

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii

AUTOREFERAT

**Zróżnicowanie strukturalne antygenów O-swoistych
lipopolisacharydów bakterii z rodzaju *Aeromonas***

Anna Turska-Szewczuk

Lublin 2014

dr Anna Turska-Szewczuk

Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

1. Imię i nazwisko

Anna Turska-Szewczuk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2003 Stopień doktora nauk biologicznych

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, dyscyplina: biologia;

Tytuł rozprawy: *Charakterystyka immunochemiczna mutantu Mesorhizobium loti 2213.1 defektywnego w syntezie lipopolisacharydu;*

promotor: Prof. dr hab. Ryszard Russa;

praca doktorska została obroniona 7 maja 2003 r.

1995 Tytuł magistra biologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, specjalność: mikrobiologia;

Tytuł pracy: *Modulacja wytwarzania bydłowego IFN i TNF w obecności Lydium – KLP oraz wyciągów roślinnych i grzybowych;*

promotor: Prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń;

praca magisterska została obroniona 11 września 1995 r.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (od 2011 r. przekształcony w Wydział Biologii i Biotechnologii)

01.10.1995 – 30.09.2003 asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS

01.10.2003 – obecnie adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecnie: Zakład Genetyki i Mikrobiologii)

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.):

1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Zróźnicowanie strukturalne antygenów O-swoistych lipopolisacharydów bakterii z rodzaju *Aeromonas*

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1) **Turska-Szewczuk A.,*** Kozinska A., Russa R., Holst O. (2010) The structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Aeromonas bestiarum* strain 207. *Carbohydr. Res.*, 345, 680-684.

IF₂₀₁₀ 1,898; MNiSW₂₀₁₀ 32 pkt

2) **Turska-Szewczuk A.,*** Guz L., Lindner B., Pietras H., Russa R., Holst O. (2011) Structural characterization of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of the fish pathogen *Aeromonas bestiarum* strain P1S. *Carbohydr. Res.*, 346, 815-821.

IF₂₀₁₁ 2,332; MNiSW₂₀₁₂ 25 pkt

3) **Turska-Szewczuk A.,*** Lindner B., Komaniecka I., Kozinska A., Pekala A., Choma A., Holst O. (2013) Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen, *Aeromonas bestiarum* strain K296, serotype O18. *Marine Drugs*, 11, 1235-1255.

IF_{2013/14} 3.512; MNiSW₂₀₁₃ 40 pkt

4) **Turska-Szewczuk A.,*** Lindner B., Pękala A., Palusińska-Szys M., Choma A., Russa R., Holst O. (2012) Structural analysis of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Aeromonas veronii* bv. *sobria* strain K49. *Carbohydr. Res.*, 353, 62-68.

IF₂₀₁₂ 2.044; MNiSW₂₀₁₂ 25 pkt

* autor korespondencyjny

- 5) **Turska-Szewczuk A.,*** Pietras H., Duda K. A., Kozińska A., Pękała A., Holst O. (2014) Structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Aeromonas sobria* strain Pt312. *Carbohydr. Res.*, (in press), <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.011>

IF_{2013/14} 1.966; MNiSW₂₀₁₃ 25 pkt

- 6) **Turska-Szewczuk A.,*** Duda K. A., Schwudke D., Pekala A., Kozinska A., Holst O. (2014) Structural studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen *Aeromonas veronii* strain Bs19, serotype O16. *Marine Drugs*, 12, 1298-1316.

IF_{2013/14} 3.512; MNiSW₂₀₁₃ 40 pkt

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

Prace wybrane do osiągnięcia naukowego stanowią cykl sześciu publikacji spójnych metodycznie i koncepcyjnie poświęconych analizie strukturalnej antygenów O-swoistych lipopolisacharydów bakterii z rodzaju *Aeromonas*.

Wprowadzenie

Naturalnym środowiskiem występowania Gram-ujemnych pałeczek z rodzaju *Aeromonas* są ekosystemy wodne, zarówno wody słodkie jak i morskie. Izolowano je także z urządzeń służących do dystrybucji wody pitnej, w których tworzyły biofilmy, z gleby i ścieków oraz produktów spożywczych między innymi owoców morza, mięsa, mleka i warzyw. W związku z powszechnym występowaniem, bakterie *Aeromonas* są identyfikowane jako składnik naturalnej mikroflory zwierząt wodnych zmiennociągłych.^{1,2} Pałeczki zostały najlepiej poznane, jako oportunistyczne patogeny ryb, u których w warunkach stresu środowiskowego, wywołują infekcje miejscowe obejmujące powłoki skórne (MAI - motile *Aeromonas* infection) lub posocnicę krwotoczną (MAS - motile *Aeromonas* septicemia) kończącą się śnięciem ryb, w przebiegu której następuje obrzęk ciała, wysadzenie gałek ocznych, naroszenie łusek oraz wybroczynowość w obrębie skrzelu i narządów wewnętrznych.³⁻⁵ U człowieka bakterie wywołują najczęściej biegunki, zapalenie żołądka i jelit, zakażenia ran oraz infekcje dróg żółciowych i wątroby. Odnotowywano także przypadki zapalenia opon mózgowych i posocznicy u dzieci oraz osób z obniżoną odpornością.^{1,2} Główną drogą zakażenia człowieka mezofilnymi pałeczkami

Aeromonas jest kontakt ze skażoną wodą pitną i chorymi zwierzętami. Z ludzkich materiałów klinicznych najczęściej izolowano bakterie *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. veronii*.^{1,6} Z kolei szczepy najbardziej patogenne dla ryb są identyfikowane, jako: *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. veronii* bv. *sobria*.¹ Wyżej wymienione gatunki mezofilne oraz gatunek psychrofilny *A. salmonicida* wywołują choroby ryb (karpia i pstrąga) także w polskich stawach hodowlanych przyczyniając się tym samym do dużych strat ekonomicznych.^{3-5,7}

Zakażenie pałeczkami *Aeromonas* jest determinowane zdolnością tych bakterii do syntezy różnych czynników wirulencji. Należy do nich zaliczyć: enzymy wydzielane pozakomórkowo tj.: aerolizyna, o właściwościach hemolitycznych i cytolitycznych, cytotoksyczna enterotoksyna - Act, cytotoxiczne enterotoksyny (termolabilna Alt i ciepłostała Ast), proteazy, elastazy i acetylotransferaza glicerofosfolipid:cholesterol. Ważną rolę w patogenezie spełniają także struktury powierzchniowe bakterii Gram-ujemnych, które warunkują adhezję do nabłonek i śluzu takie jak: fimbrie, białka błony zewnętrznej, warstwa białkowa S, składniki trzeciego systemu sekrecji i lipopolisacharyd.^{1,2,8}

Stosunkowo słabo zbadanymi czynnikami patogenności pałeczek *Aeromonas* są składniki osłon komórkowych. Jest wśród nich **lipopolisacharyd (LPS),^{8,9} integralny glikolipid błony zewnętrznej, którego analiza strukturalna jest realizowanym przeze mnie celem badawczym.**

LPS jest amfifilową, termostabilną makrocząsteczką spełniającą funkcje o podstawowym znaczeniu dla procesów życiowych bakterii; jako adhezyna niefimbrialna warunkuje kolonizację organizmu eukariotycznego. W ogólnym planie budowy lipopolisacharydu można wyróżnić trzy regiony: najbardziej konserwatywny strukturalnie lipid A, oligosacharyd rdzeniowy i łańcuch O-swoisty (antygen O), charakteryzujący się największą heterogennością. Zmienność w budowie części O-swoistej LPS, determinowana genetycznie, jest związana z różnicami w strukturze powtarzających się podjednostek tj., rodzajami i sekwencją reszt cukrowych, formą pierścienia, typem łączących je wiązań oraz obecnością dodatkowych podstawników. Jako część glikolipidu najbardziej eksponowana na zewnątrz, silnie oddziałuje ze środowiskiem i ułatwia przyleganie bakterii do komórek gospodarza. Ze względu na unikatową budowę, nawet w obrębie szczepów, łańcuch O-swoisty pełni rolę antygeny powierzchniowego bakterii i determinuje ich swoistość serologiczną.¹⁰

Lipid A jest najbardziej konserwatywną częścią LPS, która wpływa także na aktywność biologiczną i toksyczność całej cząsteczki. Budowa lipidu A jest determinowana resztami cukrowymi tworzącymi szkielet, ilością i długością przyłączonych do niego kwasów tłuszczowych określających tzw. wzorzec acylacji oraz obecnością hydrofilowych podstawników takich jak grupy fosforanowe i 4-amino-4-deoksyarabinoza. Wynikająca ze struktury konformacja przestrzenna lipidu A warunkuje interakcję z rozpoznającym go receptorem. U większości poznanych bakterii, w tym u pałeczek jelitowych i bakterii z rodzaju *Aeromonas*, hydrofilowy komponent molekuly stanowią dwie reszty glukozaminy połączone wiązaniem β -1,6-glikozydowym.¹¹ Z kolei różnice w budowie cząsteczek lipidu A izolowanych z membrany, są warunkowane przez hydrofilowe i hydrofobowe podstawniki. **Na dużą heterogenność preparatów lipidu A otrzymanych ze szczepów *Aeromonas* wskazują także prowadzone przeze mnie badania (publikacje 3 i 6).**

Region rdzeniowy łączy część O-swoistą LPS z dystalną, nieredukującą glukozaminą lipidu A wiązaniem ketozydowym za pośrednictwem reszty Kdo (kwasu 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego). Chociaż region ten charakteryzuje się większą zmiennością strukturalną niż zakotwiczony w membranie lipid A, możliwe jest zaproponowanie wspólnego schematu budowy tego oligocukru w obrębie gatunku, a niekiedy także rodzaju bakterii. W rodzinie *Enterobacteriaceae* wyróżniono dwa strukturalnie odmienne regiony rdzenia: wewnętrzny zbudowany z podregionów heptozowego i Kdo oraz zewnętrzny, najbardziej dystalny w odniesieniu do lipidu A, nazywany rdzeniem heksozowym. **Odmienne budowę chemiczną regionu rdzeniowego, odbiegającą od tej ustalonej dla pałeczek jelitowych, wykazano w LPS *A. hydrophila*¹² i *A. salmonicida*,¹³ a także u bakterii *Aeromonas bestiarum* i *Aeromonas sobria complex* (publikacje 3 i 6).**

LPS w formie wysokocząsteczkowej (LPS typu S) zawierający wszystkie wyżej wymienione części jest charakterystyczny dla gładkich form bakterii (S). W błonie zewnętrznej form szorstkich (R) występują glikoformy LPS pozbawione łańcuchów O-swoistych (LPS typu R). Bakterie o fenotypie SR (półszorstkim) syntetyzują cząsteczki, których rdzeń jest podstawiony tylko jedną podjednostką antygeny O (SR-LPS). Naturalną cechą bakterii jest heterogenność wśród występujących w błonie zewnętrznej frakcji LPS.

Lipopolisacharyd chroni bakterie Gram-ujemne przed opsonizacją, fagocytozą i bójczym działaniem surowicy. W przypadku form gładkich, mających na swojej powierzchni hydrofilową osłonę tworzoną przez wysokopolimeryzowane łańcuchy O-swoiste, uformowanie kompleksu litycznego MAC z białek układu dopełniacza wbudowującego się do membrany zewnętrznej bakterii jest znacznie utrudnione lub wręcz niemożliwe.

LPS będąc jedną ze struktur określanych jako wzorce molekularne skorelowane z patogenami (PAMP - patogen associated molecular patterns), jest ligandem rozpoznawanym przez receptory PRR (PRR - pattern recognition receptors) komórek efektorowych układu odpornościowego takich jak: makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NKT, limfocyty B oraz komórek nabłonków i śródbłonków. Wśród receptorów PRR, receptory Toll-, (TLR) i NOD-podobne są aktywowane przez struktury komórkowe mikroorganizmów. Podczas gdy TLR-2 rozpoznaje składniki ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, ligandem dla TLR-4 jest przede wszystkim lipopolisacharyd. Reakcje PAMP-PRR aktywują układ immunologiczny, a w pierwszej kolejności wrodzone mechanizmy odpornościowe.

TLR są głównymi receptorami sygnalizującymi obecność patogenu u ssaków jak i niższych kręgowców m.in., ryb.¹⁴ Ich ekspresja na powierzchni makrofagów (kluczowych komórek fagocytujących u ryb) i w tzw. centrach melano-makrofagowych (pełniących rolę węzłów limfatycznych ssaków) jest niezbędna dla inicjowania odpowiedzi immunologicznej i skutecznego hamowania rozwoju infekcji.¹⁵ W zwalczaniu czynników patogennych u ryb uczestniczą także: białka antybakteryjne, układ dopełniacza, lektyny, inhibitory proteaz oraz tzw. naturalne immunoglobuliny produkowane po ekspozycji na antygeny środowiskowe.¹⁶

Dla zapoczątkowania odpowiedzi zapalnej u ssaków za pośrednictwem TLR-4, LPS uwolniony z błony zewnętrznej bakterii do krwi, po związaniu z białkami ostrej fazy (białko LBP), jest przekazywany na kompleks receptora CD14/TLR-4/MD-2, co prowadzi do aktywacji komórek układu immunologicznego i uwalniania mediatorów reakcji zapalnej. Uczestniczą w niej cytokiny (IL-1,-6,-8, TNF- α), chemokiny, prostaglandyny, leukotrieny oraz czynnik aktywujący płytki krwi. W reakcji ligand-receptor poziom i intensywność odpowiedzi na obcy antygen zależy od budowy i konformacji przestrzennej lipidu A. Dla rozwoju procesu zapalnego istotna jest mobilizacja właściwości fagocytarnych makrofagów, uwalnianie reaktywnych form tlenu i synteza tlenku azotu, a także poprzez zwiększenie ekspresji antygenów zgodności tkankowej rekrutacja komórek swoistej odpowiedzi immunologicznej, która prowadzi do eliminacji czynnika patogennego.¹⁷ Z drugiej strony, nadmierna stymulacja układu immunologicznego, jaka ma miejsce przy masowych zakażeniach i jest związana ze zbyt wysokim wzrostem poziomu markerów procesu zapalnego, może prowadzić do wstrząsu septycznego kończącego się śmiercią.

Co ciekawe, u ryb wstrząs endotoksyniczny nie występuje. Ma to związek z faktem, że pomimo obecności kilkunastu odpowiedników ssaczy TLR, receptor TLR-4 jest u tych zwierząt rzadko spotykany. Jak dotąd został wykryty tylko u *Danio rerio* i karpowatych, u których pełni prawdopodobnie inną funkcję. Przypuszcza się, że u ryb w rozpoznaniu LPS

biorą udział β -integryny, które są ekspozowane w dużej ilości na jednojądrzastych komórkach fagocytyjących. Za ich pośrednictwem następuje aktywacja mechanizmów odporności przeciwzakaźnej. Natomiast TLR-4 jest zaangażowany w wyciszenie reakcji zapalnej podobnie jak indukowana w odpowiedzi na infekcję, interleukina 10 (IL-10).¹⁸

Cel badań

Celem prezentowanego jednotematycznego cyklu prac jest analiza strukturalna lipopolisacharydów (głównie antygenów O-swoistych, ale także oligosacharydów rdzeniowych i cząsteczek lipidu A) pałeczek Gram-ujemnych *Aeromonas bestiarum* i grupy fenotypowej *Aeromonas sobria* complex, których szczepy zostały określone jako patogenne dla ryb.^{5,7,19} Ograniczona wiedza na temat budowy endotoksyn tych bakterii^{12,13} i całkowity brak informacji dotyczących struktury LPS gatunków *A. bestiarum* i *A. sobria* complex, uzasadnia podjęcie powyższego problemu badawczego.

Strategia badawcza

W przedstawionych do oceny pracach zastosowano klasyczną metodę izolacji endotoksyny. Preparaty LPS uzyskano z degradowanych enzymatycznie komórek bakterii na drodze ekstrakcji 45% fenolem w temperaturze 65-68°C. W badaniach wyizolowanych i oczyszczonych preparatów, wykorzystano analizę metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS) modyfikowanych chemicznie składników cukrowych (octanów alditoli i aminoalditoli) uwolnionych na drodze ostrej hydrolizy. Do ustalenia sposobu podstawienia reszt cukrowych w permetylowanych polisacharydach zastosowano analizę składników metodą GC/MS jako częściowo metylowanych octanów alditoli i aminoalditoli. W określaniu struktur oligo- i polisacharydów korzystano z wysokorozdzielczych technik spektrometrii mas (ESI/MS, ESI FT-ICR MS) oraz spektroskopii jedno- i dwuwymiarowych technik NMR. Porównanie antygenów O-swoistych serogrup O18 i O34, wykonano metodą immunoblottingu z użyciem króliczych surowic poliklonalnych anti-O.

Podjęte badania doprowadziły do zdefiniowania struktur kilku antygenów O-swoistych: dla *A. bestiarum* K296, serogrupa O18 i *A. veronii* Bs19, serogrupa O16, a także ustalenia budowy antygeny O szczepów *A. bestiarum* P1S i *A. veronii* bv. *sobria* K49, które zostały zaklasyfikowane do serogrup, odpowiednio PGO6⁵ i O6 (najnowsze dane). W kolejnych pracach wykazano heterogenność kompletnych cząsteczek lipopolisacharydów

(oligocukrów rdzeniowych i lipidu A) bakterii *A. bestiarum* i *A. veronii*. Są to pierwsze prace charakteryzujące endotoksyny u tych gatunków.

Analiza strukturalna antygenów O-swoistych *Aeromonas* sp. jest ważna z uwagi na prezentowane w literaturze dane kliniczne, z których wynika, że blisko 60% przypadków posocznicy u ludzi było spowodowanych zakażeniem pałeczkami należącymi do serogrup O11, O16, O18 i O34. Wymienione typy ciepłostalego antygeny O mają zatem znaczenie w leczeniu, ^{1,8} a wspólnie z serogrupami O3, O6, PGO1, PGO4 i PGO6 są również istotne ze względu na patogenność dla ryb. ^{5,7} Obecnie są prowadzone badania nad wykorzystaniem szczepów *Aeromonas* jako składnika szczepionki wieloważnej w immunoprofilaktyce chorób wrzodowych i posocznicy krwotocznej karpia²⁰ i pstrąga. Strukturalne zdefiniowanie antygeny powierzchniowego O dla immunotypów najczęściej identyfikowanych wśród gatunków patogennych może przyspieszyć takie badania.

Omówienie osiągniętych wyników

Struktury antygenów O-swoistych po raz pierwszy opisane dla gatunku *A. bestiarum* (publikacje 1 i 2).

Lipopolisacharydy dwóch mezofilnych i patogennych dla karpia szczepów *A. bestiarum* 207 i P1S zostały wyizolowane z fazy wodnej w klasycznej metodzie ekstrakcji komórek 45% fenolem na gorąco. Polisacharydy O-swoiste (OPS) badano rozpoczynając od analizy składu i konfiguracji absolutnej reszt cukrowych, określenia sposobu ich podstawienia, a w następnej kolejności prowadzono badanie struktury chemicznej antygenów z wykorzystaniem technik spektrometrii mas i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (1D i 2D; dla jąder ¹H i ¹³C).

W preparacie OPS *A. bestiarum* 207 zidentyfikowano L-ramnozę (Rha) i D-glukozaminę (GlcN) w stosunku molowym 4:1. Analiza metylacyjna wykazała, że reszty 6-deoksymannozy były podstawione glikozydowo przy węglu C-2 lub C-3, a wśród pochodnych częściowo metylowanych octanów alditoli 6-deoksyheksos ok. 20% stanowiły te dla reszt dwupodstawionych (zarówno przy węglu C-2 jak i C-3), podczas gdy glukozaminę zidentyfikowano wyłącznie, jako resztę terminalną. Na podstawie sygnałów obserwowanych na dwuwymiarowych widmach homo- i heteronuklearnych (COSY, TOCSY, ROESY, HSQC i HMBC) ustalono budowę pentasacharydowej, rozgałęzionej podjednostki antygeny O-swoistego szczepu *A. bestiarum* 207 (**publikacja 1**). Strukturę oligomeru obrazuje schemat przedstawiony poniżej:

Badania lipopolisacharydu *A. bestiarum*. Identyfikacja wspólnych epitopów dla serotypów O18 i O34 – strukturalne podstawy (publikacja 3).

Celem pracy była analiza pełnej cząsteczki LPS szczepu K296, wirulentnego dla karpia. Izolat ten został zidentyfikowany jako *A. bestiarum* na podstawie PCR-RFLP fragmentu genu dla 16S rDNA.⁴ Szczepy tego gatunku są stosunkowo często pozyskiwane od ryb z objawami infekcji miejscowej lub uogólnionej (MAI/MAS). Patogeny wirotyp K296 został potwierdzony w teście *in vitro* na podstawie wysokiego poziomu aktywności hemolitycznej i proteolitycznej (żelatyno- i kazeinolitycznej).⁵ Badania strukturalne LPS *A. bestiarum* K296 rozszerzono o analizy immunochemiczne. Pod względem ciepłostalego antygeny O, serotyp szczepu K296 został określony jako O18.⁵

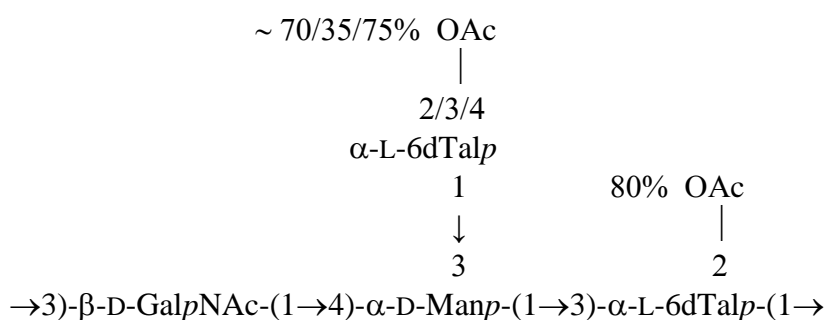
Z komórek *A. bestiarum* K296 uzyskano dwie frakcje lipopolisacharydu, hydrofilną i lipofilną. Heterogenność wyizolowanych preparatów wstępnie zaobserwowano na profilu SDS-PAGE i potwierdzono na widmach ESI/MS. Wśród glikoform LPS wyizolowanych z fazy wodnej dominowały cząsteczki zawierające heksaacylowany lipid A, natomiast w fazie fenolowej, oprócz tetraacylowanych glikoform LPS typu R zidentyfikowano także cząsteczki SR-LPS (masa większa o 783.28 Da), w których oligosacharyd rdzeniowy był podstawiony podjednostką łańcucha O-swoistego o składzie:



Poza określeniem stopnia acylacji szkieletu cukrowego lipidu A, a także rodzaju i długości łańcuchów przyłączonych reszt kwasów tłuszczowych wykazano, że bisfosforylowany disacharyd glukozaminylowy był niestechiometrycznie podstawiony 4-amino-4-deoksyarabinozą. Natomiast oligocukier rdzeniowy w LPS *A. bestiarum* K296 był **nonasacharydem: Hep₆Hex₁HexNKdoP**, w którym dominowały reszty heptozy (zidentyfikowane jako D-glicero-D-manno-heptoza i L-glicero-D-manno-heptoza), a kwas 2-keto-3-deoksyoktonowy był prawdopodobnie podstawiony grupą fosforanową.

Są to pierwsze doniesienia na temat struktury regionu rdzeniowego i lipidu A LPS *A. bestiarum*. Wykazanie wspólnego planu budowy oligocukru rdzenia u *A. bestiarum* i *A. hydrophila*, pośrednio dowodzi bliskiego pokrewieństwa ww. gatunków z grupy hybrydacyjnej HG-1 i HG-2, należących do jednej grupy fenotypowej.

Frację polisacharydu O-swoistego uzyskaną z preparatu LPS (z fazy fenolowej) badano przy użyciu metod chemicznych i instrumentalnych. Analiza GC/MS wykazała, że 6-deoksy-L-taloza (L-6dTal), D-Man i D-GalN są składnikami łańcucha O-swoistego *A. bestiarum* K296. Widma jednowymiarowe NMR dla jąder ^1H i ^{13}C wskazały natomiast większą (niż można by wnioskować ze składu chemicznego) heterogenność, spowodowaną niestechiometryczną O-acetylacją reszt cukrowych. Strategią podejmowaną najczęściej w takim przypadku jest rejestracja i analiza widm preparatu O-deacetylowanego. Postępowanie takie zdecydowanie upraszcza spektra. Przeprowadzono dwie analizy i takie rozwiązanie okazało się istotne z punktu widzenia analiz immunochemicznych. Pełną strukturę podjednostki O-antygeny, z uwzględnieniem lokalizacji wszystkich estrowo związanych grup acetylowych, ustalono interpretując widma 2D NMR preparatu natywnego i modyfikowanego. Obserwowane na spektrum $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC polisacharydu natywnego zmiany wartości przesunięć chemicznych tj. migracja w dół wartości pola dla kilku par jąder $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (H2/C2, H3/C3, H4/C4), potwierdziły, że reszty terminalnej 6dTalp były podstawione, przez grupy O-acetylowe, w pozycji O-2 i O-4 lub O-3. Heterogenność polisacharydu O-swoistego K296 była także skutkiem niestechiometrycznej acetylacji pozycji O-2 w 6-deoksytalopiranozie pochodzącej z łańcucha. Strukturę podjednostki O-antygeny *A. bestiarum* K296 przedstawiono na poniższym rysunku:



Szczegółowe badania strukturalne OPS, z uwzględnieniem lokalizacji wszystkich miejsc przyłączenia grup O-acetylowych, umożliwiły identyfikację pokrewnych epitopów reagujących krzyżowo w badaniach immunotypów: O18, do którego zaklasyfikowano szczep *A. bestiarum* K296 i O34 reprezentowanego przez szczep *A. hydrophila* AH-3.²⁴ Z użyciem surowic poliklonalnych anty-LPS wykazano podobieństwo O-antygenów, wynikające ze wspólnego schematu budowy ich powtarzających się podjednostek. Z kolei różnice w reaktywności były spowodowane innym wzorem O-acetylacji terminalnej reszty $\alpha\text{-L-6dTalp}$ i prawdopodobnie różną zawartością w surowicach przeciwciał specyficznych dla poszczególnych epitopów. Modyfikacje reszt cukrowych dotyczące pozycji przyłączenia

niecukrowych podstawników mogą determinować strukturalne warianty antygenów O i mieć swój wyraz w reaktywności krzyżowej surowic, a także w klasyfikacji do serogrup.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że serogrupa O18, która była jednym z częściej identyfikowanych immunotypów wśród ruchliwych pałeczek *Aeromonas* w przebadanej populacji ryb, skupiała prawie 80% izolatów, klasyfikowanych jako wirulentne dla karpia.⁷

Badania LPS form gładkich w grupie fenotypowej *A. sobria* complex (publikacje 4, 5, 6).

Jak wykazały badania Kozińskiej (2009)⁵ szczepy *A. sobria* complex stanowią liczącą się grupę wśród izolatów *Aeromonas* pozyskiwanych od ryb hodowlanych w Polsce. Cechuje się ona największą heterogennością pod względem budowy ciepłostalego antygeny O. Wymusza to konieczność wprowadzania tymczasowych grup serologicznych (PGO), poza stosowanym powszechnie schematem japońskim Sakazaki i Shimada (1984).²⁵

Moje zainteresowania badawcze dotyczyły analizy strukturalnej endotoksyny i antygeny O izolatów reprezentujących jedne z częściej identyfikowanych immunotypów w grupie *A. sobria* complex. Szczepy *A. veronii* bv. *sobria* K49 (serogrupa O6) i *A. veronii* Bs19 (serogrupa O16) wyizolowano z owrzodzeń skórnych karpia podczas incydentów posocznicy krwotocznej. Szczep *A. sobria* Pt312 pozyskano z nerki pstrąga tęczowego, osobnika, u którego nie wystąpiły wyraźne symptomy choroby.

Składnikami łańcucha O-swoistego K49 były: L-ramnoza (L-Rha), 3-amino-3,6-dideoksy-D-glukoza (D-Qui3N) i 2-amino-2,6-dideoksy-D-galaktoza (D-FucN) w proporcji 2,6:1,1:1 (**publikacja 4**). Na widmach 2D NMR zidentyfikowano układy spinowe dla pięciu reszt cukrowych: dwóch amino-6-deoksyheksoz (β -Quip3NAc i α -FucpNAc) oraz trzech reszt α -Rhap. Wysoki stopień spolimeryzowania łańcucha i jego regularną budowę ustalono w analizie ESI/MS. Jony powstałe na skutek fragmentacji wiązań glikozydowych między Quip3NAc i Rhap, były oddalone od siebie o 812.34 Da. Wartość ta korespondowała z wielkością masy podjednostki antygeny O-swoistego wyliczoną dla pojedynczego pentasacharydu o następującym składzie:



Struktura oligomeru łańcucha O-swoistego szczepu K49, zaprezentowana poniżej, odpowiada biologicznej powtarzającej się podjednostce, w której β -D-Quip3NAc jest resztą terminalną:



Jest to pierwsza struktura antygeny O opublikowana dla gatunku *A. veronii* bv. *sobria*.

Analiza składników łańcucha O-swoistego otrzymanego z rozpuszczalnego w fenolu preparatu S-LPS szczepu *A. sobria* Pt312, wykazała, że jest on zbudowany z dwóch reszt cukrowych: D-GlcN i L-Rha. Widma jednowymiarowe NMR dla jąder ^1H i ^{13}C okazały się jednak o wiele bardziej złożone niż można by oczekiwać na podstawie składu chemicznego. Wynikało to z niestechiometrycznej O-acetylacji reszt cukrowych. Przesunięcie sygnałów w dół wartości pola dla par jąder $^1\text{H}/^{13}\text{C}$: H-2/C-2 i H-3/C-3 potwierdziło, że reszty L-Rha są dekorowane grupami acetylowymi w pozycji O-2 lub O-3 z częstością, która została oszacowana na poziomie odpowiednio 80% i 35% (**publikacja 5**).

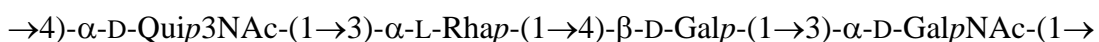
W kolejnej pracy (**publikacja 6**) badano strukturę kompletnych cząsteczek lipopolisacharydu wyizolowanych z komórek *A. veronii* Bs19, o serotypie antygeny powierzchniowego O16, patogenego dla człowieka i ryb.

Analiza objęła frakcje LPS z fazy wodnej i fenolowej, które uzyskano po ekstrakcji. Heterogenność wyizolowanych cząsteczek LPS, zaobserwowana w profilu migracji preparatów w SDS-PAGE, została potwierdzona na widmach ESI/MS. Wśród form LPS, w obu wydzielonych frakcjach, dominowały te o tetraacylowanym wzorze lipidu A. Co więcej, glikoformy LPS typu R z fazy wodnej i fenolowej, którym towarzyszyły cząsteczki SR-LPS, różniły się składem oligocukru rdzeniowego. **Dekasacharyd: Hep₅Hex₃HexNKdoP** był dominującą formą oligomeru we frakcji hydrofilnej LPS *A. veronii* Bs19. Z kolei wśród cząsteczek LPS wyizolowanych z fenolu, takiej budowie rdzenia towarzyszyły molekuly zawierające oligosacharydy złożone z siedmiu i ośmiu reszt cukrowych i dominowały frakcje z krótszymi oligomerami rdzenia. Analiza widm masowych wykazała, że ufosforylowany dwucukier glukozaminyłowy był niestechiometrycznie podstawiony resztą 4-amino-4-deoksy-pentozy, pozwoliła także określić wzór acylacji szkieletu cukrowego lipidu A oraz rodzaj i długość łańcuchów przyłączonych reszt kwasów tłuszczowych.

Struktura rdzenia *A. veronii* jest pierwszą dla grupy fenotypowej *A. sobria* complex zbadaną techniką spektrometrii mas. Zauważone różnice w składzie oligocukru wskazują, że jest to inny jego typ, w porównaniu do opisanego dla *A. bestiarum* i *A. hydrophila*.

Wysokocząsteczkowy polisacharyd O-swoisty *A. veronii* Bs19 uzyskano z hydrofilowych cząsteczek LPS. Składnikami łańcucha były: L-ramnoza (Rha), 3-amino-3,6-

dideoksy-D-glukoza (Qui3N), D-galaktoza (Gal) i 2-amino-2-deoksy-D-galaktoza (GalN) występujące w stosunku molowym 1,2:1:1,2:1. Na widmach NMR zidentyfikowano układy spinowe dla czterech reszt cukrowych: α -GalpN, α -Rhap, α -Qui3N i β -Galp. Sekwencję składników w oligomerze ustalono w eksperymencie ^1H , ^{13}C HMBC i po analizie fragmentacyjnego widma masowego ESI/MS/MS, zarejestrowanego dla niskocząsteczkowej frakcji degradowanego polisacharydu. Poniżej przedstawiono strukturę czterocukrowej powtarzającej się podjednostki OPS *A. veronii* Bs19, serotyp O16:



Podsumowując, w przedstawionych do oceny pracach, określono heterogenność cząsteczek endotoksyn oportunistycznych patogenów ryb z rodzaju *Aeromonas*, wykorzystując metody chemiczne i wysokorozdzielcze techniki spektralne tj., spektrometrię mas i spektroskopię NMR. Zbadano polisacharydy O-swoiste gatunków *A. bestiarum* i grupy *A. sobria* complex, których serotypy są istotne w chorobotwórczości człowieka i ryb. Struktury ciepłostalego antygeny powierzchniowego uzupełnią bazy danych tworzone dla rodzaju i mogą przyczynić się do analizy molekularnych podstaw pokrewieństwa między pałeczkami *Aeromonas* i innymi bakteriami Gram-ujemnymi. Badania takie mogą być także punktem wyjścia do analiz genetycznych nad organizacją regionów determinujących syntezę polisacharydów O-swoistych u tych bakterii. Znajomość struktury antygenów O dla gatunków najczęściej wykrywanych przy infekcjach ryb, może być jedną z cech uwzględnianych podczas komponowania szczepionki poliwalentnej w immunoprofilaktyce zakażeń pałeczkami *Aeromonas* hodowli karpia i pstrąga w Polsce.

Badania antygenów powierzchniowych mezofilnych pałeczek z rodzaju *Aeromonas* zostały rozpoczęte w ramach działalności statutowej Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii UMCS oraz grantu zespołowego przyznanego mi przez Prorektora UMCS d/s Badań Naukowych i Współpracy Międzynarodowej. Obecnie są przedmiotem projektu badawczego zatytułowanego: *Zróżnicowanie strukturalne lipopolisacharydu bakterii z rodzaju Aeromonas - korelacja między budową LPS, wirulencją szczepów i zdolnością do przeżywania w amebach, naturalnym rezerwuarze bakterii w środowisku wodnym*, UMO-2011/03/B/NZ1/01203, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. Jestem kierownikiem powyższego projektu.

Literatura

1. Janda J.M., Abbott S. (2010) The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 23:35-73.
2. Kahajanchi B.K., Fadl A.A., Borchardt M.A., Berg R.L., Horneman A.J., Stemper M.E., Joseph S.W., Moyer N.P., Sha J., Chopra A.K. (2010) Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:2313-2325.
3. Rahman M., Colque-Navarro P., Kühn I., Huys G., Swings J., Möllby R. (2002) Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* bv. *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:650-655.
4. Kozińska A., Figueras M.J., Chacon M.R., and Soler L. (2002) Phenotypic characteristics of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Appl. Microbiol.*, 93:1034-1041.
5. Kozińska A. (2009) Genotypowa i serologiczna analiza krajowych izolatów mezofilnych *Aeromonas* sp. w aspekcie chorobotwórczości i rodzaju objawów chorobowych wywoływanych przez nie u ryb. Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy, Puławy.
6. Holmberg S.D., Schell W.L., Fanning G.R., Wachsmuth I.K., Blake P.A., Brenner D.J., Farmer J.J. (1986) *Aeromonas* intestinal infections in the United States. *Annals of Internal Medicine.*, 105:683-689.
7. Kozińska A., Pękala A. (2010) Serotyping of *Aeromonas* species isolated from Polish fish farms in relation to species and virulence phenotype of the bacteria. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 54:315-320.
8. Tomas J.M. (2012) The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISNR Microbiology*, doi:10.5402/2012/256261.
9. Merino S., Rubires X., Aguillar A., Alberti S., Hernandez-Alles S., Benedi V.J., Tomas J.M. (1996) Mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:11 resistance to complement-mediated killing. *Infect. Immun.*, 64:5302-5309.
10. Raetz C.R.H., Whitfield C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 71:635-700.
11. Wang Z., Li J., Altman E. (2006) Structural characterization of the lipid A region of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 341:2816-2825.
12. Knirel, Y. A.; Vinogradov, E.; Jimenez, N.; Merino, S.; Tomas, J. M. (2004) Structural studies on the R-type lipopolysaccharide of *Aeromonas hydrophila*. *Carbohydr. Res.*, 339:787-793.
13. Wang Z., Li J., Vinogradov E., Altman E. (2006) Structural studies of the core region of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 341:109-117.
14. Pietretti D., Wiegertjes G.F. (2014) Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies. *Dev. Comp. Immunol.*, 43:205-222.
15. Antychowicz J. (2014) Rola makrofagów i centrów melano-makrofagowych w odporności ryb. *Życie Weterynaryjne*, 89:28-35.
16. Magnadóttir B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.*, 20:137-151.
17. Alexander C., Rietschel E.T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.*, 7:167-202.
18. Sepulcre M.P., Alcaraz-Perez F., Lopez-Munoz A., Roca F.J., Meseguer J., Cayuela M.L., Mulero V. (2011) Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation. *J. Immunol.*, 18:1837-1845.
19. Kozińska A. (2007) Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J. Fish Dis.*, 30:293-301.
20. Guz L. (2011) Immunogenność szczepów z rodzaju *Aeromonas*. Doświadczalne szczepionki przeciwko MAI/MAS karpia. Rozprawy Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, zeszyt 354.
21. Linnerborg M., Widmalm G., Rahman M.M., Jansson P.E., Holme T., Quadri F., Albert M.J. (1996) Structural studiem of the O-antigenic polysaccharide from an *Aeromonas caviae* strain. *Carbohydr. Res.*, 291:165-174.
22. Wang Z., Vinogradov E., Larocque S., Harrison B.A., Li J., Altman E. (2005) Structural and serological characterization of the O-chain polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* strains A449, 80204 and 80204-1. *Carbohydr. Res.*, 340:693-700.
23. Wang Z., Liu X., Li J., Altman E. (2008) Structural characterization of the O-chain polysaccharide of *Aeromonas caviae* ATCC 15468 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 343:483-488.
24. Knirel Y.A., Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Merino S., and Tomas J.M. (2002) Structure of the O-specific polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* O:34; a case of random O-acetylation of 6-deoxy-L-talose. *Carbohydr. Res.*, 337:1381-1386.
25. Sakazaki R., Shimada T. (1984) O-serogrouping for mesophilic *Aeromonas* strains. *Japan J. Med. Sci.*, 37:247-255.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

A) Praca magisterska

Celem pracy było zbadanie indukcji cytokin IFN i TNF w leukocytach krwi bydlęcej pod wpływem następujących substancji pochodzenia naturalnego: dimeru lizozymu jaja kurzego (Lydium – KLP), ekstraktu eterowego z owocników grzyba *Piptoporus betulinus*, glikozydów saponinowych, ekstraktów alkoholowych z igieł cisa *Taxus media var. Hatheldii* i żywotnika zachodniego *Tui occidentalis „Aurescens”*. W pracy magisterskiej określiłam także właściwości immunomodulacyjne ww. substancji na wytwarzanie TNF i IFN, po zastosowaniu ekstraktów łącznie z induktorami cytokin takimi jak endotoksyna (LPS *Escherichia coli* O111:B4) i wirus choroby Newcastle (NDV). Stwierdzono wówczas, że ekstrakt eterowy z owocników *Piptoporus betulinus* stymulował wydzielanie zarówno IFN jak i TNF w leukocytach z krwi obwodowej bydła, natomiast preparaty otrzymane z żywotnika, podobnie jak glikozydy saponinowe, indukowały syntezę tylko bydlęcego TNF. Z kolei dla ekstraktu metanolowego z igieł cisa wykazano właściwości obniżania poziomu TNF indukowanego przez NDV. Dimer lizozymu jaja kurzego i saponiny modulowały produkcję cytokin wytwarzanych pod wpływem induktorów w leukocytach krwi bydlęcej.

Pracę magisterską zatytułowaną „*Modulacja wytwarzania bydlęcego IFN i TNF w obecności Lydium – KLP oraz wyciągów roślinnych i grzybowych*”, którą wykonałam w Zakładzie Wirusologii i Immunologii UMCS, pod kierunkiem Prof. dr hab. Martyny Kandefer-Szerszeń obroniłam 11 września 1995 r. i uzyskałam tytuł magistra biologii.

B) Praca badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę naukową rozpoczęłam w 1995 r., w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii) UMCS na stanowisku asystenta. Moje badania koncentrowały się na roli struktur powierzchniowych diazotroficznych bakterii Gram-ujemnych określanych wspólnym terminem rizobia w zawiązywaniu symbiozy z roślinami motylkowatymi i wpisywały się w nurt badawczy zespołu kierowanego przez Prof. dr hab. Ryszarda Russe. Tematem moich zainteresowań były także wirusy bakteryjne o aktywności litycznej w stosunku do bakterii rizobiowych.

Pracę doktorską zatytułowaną „Charakterystyka immunochemiczna mutantu *Mesorhizobium loti* 2213.1 defektywnego w syntezie lipopolisacharydu”, której promotorem był Prof. Ryszard Russa, obroniłam 7 maja 2003 r., i uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych.

Do najważniejszych wyników uzyskanych w mojej pracy doktorskiej należą:

- Otrzymanie mutantu transpozonowego Tn5 szczepu *M. loti* NZP2213 opornego na aktywność lityczną faga A1 (**Zał.3, II.A**), którego receptor został zlokalizowany w LPS *M. loti* NZP2213.
- W testach roślinnych dowiedziono, że mutant *M. loti* 2213.1 tworzył nieefektywny układ symbiotyczny z komonicą zwyczajną (*Lotus corniculatus*). Analiza mikroskopowa brodawek indukowanych przez mutant wykazała zmiany w budowie nici infekcyjnych, niski stopień zasiedlenia brodawek, przedwczesne obumieranie tkanki roślinnej oraz degenerację bakteroidów. Konsekwencją powyższych zmian było zahamowanie procesu symbiotycznego wiązania azotu.
- Wykazanie, że synteza kompletnych cząsteczek LPS typu S i ich właściwa proporcja w błonie zewnętrznej bakterii do glikoform LPS typu R jest warunkiem koniecznym dla prawidłowej organogenezy brodawek i zasiedlenia ich przez mesorizobia.
- Ustalenie zmian w składzie części cukrowej LPS mutantu: zmniejszenie zawartości 6-deoksy-L-talozy i wzrost ilości 2-O-metylo-6-deoksy-L-talozy.
- Wykazanie zmian w budowie antygeny O-swoistego mutantu, techniką spektrometrii mas (MALDI-TOF) i spektroskopii NMR.
- Zlokalizowanie miejsca insercji transpozonu w obrębie genu kodującego białko o przewidywanej funkcji glikozylotransferazy, której zablokowanie mogło być przyczyną obserwowanych zmian w polisacharydzie O-swoistym mutantu.
- Ocena aktywności biologicznej LPS *M. loti* NZP2213, którego szkielet cukrowy lipidu A jest zbudowany z dwóch cząsteczek 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy (GlcN3N) i jednej reszty kwasu galakturonowego (D-GalA), w porównaniu z aktywnością preparatu LPS *S. enterica* serowar Typhimurium o znanej budowie. Wykazano, że dawka LPS *M. loti* NZP2213 powodująca 50% śmiertelność grupy zwierząt (LD₅₀) w teście *in vivo* dla myszy (NIH) była 1000-krotnie wyższa niż wielkość dawki konieczna do wywołania analogicznego efektu przy zastosowaniu endotoksyny szczepu referencyjnego.

Uzyskane wyniki były prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych oraz zostały opublikowane w pracy naukowej (**Zał.3, II.A, poz. 3**).

Po otrzymaniu stopnia doktora nauk biologicznych od 1 października 2003 r. zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii), w którym pracuję do dnia dzisiejszego.

5.2. Praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam badania nad rolą struktur antygenowych rizobiów w zawiązywaniu symbiozy z gospodarzem roślinnym.

Znaczenie struktur powierzchniowych bakterii w symbiozie

Nawiązanie symbiozy jest złożonym procesem, który poprzedza wymiana sygnałów molekularnych między partnerami: bakterią i rośliną. Jednym z ważnych czynników mutualistycznej interakcji są glikokoniugaty struktur powierzchniowych bakterii, do których należy lipopolisacharyd. Udowodniono, że LPS typu S jest niezbędny w swoistym rozpoznaniu symbiontów, na etapie adhezji i kolonizacji włośników korzeniowych. Wykazano korelacje między budową lipopolisacharydu, a prawidłowym rozwojem brodawek. Jest to związane z faktem, że LPS mikrosymbionta wchodzi w ścisły kontakt z wnętrzem powstającej nici infekcyjnej, a progres symbiozy i uwalnianie bakterii do komórek brodawki, są zależne od supresji roślinnych mechanizmów obronnych. Co więcej, polisacharyd O-swoisty osłania elementy strukturalne endotoksyny, które indukują reakcję nadwrażliwości w zakażanych komórkach gospodarza. Zmiany przystosowawcze, jakie zachodzą w łańcuchu O-swoistym (wzrost O-acetylacji i O-metylacji reszt cukrowych) i części lipidowej LPS, nadają osłonom bakterii charakter hydrofobowy, co zwiększa właściwości adhezyjne we wnętrzu nici infekcyjnej i w symbiosomie. Natomiast zmiany w LPS tj., skrócenie łańcucha O-swoistego, wywołują silną reakcję obronną rośliny powodującą zahamowanie symbiozy.

Budowa lipopolisacharydu bakterii rizobiowych oraz jego rola w brodawkowaniu zostały szczegółowo opisane w pracy przeglądowej (**Zal.3, II.D, poz. 1**).

Analiza immunochemiczna mutantów defektywnych w syntezie LPS i symbiotycznym wiązaniu azotu dowiodła, że zmiany w strukturze łańcuchów, a przede wszystkim w proporcji gładkich i szorstkich cząsteczek LPS w błonie zewnętrznej bakterii mają wpływ na powstawanie efektywnych symbiotycznie brodawek. Potwierdziły to także moje badania na układzie *Mesorhizobium loti* – komonica zwyczajna, które zostały rozpoczęte w ramach pracy doktorskiej i były kontynuowane w następnych latach. Wykazano, że wysokocząsteczkowy LPS typu dzikiego jest konieczny dla prawidłowego brodawkowania. W LPS mutantu 2213.1

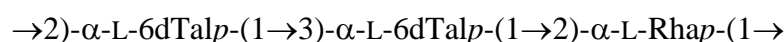
(w genie dla glikozylotransferazy) stwierdzono trzykrotny spadek zawartości 6-deoksytalopiranozy, głównego składnika antygeny O-swoistego. Zaobserwowano także zmniejszenie zawartości gładkich form LPS, w porównaniu do ilości tej frakcji w membranie szczepu dzikiego. Na korzeniach roślin powstawały nieefektywne brodawki, rzadko wypełnione bakteroidami, najprawdopodobniej wskutek nieprawidłowego wzrostu nici infekcyjnych będącego konsekwencją silnej reakcji obronnej (**Zal.3, II.A, poz. 3**).

Eksperymenty immunochemiczne z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał anti-S-LPS, znakowanych złotem (immunogold), pozwoliły na lokalizację determinant antygenowych w obrębie części O-swoistej LPS szczepu rodzicielskiego i mutanta. Znacznie niższy stopień rozmieszczenia cząsteczek złota na powierzchni osłon bakteroidów mutanta, w symbiosomach, w porównaniu z dzikim szczepem potwierdził spadek zawartości gładkich form LPS w błonie zewnętrznej mutanta. Uzyskane wyniki były zgodne z tymi otrzymanymi dla izolowanych preparatów LPS bakterii wolnożyjących (**Zal.3, II.A, poz. 1**).

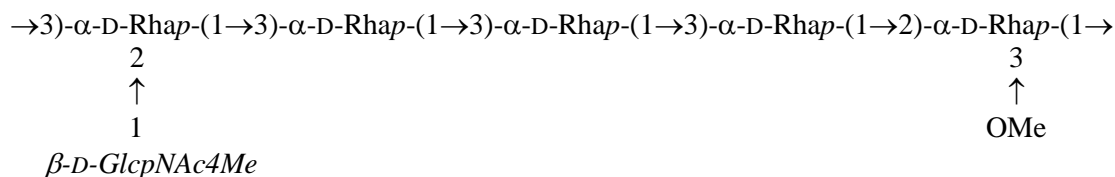
Istotną rolę w powstawaniu brodawek zdeterminowanych (o czasowo funkcjonującym merystemie) odgrywa LPS, natomiast w rozwoju brodawek o trwale aktywnym merystemie taką funkcję spełnia egzopolisacharyd (EPS). Dowiedziono, że mutacje w obrębie genów determinujących syntezę EPS skutkują zmianami w przebiegu symbiozy (efekty plejotropowe). Mutant transpozony Rt120 (w regionie *pssB-pssA*), defektywny w syntezie EPS, nie był zdolny, w przeciwieństwie do szczepu dzikiego *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii TA1, do utworzenia efektywnego układu symbiotycznego z koniczyną (*Trifolium pratense*). Analiza mikroskopowa potwierdziła nieprawidłowy rozwój brodawek i zasiedlenie ich przez nieliczne endosymbionty.¹ Wykazano, że mutacja w regionie regulatorowym dla produkcji egzopolisacharydu zakłóca szlak syntezy 6-deoksyheksoz, co skutkuje zmianami w strukturze O-swoistego polisacharydu. Lipid A był niezmienny, natomiast wyższa toksyczność preparatu LPS mutanta Rt120 w teście *in vivo* dla myszy oraz właściwość indukowania wysokich poziomów sekrecji cytokin prozapalnych (TNF- α i IL-6) wskazywały na udział części polisacharydowej w modulowaniu aktywności biologicznej endotoksyny. Co więcej, frakcja łańcucha O-swoistego LPS mutanta, w przeciwieństwie do preparatu pochodzącego ze szczepu dzikiego, była toksyczna dla komórek linii HeLa (**Zal.3, II.A, poz. 8**).

¹ Janczarek M., Krol J., Kutkowska J., Mazur A., Wielbo J., Borucki W., Kopcinska J., Lotocka B., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A. (2001) *J. Plant Physiol.*, 158:1565-1574.

zaproponowano strukturę trójcukrowej powtarzającej się podjednostki polisacharydu O-swoistego *M. huakuii* S-52, przedstawioną poniżej (**Zał.3, II.A, poz. 7**):



Kontynuacją analiz struktur powierzchniowych rizobioów były badania O-swoistych antygenów mikrosymbiontów *M. loti* HAMBI 1148 i *M. amorphae* ATCC 19655, które w odróżnieniu od wyżej omawianych gatunków charakteryzują się zdolnością krzyżowego zakażenia kilku gatunków roślin motylkowatych. Stwierdzono, że heksasacharydowe podjednostki są zbudowane z pięciu reszt D-ramnozy, związanych α -glikozydowo w przeważającej części przy węglu C-3 oraz terminalnej reszty β -4-O-metylo-D-glukozaminy, która niestechiometrycznie (80%) podstawia jedną z reszt ramnozy. Glikozylowana przy węglu C-2 ramnoza ma przyłączoną grupę metylową przy węglu C-3. Różnica w budowie polisacharydów O-swoistych obu szczepów dotyczy jedynie wyższego stopnia metylacji reszt 2-podstawionej ramnozy u *M. amorphae*. Podobną budowę polisacharydów *M. loti* i *M. amorphae* potwierdzono przez Western blotting z mysią surowicą poliklonalną anty-LPS *M. loti* HAMBI 1148. Wspólne epitopy wykryto we frakcjach wysoko- i niskocząsteczkowych LPS obu szczepów. Strukturę podjednostki OPS dla *M. loti* 1148 i *M. amorphae* ATCC 19655 przedstawiono na załączonym schemacie (**Zał.3, II.A, poz. 4**):



Podsumowując, wykazano, że składnikami antygenów O-swoistych LPS mezorizobioów są 6-deoksyheksozy tj.: 6-deoksytaloza, ramnoza i fukoza podstawione grupami O-acetylowymi i O-metylowymi. Ich obecność w LPS nadaje powierzchni bakterii charakter hydrofobowy, który zapewnia lepsze właściwości adhezyjne na etapie zakażenia włóśników. Z kolei część O-swoista osłania fragmenty strukturalne endotoksyny indukujące reakcję nadwrażliwości i ostatecznie infekcja kończy się kolonizacją komórek roślinnych.

Izolacja i charakterystyka bakteriofagów wirulentnych dla bakterii glebowych z rodzaju *Mesorhizobium* oraz bakterii środowiska wodnego z rodzaju *Aeromonas*

W środowisku gleby, bakteriofagi regulują liczebność bakterii strefy ryzosfery wpływając tym samym na różnorodność populacji mikroorganizmów wokół korzeni roślin.

Bakteriofagi wyizolowane z ryzosfery grochodrzewu białego (*Robinia pseudoacacia*) charakteryzowały się aktywnością lityczną w stosunku do szczepów *M. loti*, *M. huakuii* i *M. amorphae*, identyfikowanych także, jako mikrosymbionty robinii. Na podstawie morfologii nukleokapsydu, bakteriofagi zaklasyfikowano do rodzin *Podoviridae* i *Siphoviridae*. Miejscem receptorowym fagów były białka membrany zewnętrznej i/lub lipopolisacharyd. Dwuniciowy, liniowy DNA został zidentyfikowany, jako materiał genetyczny. Wykazano różnice w wielkości i wzorach restrykcyjnych genomów fagowych. Utworzono bibliotekę dla fragmentu DNA faga Mlo30 o wielkości 8,1 kpb (**Zal.3, II.A, poz. 6**). Fragment ten został zsekwencjonowany, a sekwencja zdeponowana w bazie GenBank (nr. FJ375326).

Zbiorniki wodne stanowią naturalne środowisko życia bakterii oraz zakażających je fagów. Do leczenia infekcji u ryb w Polsce, których przyczyną są pałeczki *Aeromonas* sp. stosuje się antybiotyki z różnych grup. Celem moich badań była izolacja fagów, które mogłyby zostać użyte w terapii fagowej, do zwalczania chorób ryb hodowlanych.

Bakteriofagi zostały wyizolowane ze zbiorników wodnych (stawy, zalewy) i rzek Lubelszczyzny. Na podstawie morfologii nukleokapsydów fagi posiadające kurczliwy lub niekurczliwy ogonek oraz dwuniciowy liniowy DNA zostały zaszeregowane odpowiednio do rodzin *Myoviridae* i *Siphoviridae*. Fagi różniły się infekcyjnością w stosunku do bakterii z rodzaju *Aeromonas*. Wśród szczepów patogennych, należących do gatunków *A. bestiarum* i *A. salmonicida*, 50% było wrażliwych na fagi. Wykazano, że bakteriofagi prowadzą efektywny cykl lityczny, w którym plon wynosił od 130 do 250 cząstek infekcyjnych.

Powyższe badania uzasadniają użycie fagów do identyfikowania patogennych szczepów *Aeromonas* i monitorowania zakażeń ryb w akwakulturach. Fagi o produktywnym cyklu namnażania i szerokim zakresie gospodarza mogą znaleźć zastosowanie do redukcji populacji bakterii *A. bestiarum* i *A. salmonicida* w hodowlach karpia i pstrąga. Terapia fagowa może być alternatywną do stosowanych obecnie i nadużywanych metod konwencjonalnych takich jak antybiotykoterapia.

Wyniki doświadczeń zaprezentowano na konferencji międzynarodowej w Dreźnie (**Zal.3, III.B, poz. 36**). Praca opisująca otrzymane wyniki jest w przygotowaniu.

Badania struktur lipidowych

Lipid A szczepu *Azorhizobium caulinodans*, który jest mikrosymbiontem tropikalnej rośliny *Sesbania rostrata*, wyizolowano z rozpuszczalnej w fenolu frakcji LPS i analizowano przy użyciu metod chemicznych, technik spektrometrii mas (ESI/MS i ESI/MS/MS) oraz spektroskopii NMR. Badania wykazały, że szkielet lipidu A jest trójczukrem zbudowanym z dwóch reszt 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukopiranozy (Glc_pN₃N) połączonych wiązaniem β-1,6-glikozydowym i jednej cząsteczki kwasu glukuronowego (GlcA), który podstawia α-glikozydowo w pozycji C-1 redukującą resztę Glc_pN₃N. Z widm masowych ESI/MS wynika, że rdzeń lipidu A nie zawiera dodatkowych hydrofilowych podstawników tj. reszty fosforanowej, a heterogenność frakcji jest spowodowana przede wszystkim różnicami we wzorze acylacji szkieletu cukrowego oraz rodzajami i długością łańcuchów przyłączonych reszt kwasów tłuszczowych. Przeprowadzone analizy wskazują, że w membranie zewnętrznej *A. caulinodans* dominują glikoformy LPS zakotwiczone za pośrednictwem heptaacylowanych cząsteczek lipidu A zawierających amidowo związane 3-hydroksy kwasy: 3-OH-18:0, 3-OH-14:0, 3-OH-20:1 i 3-OH-14:0 oraz drugorzędowe estrowo związane kwasy 3-OH-18:0, 16:0 i 18:0/18:1. Warto podkreślić fakt, że opublikowana struktura lipidu A nie zawiera estrowo związanych długołańcuchowych kwasów ω-1 typowych dla bakterii rizobiowych i uznawanych za marker chemotaksonomiczny grupy, co m.in. czyni prezentowany wariant endotoksyny wyjątkowym wśród do tej pory opisanych dla rizobiów (**Zał.3, II.A, poz. 9**).

Badanie zawartości klas fosfolipidów w błonie plazmatycznej pełzaka *Acanthamoeba castellanii* przeprowadzono metodą NMR. Spektra zarejestrowane dla jądra ³¹P przy częstotliwości rezonansowej 242.88 MHz umożliwiły identyfikację sygnałów dla dziewięciu klas fosfolipidów w zakresie przesunięć chemicznych δ_P od - 0.6 ppm do + 0.41 ppm. W membranie ameb dominującymi fosfolipidami były: fosfatydylocholina PC (47%), fosfatydyloetanolamina PE (29%), kardiolipina CL (7%) i fosfatydyloseryna PS (5.6%) (**Zał.3, II.A, poz. 11**). Do analizy składu kwasów tłuszczowych uwolnionych z fosfolipidów ameb wykorzystano metodę GC/MS, która umożliwiła ich rozdział w zależności od długości i rozgałęzienia łańcucha, ilości podwójnych wiązań oraz ich konfiguracji. Fosfolipidy zawierały kwasy o długości łańcucha od 14 do 20 atomów węgla z wyraźnie zaznaczoną przewagą reszt nienasyconych: C₁₆:1 Δ⁷ i C₁₈:1 Δ⁹. Zidentyfikowano także długołańcuchowe, wielonienasycone kwasy: oktakozenowy (28:1), oktakozienowy (28:2), triakontadienowy (30:2) i triakontatrienowy (30:3) oraz określono położenie wiązań

podwójnych (C28:1 Δ^{21} ; C28:2 $\Delta^{5,21}$; 30:2 $\Delta^{21,24}$; 30:3 $\Delta^{5,21,24}$) (**Zał.3, II.A, poz. 5**). Analiza strukturalna LC/MSⁿ wykazała, że długołańcuchowe, wielonienasycone cząsteczki są charakterystyczne tylko dla fosfatydyloetanolaminy, fosfatydyloseryny i kardiolipiny.

Występowanie unikatowych reszt kwasów tłuszczowych tj., triakontatrienowy 30:3 $\Delta^{5,21,24}$ i triakontadienowy 30:2 $\Delta^{21,24}$ tylko w określonych rodzajach fosfolipidów *A. castellanii* może zostać wykorzystane, jako marker chemotaksonomiczny zarówno wolnożyjących jak i patogennych reprezentantów gatunku (**Zał.3, II.A, poz. 11**).

Podsumowanie

- Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje współautorstwo w **17 pracach oryginalnych** opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR, w tym, w 11 pracach jestem pierwszym autorem, a w 8 z nich autorem korespondencyjnym. Jestem współautorem 1 pracy przeglądowej oraz 39 komunikatów zjazdowych wśród nich 20 było prezentowanych na konferencjach międzynarodowych.
- Sumaryczny **IF** prac wynosi **35,51**, a suma punktów **MNiSW: 421**. Do dnia 12.12.2014 r., wg bazy Web of Science (WOS) prace były cytowane **40** razy (bez autocytowań). **Łączny IF** sześciu prac włączonych do osiągnięcia naukowego wynosi **15,264**, a suma punktów **MNiSW: 187**.
- W ramach działalności naukowej byłam wykonawcą w dwóch zrealizowanych projektach badawczych finansowanych przez MNiSW (N303 10832/3585 i N303 822840) oraz kierownikiem i głównym wykonawcą dwóch grantów przyznanych przez Prorektora UMCS d/s Badań i Współpracy Międzynarodowej.
- Jestem kierownikiem realizowanego obecnie grantu naukowego ze środków Narodowego Centrum Nauki, UMO-2011/03/B/NZ1/01203.
- Współpracowałam z naukowcami z międzynarodowych (Niemcy, Rosja) i krajowych ośrodków badawczych, które zaowocowały publikacjami.
- Odbyłam **dwa staże naukowe** w wiodącym ośrodku naukowym w Niemczech - **Centrum Badawczym Borstel**, w Zakładzie Biochemii Strukturalnej. W trakcie pobytu zdobywałam doświadczenie w analizie strukturalnej biocząsteczek.
- Wykonałam recenzje manuskryptów prac dla redakcji czasopism naukowych takich jak: Carbohydrate Polymers, Carbohydrate Research, Microbial Ecology, Polish Journal of Microbiology i African Journal of Microbiology Research.

Podsumowanie pracy dydaktycznej, organizacyjnej i działalności popularyzatorskiej

W ramach pracy dydaktycznej prowadziłam ćwiczenia z mikrobiologii, mikologii klinicznej i technik laboratoryjnych dla studentów biologii, biotechnologii i ochrony środowiska oraz laboratoria i wykłady z mikrobiologii lekarskiej dla studentów chemii środków bioaktywnych i kosmetyków, a także ćwiczenia z mikrobiologii i technik laboratoryjnych, w języku angielskim, dla studentów programu Erasmus. Uczestniczyłam w opracowywaniu programów zajęć i przygotowaniu skryptu do ćwiczeń z mikrobiologii. Byłam odpowiedzialna za planowanie badań i organizację pracy doświadczalnej studentów w ramach pracowni specjalizacyjnej oraz magisterskiej. Byłam promotorem pracy magisterskiej pani mgr Eweliny Opieki oraz opiekunem naukowym studentów podczas wykonywania eksperymentów do prac magisterskich (14), a także promotorem (7) i recenzentem prac licencjackich (7).

Brałam czynny udział w wydarzeniach naukowych promujących UMCS i popularyzujących wiedzę w ramach Drzwi Otwartych, Nocy Biologów i Festiwalu Nauki. Wygłaszałam referaty i prowadziłam pokazy dla młodzieży licealnej przybliżające zagadnienia z zakresu biologii komórki oraz metod stosowanych do badania jej składników. Byłam także opiekunem naukowym studentów biotechnologii i praktyk studenckich.

Plany na przyszłość

W najbliższym czasie zamierzam kontynuować badania strukturalne endotoksyn bakterii *Aeromonas* sp., zarówno antygenów O-swoistych, immunotypów istotnych dla patogenności, jak i oligosacharydów rdzeniowych. Uzyskane wyniki ułatwią selekcję antygenów, o pożądanym cechach molekularnych, do opracowania szczepionki poliwalentnej skutecznie chroniącej przed zakażeniami *Aeromonas* sp. wśród ryb hodowlanych w Polsce. Szczegółowe analizy chemiczne struktur antygenowych bakterii *Aeromonas* są punktem wyjścia do badań biologicznych. W doświadczeniach ko-kulturowych z wykorzystaniem pełzaka *Acanthamoeba castellanii*, jako modelu komórki eukariotycznej, planuję eksperymenty, które pomogą wyjaśnić mechanizmy patogenyzy warunkujące adhezję, inwazję i adaptację do pasożytniczego trybu życia. Analiza strukturalna łańcuchów O-swoistych stanie się także podstawą do badań genetycznych nad organizacją regionów warunkujących ich syntezę u bakterii z rodzaju *Aeromonas*.

