

dr Magdalena Karaś

Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej

w Lublinie

***Zwiększanie efektywności zakażania gospodarza roślinnego przez
Mesorhizobium loti w endosymbiozie z Acanthamoeba sp.***

Załącznik 2

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

w języku polskim

Lublin 2019

dr Magdalena Karas

Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
magdalena.karas@poczta.umcs.lublin.pl
tel. (81)-537-50-58

1. IMIĘ I NAZWISKO

Magdalena Karas

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

1995 r - tytuł magistra biotechnologii uzyskany na podstawie pracy magisterskiej:
„Wpływ *Pseudomonas* na zakażanie koniczyny przez *Rhizobium leguminosarum*
bv. trifolii” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Mieczysławy Deryło (do 1994),
a następnie dr Teresy Urbanik–Sypniewskiej w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej,
Uniwersytetu Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie

2005 r - stopień doktora nauk biologicznych uzyskany na podstawie rozprawy:
„Oligoglukanowe składniki mureiny *Mesorhizobium loti* HAMB1 1148”, której
promotorem był prof. dr hab. Ryszard Russa, w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii,
Uniwersytetu Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Miejsce pracy: Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Biologii i Mikrobiologii,
Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie

kwiecień 2018 – obecnie	asystent w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii
październik 2005 – marzec 2018	adiunkt w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii
listopad 1996 – wrzesień 2005	asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (obecnie: Zakład Genetyki i Mikrobiologii)

4. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Wskazanie osiągnięcia naukowego 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. (Dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455))

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl pięciu artykułów opublikowanych w latach 2013 – 2019 pod wspólnym tytułem:

***Zwiększanie efektywności zakazania gospodarza roślinnego przez
Mesorhizobium loti w endosymbiozie z Acanthamoeba sp.***

- P1. Karaś Magdalena Anna***, Russa Ryszard. New long chain bases in lipophosphoglycan of *Acanthamoeba castellanii*. LIPIDS 2013; 48(6): 639-650. DOI: 10.1007/s11745-013-3794-2

IF₂₀₁₃ = 2,353, IF_{5-cio letni} = 2,592; 25 pkt. MNiSW

Mój udział procentowy szacuję na 85 %

- P2. Karaś Magdalena Anna***, Russa Ryszard. Ether-type moieties in the lipid part of glycoinositolphospholipids of *Acanthamoeba rhyodes*. LIPIDS 2014; 49(4): 369-383. DOI: 10.1007/s11745-014-3884-9

IF₂₀₁₅ = 1,854, IF_{5-cio letni} = 2,592; 25 pkt. MNiSW

Mój udział procentowy szacuję na 90 %

- P3. Karaś Magdalena Anna***, Turska-Szewczuk Anna, Trapska Dominika, Urbanik-Sypniewska Teresa. Growth and survival of *Mesorhizobium loti* inside *Acanthamoeba* enhanced its ability to develop more nodules on *Lotus corniculatus*. Microbial Ecology 2015; 70(2): 566-575. DOI: 10.1007/s00248-015-0587-6

IF₂₀₁₅ = 3,232, IF_{5-cio letni} = 3,662; 35 pkt. MNiSW

Mój udział procentowy szacuję na 70%

P4. Karaś Magdalena Anna*, Turska-Szewczuk Anna, Marczak Małgorzata, Jaszek Magdalena, Janczarek Monika, Dworaczek Katarzyna, Stefaniuk Dawid, Wydrych Jerzy. A mutation in the *Mesorhizobium loti oatB* gene alters the physicochemical properties of the bacterial cell wall and reduces survival inside *Acanthamoeba castellanii*. International Journal of Molecular Science 2018; 19(11): 3510. DOI:10.3390/ijms19113510

IF_{2017/18} = 3,687, IF_{5-cio letni} = 3,878; 30 pkt. MNiSW

Mój udział procentowy szacuję na 55 %

P5. Karaś Magdalena Anna*, Turska-Szewczuk Anna, Janczarek Monika, Szuster-Ciesielska Agnieszka. Glycoconjugates of Gram-negative bacteria and parasitic protozoa - are they similar in orchestrating the innate immune response? Innate Immunity 2019; 25(1): 73-96. DOI 10.1177/1753425918821168

IF_{2017/18} = 2,312, 5-cio letni IF₂₀₁₄ = 2,992, 30 pkt MNiSW₂₀₁₅

Mój udział procentowy szacuję na 75 %

*** - autor korespondujący**

Sumaryczny Impact Factor – (IF) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: 13,438

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW w roku opublikowania: 145

Wprowadzenie

Wolno żyjące ameby z rodzaju *Acanthamoeba* należą do fakultatywnie tlenowych kosmopolitycznych organizmów. Izolowano je z gleby, kurzu, powietrza, wody kranowej, wody morskiej, mineralnej wody butelkowanej, urządzeń klimatyzacyjnych, basenów kąpielowych i do hydroterapii, wani i jacuzzi, osadów ściekowych, przyrządów dentystycznych, szpitalnych urządzeń dializacyjnych, powierzchni soczewek kontaktowych oraz płynów do ich pielęgnacji a także, jako kontaminacje w hodowlach bakteryjnych, drożdżowych i liniach komórkowych. Izolaty pozyskiwano również z powierzchni tkanek roślinnych i zwierzęcych. Ponadto stwierdzono obecność ameb w wymazach z jamy nosowej i gardła u zdrowych ludzi.¹

W glebie wolno żyjące pełzaki stanowią około 60% spośród drapieżników żywiących się bakteriami/grzybami, a najliczniejsze należą do rodzaju *Acanthamoeba*. W naturalnych siedliskach, żerując głównie na bakteriach i grzybach, pełnią ważne funkcje ekologiczne. Z jednej strony wpływają na bioróżnorodność, funkcjonowanie drobnoustrojów, liczebność populacji oraz strukturę, z drugiej na wydajność dynamiki obiegu składników odżywczych. Wykazano, że *Acanthamoeba* jako element mikrobiomu ryzosfery *Arabidopsis thaliana* wspierały wzrost rizobakterii PGPR (ang. *plant growth promoting ryzobacteria*). Przykładem podobnego efektu jest zwiększenie dostępności azotu mineralnego w ryzosferze ryżu siewnego (*Oryza sativa* L.), co wpływa na wyższą akumulację tego pierwiastka w roślinie i lepszą strukturę korzeni. Dzięki *Acanthamoeba* azot był udostępniany grzybom mikoryzy arbuskularnej, co przyczyniało się do utrwalenia ich symbiozy z roślinami. Ponadto równoczesne podanie *Acanthamoeba* i biokontrolnego szczepu *Pseudomonas fluorescens* indukowało wyższą produkcję substancji pochodzenia bakteryjnego o potencjale biokontrolnym (antygrzybicznym).²⁻⁵ Przykłady te wskazują, że *Acanthamoeba castellanii* na drodze mechanizmów pośrednich, (i) jako „czynnik zwiększający przeżywalność” wprowadzonych drobnoustrojów, (ii) poprzez wywieranie presji selekcyjnej na społeczności mikroorganizmów lub (iii) mineralizację materii organicznej może promować wzrost roślin i być stosowana w zrównoważonym rolnictwie. Jednakże dalsze badania nakierowane na ustalenie wpływu protistów na dynamikę mikrobiomów, ich bezpośredniego wpływu na fizjologię roślin oraz na poszczególne gatunki ryzosfery i oddziaływania z nimi, mogą zoptymalizować sposoby ich wykorzystania, jako biostymulatorów. Pierwszy preparat łączący nawozy mineralne i pierwtotniaki (ProtoPlus®) został już wprowadzony na rynek a następny zawierający pełzaka jest w trakcie przygotowań.⁶

Komórki *Acanthamoeba* spp. mogą także wchodzić w oddziaływania bezpośrednie z bakteriami na drodze endosymbiozy, jako przejściowi gospodarze szczególnie dla fakultatywnych wewnątrzkomórkowych patogenów człowieka np. *Legionella pneumophila*, jak również przenosić obligatoryjne symbionty np. Alfaproteobakterie, Betaproteobakterie, chlamydie, *Bacteroides*.⁷ W wymazach śluzówki i płynie oskrzelowo-pęcherzykowym pacjentów z oddziałów intensywnej opieki medycznej oraz z zapaleniem płuc, przy zastosowaniu kultur wzbogaconych w *Acanthamoeba* spp., które wykorzystuje się do izolacji bakterii opornych na bakteriobójcze działanie pełzaka (ARB ang. *amoebae-resisting bacteria*) oraz bakterii zasocjowanych z pełzakami (AAM ang. *ameba-associated microorganisms*), zidentyfikowano bakterie ARB należące do rodziny *Rhizobiaceae* i *Bradyrhizobiaceae*, a

rodzaje *Mesorhizobium amorphae* (rodzina *Phyllobacteriaceae*) i *Bradyrhizobium spp.* zaliczono do AAM.^{8,9} Jednakże brak jest danych o podobnych oddziaływaniach między glebowymi symbiotycznymi szczepami i amebami. **Potwierdzenie takich interakcji mogłoby przyczynić się do rozwinięcia nowych strategii projektowania doglebowych preparatów stymulujących wzrost roślin.**

Wewnątrzkomórkowe bakterie, zarówno symbiotyczne, jak i patogenne wykształciły szereg mechanizmów, umożliwiających zasiedlenie, przeżycie lub namnażanie w komórkach eukariotycznego gospodarza. Wśród czynników infekcyjności bakterii Gram-ujemnych determinujących adaptację do tego środowiska jest lipopolisacharyd (LPS), który stanowi integralny i unikatowy składnik ich błony zewnętrznej. Częsteczka LPS zbudowana jest u większości bakterii z wysoce heterogennego O-antygeny, oligosacharydowego rdzenia i konserwatywnego hydrofobowego regionu lipidu A. Łańcuch O swoisty, złożony z powtarzających się podjednostek cukrowych, jako najbardziej eksponowana do środowiska część LPS pełni funkcję ochronną przed działaniem czynników stresogennych i wpływa na kilku poziomach interakcji z gospodarzem.¹⁰ **(Publikacja P5)** Jego właściwa struktura i/lub skład w pierwszych etapach oddziaływań między partnerami zapewnia internalizację, a na późniejszych ochronę przed fagocytozą przez wyspecjalizowane komórki odpornościowe, a także prymitywne ameby.¹¹⁻¹⁵

We wzajemnym rozpoznaniu partnerów biorą także udział struktury powierzchniowe eukariotycznego gospodarza. Należą do nich fosfolipidy, sfingolipidy czy białka błonowe, których funkcje w procesach internalizacji cząstek na drodze endocytozy, fagocytozy, czy pinocytozy są dobrze poznane.^{11,16,17} Na szczególną uwagę zasługują sfingolipidy, które dzięki zdolności do łączenia się ze sterolami tworzą odporne na działanie detergentów niejonowych platformy, zwane mikrodomenami błonowymi oraz tratwami lipidowymi (ang. *lipid rafts*). Wykazano, że z udziałem tych domen może dochodzić do internalizacji bakterii na drodze transportu pęcherzykowego (np. endocytozy).¹⁷

Komórki *Acanthamoeba spp.* o typowym dla eukariontów schemacie budowy, od środowiska zewnętrznego oddziela błona komórkowa, w której 33% stanowią białka, 25% fosfolipidy, 13% sterole i 29% lipofosfonoglikan (LPG). Lipofosfonoglikan, jest glikolipidem, równomiernie dystrybuowanym na powierzchni membrany i na zasadzie analogii do glikoinozytofosfosfingolipidów (GIPSL) innych pierwotniaków, zbudowanym z trzech regionów: hydrofobowego fitoceramidowego fosfoinozytolu (sfingolipidowego analogu fosfatydyloinozytolu) oraz polisacharydowego - złożonego z konserwatywnego rdzenia i

oligosacharydu. Na podstawie analizy składu chemicznego zdefiniowano około 80% komponentów LPG dla *A. castellanii*. Wśród zidentyfikowanych składników 26% stanowiły cukry obojętne (glukoza, mannoza, galaktoza, ksyloza w stosunkach molowych 5:4:1:1), 3,3% aminocukry (glukozamina, galaktosamina), 10% aminofosfoniany (kwas 2-aminoetylofosfonowy, 1-hydroksy-2-aminoetylofosfonowy, w stosunku molowym 1:1), 8% inozytol, 13% fitosfingizyny, 3,2% fosforany wrażliwe na kwaśną hydrolizę i 14% kwasy tłuszczowe (C₁₆ - C₃₀ normalne nasycone i nienasycone, 2-hydroksykwasy). LPG *A. castellanii* wykazuje pewną heterogenność, gdyż w profilu elektroforetycznym obserwuje się dwa prążki o różnej mobilności i odmiennym składzie cukrów. Forma LPG szybko migrująca w żelu zawiera glukozę, mannozę, ksylozę podczas gdy wolno migrująca glukozę, mannozę i galaktozę.¹⁸⁻²² Z doświadczeń w naszym laboratorium wynika, że intensywne delipidacja błon ameb prowadzi do otrzymania lipofosfoglikanu wzbogaconego w sterole. Może to wskazywać, że LPG stanowi element tratw lipidowych, do których asocjują białka z motywem glikofosfoinozytolowym (GPI) zaangażowane w rozpoznanie bakteryjnych ligandów i ich fagocytozę.²³ Jednakże analiza proteomiczna przeprowadzona dotychczas tylko dla jednego szczepu *A. polyphaga* nie potwierdziła obecności białek z kotwicą GPI. Przyczyną mogła być słaba rozpuszczalność frakcji białek błonowych w stosowanym buforze.²⁴ Na obecność takich białek w plazmalemmie pełzaka pośrednio może wskazywać wykrycie w ich genomie genów białka o prawdopodobnej funkcji transamidazy (ACA1_368940), odpowiedzialnego za potranslacyjną modyfikację białek i dołączanie do nich motywu GPI, genu (ACA1_360580) czynnika białkowego 3 zaangażowanego w przebudowę kotwic GPI zachodzącą w trakcie asocjacji białek z tratwami lipidowymi, genu (ACA1_379450) endo 1,3(4)-β-glukanazy z motywem GPI oraz innych genów dla białek z taką modyfikacją o nieznaną funkcję.

Wykazano, że 22 - 24% izolatów klinicznych jak i środowiskowych *Acanthamoeba* spp. zawiera wewnątrzkomórkowe endosymbionty.¹ Nie wiadomo, jednak co warunkuje tę wybiórczość w stosunku do bakterii. Dla blisko spokrewnionych szczepów ameb: patogennej *Entamoeba histolytica* i niepatogennej *E. dispar* wykazano, że cząsteczki podobne do lipofosfoglikanu miały odmienną budowę, która warunkowała ich zdolność do adhezji.²⁵ Z naszych niepublikowanych danych, otrzymanych w trakcie badań nad strukturą LPG *Acanthamoeba* spp. ze szczepów środowiskowych i patogennych izolatów od pacjentów z amebowym zapaleniem rogówki, wynikało że heterogenność tego polimeru jest znacznie większa niż w dotychczas opublikowanych pracach. Analiza elektroforetyczna niektórych

wirulentnych szczepów ujawniła trzy lub cztery prążki, a nie jak wcześniej wskazywano dwa w regionie typowym dla lipofosfonoglikanu. Polimorficzność form LPG prawdopodobnie ma związek z heterogennością w obrębie regionu cukrowego, ale może również być spowodowana różnicami struktury części lipidowej (ceramidowej *versus* eterowy lipid) (**Publikacje P1 i P2**). Wiadomo, że patogenne szczepy *Acanthamoeba* spp. wykazują wyższą ekspresję białka wiążącego mannozę (MBP ang. *mannose binding protein*), C lektyny zaangażowanej w pobieranie patogennych endosymbiontów oraz przyleganie do komórek ssaczego gospodarza.²⁶ Białko MBP rozpoznaje w LPS rdzeniową resztę cukru o konfiguracji mannozy, co wskazuje na oddziaływanie o niskiej swoistości. Z drugiej strony wiadomo, że pobieranie bakterii przez ameby zależne jest od ich serotypu. Dlatego jest prawdopodobne, że w ten proces zaangażowane są ko-receptory, związane z domenami opornymi na detergenty i rozpoznające wzorce molekularne w LPS. Dlatego badania **budowy lipofosfonoglikanu pozyskanego z różnych szczepów ameb mogą pomóc w wyjaśnieniu przebiegu endosymbiozy.**

Omówienie wyników badań i celu naukowego

*Celem prowadzonych badań była ocena potencjału *Acanthamoeba castellanii*, jako jednego ze składników glebowych preparatów mikrobiologicznych, w konsorcjach z rizobiami, stosowanymi w promowaniu wzrostu roślin bobowatych (*Fabaceae*). W ramach tego problemu określono właściwości fizyczne, chemiczne i strukturalne powierzchni bakterii *Mesorhizobium* istotne w oddziaływaniach z amebami. (**Publikacje P3 i P4**). Analizie poddano też składniki lipidowej części lipofosfonoglikanu pełzaka. (**Publikacja P1 i P2**)*

Preparaty mikrobiologiczne zawierające żywe kultury rizobiów wykazują niską skuteczność w doświadczeniach polowych, nie tylko z powodu małej konkurencyjności w stosunku do szczepów autochtonicznych, wrażliwości na liczne czynniki stresogenne, ale też z powodu szybkiego spadku ich miana w glebie na skutek żerowania drapieżców. Z drugiej strony pełzaki na drodze mechanizmów pośrednich mogą stymulować wzrost roślin. Mając na uwadze, doniesienia o możliwości przeciwstawienia się endocytolitycznej aktywności ameb przez niektóre szczepy rizobiów postanowiono sprawdzić możliwość łącznego zastosowania tych drobnoustrojów w konsorcyjnych preparatach glebowych. (**Publikacja P3**)

Ponieważ mezorizobia mają wiele cech antygenowych oraz te same szlaki syntezy fosfatydylocholiny co pałeczki *Legionella*,^{27,28} a także są mikrosymbiontem ważnych ekonomicznie roślin pastewnych np. *Lotus* spp., uprawianych głównie na paszę zieloną i susz, do badań nad możliwością stosowania w doglebowych preparatach mikrobiologicznych w połączeniu z pełzakiem wybrałam przedstawicieli rodzaju *Mesorhizobium*: *Mesorhizobium loti* NZP2213 i *M. huakuii* sbv. *loti* MAFF303099. Oba szczepy charakteryzuje podobny profil kwasów tłuszczowych (FA), obecność w lipidzie A kwasu 27-hydroksyoktakozanowego (27-OH-28:0) identyfikowanego w wielu wewnątrzkomórkowych patogenicznych bakteriach, w tym *Legionella*, odmienne systemy sekrecyjne (odpowiednio T4SS i T3SS, których geny indukowane są w obecności flawonoidów) i różna struktura antygeny O-swoistego.^{29,30} Ponadto nie syntetyzują kapsularnego polisacharydu, który pełni w komórkach bakteryjnych funkcje ochronne przed fagocytozą i działaniem antybakteryjnych polipeptydów (AMPs ang. *antimicrobial peptides*).

Poszukując szczepu o potencjalnym zastosowaniu jako składnika preparatu glebowego, stosowano testy asocjacji i inwazji *M. loti* z *A. castellanii* szczep Neff (*Ac*) i wykazano, że **szczep NZP2213 wykazywał wyższy stopień przylegania do *Ac* w porównaniu z MAFF303090 we wszystkich stosowanych systemach, a liczba żywych bakterii NZP2213 odzyskiwanych z *Ac* rosła wraz ze wzrostem czasu ko-inkubacji, podczas gdy ta liczba dla szczepu MAFF303099 spadała lub utrzymywała się na stałym niskim poziomie.** Spadek liczby żywych komórek *MAFF303099* wewnątrz *Ac* w trakcie krótkich (2 - 4 godziny) oddziaływań wskazywał, że są one wykorzystywane przez pełzaki jako źródło składników odżywczych na drodze cyklu endocytolitycznego, co dodatkowo potwierdzono w teście przeżywania wewnątrzkomórkowego w czasie ko-inkubacji wydłużonym do 24 godzin. Natomiast wynik tego testu dla *NZP2213* potwierdził, że ten szczep jest **zdolny do przeżywania w komórkach *Ac*.** (Publikacja 3)

Lipopolisacharyd, główny glikolipid ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, a w szczególności jego najbardziej zmienny region, antygen O-swoisty wydaje się odgrywać ważną rolę na co najmniej dwóch etapach infekcji: przylegania i kolonizacji oraz unikania i/lub pokonywania reakcji obronnych gospodarza. Wpływ składu chemicznego, jak i struktury antygenów somatycznych bakterii Gram-ujemnych na rozpoznanie oraz kinetykę pobierania bakterii przez *Acanthamoeba* spp. zostały również potwierdzone na modelu *E. coli*.^{11,31} W badanych przeze mnie układach: *NZP2213* – *Ac* oraz *MAFF303099* - *Ac*, O-antygeny

mezorizobiów miały odmienne składy cukrów^{29,30}, które jednak nie wpływały na pierwszy etap oddziaływań - internalizację bakterii do komórek pełzaka. **(Publikacja P3)**

Internalizowane przez komórki fagocytarne bakterie uruchamiają szereg reakcji obronnych gospodarza: fagocytozę, wybuch tlenowy czy aktywność indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS). W ochronie przed szkodliwym efektem ich działania bierze udział, głównie LPS typu gładkiego (S-LPS) o kompletnej strukturze, zawierający trzy regiony: lipid A, rdzeń i O-antygen, nadając wraz z innymi składnikami błony zewnętrznej ograniczoną przepuszczalność dla czynników stresogennych i antybakteryjnych. Z kolei LPS uwolniony z bakterii i wbudowany w błony symbiosomów czy parazytosmów blokuje ich fuzję z lizosomami, a tym samym zapobiega degradacji już internalizowanych bakterii w wyniku działania kwaśnych hydrolaz i AMPs obecnych w tych kompartmentach **(Publikacja P5)**. Istnieją doniesienia, że szczepy o szorstkim fenotypie, całkowicie pozbawione łańcucha O-swoistego, nie były w stanie przeżyć wewnątrz *Acanthamoeba* spp., co wskazuje, że region ten jest kluczowy w utrzymaniu trwałości zasiedlenia.^{11,31}

Aby sprawdzić znaczenie S-LPS i jego struktury na interakcje *NZP2213* – *Ac* wykorzystyłam mutanta transpozonowego *NZP2213.1* (kolekcja ZGiM UMCS) o fenotypie charakteryzującym się zmniejszoną o połowę w stosunku do form szorstkich zawartością form gładkich LPS, trzykrotnie niższą zawartością 6-deoksytalopiranozy (6-dTalp) i zmienioną zawartością grup O-acetylowych i O-metylowych podstawiających reszty 6-dTalp w porównaniu do szczepu dzikiego *NZP2213*.³² W oparciu o aktualnie dostępne dane w bazie BLAST, dokonano weryfikacji miejsca insercji wstawki zawierającej transpozon. Wykazano, że sekwencja przylegająca do insercji Tn5 w mutancie *NZP2213.1* wykazuje 93% podobieństwa z sekwencją genu A4R29_08460 w genomie *Mesorhizobium ciceri* bv. *biserrulae* WSM1284, kodującego hipotetyczną O-acetylotransferazę. Przeszukania programem BlastP ujawniły, że najbardziej podobne hipotetyczne białka z przewidywaną funkcją O-acetylotransferaz zostały znalezione w *Mesorhizobium loti* i *Mesorhizobium ciceri* (odpowiednio 99% / 100% i 93% / 96% identyczności / podobieństwa).

Na tej podstawie ustalono, że w mutancie *NZP2213.1* przerwana została ciągłość genu *oatB* (GeneBank No.MH626640) o prawdopodobnej funkcji O-acetylotransferazy zlokalizowanego w klastrze genów biosyntezy LPS. Skonstruowano mutanta komplementarnego *NZP2213.1* (pBGoatB) o fenotypie przywróconym do dzikiego, co potwierdzano badaniem składu chemicznego O-antygeny, z zastosowaniem metod

spektrometrii GC-MS i spektroskopii ^1H NMR, elektroforyzy oraz wynikiem testu wrażliwości na faga A1.

Stosując technikę ko-kultury, mikroskopii fluorescencyjnej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) ustalono, że mutant *oatB*, odmiennie niż szczep dziki (*NZP2213*) i otrzymany w wyniku komplementacji, po następującej szybko internalizacji przez pełzaka był skutecznie degradowany. Wyższa wrażliwość bakterii o fenotypie szorstkim, wewnątrz komórki gospodarza, wynika najczęściej z łatwiejszej penetracji peptydów kationowych i substancji hydrofobowych, o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Oceniając wrażliwość mutantu *oatB* na wybrane detergenty i czynniki zaburzające przepuszczalność błony stwierdzono, że był on w sposób statystycznie istotny bardziej podatny na działanie antybiotyku peptydowego, polimyksyny B niż szczep typu dzikiego *NZP2213*. Zaburzenie integralności błony mutantu *oatB* potwierdzono w teście wychwytu hydrofobowej sondy fluorescencyjnej 1-*N*-naftyloaminy (NPN) oraz analizując zmiany topografii i właściwości nanomechanicznych powierzchni przy zastosowaniu mikroskopii sił atomowych (AFM). Poziom względną fluorescencji emitowanej przez mutantu *oatB* był 17-krotnie wyższy niż zmierzony dla szczepu dzikiego *NZP2213*. Analiza topograficzna AFM ujawniła większe zróżnicowanie powierzchni mutantu *oatB*, obserwowane w postaci dużych, nieregularnego kształtu i luźno rozmieszczonych podjednostek stanowiących agregaty polimerów powierzchniowych. Podjednostki te rozdzielały głębokie i szerokie depresje, które mogły stanowić miejsca w strukturze powierzchniowej mutantu podatne na penetrację przez substancje hydrofobowe. Powierzchnia szczepu dzikiego odmiennie niż mutantu była pokryta małymi regularnymi podjednostkami, ściśle upakowanymi, wskazując na jednolite rozmieszczenie polimerów powierzchniowych (S-LPS) i potwierdzając ochronną funkcję prawidłowej ilości O-antygeny.

Podwyższona wrażliwość mutantu *oatB* na substancje hydrofobowe, które nie penetrują przez membranę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych o fenotypie gładkim; jego zmieniona morfologia po internalizacji przez *Ac* obserwowana na mikrofotografiach rejestrowanych techniką TEM; oraz podwyższona do poziomu szczepu dzikiego ilość żywych komórek mutantu *oatB* uwalnianych z *Ac*, po zablokowaniu fuzji lizosomów z fagosomem, wskazywała na udział amebowych enzymów litycznych lub AMPs w usuwaniu bakterii. Przypuszczenia te potwierdziła analiza elektronomikroskopowa (SEM), która ujawniła zmienioną morfologię mutantu *oatB*, po potraktowaniu lizatem amebowym w warunkach imitujących kwaśne pH fagolizosomów. Podobne zmiany w morfologii *oatB* obserwowano na

mikrofotografiach TEM przekrojów komórek *Ac* ze internalizowanym mutantem. Przepuszczalnie zmiany te powstały na skutek zahamowania podziałów komórek bakterii i jednoczesnej zmniejszonej tolerancji na działanie ciśnienia osmotycznego, pod wpływem amebowych czynników, gdyż podobne zmiany morfologii mutantu *oatB* uzyskano po potraktowaniu bakterii mitomycyną C cytostatycznym antybiotykiem hamującym podziały komórkowe i indukującym odpowiedź SOS.

Internalizacja całych komórek *oatB* mutantu przez pełzaka, w odróżnieniu od całych komórek szczepu dzikiego, indukowała także produkcję toksycznego dla bakterii tlenku azotu (NO) przez iNOS. Jednak ta różnica nie była spowodowana odmiennością struktur LPS typu gładkiego szczepów (*oatB* i dzikiego) dotyczącymi głównie stopnia podstawienia cukrów grupami *O*-acetylowymi, gdyż produkcja NO, po aktywacji *A. castellanii* taką samą ilością S-LPS z obu szczepów, była na tym samym poziomie. Wskazuje to, że za stymulację produkcji NO pod wpływem szczepu *oatB* odpowiedzialne były inne niż LPS ligandy, które w szczepie *NZP2213* są maskowane przez *O*-antygen.

Podsumowując, analiza otrzymanych wyników wskazała na **korelację między właściwą ilością gładkiej formy LPS, a zdolnością *M. loti* NZP2213 do przeciwdziałania reakcjom obronnym pierwotniaczego gospodarza. (Publikacja P4)**

Wewnątrzkomórkowe środowisko pełzaka może wpłynąć na zmianę ekspresji niektórych bakteryjnych genów, co przejawia się zmianą ich fizjologii.³³ Dlatego w dalszym etapie badań sprawdzano efekt wzrostu *NZP2213* wewnątrz komórek *A. castellanii* na potencjał symbiotyczny w stosunku do roślinnego gospodarza *Lotus corniculatus*. W testach roślinnych obserwowano większą liczbę brodawek na korzeniach roślin inokulowanych *NZP2213* uwolnionym z *Ac* (*NZP2213Ac*) w porównaniu do roślin inokulowanych bakteriami *NZP2213* z hodowli bulionowych, przy jednocześnie niższym stosunku mokrej masy pędów do mokrej masy korzeni. Na tej podstawie wnioskowano, że **cykl wewnątrz komórek pełzaka wpływał na podwyższenie potencjału infekcyjnego *NZP2213*, z jednoczesnym nieznacznym obniżeniem jego zdolności do asymilowania azotu**. Ponieważ ostateczny efekt stymulacji wzrostu *L. corniculatus* po zastosowaniu *NZP2213Ac*, jak i *NZP2213* był zbliżony w porównaniu do roślin kontrolnych nie inokulowanych bakteriami, tym samym **potwierdzono możliwość łącznego stosowania *A. castellanii* szczep Neff i *M. loti* NZP2213 w glebowych preparatach mikrobiologicznych. (Publikacja P4)**

Wiadomo, że gleba jest ekosystemem, w którym warunki ulegają szybkim zmianom. Ponieważ czynniki środowiskowe wpływają na interakcje między bakteriami a *Acanthamoeba*

spp., to wydajność asocjacji i internalizacji *NZP2213* do komórek pierwotniaczego gospodarza badano w środowisku ubogim i bogatym w składniki odżywcze (PBS *versus* PYG ang. *protease-yeast-glucose*) oraz różnych temperaturach (18°C i 28°C). Analiza danych wykazała, że krytyczne dla przebiegu oddziaływań *NZP2213* – *Ac* są temperatura 18°C i bogate podłoże.

Gleby, a w szczególności ryzosfera roślin bobowatych, zawierają wiele związków takich jak monosacharydy czy flawonoidy, które są potencjalnymi inhibitorami na różnych etapach fagocytozy, głównego mechanizmu pozyskiwania bakterii przez ameby. Monosacharydy poprzez blokowanie odpowiednich receptorów/lektyn pełzaka, a izoflawon genisteina hamując aktywność kinazy tyrozynowej, mogą blokować internalizację drobnoustrojów. Otrzymane wyniki wskazały, że glukoza, stanowiąca największą frakcję cukrową wśród związków niskocząsteczkowych w glebach,³⁴ nie wpływała na przebieg interakcji *Ac* – *NZP2213*. Z kolei mannoza prawie całkowicie hamowała pobieranie *NZP2213*, podobnie jak genisteina (strukturalnie i funkcjonalnie zbliżona do izoflawonoidów komonicy) w sposób zależny od stężenia. Ponieważ w warunkach środowiskowych stężenie mannozy i flawonoidów jest znacznie niższe,^{34,35} można przypuszczać, że efekt ich działania na interakcje *Ac* – *NZP2213* będzie niższy w warunkach polowych. **(Publikacje P3 i P4)**

Ponieważ pierwotniacze glikokolipidy mogą odgrywać istotną rolę w oddziaływaniach z bakteriami, jako element tratw lipidowych wzbogaconych w białka, w badaniach dotyczących analizy chemicznej lipofosfoligianu i wolnych glikoinozytolofosfolipidów (GPI) zajęto się tym regionem makrocząsteczki. W celu otrzymania LPG i GPI z błon *A. castellanii* opracowano nową metodę, w której wykorzystano stosowaną w oczyszczaniu LPS ekstrakcję 45% fenolem w temperaturze 65-68°C. Ponieważ LPG, podobnie jak ma to miejsce dla hydrofilnej frakcji LPS, dyfundował do frakcji wodnej to ten materiał poddano intensywnej delipidacji w celu usunięcia resztek fosfolipidów, solubilizacji 9% *n*-butanolem, a na koniec ekstrakcji w układzie *n*-butanol-woda. Analiza produktów (kwasów tłuszczowych, cukrów, zasad sfingoidowych) uwolnionych na drodze kwaśnej metanolizy z frakcji wodnej/butanolowej z zastosowaniem chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) w połączeniu z analizą elektroforetyczną wykazała, że frakcja wodna zawierała LPG natomiast butanolowa wolne GPI. **(Publikacje P1 i P2)**

Zasady sfingoidowe (LCB ang. *long chain bases*), obecne w LPG, identyfikowano w postaci N-acetylo trimetylosililowych pochodnych oraz otrzymanych z nich na drodze utleniania nadjodaniem aldehydów. Stereoizomerię (normalna, *izo*-, *anteizo*-) LCB ustalano

utleniając je nadjodaniem sodu do kwasów tłuszczowych, które po przeprowadzeniu do pochodnych dimetylooksazolinowych (DMOX) oraz pirolidków identyfikowano na podstawie charakterystycznych jonów na widmach masowych. Połączone wyniki analiz wskazały na niezwykle wzór fitosfingiozyn w LPG *A. castellanii*, wśród których dominowały zasady o rozgałęzionym łańcuchu: *anteizo-C₂₄*, *anteizo-C₂₅*, *anteizo-C₂₆*, *izo-C₂₆*, *anteizo-C₂₇* i *anteizo-C₂₈*, chociaż nierozgałęzione (*nC₂₄₋₂₇*) również były obecne. Dominującą frakcją stanowiła fitosfingiozyna *anteizo-C₂₅*, której ilość oszacowano na ponad 50% zawartości wszystkich LCB. Uzyskane wyniki o występowaniu fitosfingiozyn w LPG, których łańcuch węglowodorowy wynosi C₂₄ i C₂₅ były zgodne z danymi literaturowymi oraz poszerzyły bazę danych wprowadzając istotną wiedzę na temat ich konfiguracji. **Ponadto, LCB z łańcuchami o długości hekso-, hepta- i oktakozanowymi (C₂₆, C₂₇, C₂₈) nie były identyfikowane wcześniej w komórkach *Acanthamoeba*, natomiast *anteizo-C₂₇*- i *anteizo-C₂₈*-fitosfingiozyny nie zostały dotychczas zidentyfikowane w komórkach organizmów eukariotycznych. (Publikacja P1)**

Równolegle ustalono też konfigurację kwasów tłuszczowych uwolnionych z LCB, o znanych wcześniej typach i długościach łańcucha oraz ustalono, że dominowały kwasy o konfiguracji *anteizo*, a o łańcuchu prostym obecne były w znacznie mniejszych ilościach. **Wśród nich kwas *anteizo 2-hydrokso-heksakozanowy (a2-OH C₂₆)* występował w największej ilości.** Wskazuje to na unikalność struktury motywu lipidowego w LPG ameb związanych z: 2-OH FA rzadko występujących w komórkach eukariotycznych, jak i rzadko występującego u protistów rozgałęzienia typu *anteizo*, gdyż większość z nich ma rozgałęzienia typu *izo*. Ustalenie, że dominująca fitosfingiozyna *t25:0* może być acylowana głównie kwasem 2-OH C₂₆ wskazuje, że fitoceramidowe cząsteczki w LPG zawierają w regionie hydrofobowym ponad 50 atomów węgla. (Publikacja P1)

Wśród produktów uwolnionych na drodze metanolizy z LPG oraz wolnych GPI, otrzymanych z błon *Acanthamoeba rhyodes*, identyfikowano odpowiednio: cztery i siedem klas monoacylgliceroli (AKG ang. *alkylglycerols*). **AKG pochodzące z LPG podstawione były w pozycji *sn-1* henekozanem, dokozanem i trikozanem (C₂₁, 22, 23), z których dominujący był *anteizo 1-O-dokozylo-sn-glicerol (57,26%)* oraz *1-O-trikozylo-sn-glicerol (30,12%)*.** Z kolei w AKG uwolnionych z GPI występowały *sn-1* alkanany z łańcuchem prostym i rozgałęzionym C₂₀₋₂₄, wśród których największą frakcję stanowił alkan o łańcuchu prostym *nC₂₂* (47,56%). Ponieważ analiza GC-MS nie ujawniła AKG, w postaci izopropylidenowych jak i TMS pochodnych, wśród produktów defosforylacji sfingolipidów, a po ich kwaśnej hydrolizie poprzedzającej derywatyzację, wyciągnięto wniosek, że **eterowe**

lipidy w LPG i GPI *A. rhysodes* występują w postaci alkyl-acylgliceroli. Analiza GC-MS niepolarnych produktów deaminacji lipofosfonoglikanu (2,5-anhMan-PIno-lipid) po uprzednim ich przeprowadzeniu do formy rozpuszczalnej na drodze metanolizy potwierdziła, że **AKG (C₂₁₋₂₃) obok LCB (t25:0-27:0) są integralnymi składnikami LPG.** Ponieważ w profilu elektroforetycznym LPG z *A. rhysodes*, podobnie jak LPG z *A. castellanii* obserwowano dwa prążki, wyciągnięto wniosek, że różne lipidy podstawiają takie same oligosacharydy polarnego regionu cząsteczki. Podobne zjawisko obserwowano dla GIPL w formach epimastigota *Trypanosoma cruzi*, w których wykazano, że przyłączanie części lipidowej do tej samej struktury glikanu jest zależne od fazy rozwoju.³⁶ **(Publikacja P2)** Na podstawie powyższych wyników dla dwóch niepatogennych szczepów *Acanthamoeba* spp. nie można jeszcze wnioskować o roli lipofosfonoglikanu w oddziaływaniach z bakteriami. Jednakże doświadczenia dotyczące preparatyki amebowego glikokoniugatu zostały wykorzystane przy realizacji grantu NCN Miniatura 1, którego celem naukowym była identyfikacja i charakterystyka lipidów (fosfolipidów oraz glikoinozytolofosfolipidów) błon pęcherzyków wielolamelarnych MLB, tworzonych w amebach na drodze cyklu fagocytarnego w monoksenicznych hodowlach z *Klebsiella aerogenes*.

W pracy przeglądowej, będącej częścią zgłaszanego osiągnięcia, przedstawiono podobieństwa w transdukcji sygnałów i indukcji różnych komórkowych mechanizmów obronnych w komórkach żernych na skutek stymulacji PRR: pierwotniaczymi glikolipidami z modułem GPI oraz endotoksyną bakterii Gram-ujemnych. Wskazano też na zależność struktury obu typów antygenów na ich immunomodulującą aktywność oraz ochronną funkcję przed działaniem komórkowych reakcji obronnych gospodarza: fagocytozą, autofagią i stresem oksydacyjnym. Podobnie, jak w przypadku oddziaływań z *A. castellanii* **(Publikacja P4)** gładka forma LPS bakterii niezbędna jest do prawidłowego zasiedlenia i przeżycia wewnątrz wyspecjalizowanych fagocytów układu immunologicznego. Praca **(Publikacja P5)** częściowo finansowana była z grantu NCN Miniatura 1, którego byłam kierownikiem (2017/01/X/NZ1/01153).

Podsumowując wykazano, że pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* spp. mogą być stosowane (w badanym układzie), jako składnik konsorcyjnych preparatów doglebowych, gdyż nie wpływały na liczebność i aktywność symbiotycznych pałeczek *Mesorhizobium loti*. Możliwość ucieczki bakterii przed działaniem stresogennych czynników środowiska do komórek pełzaka pełniłaby funkcję protekcyjną. Ponieważ w glebie bakterie podlegają presji także ze strony bakteriofagów, co często prowadzi do zmiany fenotypu LPS bakterii w kierunku formy szorstkiej,³⁷ która w przypadku *M. loti* NZP2213 wiąże się z upośledzeniem

właściwości symbiotycznych w stosunku do roślinnego gospodarza komonicy zwyczajnej (*L. corniculatus*),³⁸ to presja selekcyjna ze strony pełzaka, który eliminuje komórki o fenotypie szorstkim, mogłaby utrzymywać homoestazę i zachować mezorizobia w postaci symbiotycznie aktywnej formy. Ponadto ameba na drodze mechanizmów pośrednich uwalniając substancje odżywcze z obumarłych bakterii w ryzosferze wzmacniałaby wzrost roślin.

Otrzymane wyniki analiz chemicznych dla lipofosfonoglikanu, na tym etapie nie dały odpowiedzi o jego roli w oddziaływaniach z *M. loti* NZP2213, ujawniły jednak unikatowość budowy lipidowego regionu, która **wskazuje że cząsteczki ceramidowe i eterowe spełniają warunki wzorców molekularnych charakterystycznych dla *Acanthamoeba* spp.**

Ponieważ niektóre szczepy *Acanthamoeba* spp. wykazują patogenność w stosunku do człowieka i ponieważ nieznaną jest ligand amebowy dla TLR2, pełniący istotną funkcję w systemowych infekcjach u osób z niedoborami odporności,³⁹ którego ponadto ekspresja wzrasta w niektórych komórkach zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*,⁴⁰⁻⁴² to identyfikacja takiej cząsteczki miałaby ogromne znaczenie w ustaleniu mechanizmów patogenezы, patofizjologii i immunobiologii zakażeń tym pełzakiem, co w przyszłości pozwoliłoby opracować środki terapeutyczne i metody profilaktyki. Ponieważ, glikokoniugaty zawierające motyw GPI ulegają silnej ekspresji w kilku pasożytniczych protistach i są wysoce immunogenne, indukując odpowiedź komórek zarówno linii mieloidalnej, jak i limfoidalnej z udziałem głównie TLR2 ale też TLR4 (**Publikacja P5**), to lipofosfonoglikan *Acanthamoeba* spp. jest dobrym kandydatem na taki ligand. Znajomość jego struktury pozwoli projektować i otrzymywać syntetyczne jego analogi, które z powodu braku domieszki innych ligandów ułatwią powyższe badania.

PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ:

- Ustalono, że symbiotyczna bakteria glebowa *Mesorhizobium loti* NZP2213 zdolna jest do przeżycia wewnątrz fagotroficznych komórek *Acanthamoeba* spp. i samodzielnego uwalniania się do otoczenia, a uwolnione z ameb bakterie wykazują większą infekcyjność w stosunku do roślinnego gospodarza - komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*)
- Ustalono, że prawdopodobną funkcją genu *oatB* *M. loti* NZP2213 jest aktywność *O*-acetylotransferazy

- Dowiedziono, że właściwa ilość gładkiej formy LPS w *M. loti* NZP2213 jest niezbędna do hamowania reakcji obronnych pierwotniaczego gospodarza
- Wykazano, że *Acanthamoeba* spełnia niezbędne warunki do jej wykorzystania, jako składnik konsorcyjnych preparatów doglebowych
- Dokonano identyfikacji nowych fitosfingiozyn w liposofonoglikanie (LPG) *Acanthamoeba* sp. o łańcuchach hekso-, hepta- i oktakozanowym oraz *anteizo*-C₂₇- i *anteizo*-C₂₈-fitosfingiozyny dotychczas nie znalezionych w komórkach organizmów eukariotycznych
- Wykazano, że niektóre cząsteczki LPG posiadają region lipidowy w postaci motywów alkilacylglicerolowych (AAG), w których łańcuchy alkilowe o długości C₂₁-C₂₃ są podstawione w pozycji *sn-1*
- Ustalono, że konfiguracja *anteizo* w obrębie hydrofobowych regionów fitosfingiozyn, kwasów tłuszczowych i alkanów AAG uwolnionych z lipofosfonoglikanu *Acanthamoeba* jest dominująca i unikalna wśród pierwotniaków, co wskazują, że region lipidowy LPG spełnia warunki wzorca molekularnego charakterystycznego dla *Acanthamoeba* spp.

BIBLIOGRAFIA

1. Marciano-Cabral F., Cabral G. (2013) *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:273 – 307
2. Rosenberg K., Bertaux J., Krome K., Hartmann A., Scheu S., Bonkowski M. (2009) Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *ISME J.* 6:675-684
3. Kreuzer K., Adamczyk J., Iijima M., Wagner M., Scheu S., Bonkowski M. (2006) Grazing of a common species of soil protozoa (*Acanthamoeba castellanii*) affects rhizosphere bacterial community composition and root architecture of rice (*Oryza sativa* L.). *Soil Biol. Biochem.* 38:1665-1672
4. Jousset A., Bonkowski M. (2010) The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Soil Biol. Biochem.* 42:1647 -1649
5. Koller R, Rodriguez A, Robin C, Scheu S, Bonkowski M (2013) Protozoa enhance foraging efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi for mineral nitrogen from organic matter in soil to the benefit of host plants. *New Phytol* 199(1):203 – 211
6. Gao Z., Karlsson I., Geisen S., Kowalchuk G., Jousset A. (2018) Protists: Puppet Masters of the Rhizosphere Microbiome. *Trends Plant Sci.* 1748:1-12
7. Horn M. (2002) Obligate bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the beta-Proteobacteria: proposal of '*Candidatus Procabacter acanthamoebae*' gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:599 – 605
8. Greub G., La Scola B., Raoult D. (2004) Amoebae-resisting bacteria isolated from human nasal swabs by amoebal coculture. *Emerg. Infect. Dis.* 10:470 – 477

9. Berger P, Papazian L., Drancourt M., La Scola B., Auffray J.P., Raoult D. (2006) . Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* 12:248 - 255
10. Lerouge I., Vanderleyden J. (2002) O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 17-47
11. Arnold J.W., Spacht D., Koudelka G.B. (2016) Determinants that govern the recognition and uptake of *Escherichia coli* O157:H7 by *Acanthamoeba castellanii*. *Cell Microbiol.* 18:1459 - 1470
12. Riquelme S., Varas M., Valenzuela C., Velozo P., Chahin N., Aguilera P., Santiviago C.A. (2016). Relevant genes linked to virulence are required for *Salmonella typhimurium* to survive intracellularly in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1305
13. Simkovsky R., Daniels E.F., Tang K., Huynh S.C., Golden S.S., Brahamsha B. (2012) Impairment of O-antigen production confers resistance to grazing in a model amoeba–cyanobacterium predator–prey system. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 109:16678-16683
14. March C., Cano V., Moranta D., Llobet E., Pérez-Gutiérrez C., Tomás J. M., Bengoechea J. A. (2013). Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. *PLoS ONE*, 8(2), e56847
15. Maldonado R.F., Sá-Correia, I., Valvano M.A. (2016). Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 40(4), 480–493.
16. Bohdanowicz M., Grinstein S. (2013) Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol Rev.* 93:69-106.
17. Lafont F., Abrami L., van der Goot F.G. (2004) Bacterial subversion of lipid rafts. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:4-10.
18. Korn E.D., Wright P.L. (1973) Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 248: 439 – 447
19. Bowers B., Korn E.D. (1974) Localization of lipophosphoglycan on both sides of *Acanthamoeba* plasma membrane. *J. Cell Biol.* 62: 533 – 540
20. Deaborn D.G., Korn E.D. (1974) Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Fatty acids composition. *J. Biol. Chem.* 249: 3342 – 3344
21. Korn E.D., Dearborn D.G., Wright P.L. (1974) Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Isolation from whole amoebae and identification of the water-soluble products of acid hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 249: 3335 – 3341
22. Deaborn D.G., Smith S., Korn E.D. (1976) Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Inositol and phytosphingosine content and general structural features. *J. Biol. Chem.* 251: 2976 - 2982
23. Peyron P., Bordier C., N'Diaye E.N., Maridonneau-Parini I. (2000) Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Immunol.* 165:5186-91.
24. Caumo K.S., Monteiro K.M., Ott T.R., Maschio V.J., Wagner G., Ferreira H.B., Rott M.B. (2014) Proteomic profiling of the infective trophozoite stage of *Acanthamoeba polyphaga*. *Acta Trop.* 140:166-172
25. Moody S., Becker S., Nuchamowitz Y., Mirelman D. (1997) Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. *Parasitology.* 114:95-104.
26. Garate M., Cubillos I., Marchant J., Panjwani, N. (2005). Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. *Infect. Immun.* 73:5775-81.
27. Choma A., Komaniecka I. (2003) The polar lipid composition of *Mesorhizobium ciceri*. *Biochim. Biophys. Acta* 1631:188-196.
28. Palusińska-Szys M., Janczarek M., Kalityński R., Dawidowicz A.L., Russa R. (2011) *Legionella bozemanii* synthesizes phosphatidylcholine from exogenous choline. *Microbiol. Res.* 166:87-98.
29. Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Lindström K., Mayer H. (1995) Chemical characterization of two lipopolysaccharide species isolated from *Rhizobium loti* NZP2213. *Arch Microbiol.* 163:345–351
30. Hashimoto M., Mizukami M., Osuki K.I., Fujiwara N., Suda Y., Uchiumi T. (2017) Characterization of O-antigen polysaccharide backbone derived from nitric oxide-inducing *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 lipopolysaccharide. *Carbohydr Res.* 445:44-50
31. Alsam S., Jeong S.R., Sissons J., Dudley R., Kim K.S., Khan N.A. (2006) *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implications. *J. Med. Microbiol.* 55:689 – 694

32. Turska-Szewczuk A., Pietras H., Borucki W., Russa R. (2008) Alteration of O-specific polysaccharide structure of symbiotically defective *Mesorhizobium loti* mutant 2213.1 derived from strain NZP2213. *Acta Bioch. Polon.* 55:191-199
33. Carruthers M.D., Bellaire B.H., Minion F.Ch. (2010) Exploring the response of *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 within *Acanthamoeba castellanii* by genome-wide transcriptional profiling. *FEMS Microbiol. Lett.* 312:15 - 23
34. Gunina A, Kuzyakov Y. (2015) Sugars in soil and sweets for microorganisms: Review of origin, content, composition and fate *Soil Biol. Biochem.* 90:87-100
35. Carlsen S.C.K, Pedersen H.A., Spliid N.H, Fomsgaard I.S. (2012) Fate in soil of flavonoids released from white clover (*Trifolium repens* L.) *App. Environ. Soil Sci.* 2012:Article ID 743413
36. Lederkremer R.M., Lima C.E., Ramirez M.I., Goncalvez M.F., Colli W. (1993) Hexadecylpalmitoylglycerol or ceramide is linked to similar glycoposphoinositol anchor-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* 218:929–936
37. Knirel Y.A.; Prokhorov N.S.; Shashkov A.S.; Ovchinnikova O.G.; Zdorovenko E.L.; Liu B.; Kostryukova E.S., Larin A.K.; Golomidova A.K.; Letarov A.V. (2015) Variations in O-Antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in *Escherichia coli* 4s. *J. Bacteriol.* 197:905–912
38. 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* 2213.1 and *Lotus corniculatus*. *Microbiol Res* 164:163-173
39. Łanocha-Arendarczyk N., Kolasa-Wołoskiuk A., Wojciechowska-Koszko I., Kot K., Roszkowska P., Krasnodębska-Szponder B., Paczkowska E., Machaliński B., Łuczowska K., Wiszniewska B., Kosik-Bogacka D. (2018) Changes in the immune system in experimental acanthamoebiasis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. *Parasit. Vectors* 11:517
40. Derda M., Wojtkowiak-Giera A., Kolasa-Wołoskiuk A., Kosik-Bogacka D., Hadaś E., Jagodziński P.P., Wandurska-Nowak E. (2016) *Acanthamoeba* infection in lungs of mice expressed by toll-like receptors (TLR2 and TLR4). *Exp. Parasitol.* 65:30-34
41. Wojtkowiak-Giera A., Derda M., Kolasa-Wołoskiuk A., Hadaś E., Kosik-Bogacka D., Solarczyk P., Jagodziński P.P., Wandurska-Nowak E. (2016). Toll-like receptors in the brain of mice following infection with *Acanthamoeba* spp. *Parasit. Res.* 115: 4335-4344
42. Ren M.Y., Wu X.Y. (2011) Toll-like receptor 4 signalling pathway activation in a rat model of *Acanthamoeba* Keratitis. *Parasite Immunol.* 33:25-33
43. Ren M.Y., Gao L., Wu X.Y. (2010) TLR4: the receptor bridging *Acanthamoeba* challenge and intracellular inflammatory responses in human corneal cell lines. *Immunol Cell Biol.* 88:529–536

5. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO – BADAWCZE

1) Studia i praca magisterska

Studia biotechnologiczne na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi rozpoczęłam w roku 1989, a ukończyłam w 1995 z wynikiem bardzo dobrym, uzyskując tytuł magistra biotechnologii. Pracę magisterską zatytułowaną: „Wpływ *Pseudomonas* na zakażanie koniczyny przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*” wykonywałam w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (ZMO) pod kierunkiem prof. dr hab. Mieczysławy Deryło i opieką mgr Moniki Marek-Kozaczuk, a obroniłam pod kierunkiem dr Teresy Urbanik-Sypniewskiej. Praca miała na celu określenie wpływu ryzobakterii promujących wzrost roślin (PGPR), na wybranym szczepie *Pseudomonas fluorescens* 267, na układ symbiotyczny w warunkach gnotobiotycznych oraz wyjaśnienie niektórych mechanizmów zaangażowanych w ten proces. Ponieważ niedobór żelaza wpływa hamująco na ilość wiązanego azotu przez rośliny bobowate w obecności rizobiów, stosując Ps 267 zdolny do produkcji piowerdyny oraz jego

transpozonowe mutanty defektywne w syntezie sideroforów (267.4 i 267.5) lub wykazujące obniżoną ich produkcję (Tn5-B20), sprawdzano udział sideroforów na efektywność symbiozy w układzie: koniczyna z *R. leguminosarum* sbv. *trifolii* szczep 24 (Sid⁻) oraz *R. leguminosarum* sbv. *trifolii* 288 (Sid⁺). Badano także wpływ na te procesy witamin z grupy B produkowanych przez *Pseudomonas* oraz zdolności do przeprowadzania w formy rozpuszczalne fosforanów.

W toku pracy potwierdzono korzystny wpływ sideroforów *Pseudomonas* sp. 267 na układ *Trifolium repens* - *R. leguminosarum* sbv. *trifolii*. Efekt ten w przypadku szczepu Rt 24 (Sid⁻) manifestował się przyrostem zielonej masy oraz podwyższoną aktywnością nitrogenazy. Z kolei ko-inokulacja Ps 267 i Rt 288 (Sid⁺) w układzie z koniczyną skutkowała zwiększeniem efektywności zakażenia i wcześniejszym pojawianiem się brodawek. Uzyskano identyczne wyniki współzakażenia przy zastosowaniu jednego z defektywnych mutantów Ps 267.5 (Sid⁻), który jednocześnie wykazywał słabą aktywność upłynniania soli fosforanowych, stwierdzono, że efekt stymulujący spowodowany był wytwarzaniem witamin z grupy B przez *Pseudomonas*. Postawioną hipotezę potwierdzano stosując test krzyżowego żywienia z kontrolnym auksotroficznym szczepem *Escherichia coli* SK 1590. Ponieważ Ps 267 wykazywał neutralny efekt w stosunku do *Trifolium repens* wydaje się, że jego korzystny wpływ na układ symbiotyczny miał miejsce poprzez stymulację szczepów rizobiowych.

Wpływ upłynniania soli fosforanowych na przebieg symbiozy badano stosując mutanty Tn5-B20, które charakteryzowały się podwyższoną aktywnością upłynniania DCP i TCP. Wpływ stymulacji przejawiał się najwyraźniej w przyroście zielonej masy. Zatem stwierdzono, że dodatkowym efektem oddziaływania na rośliny koinokulantów jest podwyższenie w glebie poziomu rozpuszczalnych soli fosforanowych w postaci przyswajalnej dla roślin.

2) Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę naukową rozpoczęłam w 1996 roku w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii) pod kierunkiem prof. dr hab. Wincentego Drożańskiego. Zespół Pana profesora prowadził wielokierunkowe badania. Jeden z nurtów dotyczył Gram-ujemnych pałeczek z rodzaju *Legionella* oraz ich naturalnego gospodarza wolno żyjących ameb *Acanthamoeba* spp. W tej tematyce prof. Drożański był pionierem: już w 1954 roku opublikował pracę, w której jako pierwszy prezentował nowy gatunek bakterii *Sarcobium lyticum* (obecnie *Legionella lytica*) zdolny nie tylko do przeciwstawienia się endocytolitycznej aktywności pełzaka, ale też do proliferacji wewnątrz jego komórek. W

ramach prowadzonych badań starano się ustalić jakie czynniki obu partnerów determinują taki rodzaj interakcji między komórkami *Legionella* i amebami. Ponieważ lipopolisacharyd, a szczególnie jego łańcuch O swoisty pełni funkcję ochronną oraz immunomodulującą (**Publikacja P5**), ta część LPS była przedmiotem analizy chemicznej oraz aktywności biologicznej pałeczek *Legionella*. (komunikaty zjazdowe, Załącznik 3)

Drugi nurt badań prowadzonych w zespole związany był z ogólną problematyką badawczą Zakładu Genetyki i Mikrobiologii i dotyczył symbiotycznych bakterii glebowych. Moje badania koncentrowały się na polimerach kowalencyjnie związanych z peptydoglikanem bakterii z rodzaju *Mesorhizobium*. Tej części zagadnień poświęcona był moja praca doktorska zatytułowana „*Oligoglukanowe składniki mureiny Mesorhizobium loti HAMBI 1148*”, której promotorem, po odejściu na emeryturę prof. W. Drożańskiego, był prof. Ryszard Russa.

Do głównych osiągnięć mojej pracy doktorskiej zaliczyć można:

1/ potwierdzenie przyłączenia do mureiny oligosacharydowych podstawników dzięki otrzymaniu muopeptydów z dołączonymi resztami glukozy na drodze depolimeryzacji chemicznej i enzymatycznej woreczków mureinowych oraz analizie techniką spektrometrii MALDI-TOF,

2/ ustalenie w wyniku analizy MALDI-TOF, że podstawniki oligoglukanowe uwolnione działaniem lizozymu z mureiny zawierały od dwóch do siedmiu reszt glukozy, a najliczniejszą frakcję (42,99%) stanowiły cząsteczki dwucukrowe o charakterze neotrehalozy (α -Glc-(1 \leftrightarrow 1)- β -Glc), co potwierdziła analiza widm nuklearnego rezonansu jądrowego 2D NMR (HMQC)

3/ wykazanie, że część reszt „redukujących” kwasu muraminowego stanowi miejsce podstawienia oligoglukanem w mureinie *Mesorhizobium*; \rightarrow 4)-MurNA-(1 \rightarrow 4)- α -Glc-(1 \leftrightarrow

4/ ustalenie w wyniku analizy metylacyjnej oligoglukanów, że tylko dwie reszty glukozy, proksymalnie położone względem MurNAc połączone są wiązaniem (1 \leftrightarrow 1), natomiast kolejne wiązaniem (1 \rightarrow 4) glikozydowym,

Tematem moich zainteresowań były też enzymy bakteriolityczne pełzaka, a w szczególności amidaza odłączająca od reszt glukozaminy w LPS amidowo związane kwasy tłuszczowe, nad której oczyszczaniem i charakterystyką pracowałam.

3) Praca naukowo – badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

1) Mureina – budowa i metody uwalniania polimerów kowalencyjnie z nią związanych

Peptydoglikan (PG) bakterii (*syn.* mureina) jest dobrze poznanym heteropolimerem, do którego mogą być kowalencyjnie przyłączone inne molekuly, jak kwasy tejchojowe czy arabinogalaktan u bakterii Gram-dodatnich. U bakterii Gram-ujemnych podstawnikami w mureinie są głównie lipoproteiny i poliaminy. W dwóch szczepach *Mesorhizobium* wykazano obecność oligosacharydów kowalencyjnie związanych z PG. Miejscem zakotwiczenia podstawników może być zarówno część glikanowa (najczęściej reszta kwasu muraminowego), jak i peptydowa. Nieocenionym narzędziem badawczym w poznaniu struktury PG oraz polimerów z nią związanych okazały się do tej pory hydrolazy bakteryjne uczestniczące w metabolizmie woreczka mureinowego na różnych jego etapach. Wiele z nich należy do autolitycznych systemów bakteryjnych (np. β -N-acetyloglukozaminidazy, amidazy N-acetylo-L-alaninowe, endopeptydazy). Jednakże brak jest szerokiej gamy komercyjnie dostępnych preparatów enzymatycznych, dodatkowo o wysokim stopniu czystości, aby w szybki i skuteczny sposób degradować woreczki mureinowe (sakulus), bez usuwania z nich zakotwiczonych molekuł. W tym celu **opracowano oryginalną metodę chemiczną do otrzymywania pochodnych kwasu muraminowego z zachowanym aglikonem uwolnionych od podstawnika glukozaminowego na drodze deaminacji**. Procedura powstała na potrzeby pracy doktorskiej, której obiektem badań był szczep *Mesorhizobium loti* HAMBI 1148, zawierający oligoglukany na końcu redukującym łańcuchów glikanowych mureiny.

Degradację woreczków mureinowych do oczekiwanych produktów przeprowadzano w kilku etapach, z których pierwszy polegał na usuwaniu sieciowania tworzonego przez wiązania peptydowe na skutek traktowania silnymi zasadami (30% KOH). W tak otrzymanych dea(amino)acylowanych łańcuchach glikanowych wciąż zawierających oligocukry, obie reszty cukrowe miały wolne grupy aminowe, które w tej postaci są wrażliwe na deaminację. Dlatego, w celu zabezpieczenia grup aminowych podstawiających reszty kwasu muraminowego przekształcano je do pierścieni laktamowych w środowisku octanu hydrazyny. W efekcie deaminacji (NaNO_2) tak przygotowanych łańcuchów glikanowych, GlcN podlegała przekształceniu do 2,5-anhydromannozy z jednoczesnym rozerwaniem jej wiązania β -(1,4) glikozydowego, co skutkowało uwalnianiem dwucukrowych połączeń

lakMurN-(1 → 4)-2,5-anhydromannozy oraz fragmentów zawierających laktam podstawiony oligoglukanami. W celu weryfikacji skuteczności tej metody i wyeliminowania wątpliwości, że oligoglukany przyłączone do mureiny stanowiły artefakt powstały w trakcie przeprowadzonych procedur chemicznych zastosowano częściowe trawienie woreczków mureinowych lizozymem, a następnie kontrolowaną β -eliminację, która degradowuje tylko redukujące reszty MurNAc. Analiza spektrometryczna MALDI-TOF, produktów tak przeprowadzonej degradacji potwierdziła obecność fragmentów muropeptydowych terminalnie podstawionych oligoglukanami, „zabezpieczającymi” końce redukujące i dlatego niewrażliwych na β -eliminację. **Podsumowując, wykazano, że nowo opracowana metoda degradacji peptydoglikanu z wykorzystaniem reakcji deaminacji jest skuteczna i pozwala na identyfikację oligomerów glukozy kowalencyjnie przyłączonych do MurNAc.** Ponadto otrzymane produkty są łatwiejsze do dalszej analizy z wykorzystaniem technik MALDI-TOF i GC-MS w porównaniu z powstałymi po degradacji enzymatycznej i β -eliminacji. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w dwu artykułach.

Pomimo, że budowa chemiczna PG jest dobrze poznana to sposób ułożenia łańcuchów cukrowych względem powierzchni komórki bakteryjnej oraz sposób wzrostu mureiny nie jest do końca poznany. W pracy przeglądowej zaprezentowano dwie obecnie istniejące hipotezy dotyczące modelu planarnego oraz modelu trójwymiarowej mureiny w postaci rusztowania (ang. *scaffold model*).

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF _a	MNiSW _b
1.	Karaś M, Russa R. Localization of the attachment site of oligoglucans to <i>Mesorhizobium loti</i> HAMBI 1148 murein. <i>Acta Biochimica Polonica</i> 56 (2009): 155-160	1,262	15
2.	Karaś M, Russa R. Characterization of oligoglucan – containing products derived from <i>Mesorhizobium loti</i> HAMBI 1148 murein after lysozyme digestion and β -elimination. <i>Acta Chromatographica</i> 22(2) (2010): 325-335	0,779	20
3.	Karaś M, Drożański W, Russa R*. Peptydoglikan Gram-ujemnych pałeczkowatych bakterii. <i>Postępy Mikrobiologii</i> 45 (2006): 27-38	0,19	15
a.	IF zgodnie z rokiem opublikowania; b. MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania		

2) Kwasy tłuszczowe z lipidów *Acanthamoeba castellanii* jako marker chemotaksonomiczny do zastosowania w badaniach taksonomicznych i epidemiologicznych

Badano skład kwasów tłuszczowych (FA) uwolnionych na drodze delipidacji metodą Bligha i Dyera z całych komórek pełzaka *A. castellanii* szczep ATCC 3034. Stosując analizę GC-MS ustalono skład FA w postaci estrów metyloowych we frakcji lipidów obojętnych i fosfolipidach, a pozycję wiązań podwójnych w kwasach nienasyconych wyznaczano na podstawie charakterystycznych jonów na widmach masowych pochodnych dimetylooksazolinowych (DMOX) oraz metyloeterowych (DMDS). Wśród nowo zidentyfikowanych kwasów były cztery długołańcuchowe nienasycone: **oktakozenowy (C28:1 Δ^{21})**, **oktakozydienowy (C28:2 $\Delta^{5,21}$)**, **triakontadienowy (30:2 $\Delta^{21,24}$)** i **triakontatrienowy (C30:3 $\Delta^{5,21,24}$)**. Podobne kwasy identyfikowano zarówno w niewirulentnych szczepach wzorcowych (*A. castellanii* Neff, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*), jak i środowiskowych *Acanthamoeba* spp., zakwalifikowanych na podstawie morfologii cyst do grupy II, do której należy większość patogennych szczepów. Obecności tych kwasów nie stwierdzano w lipidach innych wolno żyjących pełzaków: *Hartmannella vermiformis* czy *Didasculus thurtoni*, co wskazuje, że **mogą one stanowić marker chemotaksonomiczny**. Ponieważ do izolacji *Acanthamoeba* spp., zarówno z zeszkobin rogówki jak i ze środowiska, najczęściej stosuje się hodowle monokseniczne na agarze nieodżywczym (NNA) z dodatkiem *Klebsiella aerogenes* (dawniej *Enterobacter aerogenes*) analizie poddano także skład FA tych bakterii i nie stwierdzano obecności tego typu nienasyconych FA, co potwierdza ich przydatność w identyfikacji pełzaków bez konieczności oczyszczania z materiału bakteryjnego. Wskazuje to także, że obecność endosymbiontów w *Acanthamoeba* spp. nie powinna utrudniać identyfikacji pełzaków. Wyniki powyższych analiz opublikowano w formie jednego artykułu i komunikatu zjazdowego.

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF ₂₀₀₉	MNiSW ₂₀₀₉
1.	Palusińska-Szys M, Turska-Szewczuk A, Karaś M, Russa R, Drożański WJ. Occurrence of new polyenoic very long chain acyl residues in lipids from <i>Acanthamoeba castellanii</i> . <i>Acta Protozoologica</i> 48 (2009): 63-72	0,775	15
2.	Komunikat zjazdowy; Załącznik 3 (III.B.a.12)		

3) Pałeczki z rodzaju *Legionella* spp. – diagnostyka i czynniki ryzyka zakażeń

Pałeczki z rodzaju *Legionella* spp. to Gram-ujemne bakterie, które występują naturalnie w ekosystemach wodnych i glebowych, jednakże ze względu na wymagania

pokarmowe do proliferacji wymagają środowiska pierwotniaczego gospodarza (*Acanthamoeba*, *Hartmanella*, *Dictyostelium*, *Tetrahymena*). W organizmie człowieka głównym czynnikiem etiologicznym grypopodobnej infekcji (gorączka Pontiac), nietypowego zapalenia płuc zwanego chorobą legionistów oraz rzadziej pozapłucnej bakteriemii są szczepy *Legionella pneumophila* serotyp 1. Na rozwinięcie pozapłucnej infekcji szczególnie narażeni są pacjenci po zabiegach chirurgicznych lub z supresją immunologiczną. Jednym z miejsc pozapłucnej lokalizacji są nerki. W celu sprawdzenia czy pacjenci dializowani i po transplantacji nerki są w grupie ryzyka rozwinięcia objawowej legionellozy i ewentualnie z jaką częstością, przebadano ich surowice na obecność przeciwciał w klasie immunoglobulin IgG (SG₁₋₇, SG₁) i IgM (SG₁₋₇), identyfikujących *L. pneumophila* serotypy 1-7. Materiał od około 300 pacjentów z niedoborami odporności oraz od 100 zdrowych osób, stanowiących grupę kontrolną, badano przy zastosowaniu testu ELISA. Czynniki ryzyka podzielono na dwie grupy: (i) związane z osobą (płeć, choroby przewlekłe, nałogi, terapia immunosupresyjna) oraz (ii) środowiskiem życia. Otrzymane wyniki wskazały, że osoby zdrowe są odporne na tego patogena. Wśród osób dializowanych około 8% pacjentów wykazywała obecność IgG i/lub IgM przeciwko *L. pneumophila* SG 1-7, a u pacjentów po przeszczepach 4%, ale bez rozwinięcia objawów klinicznych. Jednakże tylko u jednego pacjenta dializowanego wykryto IgG anti-SG₁, z bardziej zjadliwej grupy niż SG 2-14. **Podsumowując potwierdzono, że pacjenci z obniżoną odpornością są bardziej narażeni na infekcje *Legionella pneumophila* niż populacja ogólna.** Nie potwierdzono jednak korelacji między seropozytywnością, a czynnikami ryzyka zarówno z grupy (i), jak i (ii). Wyniki powyższych analiz opublikowano w formie jednej pracy.

Ponieważ metody serologiczne identyfikacji *Legionella* ograniczają się tylko do ww. gatunku i serotypów SG 1-7, i dają liczne reakcje krzyżowe z bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* i *Haemophilus* ważne jest opracowanie innych kryteriów diagnostycznych dla tej grupy bakterii. Takim markerem chemotaksonomicznym mogą być kwasy tłuszczowe uwolnione z fosfolipidów. Wstępne badania dla *Legionella lytica* (dawniej *Sarcobium lyticum*) zostały przeprowadzone a wyniki zaprezentowane w formie komunikatu zjazdowego.

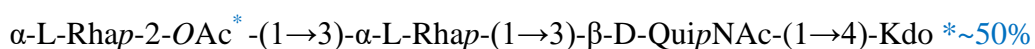
Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF ₂₀₁₃	MNiSW ₂₀₁₃
1.	Sikora A, Koziół-Montewka M, Książek A, Grzebalska A, Bednarek-Skublewska A, Steć A, Rudzki S, Furmaga J, Paluch-Oleś J, Magryś A, Karas M. Prevalence of <i>Legionella</i> antibodies in immunocompromised patients. <i>Central European Journal of Medicine</i> 8(2) (2013): 208-212.	0,209	15
2.	Komunikat zjazdowy; Załącznik 3 (III.B.a.9)		

4) Charakterystyka przystosowań strukturalnych i adaptacyjnych bakterii rizobialnych wpływających na efektywność symbiozy oraz stymulowanie wzrostu roślin

W warunkach niedoboru azotu w ryzosferze bakterie glebowe znane pod wspólną nazwą rizobia mogą wchodzić w mutualistyczne układy symbiotyczne z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*). Skoordynowana wymiana sygnałów molekularnych między rośliną a bakteriami prowadzi do różnicowania morfologicznego obu partnerów symbiozy. Na korzeniach roślinnego gospodarza (rzadziej łodygach lub liściach) dochodzi do utworzenia wyspecjalizowanych organów zwanych brodawkami, wewnątrz których rizobia różnicują się do postaci bakteroidów i redukują azot atmosferyczny. Wzrost nici infekcyjnej i rozwój prawidłowo funkcjonującej brodawki zależy także od struktur powierzchniowych mikrosymbionta jak: egzopolisacharyd (EPS), kapsularny polisacharyd (KPS), cykliczne β -glukany i lipopolisacharyd (LPS), zarówno w formie uwolnionej do środowiska, jak i związanej z komórką bakteryjną.

Kompletny S-LPS (S ang. *smooth*) stanowiący integralny składnik błony zewnętrznej rizobium jest niezbędny w przypadku mikrosymbiontów obecnych w brodawkach zdeterminowanych (soja, fasola) i ważny także w procesie infekcji gospodarzy wytwarzających brodawki niezdeterminowane (koniczyna, lucerna, groch). W procesie zakażenia gospodarza LPS pełni funkcję cząsteczki sygnałnej, bierze udział w lokalnej supresji reakcji obronnych rośliny, tworzeniu nici infekcyjnej i adaptacji bakteroidów do otaczającego mikrośrodowiska.

W badaniach struktury zewnętrznego rdzenia oligosacharydowego łączącego polisacharyd O-swoisty z rdzeniową częścią LPS wyizolowanego ze szczepu *Rhizobium leguminosarum* ssp. *trifolii* 24, mikrosymbionta *Trifolium repens* (koniczyna biała), wykorzystano metody analityczne, technikę spektrometrii mas z miękką jonizacją przez elektronorozpraszanie i fragmentacją wybranych jonów z zastosowaniem kolizyjnie indukowanej fragmentacji (CID) w układzie tandemowym (ESI-CID-MS²) oraz jedno- i dwuwymiarową spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H, ¹H DQF-COSY, TOCSY, ROESY i ¹H, ¹³C HSQC i HMBC NMR). W wyniku analiz ustalono, że zewnętrzny rdzeń tego szczepu ma następującą strukturę:



Połączone wyniki obecnych analiz i danych literaturowych wskazują, że zewnętrzny region rdzeniowy LPS szczepu *R. leguminosarum* sbv. *trifolii* 24 jest charakterystyczny dla tego szczepu i różni się od zewnętrznej części rdzeniowej LPS rizobiów należących do symbiowaru *viciae* tego samego gatunku (szczep *R. leguminosarum* sbv. *viciae* 3841) oraz od gatunku *R. etli*.

W procesie symbiozy obecność kwaśnego egzopolisacharydu jest niezbędna u rizobiów, które wchodzą w symbiotyczne interakcje z roślinami bobowatymi tworzącymi brodawki niezdeteminowane o stale funkcjonującym merystemie. Mutanty bakterii pozbawione EPS lub zawierające EPS o zmienionej strukturze indukują defektywne brodawki, w których bakterie nie są zdolne do wiązania azotu. Szlak biosyntezy EPS *R. leguminosarum* sbv. *trifolii* podlega złożonej regulacji z udziałem wielu białek regulatorowych oraz różnych sygnałów środowiskowych. Jednym z takich białek regulatorowych jest cytoplazmatyczne białko RosR, które należy do rodziny regulatorów transkrypcyjnych wpływających głównie na stopień syntezy i polimeryzacji EPS. Z wcześniejszych badań prowadzonych w ZGiM w zespole prof. Anny Skorupskiej z zastosowaniem mutantów w różnych sekwencjach *rosR* wynikało, że mutacja w obrębie tego genu przyczyniała się do: zmiany stopnia polimeryzacji łańcucha O swoistego LPS i profili białek błonowych oraz zewnątrzkomórkowych, co prowadziło do zwiększonej ich wrażliwości na niektóre antybiotyki, detergenty, wybrane związki osmotycznie czynne i stresogenne. Wykazano także zmiany w morfologii kolonii, tempie wzrostu, ruchliwości mutantów *rosR* w porównaniu do szczepu dzikiego oraz ich zdolności do tworzenia biofilmów i przyswajania różnych źródeł węgla i azotu. Efektem plejotropowym tej mutacji była również obniżona zdolność kolonizacji włóśników korzeniowych i zasiedlenia roślinnego gospodarza oraz wiązania azotu cząsteczkowego.

W ramach kontynuacji badań funkcji genu *rosR*, analizowano profil białek peryplazmatycznych i błony zewnętrznej (OM) oraz właściwości powierzchniowe bakterii stosując mutanta uzyskanego na drodze ukierunkowanej mutagenyzy z mutacją zlokalizowaną w regionie otwartej ramki odczytu genu *rosR* (Rt2472) w porównaniu do szczepu dzikiego oraz mutantów po komplementacji. Analiza proteomiczna wykazała, że mutacja w genie *rosR* wpływała na podwyższenie ekspresji białek OM: kadheryno-podobnego wiążącego Ca^{2+} , podobnego do zawierającego motyw RTX, RapA1 zaangażowanego w autoagregację oraz białek flagelliny FlaA i FlaB, natomiast ekspresja transporterów DppA, BraC, SfuA różnych klas ulegała obniżeniu. Z kolei analiza topografii i nanomechanicznych właściwości powierzchni komórkowej, przy zastosowaniu techniki mikroskopii AFM, potwierdziła niższą

zawartość EPS w mutancie, która skutkowałą zmianą hydrofobowości i w połączeniu z wcześniej ustalonymi zmianami w obrębie O-antygeny, zwiększoną przepuszczalnością błony dla substancji o charakterze hydrofobowym. Konsekwencje tych zmian miały pośredni wpływ na efektywność symbiozy, co wykazała analiza mikroskopowa brodawek indukowanych przez mutantą *rosR*. Na przekrojach brodawek obserwowano zaburzenia w budowie nici infekcyjnej, degenerację bakteroidów i obniżenie poziomu zasiedlenia.

Podsumowując, białko RosR *R. leguminosarum* bv. *trifolii* jest regulatorem ekspresji wielu genów: syntezy składników powierzchniowych w tym polisacharydów, związanych z ruchliwością oraz adaptacją bakterii do różnych warunków stresowych i wielu szlaków metabolicznych.

Stosowanie preparatów doglebowych zawierających wyselekcjonowane szczepy rizobiowe jest uznaną i stosowaną od wielu lat metodą zwiększania dostępności azotu dla roślin. Ponieważ bakterie muszą wykazywać zdolność adaptacji do zmieniających się warunków środowiska i konkutowania ze szczepami autochtonicznymi, najlepszymi kandydatami do użycia w postaci szczepionek są izolaty pozyskane z brodawek lub ryzosfery roślin bobowatych.

Z brodawek wilżyny bezbronnej (*Ononis arvensis*) wyizolowano 29 szczepów. Wielokierunkowa analiza numeryczna cech fenotypowych pozwoliła na zaklasyfikowanie tych szczepów do rodzajów *Rhizobium*, *Ensifer* i *Mesorhizobium*. Zastosowanie techniki rep-PCR (BOX) do badania genomowego odcisku palca, tzw. „fingerprinting” amplifikowanych powtarzalnych sekwencji DNA, wskazało na wysoki poziom różnorodności genomowej wśród badanych rizobiów. Jednocześnie analiza porównawcza sekwencji genu 16S rRNA i *nodC* pokazała, że izolaty należą do dwóch rodzajów *Rhizobium* i *Mesorhizobium*. Ponadto badając tolerancję szczepów na metale ciężkie (Cd, Pb, Zn) i barwniki, ich oporność na wybrane antybiotyki, zdolność do syntezy związków chelatujących żelazo sideroforów, fitohormonów i upłynniania soli fosforanowych, jak i przez potwierdzenie obecności genu *acdS* (kodującego deaminazę ACC - kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego) oraz testy roślinne wskazujące na wąski zakres gospodarza wykazano, że **izolaty z brodawek *Ononis arvensis* wykazują potencjał, jako szczepy PGPR promujące wzrost roślin.**

Wyniki przedstawionych powyżej badań zostały opublikowane w postaci trzech artykułów.

Identyfikacja na drodze analizy transkryptomicznej trzech ortologów domniemanych kinaz serynowo-treoninowych w szczepie *R. leguminosarum* sbv. *trifolii* 24.2 zainicjowała powstanie pracy przeglądowej na temat funkcji tych enzymów oraz fosfataz w transmisji

sygnałów komórkowych oraz adaptacji do środowiska dla bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF _a	MNiSW _a
1.	Turska-Szewczuk A, Russa R, Karas MA , Danikiewicz W, Spólnik G. Structural elucidation of the outer core tetrasaccharide isolated from the LPS of <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> strain 24. <i>Carbohydrate Research</i> 409 (2015): 1-8	1,817	25
2.	Rachwał K, Boguszewska A, Kopcińska J, Karas M , Tchórzewski M, Janczarek M. A regulatory protein encoded by <i>rosR</i> affects <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> protein profiles, cell surface properties and symbiosis with <i>Trifolium pretense</i> . <i>Frontiers in Microbiology</i> (2016) 7:1302	4,076	35
3.	Wdowiak-Wróbel S, Marek-Kozaczuk M, Kalita M, Karas M , Wójcik M, Małek W. Diversity and plant growth promoting properties of rhizobia isolated from root nodules of <i>Ononis arvensis</i> . <i>Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology</i> 110(8) (2017): 1087-1103	1,795	20
4.	Janczarek M, Vinardell J-M, Lipa P, Karas M . Hanks-type serine/threonine protein kinases and phosphatases in bacteria: roles in signaling and adaptation to various environments. <i>International Journal of Molecular Science</i> 2018;19(10). pii: E2872	3,687	30
a.	IF zgodnie z rokiem opublikowania; b. MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania		

5) Struktura łańcucha O swoistego LPS *Aeromonas hydrophila*

LPS jest ważnym czynnikiem wirulencji patogennych bakterii odpowiedzialnym za indukowanie prozapalnych mediatorów w organizmie wyższym. Pełni także funkcję ochronną dla bakterii przed działaniem dopełniacza, opsonizacją i fagocytozą (**Publikacja P5**). W przypadku mezofilnych pałeczek *Aeromonas*, powszechnie zasiedlających ekosystemy wodne, udział LPS w patogenności jest stosunkowo mało poznany. Badania immunohistochemiczne O-antygenów *Aeromonas*, najbardziej eksponowanej na powierzchni części LPS, mają na celu zbudowanie podstaw molekularnych dla klasyfikacji serologicznej i reaktywności krzyżowej szczepów *Aeromonas* i pokrewnych gatunków (komunikat zjazdowy).

O-specyficzny polisacharyd (OPS) wyizolowany z LPS szczepu *Aeromonas hydrophila* K691 badano metodami chemicznymi i spektroskopią ¹H i ¹³C NMR. Na podstawie sygnałów obserwowanych na dwuwymiarowych widmach homo- i heteronuklearnych (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC) stwierdzono, że łańcuch O swoisty zbudowany był z powtarzających się pentasacharydowych jednostek złożonych z β-GlcpNAc, 2-O-acetylowanych α-Rhap i reszt β-Quip4NAc. Ustalono następującą strukturę OPS:

→3)-α-L-Rha2OAc-(1→3)- β-D-GlcNAc(1→3)-α-L-Rha2OAc -(1→3)- β-D-GlcNAc(1→2)-β-D-
Qui4NAc-(1→

Badania LPS *Aeromonas* obejmowały także analizę rdzeniowego regionu oraz dystrybucji genów dla czynników wirulencji i profili endotoksyn w szczepach wyizolowanych z ryb i prezentowane były w postaci komunikatów zjazdowych. Ponadto badano zależność struktury endotoksyny pałeczek *Aeromonas* na zdolność do przeżywania w komórkach ameb. W powyższych badaniach uczestniczyłam, jako współwykonawca grantu NCN (2011/B/NZ1/1203; kierownik grantu: dr hab. A. Turska-Szewczuk).

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF ₂₀₁₇	MNiSW ₂₀₁₇
1.	Pakiet K, Turska-Szewczuk A, Karaś MA, Pękala A, Pietras H. Structure of the O-specific polysaccharide from lipopolysaccharide of <i>Aeromonas</i> strain K691 containing 4-acetamido-4,6-dideoxy-D-glucose. <i>Carbohydrate Research</i> 439 (2017): 23-29.	2,096	25
2.	Komunikaty zjazdowe; Załącznik 3 (III.B.a.1-3)		

6. PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

W najbliższym czasie chciałabym kontynuować badania, nad strukturą lipofosfonoglikanu *Acanthamoeba* spp., które obejmowałyby ustalenie profili fitoceramidów oraz charakterystykę regionu cukrowego w szczepach patogennych i niepatogennych. Uzyskane wyniki powinny pomóc w syntezie analogów strukturalnych, we współpracy z zespołami zajmującymi się syntezą organiczną, których potencjał immunomodulujący można by testować na wybranych liniach komórkowych, co w efekcie przyczyniłoby się do lepszego zrozumienia patogenezы, patofizjologii i immunobiologii zakażeń tym pełzakiem. Ponadto planuję kontynuować badania nad składem lipidowym i białkowym oraz funkcją pęcherzyków wielolamelarnych uwalnianych z *Acanthamoeba*, które zostały rozpoczęte w ramach grantu NCN Miniatura 1.

W celu poszerzenia wiedzy o wpływie *Acanthamoeba* spp. na wzrost roślin planuję badać autochtoniczne szczepy ameb otrzymane z ryzosfery roślin bobowatych na symbiotyczne i endofityczne bakterie izolowane z tej samej niszy. W ekologiczny nurt moich zainteresowań wpisują się także badania nad biodegradacyjnym potencjałem pałeczek *Achromobacter* spp., które do tej pory prezentowane były w postaci komunikatów zjazdowych.

7. PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

Dane bibliometryczne (na dzień 24.01.2019)	IF _a	Punkty MNiSW _b
1. Publikacje stanowiące osiągnięcie habilitacyjne = 5 publikacji	IF = 13,438 IF _{5-cio letni} = 15,716	145 pkt
2. Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego): po uzyskaniu stopnia doktora = 9 publikacji	IF = 16,496	200 pkt
3. Publikacje naukowe spoza bazy JCR po uzyskaniu stopnia doktora = 1 publikacja	IF = 0,19	15 pkt
Łączna liczba publikacji Razem = 15	IF = 30,124	360 pkt
4. Liczba streszczeń naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych: A. Przed uzyskaniem stopnia doktora = 6 B. Po uzyskaniu stopnia doktora = 24	-	-
Łączna liczba komunikatów Razem = 30	-	-
Łączna liczba cytowań wg WoS: 28 (17 bez autocytowań)		
Indeks Hircha wg WoS - 3		
Łączna liczba cytowań: 37 (27 bez autocytowań)		

a – IF zgodnie z rokiem opublikowania

b – MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania

Magdalena Karaś

.....