

Jolanta Kutkowska

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

w Lublinie

**Znaczenie lipopolisacharydów i egzopolisacharydów *Rhizobium leguminosarum* i
Mesorhizobium loti w interakcji z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*)**

Autoreferat

Lublin 2018

Dr Jolanta Kutkowska
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
jolanta.kutkowska@poczta.umcs.lublin.pl
tel.: 81 537-59-05

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko Jolanta Kutkowska

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

1993 magister biotechnologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, tytuł pracy magisterskiej: „Analiza produktów degradacji peptydoglikanu *Proteus mirabilis* R24 enzymem bakteriolitycznym z *Acanthamoeba castellanii* i lizozymem”, promotor: prof. dr hab. Wincenty Drożański

2001 doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie, tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka lipopolisacharydów szczepu *Rhizobium leguminosarum* biowar *trifolii* TA1 oraz jego mutantów defektywnych w biosyntezie egzopolisacharydu”, promotor: prof. dr hab. Teresa Urbanik-Sypniewska

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

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

1993–2001 - asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecnie: Zakład Genetyki i Mikrobiologii)

2001–2016 - adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecnie: Zakład Genetyki i Mikrobiologii)

2016 - aktualnie - asystent w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS

W latach 12.2003-02.2004; 05.2006-09.2006; 10.2010-09.2011 – trzy urlopy wychowawcze.

Przebieg pracy naukowo-badawczej

Studia na kierunku biotechnologia ukończyłam w 1993 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Tytuł magistra biotechnologii uzyskałam na podstawie obronionej pracy magisterskiej pod tytułem „Analiza produktów degradacji peptydoglikanu *Proteus mirabilis* R24 enzymem bakteriolitycznym z *Acanthamoeba castellanii* i lizozymem”. Pracę tę wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Wincentego Drożańskiego w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii - ZGiM). Od 1 października 1993 r. zostałam zatrudniona w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej na stanowisku asystenta.

W 2001 r. uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Charakterystyka lipopolisacharydów szczepu *Rhizobium leguminosarum* biowar *trifolii* TA1 oraz jego mutantów defektywnych w biosyntezie egzopolisacharydu” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Urbanik-Sypniewskiej. W latach 2001 – 2016 pracowałam na stanowisku adiunkta w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii. Obecnie pracuję na stanowisku asystenta w wyżej wymienionym Zakładzie.

Probleмами badawczymi prowadzonymi w ZGiM są analiza strukturalna i funkcjonalna genomów rizobiów, ich bioróżnorodność, pokrewieństwo filogenetyczne, kontrola genetyczna syntezy egzopolisacharydu (EPS) oraz rola tego polisacharydu w symbiozie z roślinami bobowatymi. Znaczną część badań stanowi analiza struktury lipopolisacharydów (LPS), oraz znaczenie LPS bakterii rodzajów *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Bradyrhizobium* w relacji symbiotycznej z rośliną bobowatą.

Badania prowadzone przed doktoratem

W początkowym okresie podjęłam badania nad budową chemiczną powierzchniowych składników bakterii glebowych (rizobiów) oraz ich znaczeniem w symbiozie z roślinami bobowatymi (dawniej motylkowatymi) pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda Russy.

Głównym problemem badawczym była analiza immunochemiczna i aktywność biologiczna LPS bakterii z rodzaju *Rhizobium leguminosarum* biowar *trifolii* tworzących układ symbiotyczny z koniczyną. Te badania były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

Do moich najważniejszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej należą:

- Scharakteryzowanie morfologii mutantów szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 w biosyntezie egzopolisacharydu - Rt120 i Rt133, w tym: wrażliwość na bakteriofagi,

hydrofobowość powierzchni komórek, wrażliwość na detergenty oraz wykorzystywanie różnych źródeł węgla.

- Potwierdzenie braku produkcji kwaśnego EPS w mutantach i kompensowaniu tego braku syntezą neutralnego cyklicznego glukanu.
- Wykazanie różnic w stopniu polimeryzacji podjednostek łańcuchów O-swoistych mutantu Rt120 w regionie *pssA-pssB* w stosunku do LPS szczepu dzikiego RtTA1.
- Ustalenie zmian w części O-swoistej LPS mutantu Rt120, które dotyczyły głównie 6-deoksyheksoz, czyli braku fukozy, 3-N-metylo-3,6-dideoksyheksozy i 2-O-metylo-6-deoksyheksozy i występowanie: 6-deoksytalozy i ramnozy, które nie występują w LPS szczepu dzikiego.
- Opisanie zmian w rozwoju i budowie nici infekcyjnej w defektywnych brodawkach korzeniowych koniczyny indukowanych przez mutantu Rt120, w których obserwowano odpowiedź obronną rośliny.
- Otrzymanie mysich poliklonalnych surowic przeciwko LPS szczepu dzikiego RtTA1 i mutantów, dzięki którym możliwe było porównanie ekspresji antygenów bakterii wolnożyjących i form endosymbiotycznych rizobiów.
- Określenie toksyczności preparatów LPS badanych szczepów *Rhizobium*. Wykazanie, że endotoksyny rizobiowe mają taką samą aktywność jak LPS *Salmonella typhimurium*.

Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej były prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych oraz zostały opisane w publikacji (Janczarek i wsp. 2001).

Część powyższych badań była finansowana i wykonana w ramach projektu „Badania struktury lipopolisacharydów z gatunku *Rhizobium loti* i *R. huakuii*, bakterii należących do odrębnej grupy filogenetycznej *Rhizobiaceae*” (Grant KBN 6P04C 020 12, 1997-2000) kierowanego przez prof. Ryszarda Rusę, w którym byłam wykonawcą. Wyniki badań finansowanych z tych grantów zostały opisane w publikacjach oraz zaprezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych (10 komunikatów zjazdowych):

1. Choma A., Urbanik-Sypniewska T., Russa R., **Kutkowska J.**, Mayer H. (2000) Occurrence and taxonomic significance of oxo-fatty acids in lipopolysaccharides from members of *Mesorhizobium*. System. Appl. Microbiol. 23, 185-190.

(IF₂₀₀₀ 2,06; MNiSW₂₀₀₀ 20 pkt)

- Urbanik-Sypniewska T., Choma A., **Kutkowska J.**, Kamińska T., Kandefer-Szerszeń M., Russa R., Dolecka J. (2000) Cytokine inducing activities of rhizobial and mesorhizobial lipopolysaccharides of different lethal toxicity. *Immunobiol.* 202: 408-420.

(IF₂₀₀₀ 2,416; MNiSW₂₀₀₀ 15 pkt)

W tym samym okresie rozpoczęłam współpracę z prof. dr hab. Bożeną Modzelewską-Banachiewicz z Zakładu Chemii Organicznej, Instytutu Farmacji, Akademii Medycznej (obecnie Uniwersytet Medyczny) w Lublinie. Mój udział w tych badaniach dotyczył oznaczania właściwości antybakteryjnych oraz antygrzybowych syntetycznych pochodnych związków heterocyklicznych: 1,2,4-triazoli. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach (2 komunikaty zjazdowe) oraz opublikowane w pracy, której jestem współautorem (J. Kałabun, nazwisko panięskie):

- Modzelewska-Banachiewicz B., **Kałabun J.** (1999) Synthesis and biological action of 5-oxo-1,2,4-triazine derivatives. *Pharmazie.* 54, 503-505.

(IF₁₉₉₉ 0,446; MNiSW₂₀₀₀ 15 pkt)

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Znaczenie lipopolisacharydów i egzopolisacharydów *Rhizobium leguminosarum* i *Mesorhizobium loti* w interakcji z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*)

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

- Kutkowska J.**, Janczarek M., Kopcińska J., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A. (2007) Effect of *pssB* mutation on surface polysaccharides and symbiotic phenotype of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *Acta Biol Cracov Bot* 49/2: 81-89

(IF₂₀₀₇ 0,351; MNiSW₂₀₀₇ 10 pkt)

- Turska-Szewczuk A., Łotocka B., **Kutkowska J.**, Król J., Urbanik-Sypniewska T., Russa R. (2009) The incomplete substitution of lipopolysaccharide with O-chain prevents the

establishment of effective symbiosis between *Mesorhizobium loti* NZP2213.1 and *Lotus corniculatus*. Microbiol Res 164: 163-173

(IF₂₀₀₉ 1,771; MNiSW₂₀₀₉ 15 pkt)

3. **Kutkowska J.**, Turska-Szewczuk A., Janczarek M., Paduch R., Kamińska T., Urbanik-Sypniewska T. (2011) Biological activity of (lipo)polysaccharides of the exopolysaccharide deficient mutant Rt120 derived from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1. Biochemistry (Moscow) 76, 7: 840-850

(IF₂₀₁₁ 1,058; MNiSW₂₀₁₁ 15 pkt)

4. **Kutkowska J.***, Marek-Kozaczuk M., Wielbo J., Wójcik M., Urbanik-Sypniewska T. (2017) Electrophoretic profiles of lipopolysaccharides from *Rhizobium* strains nodulating *Pisum sativum* do not reflect phylogenetic relationships between these strains. Arch Microbiol 199:1011–1021

(IF₂₀₁₆ 1,60; MNiSW 20 pkt)

* autor korespondencyjny

Sumaryczny impact factor – IF ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania - **4,78**

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW - **60**

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie – przedmiot badań

Lipopolisacharyd (LPS, endotoksyna) jest kompleksem glikolipidowym będącym głównym składnikiem zewnętrznej warstwy błony komórkowej (ang. outer membrane, OM) bakterii Gram-ujemnych niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmu. LPS jako najbardziej zewnętrzna część osłony komórkowej jest ekspozycja na zmieniające się warunki otoczenia, chroni bakterie przed działaniem czynników środowiskowych, antybiotyków hydrofobowych, jak również przed mechanizmami obronnymi gospodarza (Raetz i Whitfield, 2002). Endotoksyna jest również głównym czynnikiem wirulencji bakterii Gram-ujemnych. Znaczenie LPS udowodniono w zakażeniach wywołanych przez m.in.:

Escherichia coli, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp., *Haemophilus* sp. (Moran i wsp., 1996).

W cząsteczce LPS gładkich form bakterii (S, smooth) można wyróżnić trzy strukturalne i funkcjonalne regiony: hydrofobowy lipid A, oligosacharyd rdzenia i polisacharyd O-swoisty (O-PS, antygen O) (Noel i Duelli, 2000; Raetz i Whitfield, 2002).

Lipid A zakotwicza cząsteczkę LPS w błonie zewnętrznej bakterii, jest on najmniej zmienną domeną, która determinuje aktywność patofizjologiczną LPS i jest „centrum toksyczności” endotoksyny. W enterobakteriach lipid A zbudowany jest ze szkieletu cukrowego, którym w większości bakterii jest dwucukier glukozaminowy β -GlcN-(1-6)- α -D-GlcN zwykle podstawiony dwiema resztami fosforanowymi w pozycjach C1 i C4'; na końcu redukującym i estrowo związany na końcu nieredukującym β -GlcN. Grupy hydroksylowe i aminowe szkieletu cukrowego mogą być acylowane czterema resztami hydroksylowych kwasów tłuszczowych, nazwanymi „pierwszorzędowymi”, które mogą być podstawione kolejnymi tzw. „drugorzędowymi” kwasami tłuszczowymi tworzącymi dwa ugrupowania, estrowo i amidowo związanych reszt acyloksyacylowych (Raetz i Whitfield, 2002). Synteza nienasyconych „drugorzędowych” kwasów tłuszczowych umożliwia bakteriom dostosowanie się do zmian temperatury otoczenia. Lipid A może być podstawiony symetrycznie lub asymetrycznie trzema do siedmiu resztami kwasów tłuszczowych. Pełną aktywność biologiczną wykazuje heksaacylowy lipid A o budowie identycznej lub zbliżonej do lipidu A *E. coli*, podstawiony dwoma resztami fosforanowymi. Lipidy A blisko spokrewnionych gatunków *R. leguminosarum* i *Rhizobium etli* różnią się budową od opisanej powyżej struktury; mają szkielet zbudowany z trisacharydu zawierającego glukozaminę, kwas D-galakturonowy w miejsce dystalnej glukozaminy i 2-aminoglukonian w miejsce proksymalnej glukozaminy. Lipidy te nie zawierają reszt fosforanowych (Serrato, 2014). Zarówno glukozamina jak i 2-aminoglukonian są N- i O-acylowane przez β -hydroksykwasz tłuszczowe o różnej długości łańcucha. Większość lipidów A rizobiów jest acylowana drugorzędowymi długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi głównie 27-hydroksyoktakozanowym (27-OH-C28:0), rzadziej kwasem 29-hydroksytrikontanowym (29-OH-C30:0) (Vedam i wsp., 2003, Choma i Komaniecka, 2011)

Oligocukier rdzenia jest regionem łączącym część lipidową LPS z wielocukrem O-swoistym (O-PS) za pośrednictwem reszty kwasu 3-deoksy-D-glicero-D-manno-oktulozonowego (Kdo). U pałeczek jelitowych w oligocukrze rdzenia wyróżnia się dwa regiony wewnętrzny, zwany heptozowym i zewnętrzny, heksozowy (Raetz i Whitfield, 2002). Region rdzenia LPS szczepów *R. leguminosarum* i *R. etli* jest oktasacharydem zbudowanym z

jednej reszty mannozy i galaktozy, 3 cząsteczek kwasu galakturonowego i 3 reszt Kdo (Muszyński i in. 2011).

Polisacharyd O-swoisty, czyli polimer złożony z kilku do kilkunastu podjednostek oligosacharydowych (ang. *repeating units*) zbudowanych z cukrów (2-8 monocukrów) połączonych liniowo lub w sposób rozgałęziony, jest najbardziej zewnętrzną częścią LPS i stanowi główną determinantę antygenową LPS. O-PS chroni bakterię przed mechanizmami obronnymi gospodarza, w tym reakcją ze składnikami układu dopełniacza i fagocytozą. Polisacharydy O-swoiste wykazują duże zróżnicowanie komponentów cukrowych nawet pomiędzy szczepami danego gatunku. Ich swoistość serologiczną determinują m. in. rodzaj i sekwencja reszt cukrowych, forma pierścienia (piranoza, furanoza), typ wiązań, jak również liczba i rodzaj innych nie cukrowych podstawników np. reszty O- i N-acetylowe, formylowe, fosforanowe, aminokwasy, glicerol, kwas mlekowy czy pirogronowy (Reatz i Whitfield, 2002, Lodowska i wsp., 2007).

W polisacharydzie O-swoistym *Rhizobium leguminosarum* zidentyfikowano deoksy- i metylodeoksycukry, kwasy uronowe, heksozy i heptozy (Forsberg i wsp., 2000; Noel i Duelli, 2000; Serrato, 2013). Antygen O *Rhizobium etli* CE3 w części dystalnej jest polimerem pięciu powtórzeń trójcukrowej podjednostki zbudowanej z L-fukozy, 3-O-metylo-6-deoksygalozy i kwasu 6-O-metyloglukuronowego. Na końcu redukującym trisacharydu występuje tri-O-metylofukoza, a od strony redukującej nie powtarzająca się sekwencja złożona z L-fukozy, D-mannozy, 2-acetamido-2,6-dideoksy-D-glukozy oraz Kdo, którego reszta łączy O-PS z oligocukrem rdzenia (Ojeda i wsp., 2013).

LPS ma zdolność aktywowania układu immunologicznego przez działanie głównie na makrofagi, monocyty i granulocyty, a także płytki krwi i komórki śródbłonna. Dochodzi wówczas do uwolnienia dużych ilości cytokin i mediatorów prozapalnych: interleukin (głównie IL-1, -6, -8), czynnika martwicy nowotworu (TNF- α), interferonu γ (IFN- γ), eikozanoidów (Lodowska i wsp., 2007). Endotoksyny rizobiów są zazwyczaj słabo lub w ogóle nietoksyczne dla organizmu człowieka, co może wynikać z ich szczególnych właściwości biologicznych związanych z adaptacją do warunków symbiotycznych (Urbanik-Sypniewska i wsp., 2000; Tsukushi i wsp., 2004). Badania korelacji pomiędzy strukturą i aktywnością biologiczną LPS *Rhizobium* są jednym ze sposobów poszukiwania analogów LPS, które działają antagonistycznie w stosunku do niekorzystnych skutków działania endotoksyn w zakażeniach spowodowanych przez bakterie Gram-ujemne.

Biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego jest jednym z najważniejszych mechanizmów wprowadzania tego pierwiastka do biosfery. Do wiązania azotu atmosferycznego zdolne są zarówno bakterie wolno żyjące, bakterie żyjące w asocjacji z roślinami, jak i bakterie glebowe z rodziny *Rhizobiaceae* tworzące wyspecjalizowane układy symbiotyczne z roślinami bobowatymi. W wyniku wzajemnych oddziaływań pomiędzy mikrosymbiontem, a rośliną na korzeniach rośliny powstają brodawki, wewnątrz których bakterie (zróżnicowane do formy endosymbiotycznej - bakteroidów) wiążą azot atmosferyczny i przekształcają go w łatwo przyswajalne przez roślinę związki azotowe (Zahran 1999).

LPS *Rhizobium* pełni istotną rolę w tworzeniu układów symbiotycznych z roślinami bobowatymi. Częstecze LPS przypisuje się działanie polegające na supresji reakcji obronnych rośliny oraz funkcję cząsteczki sygnałnej w procesie zakażenia komórek korzenia rośliny gospodarza. Wyniki badań mutantów pozbawionych polisacharydu O-swoistego lub ze zmienionymi O-PS wskazują, że do prawidłowego procesu zakażenia roślin i efektywnego wiązania azotu atmosferycznego niezbędna jest określona ilość cząsteczek LPS o kompletnej strukturze, w których cukier rdzenia jest podstawiony O-polisacharydem (Frayse i wsp. 2003). Doświadczenia *in vitro* wykazały, że w niektórych układach mikrosymbiont - roślina bobowata, LPS może stymulować rozwój nici infekcyjnej. Mutanty pozbawione łańcuchów bocznych LPS, lub ze zredukowaną ich ilością, nie są efektywne w symbiozie, czyli nie wiążą azotu. Modyfikacja budowy LPS *Rhizobium* może spełniać znaczącą rolę w adaptacji form endosymbiotycznych rizobiów (tzw. bakteroidów) do otaczającego mikrośrodowiska w brodawce, np. poprzez metylację reszt cukrowych (Noel i Duelli, 2000). Mutacje wpływające na obecność, ilość i długość łańcuchów bocznych LPS wpływają na tworzenie brodawek korzeniowych (nodulację), począwszy od wczesnych etapów infekcji t.j. tworzenia nici infekcyjnych do uwalniania bakterii z nici infekcyjnych do komórek roślinnych (Frayse i wsp., 2003; Noel i wsp., 2004; D'Haese i wsp., 2007).

Ważną funkcję w specyficzności interakcji między bakterią a rośliną pełnią również inne składniki rizobiów takie jak: powierzchniowe egzopolisacharydy (EPS), kapsularne polisacharydy (K-polisacharydy, KPS), periplazmatyczne cykliczne β -glukany, wysokocząsteczkowe neutralne polisacharydy (glukomannan) oraz polisacharydy żelujące (ang. gel-forming capsular polysaccharides, GPS) (Skorupska i wsp., 2006; Kawaharada i wsp., 2015, Stasiak i wsp. 2016). W Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS w grupie prof. dr hab. Anny Skorupskiej prowadzone są badania, których przedmiotem jest genetyczna kontrola biosyntezy EPS i analiza funkcji genów *pss* (ang. *polysaccharide synthesis*) w

symbiozie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną. Zidentyfikowano geny uczestniczące w biosyntezie, polimeryzacji i transporcie EPS. W wyniku zastosowania ukierunkowanej mutagenyzy skonstruowano szereg mutantów w genach *pss* i poznano ich funkcję zarówno w biosyntezie EPS jak i w symbiozie z koniczyną (Mazur i wsp. 2002; Janczarek i wsp. 2010; Janczarek i wsp. 2017; Marczak i wsp. 2017).

Omówienie wyników badań po uzyskaniu stopnia doktora

Po doktoracie kontynuowałam badania nad szczepami *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i *Mesorhizobium* spp. noszącymi mutacje wpływające na syntezę egzopolisacharydu i lipopolisacharydu. Zajmowałam się również problematyką korelacji między cechami strukturalnymi LPS *Rhizobium* a ich taksonomią.

Egzopolisacharyd *R. leguminosarum* (bv. *trifolii*, *viciae*, *phaseoli*) zbudowany jest z ośmiocukrowej podjednostki, składającej się z pięciu reszt glukozy, dwóch reszt kwasu glukuronowego i galaktozy. Podstawnikami modyfikującymi pierścienie cukrowe podjednostki EPS mogą być: grupy octanowe, pirogronianowe i 3-hydroksymaślanowe. Rozmieszczenie tych podstawników w rdzeniu i łańcuchu bocznym jest charakterystyczne dla każdego biowaru *R. leguminosarum* (Frayssse i wsp. 2003, Skorupska i wsp. 2006, Marczak i wsp., 2017). Struktura podjednostki EPS oraz stopień polimeryzacji są istotne dla funkcji tego polisacharydu w symbiozie *Rhizobium leguminosarum* ze specyficzną roślinnym gospodarzem.

Biosynteza EPS rozpoczyna się od przeniesienia glukozy z UDP-glukozy na błonowy nośnik lipidowy (fosforan izoprenyłu) przez białko PssA. Następnie transferazy glukuronylo-(β -1,4)-glukozowe PssD i PssE przyłączają kwas glukuronowy do Glc-1-pirofosforanu izoprenyłu. Kolejnym etapem jest przyłączenie reszty octanowej w pozycji 2 i/lub 3 kwasu glukuronowego (GlcA). Produkt genu *pssC* (transferaza glukuronylo-(β -1,4)-glukuronowa) katalizuje przyłączenie drugiej reszty GlcA do GlcA-Glc-1P*. Ostatnim etapem syntezy EPS jest wbudowanie do podjednostki galaktozy.

Jednym z genów *pss* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* jest gen *pssB* kodujący wielofunkcyjne białko PssB homologiczne do rodziny monofosfataz inozytolu, które pełni rolę regulatorową w biosyntezie EPS (Janczarek i wsp. 1999; Janczarek i Skorupska 2001). Badano wpływ mutacji w genie *pssB* na chemiczne i fizyczne właściwości EPS, profil elektroforetyczny, strukturę chemiczną LPS oraz właściwości symbiotyczne mutantu Rt12A, w którym do genu *pssB* wprowadzono kasetę *lacZ-Gm^r*. Stwierdzono, że ilość EPS

produkowanego przez mutantu Rt12A była dwukrotnie wyższa w porównaniu ze szczepem dzikim RtTA1. Mimo braku zmian składu chemicznego cukrowego podjednostek EPS preparatu zaobserwowano wzrost jego lepkości i zmiany w proporcji frakcji wysokocząsteczkowej (ang. *High Molecular Weight*, HMW) w stosunku do frakcji niskocząsteczkowej (ang. *Low Molecular Weight*, LMW) EPS, wynoszące odpowiednio 1:1 w szczepie rodzicielskim RtTA1 oraz 1,3:1 w szczepie mutantu Rt12A, co wskazuje na większy stopień polimeryzacji powtarzających się podjednostek EPS. Stopień polimeryzacji EPS Rt12A liczony jako stosunek liczby powtarzających się podjednostek EPS do liczby cukrów redukujących odzwierciedlających liczbę wolnych grup redukujących, był ponad 5 razy wyższy niż dla EPS szczepu RtTA1. Analiza widm magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) wykazała nieznaczny wzrost ilości podstawników acetylowych, pirogronianowych i 3-hydroksybutyrylowych w EPS mutantu Rt12A w porównaniu z dzikim szczepem RtTA1. Wzór podstawienia reszt cukrowych oktasacharydowej podjednostki EPS przez składniki niecukrowe zmienia się w zależności od fazy wzrostu bakterii i środowiska np. obecności flawonoidów roślinnych.

W szczepie Rt12A zaobserwowano także różnice w profilu elektroforetycznym LPS w porównaniu do LPS wyjściowego szczepu RtTA1. Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) wykazała wzrost ciężaru cząsteczkowego głównej frakcji wolno migrującego LPS, zawierającego O-PS (LPS I) oraz występowanie dodatkowych prążków poniżej tej frakcji, co świadczy o większej heterogenności w stopniu polimeryzacji podjednostek przyłączanych do oligosacharydu rdzenia. W wyniku przeprowadzonej analizy chemicznej stwierdzono, że LPS mutantu i szczepu rodzicielskiego różnią się nie tylko profilem elektroforetycznym, ale również składem cukrów. Zmiana dotyczyła przede wszystkim ilości oraz rodzaju cukrów budujących O-PS. Stwierdzono, że w LPS mutantu znikają trzy cukry charakterystyczne dla LPS szczepu dzikiego: fukoza, 2-O-metylo-6-deoksyheksoza i 3-N-metylo-3,6-dideoksyheksoza, a pojawiają się dwie 6-deoksyheksozy: 6-deoksytaloza i ramnoza, które nie występują w LPS RtTA1.

Mutant Rt12A utracił zdolność nawiązywania efektywnej symbiozy z koniczyną. Analiza mikroskopowa wykazała, że brodawki indukowane przez tego mutantu zawierały nietypowe „puste” struktury błonowe wewnątrz komórek roślinnych, były defektywne w procesie uwalnianiu bakterii z nici infekcyjnych do komórek roślinnych, w których gromadziły się duże ilości skrobi.

Podsumowując, wykazano, że produkt genu *pssB* pełni istotną rolę w biosyntezie EPS. Działanie tego białka dotyczy także szlaku syntezy 6-dezoksyheksoz wchodzących

w skład podjednostki O-swoistego polisacharydu LPS. Tworzenie przez szczep mutanta brodawek nie wiążących azotu, w wyniku zaburzonego uwalnianiu bakterii z nici infekcyjnych jest prawdopodobnie następstwem zmian w obu polimerach węglowodanowych.

Opisane badania opublikowano w publikacji:

1. Kutkowska J., Janczarek M., Kopcińska J., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A. (2007) Effect of *pssB* mutation on surface polysaccharides and symbiotic phenotype of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Acta Biol Cracov Bot 49/2: 81-89

W kolejnych badaniach analizowano znaczenie struktur LPS dla efektywnej symbiozy *Mesorhizobium loti* z komonicą zwyczajną *Lotus corniculatus*. W wyniku mutagenезy transpozonowej szczepu *M. loti* NZP2213 wyizolowano mutanta *M. loti* NZP2213.1 w genie glikozylotransferazy, który tworzył nieefektywne brodawki na komonicy zwyczajnej. Defekt symbiotyczny w tym mutancie nie był związany z EPS, ponieważ nie stwierdzono zmian zarówno w ilości, jak i w składzie EPS, który jest polimerem podjednostek złożonych z: kwasu ryburonowego, glukozy, kwasu glukuronowego i galaktozy w stosunku molowym 2: 5: 1: 0,5.

Analiza LPS szczepu dzikiego i mutanta wykazała różnice ilościowe i jakościowe między tymi preparatami. W wyniku ekstrakcji metodą wodno-fenolową z fazy wodnej otrzymano dwukrotnie więcej LPS ze szczepu mutanta, co świadczy o przewadze hydrofilowej formy LPS w tym szczepie w porównaniu do szczepu dzikiego, w którym forma hydrofilowa i hydrofobowa LPS występowały w równowadze. Analiza rozdziału elektroforetycznego LPS w obecności SDS pokazała, że profile frakcji LPS z fazy wodnej w obu szczepach były zbliżone i przeważała w nich frakcja niskocząsteczkowa. Natomiast wzory LPS o charakterze hydrofobowym (faza fenolowa) różniły się ilością materiału wysokocząsteczkowego: w preparacie mutanta było znacznie mniej LPS. Mniejsza ilość wysokocząsteczkowej frakcji LPS mutanta była skorelowana ze spadkiem ilości cukrów wchodzących w skład O-PS: trzykrotnym w przypadku 2-O-metylo-6-deoksytalozy i dwukrotnym w przypadku 6-deoksytalozy. Badania składu chemicznego oraz jedno i dwuwymiarowych protonowych i protonowo-węglowych widm NMR wykazały, że dwa wymienione cukry, są składnikami O polisacharydu zbudowanego z 2-O-metylo-6-deoksy-L-talozy i 6-deoksy-L-talozy w stosunku molowym 1,2:7 połączonymi wiązaniami 1-3 glikozydowymi. Stosunek reszt Kdo do sumy reszt cukrów reprezentujących O antygen, które wynosiły odpowiednio 1:33 i 1:19,6 w szczepie dzikim i mutancie oraz porównanie obrazów

elektroforetycznych wykazało, że oligosacharyd rdzenia jest podstawiony dwukrotnie mniejszą ilością O polisacharydu w LPS mutanta.

Analiza elektronomikroskopowa przekrojów brodawek wykazała nieprawidłowy rozwój nici infekcyjnych, przedwczesne starzenie się i degradację symbiosomów w brodawkach indukowanych przez mutantą *M. loti* NZP2213.1 na komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*). Zmiany te mogą być konsekwencją silnej odpowiedzi obronnej gospodarza roślinnego wobec bakterii u których dominuje hydrofilowa forma LPS.

Powyższe badania wykazały, że mutacja genu kodującego glikozylotransferazę powoduje zmniejszenia ilości formy hydrofobowej LPS oraz wpływa na zmiany w proporcji 6-deoksyheksoz części O-swoistej LPS, wzrasta zawartość 2-O-metylo-6-deoksy-L-talozy i zmniejsza się ilość 6-deoksy-L-talozy. Konsekwencją tych zmian są nieprawidłowości w budowie nici infekcyjnej i degeneracja bakteroidów, co powoduje nieefektywną symbiozę z komonicy,

Powyższe badania zostały opublikowane w:

2. Turska-Szewczuk A., Łotocka B., **Kutkowska J.**, Król J., Urbanik-Sypniewska T., Russa R. (2009) The incomplete substitution of lipopolysaccharide with O-chain prevents the establishment of effective symbiosis between *Mesorhizobium loti* NZP2213.1 and *Lotus corniculatus*. *Microbiol Res* 164: 163-173

Celem następnych badań była charakterystyka chemiczna antygenów O-swoistych LPS szczepu wyjściowego *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 oraz mutantą Rt120 w regionie międzygenowym *pssB-pssA*. Mutacja z użyciem transpozonu Tn5 została zlokalizowana przed genem *pssA* kodującym glikozylotransferazę inicjującą biosyntezę EPS.

Badania (Janczarek i wsp., 2001) wykazały brak EPS w komórkach mutantą Rt120, zmiany w profilu elektroforetycznym LPS oraz zmiany swoistości antygenów somatycznych. Mutant wykazywał także obniżoną zdolność zakażenia koniczyny czerwonej (*Trifolium repens*) i indukcję brodawek, które nie wiązały azotu.

W wyniku analizy nie frakcjonowanego degradowanego polisacharydu Rt120 będącego mieszaniną oligomerów różnej wielkości pochodzących z części rdzeniowej i O-polisacharydu, zidentyfikowano ramnozę, 6-deoksytalozę, 2,3-di-O-metylo-glukozę, mannozę, glukozę, galaktozę, heptozę, 2-acetamido-2,6-dideoksy-D-glukozę (D-QuiNAc), kwas galakturonowy i Kdo. We frakcji wysokocząsteczkowej otrzymanej z rozdziału na Bio-Gel P-4 (zakres mas 800-4000 Da) występowały wszystkie cukry z wyjątkiem D-QuiNAc,

heptozy i Kdo. Dla porównania w analogicznym preparacie degradowanego polisacharydu (DPS) szczepu dzikiego RtTA1 zidentyfikowano: 2-O-metylofukozę, L-fukozę, D-mannozę, D-glukozę, D-galaktozę, heptozę, 2-acetamido-2,6-dideoksy-D-glukozę, 3-N-metylo-fukozę (3-N-Me-Fuc), kwasy: D-glukuronowy i D-galakturonowy oraz Kdo.

Te wstępne dane sugerowały odmienną budowę części O-swoistej w LPS szczepu dzikiego i mutantu. Potwierdzeniem takiego wniosku był wzór migracji LPS w żelu poliakrylamidowym, wskazujący na większą heterogenność polisacharydu O mutantu.

Na podstawie porównania czasów retencji wzorców i badanych składników DPS obu szczepów rozdzielanych w formie butylowych glikozydów ustalono, że wszystkie deoksycukry występowały w konfiguracji L, natomiast kwasy heksuronowe i heksozy w konfiguracji D. Analiza metylacyjna niefrakcjonowanego DPS Rt120 wykazała obecność głównych cukrów: heptozy, glukozy, kwasu galakturonowego oraz 6-deoksy-L-talozy i L-ramnozy występujących w pozycji terminalnej. Z kolei w DPS szczepu wyjściowego dominowały glukoza, kwas glukuronowy i galakturonowy, a jako terminalne reszty 2-O-metylo-L-fukoza, L-fukoza i heptoza. Miejscem rozgałęzienia w obydwu polisacharydach były reszty glukozy i mannozy.

Analiza DPS Rt120 techniką MALDI-TOF pozwoliła na zidentyfikowanie niektórych oligomerów, takich jak: oligomer o masie m/z 747,7 odpowiadający czterocukrowi zbudowanemu z 6-deoksyheksozy-D-GalA-QuiNAc-Kdo oraz o masie m/z 538,9 odpowiadającego trójocukrowi złożonemu z heksozy-2,3-di-O-metylo-heksozy-6-deoksyheksozy. Wśród oligocukrów RtTA1 analizowanych tą metodą otrzymano jony o masie m/z 823,8, odpowiadający pentasacharydowi zbudowanemu z 3-N-Me-Fuc, 6-deoksyheksozy, dwu reszt heksoz i kwasu heksuronowego oraz m/z 369,0 odpowiadającego dwucukrowi złożonemu z 3-N-Me-Fuc i heptozy. W preparatach obu szczepów występował tetrasacharyd złożony z kwasu heksuronowego, dwu reszt heksozy i 6-deoksyheksozy (m/z 686,3) oraz dwucukry: heptozowo-heksozowy (m/z 395,5) i 6-deoksyheksozowy (m/z 332,9). Analiza widm protonowych NMR potwierdziła heterogenność obu preparatów widoczną w zakresie regionu anomerycznego widma oraz różnice ilościowe acetylowanych reszt cukrowych. Względne intensywności sygnałów dla głównych grup O-acetylowych (2,25 i 2,26 ppm) i grup N-acetylowych (2,10 - 2,12 ppm) wynosiły odpowiednio 1: 0,8 i 1: 1,24 w polisacharydzie RtTA1 i mutantu Rt120.

Biologiczną aktywność preparatu LPS mutantu Rt120 porównano z aktywnością LPS szczepu wyjściowego TA1. Wykazano, że dawka LPS mutantu powodująca 50% śmiertelności (LD_{50}) dla myszy linii NIH wynosi 10 μ g/mysz i jest około 2-krotnie niższa niż

dla LPS szczepu rodzicielskiego. Określono zdolność badanych preparatów LPS do stymulacji produkcji głównych cytokin *in vivo*: czynnika martwicy nowotworu (TNF- α), interleukiny 1 (IL-1 β), interleukiny 6 (IL-6), interferonu γ (IFN- γ). Stwierdzono, że LPS Rt120 indukował porównywalne ilości IFN- γ oraz nieco wyższy poziom TNF- α i IL-6 niż LPS RtTA1. Ponieważ ilość IL-1 β produkowanej po podaniu LPS mutanta była ponad dwukrotnie niższa w porównaniu z LPS szczepu rodzicielskiego, jego właściwości jako np. czynnika immunizującego oceniono jako bardziej korzystne.

Z uwagi na to, że główne różnice między LPS obu szczepów dotyczyły części antygeny O i rdzenia, a skład części lipidowej był identyczny, sprawdzono aktywność cytotoksyczną cukrowych fragmentów LPS na komórki eukariotyczne. Określono przeżywalność komórek fibroblastów skóry właściwej (HSF) i komórek linii nowotworowej HeLa po dodaniu frakcji o wielkości ok. 3000 Da odpowiadających części O-PS badanych preparatów. Dominującymi składnikami tych frakcji w preparacie mutanta były: ramnoza, 6-deoksytalozyna i kwas galakturonowy, natomiast w preparacie RtTA1: fukoza, 3-deoksy-3-metylamino-fukoza, glukoza, kwas glukuronowy i heptoza. Stwierdzono, że polisacharyd mutanta powodował apoptozę komórek nowotworowych i nie działał toksycznie na komórki linii prawidłowej. Przeżywalność komórek linii HeLa spadała wraz ze wzrostem stężenia preparatu i jej maksymalna wartość wynosiła 40% przy stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ oligocukrów. Nie stwierdzono działania hamującego podobnie uzyskanej frakcji LPS szczepu RtTA1 na żywotność zarówno komórek prawidłowych, jak i nowotworowych.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że mutacja w regionie *pssB-pssA* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* powoduje zahamowanie biosyntezy egzopolisacharydu i jednocześnie zmiany w strukturze i swoistości antygeny O prawdopodobnie poprzez pośredni związek ze szlakiem biosyntezy 6-deoksyheksoz (6-deoksy-L-talozyna i 6-deoksy-L-ramnozy) będących immunodominującymi cukrami antygenowej części LPS.

Wyizolowany oligosacharyd o wielkości 3000 Da (16-18 reszt cukrowych) z LPS mutanta Rt120 wykazuje działanie cytotoksyczne *in vitro* na komórki linii HeLa w odróżnieniu od podobnie otrzymanego fragmentu LPS szczepu dzikiego RtTA1. Jedną z możliwych przyczyn może być blokowanie receptorów dla cząsteczek sygnałowych komórek nowotworowych przez oligosacharyd występujący w strukturze O-polisacharydu w LPS mutanta.

Opisane badania były realizowane przeze mnie w ramach grantu indywidualnego Prorektora ds. Badań Naukowych i Współpracy z Zagranicą UMCS „Porównanie struktur antygenowych łańcuchów bocznych lipopolisacharydu mikrosymbionta koniczyny *Rhizobium*

leguminosarum bv. *trifolii* TA1 i mutantu w regionie regulatorowym syntezy egzopolisacharydu” (2001-2002, kierownik).

Badania te zostały opublikowane w:

3. Kutkowska J., Turska-Szewczuk A., Janczarek M., Paduch R., Kamińska T., Urbanik-Sypniewska T. (2011) Biological activity of (lipo)polysaccharides of the exopolysaccharide deficient mutant Rt120 derived from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1. *Biochemistry (Moscow)* 76, 7: 840-850

Celem następnych badań było opisanie związku między filogenezą mikrosymbiontów grochu a ich strukturą LPS i zawartością hydroksykwasów tłuszczowych. Badano również bioróżnorodność szczepów wyizolowanych z brodawek korzeniowych grochu *Pisum sativum* w oparciu o markery genetyczne i właściwości fenotypowe.

Do określania poziomu zróżnicowania genomowego między blisko spokrewnionymi gatunkami lub w obrębie gatunku oraz ustalaniu filogenezy na poziomie populacyjnym stosowana jest metoda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Terefework i in. 2001).

Na podstawie analizy porównawczej profili genomowych uzyskanych z zastosowaniem techniki AFLP stwierdzono, że badane izolaty z brodawek grochu charakteryzuje znaczne zróżnicowanie genomowe. Na poziomie podobieństwa 58% badane szczepy tworzyły 2 grupy genomowe, a tylko dwa izolaty posiadały identyczny profil genomowy.

Pokrewieństwo filogenetyczne mikrosymbiontów zostało określone na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA i genów metabolizmu podstawowego *atpD* i *recA*, które kodują odpowiednio: podjednostkę β syntetazy ATP i rekombinazę DNA.

Na podstawie analizy porównawczej sekwencji genu kodującego podjednostkę 16S rRNA izolatów *P. sativum* stwierdzono wysoki stopień podobieństwa (98%) do bakterii rodzaju *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* i bv. *trifolii*. Wykonana analiza sekwencji genów *atpD* i *recA* badanych izolatów potwierdziła ich pozycję rodzajową ustaloną w oparciu o gen 16S rRNA. Stwierdzono, że sekwencje badanych genów *atpD* i *recA* są identyczne w zakresie wynoszącym od 92,7 % do 100% dla *atpD* i od 95,1% do 100% dla *recA*.

Dendrogram skonstruowany na podstawie podobieństwa sekwencji nukleotydowych połączonych genów 16S rRNA, *recA* i *atpD* pokazał, że większość izolatów grochu tworzy klaster ze szczepami referencyjnymi *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 237 i *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ATCC 14480. Uzyskane wyniki potwierdziły, że mikrosymbionty grochu są filogenetycznie spokrewnione z *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* i *trifolii*.

Ocena fenotypowa mikrosymbiontów *P. sativum* była przeprowadzona w oparciu o profile elektroforetyczne utworzone przez LPS, skład kwasów tłuszczowych w LPS, oraz zdolność do produkcji EPS. Dodatkowo w celu ustalenia selekcyjnego wpływu czynników środowiskowych zbadano wrażliwość na zasolenie, detergenty, pH i podwyższoną temperaturę.

Weześniejsze badania prowadzone w ZGiM wykazały, że profile hydroksykwasów tłuszczowych pochodzących z LPS są cennym markerem chemotaksonomicznym wykorzystanym w systematyce bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* (Choma i Komaniecka 2011). W analizie porównawczej profili elektroforetycznych LPS mikrosymbiontów grochu i szczepu referencyjnego stwierdzono znaczne różnice we wzorcach elektroforetycznych LPS szczepów izolowanych z tego samego gospodarza roślinnego. W oparciu o tę technikę szczepy zostały podzielone na dwie grupy na poziomie podobieństwa wynoszącym 58%.

Analiza składu kwasów tłuszczowych uwolnionych z LPS izolatów grochu i szczepu referencyjnego metodą GC/MS potwierdziła obecność specyficznych dla *R. leguminosarum* i *R. etli* 3-hydroksykwasów: 3-hydroksymirystynowego (3-OH-C14:0), 3-hydroxypentadekanowego (3-OH-C15:0), 3-hydroksypalmitynowego (3-OH-C16:0), 3-hydroksystearynowego (3-OH-C18:0), a także długołańcuchowych (ω -1)- kwasów tłuszczowych, 27-hydroksyoktakożanowego (27-OH-C28:0) i 29-hydroksytriantanowego (29-OH-C30:0) acylujących reszty kwasów 3-hydroksy. Zaobserwowano różnice w proporcji kwasów tłuszczowych wśród izolatów i na ich podstawie wyróżniono 2 grupy mikrosymbiontów. Do grupy pierwszej zaliczono szczepy, w których zawartość procentowa kwasów była podobna jak w szczepie referencyjnym. W grupie drugiej znalazły się szczepy ze zmienionymi proporcjami kwasów 3-OH-C15:0, 3-OH-C16:0 i kwasów długołańcuchowych 27-OH-C28:0, 29-OH-C30:0.

Stwierdzono, że podział izolatów w oparciu o proporcje kwasów tłuszczowych nie odzwierciedla podobieństwa stwierdzonego na podstawie profili elektroforetycznych LPS. Podobnie nie znaleziono korelacji pomiędzy typem profilu elektroforetycznego LPS a charakterystyką fenotypową szczepów, w tym wrażliwością na anionowe detergenty, pH i zasolenie. Nie zaobserwowano również podobieństwa pomiędzy dendrogramami skonstruowanymi na podstawie wzorów elektroforetycznych LPS i drzew filogenetycznych opartego na analizie AFLP.

Podsumowując, stwierdzono, że klasyfikacja szczep(ów) oparta na różnicach profili LPS i kwasów tłuszczowych nie jest bezpośrednio skorelowana z klasyfikacją

filogenetyczną, lecz może być z powodzeniem stosowana do różnicowania szczepów mikrosymbiontów grochu.

Opisane badania zostały opublikowane w:

4. Kutkowska J., Marek-Kozaczuk M., Wielbo J., Wójcik M., Urbanik-Sypniewska T. (2017) Electrophoretic profiles of lipopolysaccharides from *Rhizobium* strains nodulating *Pisum sativum* do not reflect phylogenetic relationships between these strains. Arch Microbiol 199:1011–1021

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć

- Ustalenie znaczenia mutacji w genie *pssB* kodującym monofosfatazę inozytolu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (mutant Rt12A) w produkcji i polimeryzacji EPS
- Opisanie wpływu mutacji w genach *pssB* oraz regionie *pssB-pssA* na szlak biosyntezy 6-deoksyheksoz – składników O-swoistego polisacharydu LPS *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1.
- Opisanie zmian w stopniu polimeryzacji EPS oraz budowie O-polisacharydu LPS mutantu *pssB*, które niekorzystnie wpływały na brodawkowanie koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense*) na etapach infekcji, tworzenia nici infekcyjnych i uwalniania bakterii do komórek roślinnych.
- Określenie różnic w budowie oligocukrów części polisacharydowej LPS szczepu rodzicielskiego *R. leguminosarum* TA1 i mutantu Rt120 w regionie *pssB-pssA*.
- Wykazanie aktywności biologicznej preparatów LPS oraz oligosacharydów szczepu dzikiego RtTA1 i mutantu Rt120.
- Wykazanie, że mutacja w genie *Mesorhizobium loti* kodującym ~~homologicznym~~ do glikozylotransferazę wpływa na wzrost zawartości frakcji hydrofilowej LPS oraz zmiany w proporcji 6-deoksytalozy i 2-O-metylo-6-deoksytalozy cukrów wpływających na hydrofobowość LPS.
- Konsekwencją zmian fizykochemicznych LPS *M. loti* było tworzenie przez mutantu NZP2213.1 brodawek o nieprawidłowej budowie nici infekcyjnych i nieefektywnych w symbiozie z koniczą (*Lotus corniculatus*).
- Ustalenie pozycji taksonomicznej rizobiów izolowanych z brodawek lokalnej populacji grochu (*Pisum sativum*) i wykazanie znacznego zróżnicowania genomowego izolatów.

- Wykazanie wysokiego potencjału różnicującego profili elektroforetycznych LPS oraz kwasów tłuszczowych otrzymanych z LPS mikrosymbiontów grochu i braku zgodności tych cech z klasyfikacją opartą na markerach genomowych.

Literatura

1. Choma A, Komaniecka I. (2011) Straight and branched (ω -1)-hydroxylated very long chain fatty acids are components of *Bradyrhizobium* lipid A. *Acta Biochim Pol* 58: 51–57
2. D’Heaze W., Leoff C., Freshour G., Noel K.D., Carlson R.W. (2007) *Rhizobium etli* CE3 bacteroid lipopolysaccharides are structurally similar but not identical to those produced by cultured CE3 bacteria. *J Biol Chem* 282: 17101–17113
3. Forsberg L.S., Bhat U.R., Carlson R.W. (2000) Structural characterization of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* strain CE3. *J. Biol. Chem.* 275: 18851-18863
4. Fraysse N., Couderc F., Poinot V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. *Eur J Biochem.* 270: 1365–1380
5. Janczarek M, Kutkowska J, Piersiak T, Skorupska A (2010) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Microbiol* 10: 1–23
6. Janczarek M., Król J., Kutkowska J., Mazur A., Wielbo J., Borucki W., Kopcińska J., Łotocka B., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A. (2001) Mutation in *pssB-pssA* intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* affects the surface polysaccharides synthesis and nitrogen fixation ability, *J. Plant Physiol.* 158: 1565-1574
7. Janczarek M., Król J., Skorupska A. (1999) The *pssB* gene product of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is homologous to a family of inositol monophosphatases. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 319- 325
8. Janczarek M., Rachwał K., Turska-Szewczuk A. (2017) A mutation in *pssE* affects exopolysaccharide synthesis by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, its surface properties, and symbiosis with clover. *Plant Soil* 417: 331-347
9. Janczarek M., Skorupska A. (2001) The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *pssB* gene product is an inositol monophosphatase that influences exopolysaccharide synthesis. *Arch. Microbiol* 175: 143-151
10. Kawaharada Y, Kelly S, Wibroe Nielsen M, Hjuler CT, Gysel K, Muszyński A, Carlson RW, Thygesen MB, Sandal N, Asmussen MH, Vinther M, Andersen SU, Krusell L, Thirup S, Jensen KJ, Ronson CW, Blaise M, Radutoiu S, Stougaard J (2015) Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523: 308–312
11. Lodowska J., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z. (2007) Heterogenność strukturalna lipidu A bakterii Gram-ujemnych. *Postepy Hig Med Dosw.* 61: 106-121
12. Marczak M., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A. (2017) Synthesis of rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. *Genes (Basel).* 8: 360

13. Mazur A., Król J.E., Wielbo J., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska, A. (2002) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* PssP protein is required for exopolysaccharide biosynthesis and polymerization. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 388–397
14. Moran, A. P., Prendergast, M. M. and Appelmelk, B. J. (1996) Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16: 105–115
15. Muszyński A, Laus MC, Kijne JW, Carlson RW (2011) Structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* RBL5523 and its UDP-glucose dehydrogenase mutant (exo5). *Glycobiology* 21: 55–68
16. Noel K.D., Box J.M., Bonne V.J. (2004) 2-O-methylation of fucosyl residues of a rhizobial lipopolysaccharide is increased in response to host exudate and is eliminated in a symbiotically defective mutant. *Appl Environ Microbiol.* 70:1537-44
17. Noel K.D., Delli D.M. (2000) *Rhizobium* lipopolysaccharide and its role in symbiosis. W: Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of a biological process. Edytor: Triplett E.W., Horizon Scientific Press, Wymondham, UK: 415- 431
18. Ojeda K.J., Simonds L., Noel K.D. (2013) Roles of predicted glycosyltransferases in the biosynthesis of the *Rhizobium etli* CE3 O antigen. *J Bacteriol.* 195: 1949–1958
19. Raetz C.R., Whitfield C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71: 635-700
20. Serrato R.V. (2014) Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.*4:119. doi:10.3389/fcimb.2014.00119
21. Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Król J. (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories.* 5:7
22. Stasiak G., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A. (2016) Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*). *Post. Mikrobiol.* 55: 289–299
23. Terefework Z., Kaijalainen S., Lindström K. (2001) AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *J. Biotech.* 91: 169-180
24. Tsukushi Y., Kido N., Saeki K., Sugiyama T., Koide N., Mori I., Yoshida T., Yokochi T. (2004) Characteristic biological activities of lipopolysaccharides from *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium*. *J Endotoxin Res.*10:25-31
25. Urbanik-Sypniewska T., Choma A., Kutkowska J., Kamińska T., Kandefer-Szerszeń M., Russa R., Dolecka J. (2000) Cytokine inducing activities of rhizobial and mesorhizobial lipopolysaccharides of different lethal toxicity. *Immunobiol.* 202: 408-420
26. Vedam V, Kannenberg EL, Haynes JG, Sherrier DJ, Datta A, Carlson RW (2003) A *Rhizobium leguminosarum* AcpXL mutant produces lipopolysaccharide lacking 27- hydroxyoctacosanoic acid. *J Bacteriol* 185: 1841–1850
27. Zahran H.H. (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 968-989

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

A. Struktury powierzchniowe bakterii w oddziaływaniu ze środowiskiem

Prace doświadczalne

P1. Janczarek M., Król J., **Kutkowska J.**, Mazur A., Wielbo J., Borucki W., Kopcińska J., Łotocka B., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A. (2001) "Mutation in *pssB-pssA* intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* affects the surface polysaccharides synthesis and nitrogen fixation ability", J. Plant Physiol. 158: 1565-1574

(IF₂₀₀₁ 1,018; MNiSW₂₀₀₁ 16 pkt)

Część wyników przedstawiona w tej pracy została wykonana podczas realizacji pracy doktorskiej.

Mutant *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Rt120 został wyizolowany w wyniku mutagenyzy transpozonom Tn5 szczepu dzikiego RtTA1 jako szczep „szorstki” nie produkujący EPS na podłożu stałym. Analiza sekwencji nukleotydowej ujawniła miejsce insercji transpozonu w obszarze między genami *pssB* i *pssA*, przed ORF genu *pssA* kodującym glikozylotransferazę inicjującą biosyntezę EPS. Szczep Rt120 był mniej wrażliwy na hydrofobowe detergenty-SDS i DOC, w porównaniu ze szczepem dzikiem RtTA1. Zmiany tego typu sugerowały wpływ mutacji nie tylko na syntezę EPS, ale też na przepuszczalność błony zewnętrznej i możliwe zmiany w LPS. Przeprowadzona analiza elektroforetyczna SDS-PAGE preparatów LPS wykazała zmiany w profilu LPS mutantu Rt120; w regionie wolno migrującym odpowiadającym antygenowi O brak było prążka, który był intensywny w LPS szczepu dzikiego. Zmiany te zostały potwierdzone techniką immunoblotingu w reakcji z mysimi surowicami poliklonalnymi otrzymanymi po immunizacji myszy preparatami LPS z badanych szczepów. Preparaty LPS szczepu TA1 i Rt120 reagowały tylko z ich surowicami homologicznymi. Brak reakcji krzyżowej wskazuje, że LPS mutantu utracił główne determinanty antygenowe obecne w LPS szczepu dzikiego.

Szczep Rt120 był nieefektywny w wiązaniu azotu; analiza mikroskopowa brodawek indukowanych przez ten szczep wykazała, że zawierały one nieliczne bakteroidy. Immunodetekcja w mikroskopie elektronowym przy użyciu przeciwciał anti-LPS RtTA1 i Rt120 znakowanych złotem wykazała, że na powierzchni bakteroidów występują epitopy wspólne z LPS form wolnożyjących. Determinanty te zlokalizowano na powierzchni ściany

komórkowej bakteroidów indukowanych przez szczep dziki i mutant. Ich ekspresja w przypadku bakteroidów Rt120 była znacznie słabsza w porównaniu do szczepu dzikiego.

P2. Wielbo J., Mazur A., Król J., Marczak M., **Kutkowska J.**, Skorupska A. (2004) "Complexity of phenotypes and symbiotic behavior of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* exopolysaccharide mutants", Arch. Microbiol., 182: 331-336

(IF₂₀₀₄ 2,374; MNiSW₂₀₀₄ 15 pkt)

Uczestniczyłam w badaniach mutantów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 w genach *pssD*, *pssP*, *pssT* i *pssO*, kodujących białka odpowiedzialne za biosyntezę i polimeryzację egzopolisacharydu. Mutanty w tych genach nie produkowały EPS lub syntetyzowały EPS o zmienionym stopniu polimeryzacji (Król i wsp. 1998; Mazur i wsp., 2002; Mazur i wsp., 2003; Marczak i wsp. 2008).

Analiza elektroforetyczna profilu LPS mutantów *pss* wykazała istotne zmiany tylko w szczepach mutantów w genach *pssD* (Rt133) i *pssP* (RtP22), które nie wytwarzały egzopolisacharydu. Frakcje wolno migrujące, odpowiadające LPS z przyłączonym polisacharydem O różniły się w obu mutantach intensywnością prążków i szybkością migracji w żelu poliakrylamidowym w porównaniu do szczepu dzikiego RtTA1 i pozostałych mutantów. Wyniki te sugerują zmiany w długości polisacharydów O lub znaczną redukcję ich długości oraz ilości.

Szczepy mutantów w genach *pss* różniły się wrażliwością na detergenty, etanol oraz antybiotyki. Szczepy o zmienionym profilu LPS: Rt133 i RtP22 były bardziej wrażliwe na te czynniki, co może wskazywać na zmiany integralności (przepuszczalności) błony komórkowej mutantów.

Badania zdolności symbiotycznych wykazały, że szczepy mutantów indukowały z opóźnieniem nieefektywne brodawki na koniczynie w porównaniu do szczepu dzikiego RtTA1. W przypadku mutantów nie syntetyzujących EPS (szczególnie Rt133) wyraźne były reakcje obronne ze strony rośliny, obserwowano zmiany nekrotyczne, akumulację związków fenolowych, odkładanie się w ścianie komórek roślinnych substancji o charakterze hydrofobowym (prawdopodobnie suberyny). Mutanty *pss* produkujące EPS w zmienionej ilości, lub o innym stopniu polimeryzacji zasiedlały młodsze strefy rozwojowe brodawki, jednak reakcje obronne ze strony rośliny były znacznie słabsze w porównaniu z mutantami Rt133 i RtP22.

Podsumowując stwierdzono, że mutacje w genach *pss* kodujących białka uczestniczące w biosyntezie i polimeryzacji EPS, podobnie jak opisane wcześniej w regionie regulatorowym położonym w odcinku *pssB-pssA*, wywierają efekt plejotropowy. Jednym ze szlaków, które pośrednio wynikają z mutacji, może być szlak związany z biosyntezą LPS, co wpływa na efektywność symbiotyczną bakterii.

P3. Zdrovenko E.L., Valueva O.A., Kachala V.V., Shashkov A.S., Kocharova N.A., Knirel Y.A, **Kutkowska J.**, Turska-Szewczuk A., Urbanik-Sypniewska T., Choma A., Russa R. (2009) Structure of the O-polysaccharides of the lipopolysaccharides of *Mesorhizobium loti* HAMBI 1148 and *Mesorhizobium amorphae* ATCC 19655 containing two O-methylated monosaccharides. Carbohydr. Res. 344: 2519–2527

(IF 2009 2,025; MNiSW₂₀₀₉ 24 pkt)

We współpracy z zespołem prof. Y. A. Knirela z Instytutu Chemii Organicznej Rosyjskiej Akademii Nauk w Moskwie (Rosja), badano antygeny O-swoiste *Mesorhizobium loti* HAMBI 1148 i *M. amorphae* ATCC 19655.

Wyniki analizy SDS-PAGE wskazywały na różnice w części rdzeniowej LPS badanych szczepów i znaczną heterogenność LPS *M. loti*. Profile elektroforetyczne LPS obu badanych gatunków *Mesorhizobium* były podobne, dominował jeden bardzo wyraźny prążek i kilka prążków o mniejszej ruchliwości. Prążki LPS *M. loti* były przesunięte w kierunku regionu o niższych masach cząsteczkowych, w porównaniu do LPS *M. amorphae*.

Występowanie wspólnych epitopów w obu szczepach wykazała analiza Western blotting. Pozytywne reakcje z mysią surowicą poliklonalną anti-LPS *M. loti* HAMBI 1148 uzyskano zarówno z cząsteczkami o dużej masie (antygen O), jak i LPS o niskiej masie cząsteczkowej składające się z rdzenia i lipidu A.

Określono strukturę podjednostek antygenów O-swoistych badanych mezorizobiów. Oba polisacharydy były polimerami zbudowanymi z pentasacharydowych liniowych podjednostek zawierających jedną α -(1→2)- i cztery α -(1→3)- reszty D-ramnozy. Niektóre podjednostki były podstawione resztą 4-O-metylo-D-glukozaminy (80%) i/lub grupą O-metylową. Stwierdzono istotne różnice w stopniu metylacji 2-podstawionej reszty ramnozy (70% u *M. amorphae* i 40% u *M. loti*).

P4. Janczarek M., **Kutkowska J.**, Piersiak T., Skorupska A. (2010) *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. BMC Microbiology 10:284

(IF₂₀₁₀ 2,96; MNiSW₂₀₁₀ 27 pkt)

Badania nad wpływem mutacji w genie *rosR* na syntezę polisacharydów bakteryjnych prowadziłam w ramach grantu finansowanego przez MNiSW „Funkcja genu *rosR* w regulacji syntezy egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*” (N N303 092234, 2008-2011), w którym byłam wykonawcą. W pracy tej zostały opisane mutanty *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 w genie *rosR*, który koduje pozytywny regulator transkrypcji w syntezie egzopolisacharydu.

Wykazano, że białko RosR wpływa na poziom syntezy EPS oraz na stopień jego polimeryzacji. Ilości EPS produkowane przez mutanty Rt2440, Rt2441 i Rt2472 były 3-krotnie mniejsze w porównaniu do szczepu dzikiego Rt24.2. W mutantach *rosR* Rt2440 i Rt2441 zaobserwowano zmianę proporcji frakcji wysokocząsteczkowej (HMW) do niskocząsteczkowej (LMW) EPS - mutanty tworzyły znacznie mniejszą ilość frakcji niskocząsteczkowej EPS. Określono składniki cukrowe EPS szczepu dzikiego i mutantów, którymi były: glukoza, kwas glukuronowy, galaktoza w proporcji 5: 2: 1, identycznie jak w kwaśnym EPS dzikich szczepów *R. leguminosarum*. Ponadto zaobserwowano, że w EPS Rt2440 (mutant *rosR*) poziom substytucji grupami O-acetylowymi i 3-hydroksymaślanowymi jest niższy, a w przypadku grup pirogronianowych nieco wyższy w porównaniu z EPS typu dzikiego. Mutacja genu kodującego białko regulatorowe RosR wpłynęła także na lipopolisacharyd. LPS mutantu Rt2440 miał zbliżony profil elektroforetyczny do szczepu Rt24.2; jednak intensywność poszczególnych pasm była znacznie słabsza. Ponadto frakcja LPS o wysokiej masie cząsteczkowej (LPS I) mutantu *rosR* migrowała nieco szybciej niż LPS I ze szczepu dzikiego. W celu określenia zmian chemicznych w LPS badano składniki cukrowe polisacharydów otrzymanych z LPS szczepu dzikiego i Rt2440 po łagodnej kwaśnej hydrolizie. Ustalono, że skład cukrowy obu polisacharydów był taki sam, występowały jednak różnice w ilości poszczególnych składników - zwłaszcza 6-deoksyheksoz. Stosunek molowy L-ramnozy do 6-deoksy-L-talozy wynosił 1: 1 w DPS mutantu *rosR* w porównaniu 2: 1 w DPS szczepu rodzicielskiego.

Szczepy z mutacją w genie *rosR* były zmienione pod względem wrażliwości na detergenty i antybiotyki oraz wykazywały różnice we frakcjach białek błonowych i zewnątrzkomórkowych w porównaniu do szczepu dzikiego.

Zmienione białko RosR wpływało na wydajność symbiotyczną szczepu, zmniejszając adhezję bakterii do włóśników korzenia koniczyny i tworzenie się nici infekcyjnych. W konsekwencji brodawki powstawały ze znacznym opóźnieniem, ich liczba była mniejsza i były niezdolne do wiązania azotu. Mutanty wykazywały obniżoną zdolność ruchu i tworzenia biofilmu w porównaniu ze szczepem dzikim, co pośrednio potwierdza zmiany w organizacji błony zewnętrznej.

Stwierdzono, że białko RosR wpływa na poziom syntezy i stopień polimeryzacji EPS *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz na syntezę antygeny somatycznego. Zmiany te są istotne w adaptacji do środowiska i w tworzeniu efektywnego układu symbiotycznego z koniczyną.

P5. Marczak M., Matysiak P., Kutkowska J., Skorupska A. (2014) PssP2 is a polysaccharide co-polymerase involved in exopolysaccharide chain-length determination in *Rhizobium leguminosarum*. PLOS ONE 9(9): e109106. doi:10.1371/journal.pone.0109106

(IF₂₀₁₄ 3,234; MNiSW 40 pkt)

Geny związane z syntezą polisacharydów, homologi genów *pss*, zidentyfikowano w różnych regionach genomu *R. leguminosarum*. Jednym z nich jest region chromosomalny PssII kodujący białka homologiczne do białek związanych z biosyntezą i transportem polisacharydów zależnych od systemu Wzx/Wzy (flipaza/polimeraza). Zlokalizowany w tym regionie gen *pssP2*, koduje hipotetyczne białko (586 aminokwasy) podobne do kopolimeraz polisacharydu kodowanych w regionie PssI, które odpowiedzialne są za określanie długości łańcuchów w syntezie polisacharydów otoczkowych i O-antygeny (Marczak i wsp., 2017).

W celu zbadania roli białka PssP2 w produkcji EPS i LPS oraz fenotypu symbiotycznego skonstruowano mutantą *pssP2::pKP2* kodującego białko pozbawione 153 aminokwasów w C-końcowej domenie cytoplazmatycznej. Mutant produkował nieznacznie większe ilości EPS niż szczep dziki. Zaobserwowano zmiany w proporcji frakcji wysokocząsteczkowej (HMW) do niskocząsteczkowej (LMW) EPS mutantą w porównaniu do szczepu RtTA1. Proporcje HMW/LMW wynosiły 1:0,55 dla EPS szczepu dzikiego i 1,35:0,59 mutantą *pssP2::pKP2*. Ponadto frakcja HMW EPS syntetyzowanego przez mutantą miała wyższą masę cząsteczkową w porównaniu z analogiczną frakcją szczepu RtTA1. Brak pełnej długości białka PssP2 nie wpływał na zmiany jakościowe EPS. Składnikami cukrowymi EPS szczepu dzikiego, jak i mutantą były glukoza, kwasu glukuronowy i

galaktoza w stosunku molowym 5: 2: 1. Analiza elektroforetyczna nie wykazała zmian w profilu LPS mutantu pssP2 w porównaniu ze szczepem rodzicielskim, co wskazuje na to że białko PssP2 nie wpływa na syntezę polisacharydów antygeny O-swoistego LPS.

Zmiany w stopniu polimeryzacji EPS mutantu istotnie wpływały na tworzenie układu symbiotycznego z koniczyną. Mutant indukował mniej brodawek, ale były one bardziej efektywne, uzyskano większą masę zieloną roślin zakażonych tym szczepem niż w przypadku roślin zakażonych szczepem dzikim.

Uzyskane wyniki potwierdzają rolę białka PssP2 w polimeryzacji cząsteczek EPS i wskazują, że frakcja wysokocząsteczkowa EPS może korzystnie wpływać na symbiozę na etapie infekcji.

Od kilku lat zajmuję się również badaniami molekularnymi czynników wirulencji szczepów *Escherichia coli*, a szczególnie serotypem O157. Utworzyłam kolekcję szczepów *E. coli* wyizolowanych z wód powierzchniowych oraz od zwierząt z udokumentowanymi badaniami weterynaryjnymi, które zidentyfikowałam na podstawie sekwencji 16S rRNA i genu *rfbE* determinującego syntazę perozaminy. Zgłosiłam 11 rekordów sekwencji nukleotydowych w bazie GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI).

P.6 Kutkowska J.*, Michalska-Szymaszek M., Matuszewska R., Chmiel E., Urbanik-Sypniewska T. (2015) Antygeny powierzchniowe i czynniki wirulencji *Escherichia coli* O157. Postępy Mikrobiol., 1: 53-64

(IF 2015 0,236; MNiSW 15 pkt)

*autor korespondencyjny

W tym artykule przeglądowym opisano znaczenie, strukturę, regulację biosyntezy i znaczenie antygeny somatycznego *E. coli* O157 w patogenezie tych bakterii. Serotyp O157 należy do patotypu enterokrwotocznych *E. coli* (EHEC) i może wywoływać u ludzi biegunki krwotoczne (HC), hemolityczny zespół mocznicowy (HUS) i małopłytkową plamicę zakrzepową (TTP). Najczęstszą przyczyną infekcji *E. coli* O157 u ludzi jest spożycie niewłaściwie przetworzonych produktów spożywczych (mięso, nabiał).

W artykule tym analizowano dostępne informacje na temat występowania w środowisku i źródeł zakażenia oraz sposobów transmisji *E. coli* O157. Szczególną uwagę zwrócono na znaczenie wody jako źródła infekcji tymi bakteriami. Opisano mechanizm selekcji genów determinujących syntezę antygeny O157 i sprzężenia z występowaniem antygeny rzęskowego

H7 oraz czynnikami wirulencji takimi, jak: wytwarzanie toksyny Shiga (Stx), system sekrecji T3SS (type 3 secretion system) związany z kolonizacją nabłonka jelitowego z udziałem intyminy i enterohemolizyny.

B. Ocena *in vitro* aktywności biologicznej syntetycznych związków z grupy triazoli i oksymów

Prowadziłam badania z grupą kierowaną przez prof. B. Modzelewską z Zakładu Chemii Organicznej, Collegium Medicum, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika dotyczące właściwości antybakteryjnych oraz antygrzybowych pochodnych związków heterocyklicznych. Efektem tych prac jest osiem publikacji, w których jestem współautorem oraz 12 komunikatów prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych. Struktury sześciu związków zostały zdeponowane w Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC).

Badania dotyczące aktywności kompleksów jonów żelaza, miedzi i cynku z pochodnymi hydrazonów i amidrazonów wykonywałam we współpracy z dr L. Mazur z Zakładu Chemii Ogólnej i Koordynacyjnej UMCS. Część badań była wykonywana w ramach projektu „Właściwości strukturalne i elektronowe a aktywność biologiczna kompleksów Fe, Cu i Zn z pochodnymi hydrazonów i amidrazonów”; (N N204 546839, NCN, 2010-2013), finansowanego przez NCN.

Synteza nowych związków o działaniu antybakteryjnym i przeciwgrzybowym jest niezbędna ze względu na rosnący odsetek drobnoustrojów opornych na antybiotyki. W ostatnich latach zwrócono uwagę na amidrazony (hydrazony amidów kwasowych), które są wykorzystywane do syntezy pochodnych 1,2,4-triazolu. Przez modyfikacje układu pierścieniowego 1,2,4-triazolu można uzyskać nowe heterocykliczne pochodne o szerokim spektrum właściwości biologicznych m.in.: przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, antywirusowych, przeciwnowotworowych (Gupta i Jain 2015).

P7. Kutkowska J.*, Modzelewska-Banachiewicz B., Urbanik-Sypniewska T., Rzeski W., Ziółkowska G., Zwolska Z., Prus M. (2005) Antimicrobial activity of 3,4-disubstituted-1,2,4-triazole derivatives. *Acta Polon. Pharm. Drug Res.* 62: 303-306

* autor korespondencyjny

Oznaczono aktywność przeciwbakteryjną pochodnych 3,4-dwupodstawionych 1,2,4-triazolu. Badane związki hamowały wzrost *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, były również aktywne wobec promieniowców (*Nocardia* sp.), jak i szybkorosnących prątków z

rodzaju *Mycobacterium*. Pochodne te nie wykazywały działania grzybobójczego na dermatofity z rodzaju *Trichophyton*, *Microsporum* i drożdżaki z rodzaju *Candida* i *Malassezia*.

P8. Ziegler-Borowska M., Ucherek M., **Kutkowska J.**, Mazur L., Modzelewska-Banachiewicz B., Kędziera D., Kaczmarek-Kędziera A. (2010) Reaction of N3-phenylbenzamidrazone with cis-1,2-cyclohexanedicarboxylic anhydride. *Tetrahedron Lett* 51: 2951–2955

(IF₂₀₁₀ 2,618; MNiSW₂₀₁₀ 27 pkt)

P9. Modzelewska-Banachiewicz B., Ucherek M., Zimecki M., **Kutkowska J.**, Kamińska T., Morak-Młodawska B., Paprocka R., Szulc M., Lewandowski G., Marciniak J., Bobkiewicz-Kozłowska T. (2012) Reactions of N3-substituted amidrazones with cis-1,2-cyclohexanedicarboxylic anhydride and biological activities of the products. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 345, 486–494

(IF₂₀₁₂ 1,54; MNiSW₂₀₁₂ 20 pkt)

P10. Modzelewska-Banachiewicz B., Paprocka R., Mazur L., Sączewski J., **Kutkowska J.**, Stępień D., Cyrański M. (2012) Experimental and theoretical study on the reaction of N3-phenyl-(pyridin-2-yl)carbohydrazonamide with itaconic anhydride. *J. Mol Struct.*, 1022, 211–219

(IF₂₀₁₂ 1,404; MNiSW₂₀₁₂ 20 pkt)

W wyniku reakcji N3-podstawionych amidrazonów z bezwodnikami kwasów cis-1,2-cykloheksanodikarboksylowego i itakonowego otrzymano serię związków o potencjalnych właściwościach przeciwbakteryjnych. Przewidywana aktywność biologiczna związków była określana za pomocą programu Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). Uzyskane wyniki badań wykazały aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich, hamowały wzrost *Enterococcus faecalis*, *Sarcina lutea*, *Nocardia*, *Rhodococcus equi* i *Mycobacterium* sp. (**P8.**; **P9.**; **P10.**). Stwierdzono, że pochodne liniowe, w których obecne były podstawniki pirydylowy i fenylowy w pozycji 2- oraz związki triazolowe z podstawnikami pirydylowym i metylofenylowym w pozycji 4- wykazują najsilniejsze działanie antybakteryjne (**P8.**).

P11. Mazur L., Modzelewska-Banachiewicz B., Bursa R., Zimecki M., Wawrzyniak U., **Kutkowska J.**, Ziółkowska G. (2012) Synthesis, crystal structure and biological activities of

a novel amidrazone derivative and its copper(II) complex – a potential antitumor drug. J. Inorganic Biochem., 114:55-64

(IF₂₀₁₂ 3,197; MNiSW₂₀₁₂ 35 pkt)

Amidrazony i ich pochodne stanowią grupę ligandów, które w reakcji z metalami przejściowymi tworzą kompleksy, które wykazują wyższą biologiczną aktywność (Filipovic i wsp., 2009). Przeprowadzone badania aktywności antybakteryjnej liniowej pochodnej amidrazolu i jej kompleksu z jonami Cu (II) wykazały, że ligand hamował wzrost bakterii Gram-dodatnich w prawie dwukrotnie niższym stężeniu w porównaniu z pochodną niezawierającą jonu miedzi.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że tworzenie związków koordynacyjnych amidrazonów z jonami miedzi podwyższa ich aktywność antybakteryjną. Takie pochodne mogą być szczególnie pomocne w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie.

P12. Paprocka R., Modzelewska-Banachiewicz B., Kutkowska J., Pawłowski K., Piątkowska-Chmiel I., Jagiełło-Wójtowicz E. (2017) Antibacterial and central nervous system activity of (4,5-diary-4H-1,2,4-triazol-3-yl)methacrylic acid derivatives. Acta Polon. Pharm. Drug Res., 74: 289 – 292

(IF₂₀₁₆ 0,745; MNiSW 15 pkt)

Pochodne 1,2,4-triazolu zawierające resztę kwasu metakrylowego wykazywały umiarkowaną aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*, *S. lutea*, *E. faecalis*). Badane związki nie hamowały wzrostu bakterii Gram-ujemnych oraz nie wykazywały działania przeciwgrzybiczego ani przeciwprątkowego (**P12.**).

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że badane pochodne mają umiarkowane działanie przeciwbakteryjne hamujące wzrost bakterii Gram-dodatnich, w tym szybko rosnących prątków z rodzaju *Mycobacterium*. W porównaniu do bakterii Gram-dodatnich większość bakterii Gram-ujemnych wykazuje mniejszą wrażliwość na działanie związków z tej grupy.

P13. Kosmalski T., Kutkowska J., Gzella A., Nowakiewicz A. (2015) New heterocyclic oxime ethers of 1-(benzofuran-2-yl)ethan-1-one and their antimicrobial activity. Acta Polon. Pharm. Drug Res., 72: 289-295

(IF₂₀₁₅ 0,877; MNiSW 15 pkt)

P14. Kosmalski T., **Kutkowska J.**, Dwojak I., Studzińska R., Sikora A., Modzelewska-Banachiewicz B., Gzella A. (2017) Novel O-benzyl oxime ethers of 1-(thiophen-2-yl)ethan-1-one – synthesis, structure and antimicrobial activity. *Heterocycles* 94: 523 – 530

(IF_{2016/2017} 0,805; MNiSW 20 pkt)

Etery oksymów stanowią grupę związków wykazujących szeroką aktywność biologiczną (De Luca 2006). Oznaczono aktywności przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą uzyskanych pochodnych. Oksymy zawierające benzofuran wykazały stosunkowo słabą aktywność biologiczną; najbardziej aktywna była pochodna zawierająca grupę trifluorometylową (CF₃) w pozycji 4- pierścienia fenylowego, która wykazywała działanie bakteriostatyczne wobec *S. aureus*. Dla pozostałych badanych związków wartości MIC dla testowanych mikroorganizmów były dwukrotnie wyższe (**P13.**).

Stwierdzono, że większą aktywność wykazywały etery oksymu zawierające 2-acetylotiofen (C₆H₆OS). Pochodne tych eterów z podstawnikami w pozycji: 4-Br, 4-Br-2-F i 4-CF₃ wykazywały najsilniejsze działanie na *Candida albicans*, podobnie jak w przypadku benzylowych eterów oksymów. Obecność atomu bromu oraz dwu atomów chloru (4-Br i 2,4-diCl) zwiększała aktywność w przypadku *Escherichia coli* w porównaniu z stereoizomeru 2,6-diF (**P14.**).

Różnice w aktywności stereoizomerów triazoli i oksymów, które posiadają udokumentowaną aktywność wobec organizmów eukariotycznych wskazują na konieczność dalszych badań wyjaśniających ich mechanizm działania na komórki prokariotyczne.

Literatura

1. De Luca L. (2006) Naturally occurring and synthetic imidazoles: their chemistry and their biological activities *Curr Med Chem.* 13:1-2
2. Filipovic N., Borrmann H., Todorovic T., Borna M., Spasojevic V., Sladic D., Novakovic I., Andjelkovic K. (2009) Copper(II) complexes of N-heteroaromatic hydrazones: Synthesis, X-ray structure, magnetic behavior, and antibacterial activity *Inorganica Chim. Acta* 362:1996–2000
3. Gupta D., Jain D. K. (2015) Synthesis, antifungal and antibacterial activity of novel 1,2,4-triazole derivatives. *J Adv Pharm Technol Res* 6: 141–146
4. Król J., Wielbo J., Mazur A., Kopeńska J., Lotocka B., Golinowski W., Skorupska A. ((1998) Molecular characterization of *pssCDE* genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1: PssD mutant is affected in exopolysaccharide synthesis and endocytosis of bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact* 11: 1142–1148

5. Marczak M., Mazur A., Gruszecki W.I., Skorupska A. (2008) PssO, a unique extracellular protein important for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Biochimie*. 90:1781-90
6. Marczak M., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A. (2017) Synthesis of rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. *Genes (Basel)*. 8: 360
7. Mazur A., Król J.E., Marczak M., Skorupska A. (2003) Membrane topology of PssT, the transmembrane protein component of the type I exopolysaccharide transport system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1. *J. Bacteriol.*, 185, 2503–2511
8. Mazur A., Król J.E., Wielbo J., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska, A. (2002) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* PssP protein is required for exopolysaccharide biosynthesis and polymerization. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 388–397

W ostatnim czasie moje zainteresowania naukowe dotyczą również właściwości przeciwdrobnoustrojowych natywnych oraz immobilizowanych preparatów dehydrogenazy celobiozowej izolowanej z grzybów *Phlebia lindtnerii*, *Pycnoporus sanguineus*, *Cerrena unicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*. Obecnie jestem wykonawcą w projekcie „Ocena potencjału antyoksydacyjnego i przeciwdrobnoustrojowego grzybowej dehydrogenazy celobiozowej jako składnika opakowań aktywnych” (NCN 2015/17/D/NZ9/02066) we współpracy z Zakładem Biochemii UMCS w Lublinie. Wyniki dotychczasowych badań zostały zaprezentowane na międzynarodowej konferencji naukowej oraz przygotowywana jest publikacja.

Wspólnie z Zakładem Immunobiologii UMCS w Lublinie zajmuję się problemem dotyczącym aktywności biologicznych płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*. Wyniki zostały przedstawione na dwóch konferencjach naukowych oraz w postaci zgłoszenia patentowego „Wysokocząsteczkowa frakcja płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* do leczenia grzybic spowodowanych drożdżakiem *Candida albicans*”, zgłoszenie nr P.423697 (wniosek w trakcie rozpatrywania).

Dane bibliometryczne	IF¹	Punkty MNiSW²
Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe 4 publikacje	4,78	60
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia):		
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora 3 publikacje	4,922	50
B\ po uzyskaniu stopnia doktora 13 publikacji	23,033	289
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR:		
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora brak	-	-
B\ po uzyskaniu stopnia doktora 1 publikacja	-	-
Łączna liczba publikacji		
Razem 21	32,735	399
Liczba komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych		
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora 14		
B\ po uzyskaniu stopnia doktora 39		
Łączna liczba cytowań (wg. bazy Web of Science) 165		
Liczba cytowań (WoS) z wyłączeniem autocytowań 153		
Indeks Hirscha (h) (wg. bazy Web of Science) 8		
Liczba projektów badawczych 5		

¹ Wartość współczynnika wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania.

² Liczba punktów według polskiego systemu punktacji czasopism, zgodnie z rokiem opublikowania.

Plany na przyszłość

W najbliższym okresie chciałbym kontynuować prace dotyczące struktury i funkcji polisacharydów rizobiów i mesorizobiów. Ponadto zamierzam podjąć badania nad genami kodującymi czynniki wirulencji oraz oporności na antybiotyki szczepów *E. coli* izolowanych ze środowiska oraz od zwierząt we współpracy z pracownikami z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie i Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W tym celu planuję ponownie aplikować o finansowanie badań na dokończenie doświadczeń nad ekspresją antygeny O 157 *E. coli* w warunkach stresowych. Poprzednio złożony wniosek grantowy „Zmienność antygeny O157 *Escherichia coli* w środowisku wodnym”, (OPUS 12 nr rejestracyjny 2016/23/B/NZ6/02550) nie został pozytywnie rozpatrzony.

Jolanta Kucharska