tylko u niektórych gatunków (np. *E. andrei*, *A. chlorotica*), podczas gdy u innych są ściśle związane z jelitem lub występują w celomie jako niewielki procent wszystkich celomocytów (np. *L. terrestris*).

Wyniki te opublikowano w pracy:

Plytycz B., **Homa J.**, Koziol B., Rozanowska M., Morgan A.J., 2006. Riboflavin content in autofluorescent earthworm coelomocytes is species-specific. *Folia Histochem Cytobiol.* 44:65-71. IF₂₀₀₆=0.897; MNiSW=15.

Inny nurt badań dotyczący odporności dżdżownic, które realizowałam, to badania tempa odbudowy puli celomocytów gatunku *Dendrobaena veneta*. W badaniach tych wykazano zdolność dżdżownic do odbudowy puli celomocytów po wcześniejszym usunięciu komórek z organizmu poprzez wielokrotną izolację. Stwierdzono, że szybciej dochodzi do odbudowy w celomie puli amebocytów, natomiast komórki tkanki chloragogenowej, eleocyty regenerują się znacznie wolniej. Opublikowane wyniki były jednymi z pierwszych dostępnych analiz proliferacji komórek bezkręgowców badanych metodą cystometrii przepływowej oraz przy użyciu przeciwciał klasycznie stosowanych do oceny proliferacji komórek ssaczych tj. skierowanych przeciwko antygenowi Ki-67 (Homa i wsp. 2008).

Homa J., Bzowska M., Klimek M., Plytycz B., 2008. Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from the earthworm, *Dendrobaena veneta*. *Dev Comp Immunol.* 32:9-14. IF₂₀₀₈=2,833; MNiSW=40

Od 2014 roku rozpoczęłam również współpracę z dr hab. Grażyną Wilczek (Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii, Uniwersytet Śląski). Zainteresowania odpornością bezkręgowców pozwoliły dodać do moich badań kolejną grupę bezkręgowców, jakimi są pająki. W światowej literaturze praktycznie brak jest publikacji opisujących komórki immunokompetentne tych organizmów. W ramach wspomnianej współpracy realizowane są

analizy dotyczące hemocytów dwóch gatunków pajaków (*Xerolycosa nemoralis* i *Steatoda grossa*). Prowadzone prace pozwoliły na scharakteryzowanie elementów komórkowych hemolimfy oraz na zbadanie aktywności hemocytów. W obrębie populacji hemocytów wykazałyśmy cztery główne subpopulacje tych komórek, w tym plazmatocyty, prohemocyty, granulocyty oraz cyjanocyty. Co ciekawe, wykazaliśmy różnice w składzie hemocytów w zależności od płci oraz większą wrażliwość komórek immunokompetentnych samców poddanych głodzeniu lub karmionych skażonym pokarmem. Wyniki uzyskane na hemocytach *X. nemoralis* zostały już opublikowane:

Stalmach M., Wilczek G., **Homa J.**, Szulinska E., 2015. Antioxidative and immunological responses in the haemolymph of wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) exposed to starvation and dimethoate. Environ Pollut. 206:551-559. IF₂₀₁₅=4,839; MNiSW=40.

Natomiast, kolejny artykuł dotyczący drugiego badanego gatunku *S. grossa* jest obecnie przygotowywany do druku.

W ostatnich latach (od 2014 roku) współpracuję także z Dr hab. Pauliną Kramarz (Zespół Ekologii Fizjologicznej i Ewolucyjnej Bezkręgowców, Instytut Nauk o Środowisku Uniwersytet Jagielloński). W ramach tych badań prowadzimy oznaczenia parametrów immunologicznych u owadów (*Tribolium castaneum*) i mięczaków (*Arion vulgaris*). W efekcie współpracy dopracowane zostały metody związane z określeniem aktywności układu odpornościowego badanych organizmów w tym testy badające aktywność lizozymu, oraz układu profenoloksydazy (pro-PO). W prowadzonych doświadczeniach wykazaliśmy między innymi różnice w odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na zakażenie nicieniami *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) w zależności od statusu reprodukcyjnego owadów na przykładzie *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Wykazaliśmy wpływ statusu reprodukcyjnego na aktywność fenoloksydazy (PO), w przypadku, której aktywność u zakażonych nicieniami osobników dziewiczych była wyższa niż u osobników rozmnażających się. Wyniki korelowały również z zwiększoną śmiertelnością zakażonych osobników z niższym poziomem odpowiedzi układu PO. Nasze wyniki wskazują, że koszty reprodukcji osłabiają układ odpornościowy *T. castaneum*, a obniżenie aktywności PO jest niezależne od płci.

Kolejne badania, w których aktywnie uczestniczę, dotyczą mięczaków, na przykładzie ślimaków gatunku *Arion vulgaris*. Immunologia ślimaków jest słabiej poznana w stosunku do

owadów i stanowi ciekawe zagadnienie badawcze. W dotychczasowych badaniach wykazano wpływ temperatury otoczenia na wzrost aktywności systemu proPO, natomiast nie wykazano wpływu stosowanego różnego rodzaju pokarmu. W dalszych badaniach chcemy skupić się na dokładniejszej analizie komórek immunokompetentnych, hemocytów oraz komórkowej odpowiedzi immunologicznej. W ramach tych badań jestem również wykonawcą w projekcie Polish-Norwegian Research Programme nr Pol - Nor/201888/77.

Uzyskane w efekcie współpracy wyniki zostały zaprezentowane, jako doniesienia konferencyjne (Załącznik 3 pkt IIIB poz. 46, 48, 50) i opublikowane w postaci oryginalnej pracy naukowo-badawczej:

Kramarz P., Małek M., Gawęł M., Drobnia S.M., **Homa J.**, 2016. Reproductive status of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) affects response to infection by *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). Eur J Entomol. 113:309-314. IF₂₀₁₅=0,954; MNiSW=25.

Kolejne dwie prace dotyczące tych zagadnień przygotowywane są do wysłania do czasopism.

W trakcie badań odporności pierścienic zajęłam się również interesującą tematyką związaną z właściwościami cząsteczek biologicznie aktywnych pochodzących z płynu celomatycznego. Zainicjowanie badań w tym kierunku wynikało z faktu, że coraz częściej w badaniach nad nowotworami i zmianami powstającymi w organizmach wywołanymi różnymi czynnikami wykorzystuje się wiedzę uzyskaną z badań nad organizmami bezkręgowymi. W tkankach i płynach organizmów dżdżownic również występują białka, które wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Są to białka mające właściwości bakteriostatyczne, antykoagulacyjne, fibrynolityczne, proteolityczne, cytolityczne czy antyoksydacyjne (Grdiša i Hrženjak 2007). Białka pozyskane z organizmów dżdżownic mogą także stymulować czynniki wzrostu i pomagać w regeneracji ran, stymulować proliferację fibroblastów i komórek nabłonkowych oraz ich różnicowanie. Badania innych zespołów wykazały również działanie proapoptotyczne czynników obecnych w płynie celomatycznym dżdżownic na komórki linii nowotworowej raka szyjki macicy, HeLa (Yanqin et al. 2007) oraz na komórki raka wątroby (Chen et al. 2007). W wyniku zainteresowań związanych z właściwościami przeciwnowotworowymi białek dżdżownic, w latach 2010 – 2012 prowadziłam badania dotyczące efektu apoptotycznego płynów celomatycznych dżdżownic na komórki czerniaka pochodzących z trzech linii komórkowych: i) linii IGR-39 - komórek czerniaka skórno-

pochodzącą z fazy pierwotnej RGP, ii) linii 92-1 - komórek pierwotnego czerniaka ciała rzęskowego oraz iii) metastatycznych komórkach czerniaka linii A375. Badania prowadziłam we współpracy z dr hab. Ewą Pocheć z Zakładu Biochemii Glikokonjugatów IZ UJ. Badania zaowocowały powstaniem dwóch prac magisterskich, jednej pod moim kierunkiem i drugiej pod kierunkiem dr hab. Ewy Pocheć. Wstępne wyniki zostały pokazane także jako doniesienie konferencyjne (Załącznik 3 pkt IIIB poz. 44). Badania wykazały podatność komórek czerniaka na apoptozę indukowaną czynnikami obecnymi w płynach celomatycznych dżdżownic. Obserwowany efekt proapoptotyczny zależał zarówno od składu płynu celomatycznego danego gatunku dżdżownicy i sezonu, w którym gromadzono płyny (wiosenno-letni vs. jesienno-zimowy), jak również od etapu rozwoju czerniaka wybranych linii komórkowych. Publikacja przeglądowa z tej tematyki zawierająca wstępne wyniki przeprowadzonych badań została opublikowana w 2016 w czasopiśmie Kosmos:

Matejko S., Pocheć E., **Homa J.**, 2016. Dżdżownice jako źródło biologicznie aktywnych cząsteczek – właściwości przeciwnowotworowe białek dżdżownic. Kosmos, 65:23-32. MNiSW=12

Ze względu na wcześniejszą współpracę i badania prowadzone na komórkach linii nowotworowych z dr hab. Ewą Pocheć, w 2015 roku dołączyłam z kolei do jej badań, w których badałam zmiany ekspresji integryny $\alpha\beta3$ (receptor witronektyny) w obecności swainsoniny i w komórkach transfekowanych cDNA dla MGAT-5, komórkach metastatycznych czerniaka skóry linii WM266-4 i A375. Wykazano, że ekspresja integryny $\alpha\beta3$ nie ulegała zmianie ani w obecności swainsoniny, ani w komórkach transfekowanych cDNA dla MGAT-5, a obserwowane zmiany poziomu fosforylacji kinazy ognisk przylegania (FAK) są efektem zmian w glikozylacji receptora witronektyny. Wyniki opublikowano w pracy:

Pocheć E., Ząbczyńska M., Bubka M., **Homa J.**, Lityńska A., 2016. $\beta1,6$ -branched complex-type N-glycans affect FAK signaling in metastatic melanoma cells (LCNV-2015-0113). Cancer Investigation. 34:45-56. IF₂₀₁₅ 2,231; MNiSW=20.

Do innego nurtu badań, w których brałam udział należą prace badawcze na rybach. Ze względu na prowadzone przeze mnie badania, związane z apoptozą komórek, w roku 2013 włączyłam się do prowadzonych w naszym Zakładzie doświadczeń dotyczących apoptozy leukocytów karpia (*Cyprinus carpio* L.). Badania pokazały, że apoptoza neutrofili jest

Wykonawca w ramach grantu kierowanego przez Dr Krzysztofa Pawlaka z Uniwersytetu Rolniczego; N N311 536340: „Zarodek kurzy, jako model w badaniach nad wpływem pól elektromagnetycznych o częstotliwościach radiowych na proces embriogenezy” (2011-2015).

Wykonawca w ramach grantu kierowanego przez Dr Agnieszkę Mazur-Białą, Wydział Nauk o Zdrowiu Collegium Medicum UJ; UMO-2011/01/D/NZ6/02704: "Ryboflawina jako immunomodulator – wpływ niedoboru i wzbogacenia ryboflawiną na wczesne rozpoznanie patogenów i rozwój reakcji zapalnej (badania *in vitro* i *in vivo*)" (2011-2014).

Wykonawca w projekcie kierowanym przez Dr hab. Paulinę Kramarz z Instytutu Nauk o Środowisku UJ; Polish-Norwegian Research Programme nr Pol - Nor/201888/77: "Impact of climate change on biodiversity and spread of invasive species - A study on Arion slugs" (2013-2016).

6.2. Współpraca naukowa

Współpracowałam i nadal aktywnie współpracuję z następującymi ośrodkami badawczymi: Laboratoire de Génie Civil et géoEnvironnement, LGCgE, EA4515 Equipe Ecologie Numérique et Ecotoxicologie, UFR de Biologie, Université de Lille 1, Francja (Profesor Franck Vandenbulcke)

Analytical & Environmental Sciences Division, King's College, Londyn Wielka Brytania (Profesor Stephen R. Stürzenbaum)

Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii, Uniwersytet Śląski (Dr hab. Grażyna Wilczek)

Zespół Ekologii Fizjologicznej i Ewolucyjnej Bezkręgowców, Instytut Nauk o Środowisku Uniwersytet Jagielloński (Dr hab. Paulina Kramarz)

Zakład Weterynarii, Rozrodu i Dobrostanu Zwierząt, Instytut Nauk Weterynaryjnych, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytet Rolniczy w Krakowie (Dr hab. Marcin Lis)

Zakład Weterynarii, Rozrodu i Dobrostanu Zwierząt, Instytut Nauk Weterynaryjnych, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytet Rolniczy w Krakowie (Dr hab. Krzysztof Pawlak)

Zakład Biochemii Glikokonjugatów, Instytut Zoologii Uniwersytet Jagielloński (Dr hab. Ewa Pocheć)

ważnym procesem zachodzącym podczas immunostymulacji zymosanem i PMA, zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Wykazaliśmy między innymi, że, apoptoza wywołana przez PMA jest zależna od kinaz natomiast nie zależy od aktywności oksydazy NADPH, podczas gdy apoptoza zaindukowana przez zymosan zależna jest od ROS.

Kepka M, Verburg-van Kemenade BML, Homa J, Chadzinska M, 2014. Mechanisms involved in apoptosis of carp leukocytes upon *in vitro* and *in vivo* immunostimulation. Fish & Shellfish Immunology 39: 386-395. IF₂₀₁₄=3,034; MNiSW=40.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 20 publikacji anglojęzycznych, 2 publikacje popularnonaukowe, 2 rozdziały oraz współautorstwo w 1 książce. Sumaryczny IF moich publikacji wg bazy JCR zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi 38.219, suma punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW z grudnia 2015 wynosi 604, a indeks Hirscha wg Web of Science 7 (dane z 28.06.2016). Prace wchodzące w skład mojego dorobku cytowane były łącznie 214 razy, w tym 191 razy nie wliczając autocytowań (dane z 28.06.2016).

6. Udział w projektach badawczych i współpraca naukowa

6.1. Projekty naukowe

W trakcie zatrudnienia w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej byłam kierownikiem pięciu projektów finansowanych ze środków statutowych Instytutu Zoologii UJ (BW/IZ/33, BW/IZ/20a, BW/IZ/18a/2007, BW/11/IZ/2010, BW/IZ/15) oraz brałam udział w realizacji pięciu projektów badawczych.

Główny wykonawca w ramach grantu kierowanego przez Prof. dr hab. Barbarę Płytycz, Instytut Zoologii UJ; N304 088 32/3502: "Zastosowanie celomocytów dżdżownic jako bioindykatorów skażenia gleby, opracowanie i praktyczne zastosowanie rutynowych testów do monitoringu w oparciu o komórki immunokompetentne nieinwazyjnie pobrane z celomy dżdżownicy". (2007-2010).

Wykonawca w ramach grantu kierowanego przez Dr Marcina Lisa z Uniwersytetu Rolniczego; N311 1351 33: "Wpływ kwasu askorbinowego na przebieg embriogenezy, odpowiedź immunologiczną oraz wyniki produkcyjne, z uwzględnieniem reakcji na hipertermię kłujnikową kurcząt brojlerów" (2007 -2011).

7. Działalność organizacyjna i popularyzatorska

W ramach działalności organizacyjnej angażowałam się w liczne aktywności związane z pracami w Instytucie Zoologii UJ jak również poza uczelnią.

7.1. Działalność w towarzystwach naukowych

Od 2006 roku jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki. W latach 2006-2009 byłam sekretarzem Zarządu Głównego tego towarzystwa oraz zajmowałam się administracją nowopowstałej strony internetowej towarzystwa. Byłam również redaktorem technicznym drugiego wydania Słownika Biologii Komórki (2008).

W latach 2008-2012 byłam wiceprezesem Nowodworskiego Towarzystwa Młodych Biologów.

7.2. Organizacja konferencji naukowych

W 2006 roku byłam członkiem komitetu organizacyjnego 8th International Symposium on Earthworm Ecology, 4-9 września 2006, Kraków.

7.3. Recenzje

Byłam recenzentem 8 prac w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (Water, Air & Soil Pollution, Ecotoxicology, International Journal of Biological Sciences, Invertebrate Survival Journal, Science of the Total Environment, Experimental and Molecular Pathology) oraz jednej pracy w Zeszytach Naukowych Towarzystwa Doktorantów UJ.

W 2007 roku byłam recenzentem prac uczniów biorących udział w „Konkursie wiedzy immunologicznej” organizowanym w ramach II Nowodworskiej Konferencji Młodych Biologów.

7.4. Promocja wiedzy

Od 2013 roku zaangażowałam się w działalność organizacyjną na rzecz promocji Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (BiNoZ), pełniąc funkcję koordynatora wydziałowego ds. promocji. Do moich obowiązków należało koordynowanie prac pięciu Instytutów wchodzących w skład Wydziału BiNoZ w działalności związanej z promocją uczelni. Zajmowałam się między innymi pomocą w organizowaniu Dnia Otwartego UJ jak i

organizacją wydarzeń związanych z promowaniem uczelni w ramach wydarzeń zewnętrznych. Dużą część mojej działalności organizacyjnej (od roku 2013) stanowiły przygotowania kolejnych trzech edycji Nocy Biologów. Równocześnie w 2014 roku byłam koordynatorem instytutowym organizując IV Małopolską Noc Naukowców. W 2015 roku koordynowałam prace związane z realizacją filmu promującego Wydział BiNoZ, powstającego w ramach promocji Uniwersytetu Jagiellońskiego.

W ramach działalności organizacyjnej od 2014 roku, jako przedstawiciel niesamodzielnych pracowników naukowo-dydaktycznych jestem członkiem Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi.

8. Działalność dydaktyczna

W okresie zatrudnienia na stanowisku asystenta (2004-2007) i adiunkta (2007-2016) prowadziłam zajęcia dydaktyczne w pełnym wymiarze godzinowym (210 godzin pensum) oraz dodatkowo pełniłam opiekę nad licencjatami i magistrantami. W trakcie mojej pracy na etacie adiunkta byłam promotorem 8 prac licencjackich oraz 10 prac magisterskich. W tym roku mam pod opieką jedną osobę na trzecim roku, wykonującą licencjat, oraz dwoje magistrantów. Chciałabym również zaznaczyć, że wielu wypadkach moi magistranci są współautorami publikowanych przeze mnie prac naukowych.

Ponadto, w 2014 roku pomagałam w wykonaniu części badań do pracy magisterskiej Pana Jakuba Trzeciaka z kierunku Biotechnologia Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, prowadzonej przez dr hab. Marcina Lisa, „Wpływ zakażenia wybranymi szczepami bakterii z rodzaju *Staphylococcus* na poziom białka stresu cieplnego HSP70 w tkankach zarodków kurzych”, do której oznaczenia białek HSP zostały wykonane pod moim kierunkiem. Prowadziłam również kilkudniowe szkolenia z zakresu technik immunobiologicznych dla doktorantki Pani dr hab. Grażyny Wilczek, mgr Moniki Stalmach (5 dni w 2014 i 5 dni w 2015 roku).

W ramach działalności dydaktycznej jestem obecnie również doradcą studentów pierwszego i drugiego roku (2014 do teraz).

W związku z działalnością na rzecz Nowodworskiego Towarzystwa Młodych Biologów, w 2008 roku prowadziłam serię zajęć i warsztatów z Immunologii w Zakładzie

Immunologii Ewolucyjnej Instytutu Zoologii dla osób z I Liceum Ogólnokształcącego im. B. Nowodworskiego.

Informacje o pozostałych osiągnięciach naukowych i dydaktycznych nieuwzględnionych powyżej przedstawiono w „Wykazie opublikowanych prac naukowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki” (załącznik nr. 3).

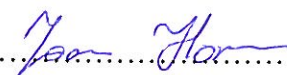
Literatura uzupełniająca

1. Bernard F., Brulle F., Dumez S., Lemiere S., Platel A., Nessler F., Cuny D., Deram A., Vandenbulcke F., 2015. Antioxidant responses of Annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 114:273–303.
2. Bilej M., Procházková P., Šilerová M., Josková R. 2010. Earthworm immunity in Invertebrate immunity (Red. Söderhäll K.) 66-79 (Uppsala, Sweden 2010).
3. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532-1535.
4. Chen H., Shoichi T., Michio I., Eiko O., Zhang Z., Kazuaki Ch., Chen B., 2007. Earthworm fibrinolytic enzyme : anti-tumor activity on human hepatoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Chin Med J.* 120:898-904.
5. Cholewa J., Feeney G.P., O'Reilly M., Stürzenbaum S.R., Morgan A.J., Plytycz B., 2006. Species specific autofluorescence in earthworm coelomocytes. *Folia Hist Cytobiol.* 44: 65-71.
1. Chow O.A., von Kockritz-Blickwede M., Bright A.T., Hensler M.E., Zinkernagel A.S., Cogen A.L., et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 2010;8:445–454.
2. Fjøsne T.F., Stenseth E.B., Myromslien F., Rudi K. 2015. Gene expression of TLR homologues identified by genome-wide screening of the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Innate Immun.* 21:161-166.
3. Grdiša M., Hrženjak T., 2007. Glycolipoprotein extract of *Eisenia foetida* (G-90): A source of biological active molecules. *Eur J Soil Biol.* 43:104-109.
4. Koiwai K., Alenton R.R., Kondo H., Hirano I. 2016. Extracellular trap formation in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) hemocytes is coupled with c-type lysozyme. *Fish Shellfish Immunol.* 52:206-209.
5. Kolaczowska E., Jenne C.N., Surewaard B.G., Thanabalasuriar A., Lee W.Y., Sanz M.J., Mowen K., Opdenakker G., Kubes P., 2015. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun.* 6:6673.
6. Little T.J., Hultmark D., Read A.F. 2005. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat Immunol.* 6:651-654.
7. Mills C.D., Ley K., Buchmann K., Canton J., 2015. Sequential Immune Responses: The Weapons of Immunity. *J Innate Immun.* 7:443-449.
8. Neeli I., Dwivedi N., Khan S., Radic M. 2009. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 1:194–201.
9. Ng T.H., Chang S.H., Wu M.H., Wang H.C. 2013. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Dev Comp Immunol.* 41:644-651.
10. Ng T.H., Wu M.H., Chang S.H., Aoki T., Wang H.C. 2015. The DNA fibers of shrimp hemocyte extracellular traps are essential for the clearance of *Escherichia coli*. *Dev Comp Immunol.* 48:229-233.

11. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. 2010. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191:677-691.
12. Pijanowski L., Golbach L., Kolaczowska E., Scheer M., Verburg-van Kemenade B.M., Chadzinska M., 2013. Carp neutrophilic granulocytes form extracellular traps via ROS-dependent and independent pathways. *Fish Shellfish Immunol.* 34:1244-1252.
13. Pijanowski L., Scheer M., Verburg-van Kemenade B.M., Chadzinska M., 2015. Production of inflammatory mediators and extracellular traps by carp macrophages and neutrophils in response to lipopolysaccharide and/or interferon- γ 2. *Fish Shellfish Immunol.* 42:473-482.
14. Poirier A.C., Schmitt P., Rosa R.D., Vanhove A.S., Kieffer-Jaquinod S., Rubio T.P., et al. 2014. Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. *J Biol Chem.* 289:24821-31.
15. Robb C.T., Dyrinda E.A., Gray R.D., Rossi A.G., Smith V.J., 2014. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nat Commun.* 5:4627.
16. Rohrbach A.S., Slade D.J., Thompson P.R., Mowen K.A., 2012. Activation of PAD4 in NET formation. *Front Immunol.* 3:360.
17. Škanta F., Roubalová R., Dvořák J., Procházková P., Bilej M., 2013. Molecular cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm. *Dev Comp Immunol.* 41:694-702.
18. Valembois P., Seymour J., Lasségués M., 1994. Evidence of lipofuscin and melanin in the brown body of the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Cell Tissue Res.* 227:183-188.
19. Yanqin L., Yan S., Zhenjun S., Shijie L., Chong W., Yan L., Yuhong G., 2007. Coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida* induces apoptosis of HeLa cells *in vitro*. *Europ J Soil Biol.* 43:143-148.
20. Zhang X., Zhuchenko O., Kuspa A., Soldati T. 2016. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat Commun.* 7:10938.
21. Yousefi S., Gold J.A., Andina N., Lee J.J., Kelly A.M., Kozłowski E., et al. 2008. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* 14:949-953.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego oraz publikacje, w których jestem współautorem zostały wymienione na początku autoreferatu oraz w opisie osiągnięcia i nie wchodzi w spis literatury.

Kraków dnia11.07.2016.....

..........
podpis