

AUTOREFERAT

dr inż. Marta Kaszowska

**Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk**

Wrocław, maj 2018 r.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

Dr inż. Marta Kaszowska

I. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 02.07.2002 dyplom mgr inż. na kierunku Biotechnologia, specjalność: Biotechnologia molekularna i biokataliza; Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, tytuł pracy magisterskiej: „Badania immunochemiczne lipopolisacharydu *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 39/89 (O37)”. Promotor: dr hab. Wojciech Jachymek.
- 04.12.2006 stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii nauk we Wrocławiu na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt.: Badania immunochemiczne endotoksyn *Plesiomonas shigelloides* O13, O37”. Promotor: prof. dr hab. Czesław Ługowski, praca doktorska wyróżniona przez Radę Naukową IITD PAN.

II. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- 10.2011 - obecnie adiunkt, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek
- 10.2008 - 10.2011 asystent, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek
- 04.2007 - 09.2008 post-doc, Zakład Chemii, Szwedzki Uniwersytet Rolniczy (SLU), Uppsala, Szwecja
- 11.2006 - 04.2007 specjalista, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

III. OPIS OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART.16 UST. 2 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.)

III.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl pięciu publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik 3, objęty tytułem:

”STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE WYBRANYCH ENDOTOKSYN *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda*, *Proteus penneri*”

Sumaryczny IF prac stanowiących cykl wynosi 17,442 (150 punktów MNiSW)

III.1.1. AUTOR/AUTORZY, TYTUŁ/TYTUŁY PUBLIKACJI, ROK WYDANIA, NAZWA WYDAWNICTWA

1. Lundqvist L.C., **Kaszowska M.**, Sandström C. NMR study of the O-specific polysaccharide and the core oligosaccharide from the lipopolysaccharide produced by *Plesiomonas shigelloides* O24:H8 (strain CNCTC 92/89). *Molecules*, 2015, 20 (4), 5729-5739.

IF¹: **2,465** / MNiSW²: **30** / liczba cytowań³: **3**

Indywidualny wkład w autorstwo: **40%**, prowadzenie hodowli bakteryjnych, ekstrakcje LPS, przeprowadzenie analiz serologicznych, udział w interpretacji uzyskanych wyników NMR oraz ESI MSⁿ, udział w przygotowaniu pracy do druku.

2. **Kaszowska M.**, Stojkovic K., Niedziela T., Lugowski C. The O-antigen of *Plesiomonas shigelloides* serotype O36 containing pseudaminic acid. *Carbohydr Res.* 2016, 434, 1-5.
IF¹: **2,096** / MNiSW²: **25** / liczba cytowań³: **0**

Indywidualny wkład w autorstwo: **85%**, **autor korespondencyjny**, pomysłodawca w planowaniu wszystkich doświadczeń, wiodący udział w analizie wyników (NMR, MALDI-TOF, analizy chemiczne), opiekun naukowy drugiego autora, przygotowanie manuskryptu, ostateczna redakcja manuskryptu po recenzjach.

3. **Kaszowska M.**, de Mendoza-Barberá E., Maciejewska A., Merino S., Lugowski C., Tomás J.M. The complete structure of the core oligosaccharide from *Edwardsiella tarda* EIB 202 lipopolysaccharide. *Int J Mol Sci.* 2017, 18 (6), 1163.

IF¹: **3,226** / MNiSW²: **30** / liczba cytowań³: **0**

Indywidualny wkład w autorstwo: **55%**, **autor korespondencyjny**, pomysłodawca przeprowadzonych badań strukturalnych, znaczący udział w przygotowaniu

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

manuskryptu, wiodący udział analizie wyników NMR oraz MALDI-TOF, przygotowanie manuskryptu do druku.

4. **Kaszowska M.**, Wojcik M., Siednienko J., Lugowski C., Lukasiewicz J. Structure-activity relationship of *Plesiomonas shigelloides* lipid A to the production of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 by human and murine macrophages. *Front Immunol.* 2017, 8, 1741.
IF¹: **6,429** / MNiSW²: **35** / liczba cytowań³: **0**

Indywidualny wkład w autorstwo: **85%**, **autor korespondencyjny**, pomysłodawca wszystkich przeprowadzonych badań, opiekun naukowy drugiego autora, wiodący udział w planowaniu eksperymentów, przygotowanie próbek do badań, oznaczanie toksyczności testem MTT, wiodący udział w wykonaniu wszystkich eksperymentów testem ELISA, udział w przeprowadzeniu analizy statystycznej, interpretacja uzyskanych wyników, napisanie i ostateczne zredagowanie manuskryptu po recenzjach.

5. Palusiak A., Maciejewska A., Lugowski C., Rozalski A., **Kaszowska M.** The new structure of core oligosaccharide presented by *Proteus penneri* 40A and 41 lipopolysaccharides. *Int J Mol Sci.* 2018, 28, 19 (3), 676.
IF¹: **3,226** / MNiSW²: **30** / liczba cytowań³: **0**

Indywidualny wkład w autorstwo: **35%**, **autor korespondencyjny**, wiodący udział w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, wiodący udział w analizie widm NMR, analiza widm masowych ESI MSⁿ, przygotowanie manuskryptu do druku.

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

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

³ Liczba cytowań (z uwzględnieniem autocytowań), według bazy Web of Science, stan z dnia 21.05.2018r.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

III.2. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Prezentowane osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl pięciu prac oryginalnych (Załącznik 5), poświęcony badaniom immunochemicznym lipopolisacharydów *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda* oraz *Proteus penneri*. Przedstawiony cykl publikacji przygotowany został w ramach mojej pracy realizowanej w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Wspólną cechą większości bakterii Gram-ujemnych, do których należą *P. shigelloides*, *E. tarda*, *P. penneri* jest obecność, zakotwiczonych w ich zewnętrznej błonie, cząsteczek nazywanych ze względu na budowę lipopolisacharydami (LPS), natomiast ze względu na aktywność biologiczną – endotoksynami. Stanowią one integralny składnik błony zewnętrznej osłony komórkowej tych bakterii, będąc równocześnie cząsteczkami niezbędnymi do ich funkcjonowania i przeżywalności. Są to bardzo ważne antygeny powierzchniowe, rozpoznawane przez receptory na komórkach układu odpornościowego makroorganizmu. Cząsteczki LPS są jednymi z tzw. wzorców molekularnych patogenów (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) tj. charakterystycznych struktur pochodzących z drobnoustrojów równocześnie obcych dla organizmów eukariotycznych. Istotną cechą PAMPs jest ich konserwatywność tzn. nie ulegają one częstym zmianom w procesie ewolucji. W odpowiedzi na PAMPs, organizmy eukariotyczne wykształciły uniwersalny system receptorów zdolnych do rozpoznawania i indukcji reakcji obronnej skierowanej przeciwko tym cząsteczkom.

Lipopolisacharydy to amfifilowe i termostabilne cząsteczki zbudowane z trzech, różniących się pod względem struktury i właściwości regionów: (I) łańcucha O-swoistego (polisacharyd O-swoisty, antygeny O), (II) oligosacharydu rdzenia oraz (III) lipidu A. Antygen O, skierowany na zewnątrz komórki bakteryjnej jest zbudowany z wielu powtarzających się podjednostek oligosacharydowych i określa specyficzność serologiczną (serotyp O). Oligosacharyd rdzenia bierze udział w utrzymaniu struktury błony zewnętrznej, moduluje heterogenność cząsteczki LPS oraz moduluje jej aktywność biologiczną. W strukturze oligosacharydu rdzenia można wyróżnić dwie części heksozową (zewnętrzną) zbudowaną z reszt sześciowęglowych oraz heptozową (wewnętrzną) zbudowaną z reszt heptoz oraz przynajmniej jednej reszty Kdo (reszty obecnej tylko w strukturach LPS, u mikroorganizmów). Heptozy o konfiguracji L,D oraz D,D podstawiane są dodatkowo

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

ujemnie naładowanymi grupami P, PP, PEtn. Oligosacharyd rdzenia, poprzez część wewnętrzną łączy się lipidem A, nazywanym centrum endotoksyczności cząsteczki LPS. Lipid A zbudowany jest ze szkieletu cukrowego podstawianego przez reszty kwasów tłuszczowych oraz ujemnie naładowane grupy fosforanowe, które odgrywają znaczący udział w interakcjach z receptorami na powierzchni komórek.

W zależności od budowy chemicznej poszczególnych fragmentów LPS, cząsteczki te aktywują komórki układu odpornościowego prowadząc do uwalniania prozapalnych cytokin tj. IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α , co bezpośrednio związane jest ze stopniem aktywności biologicznej tych cząsteczek. Podczas aktywacji, lipid A (centrum toksyczności), bezpośrednio wiąże się z kompleksem TLR4/MD-2 występującym na powierzchni komórek np. monocytów/makrofagów, a część cukrowa LPS (oligosacharyd/polisacharyd) może znacznie modulować te interakcje. Specyficzna molekularna konformacja lipidu A (tzw. konformacja endotoksyczna) zależy od budowy chemicznej (stosunku między fragmentami hydrofobowymi i hydrofilowymi) jak również od przestrzennego rozmieszczenia poszczególnych jego składników, z których każdy ma większy lub mniejszy wpływ na endotoksyczność, co ma swoje odbicie w aktywności biologicznej oraz sposobie zakotwiczenia w błonie zewnętrznej komórki bakteryjnej.

Z medycznego punktu widzenia, z pojawieniem się endotoksyny bakteryjnej w krwiobiegu związane są stany chorobowe takie jak posocznica oraz wstrząs septyczny, które są bardzo poważnym problemem współczesnej medycyny. Nie znane są ciągle skuteczne metody profilaktyki i terapii wstrząsu septycznego, jednakże wieloletnie badania nad zależnościami pomiędzy strukturą a funkcją biologiczną LPS, prowadzone w wielu ośrodkach na całym świecie, przybliżają zrozumienie mechanizmów tego procesu. Niestety, wykorzystanie antybiotyków podczas uogólnionych infekcji nie gwarantuje skuteczności terapii ponieważ antybiotyki nie inaktywują cząsteczki LPS, a dodatkowo niektóre z nich wręcz prowadzą do uwolnienia ich z powierzchni zabitych komórek bakteryjnych. Poszukuje się więc skutecznych leków które doprowadziłyby do neutralizacji endotoksyny, tak by zminimalizować jej negatywny wpływ działania.

Cechą wspólną przedłożonych publikacji jest kompleksowe podejście do analizy strukturalnej wybranych fragmentów lipopolisacharydów *P. shigelloides*, *E. tarda* oraz *P. penneri*. Przedstawiony do oceny jednotematyczny cykl pięciu prac oryginalnych obejmuje trzy zagadnienia badawcze stanowiące główny przedmiot moich zainteresowań naukowych:

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

- ✓ analizę strukturalną kompletnych lipopolisacharydów,
- ✓ badanie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną lipopolisacharydów,
- ✓ zastosowanie spektrometrii mas MALDI-TOF oraz ESI MSⁿ do identyfikacji lokalizacji glicyny w strukturach LPS.

Przedłożone prace obejmują analizę strukturalną wybranych fragmentów lipopolisacharydów *P. shigelloides* oraz analizę strukturalną dwóch nowych typów oligosacharydów rdzenia zidentyfikowanych wśród *E. tarda* i *P. penneri*. Trzy z przedstawionych w cyklu prac są wynikiem współpracy z innymi ośrodkami naukowymi.

P. shigelloides jest przedmiotem zainteresowania badaczy z powodu swoich właściwości chorobotwórczych. Najczęstsze przypadki izolacji tego gatunku związane są z zakażeniami jelitowymi przede wszystkim z ostrymi biegunkami (biegunki podróżnych) do których dochodzi w wyniku spożywania zanieczyszczonych pokarmów (głównie ryb i owoców morza) oraz kontaktu z zakażoną wodą. Zakażenia wywołane przez *P. shigelloides* cechuje wysoka śmiertelność, a głównym czynnikiem wirulencji tych bakterii jest LPS.

E. tarda jest okazjonalnym patogenem u ludzi, odpowiedzialnym przede wszystkim tak jak *P. shigelloides* za zakażenia jelitowe, do których dochodzi w wyniku kontaktu z zakażoną wodą lub spożywaniem zanieczyszczonych pokarmów przede wszystkim ryb, u których te bakterie są etiologicznym czynnikiem wywołującym edwardsiellozę (posocnicę wywołaną przez *Edwardsiella*).

P. penneri występują powszechnie w środowisku, u człowieka są składnikiem flory fizjologicznej układu pokarmowego. Najczęściej odpowiedzialne są za zakażenia układu moczowego.

Wszystkie prace były prowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych technik instrumentalnych stosowanych we współczesnej immunochemii. We wszystkich badaniach LPS oraz ich poszczególnych fragmentów wykorzystane zostały jedno- i dwuwymiarowe eksperymenty spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) tj. ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HSQC-TOCSY, ¹H-¹H NOESY, ¹H-¹³C HSQC-DEPT, ¹H-¹³C HMBC oraz metody spektrometrii mas MALDI-TOF lub/oraz ESI MSⁿ, niezbędne do określenia elementów strukturalnych badanych struktur oligosacharydów (rodzaju i formy poszczególnych reszt monosacharydów, anomerii wiązań), ustalenia sekwencji oraz identyfikacji dodatkowych niecukrowych podstawników w cząsteczkach LPS. Połączenie

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

metod immunologicznych, które nie umożliwiają precyzyjnej analizy strukturalnej z nowoczesnymi metodami instrumentalnymi umożliwia badanie tych amfifilowych cząsteczek LPS z zachowaniem wszystkich obecnych składników, nawet tych najbardziej labilnych. W analizach strukturalnych badanych fragmentów cukrowych LPS równolegle wykorzystano klasyczne metody chemiczne, takie jak analiza cukrowa, metylacyjna oraz analiza absolutnej konfiguracji reszt cukrowych.

Za najważniejsze osiągnięte rezultaty uważam:

- ✓ określenie kompletnej struktury lipopolisacharydu *P. shigelloides* O36,
- ✓ określenie kompletnej struktury lipopolisacharydu *P. shigelloides* O24,
- ✓ szczegółową analizę heterogenności 85 lipidów A *P. shigelloides*,
- ✓ wpływ heterogenności lipidów A *P. shigelloides* na aktywność biologiczną w mysich i ludzkich makrofagach,
- ✓ określenie kompletnej struktury nowego typu oligosacharydu rdzenia u *P. penneri*,
- ✓ określenie kompletnej struktury nowego typu oligosacharydu rdzenia u *E. tarda*,
- ✓ wykorzystanie metod spektrometrii mas MALDI-TOF oraz ESI MSⁿ do ustalenia lokalizacji glicyny – częstego podstawnika identyfikowanego w strukturach LPS *Enterobacteriaceae*.

III.3. PODSUMOWANIE WYNIKÓW OPISANYCH W PUBLIKACJACH WYBRANYCH DO OCENY

Lundqvist L.C., **Kaszowska M.**, Sandström C. NMR study of the O-specific polysaccharide and the core oligosaccharide from the lipopolysaccharide produced by *Plesiomonas shigelloides* O24:H8 (strain CNCTC 92/89). *Molecules*, 2015, 20 (4), 5729-5739.

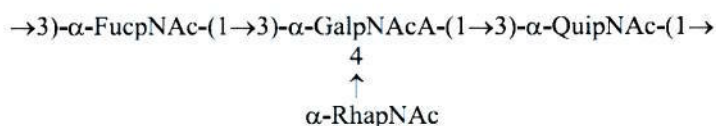
Celem pracy była analiza strukturalna fragmentów cukrowych (antygeny O, oligosacharydu rdzenia) LPS *P. shigelloides* O24:H8 (szczep CNCTC 92/89), wykorzystując techniki spektroskopii ¹H-¹³C NMR oraz spektrometrii mas ESI-MSⁿ.

Wstępne analizy immunochemiczne (immunoblotting) wśród LPS *P. shigelloides* wskazywały na podobieństwo we fragmencie oligocukru rdzenia z serotypem O54, którego struktura została poznana jako pierwsza wśród LPS *P. shigelloides*. Kompletna analiza strukturalna oligocukru rdzenia LPS *P. shigelloides* O24 umożliwiła zidentyfikowanie dekasacharydowej struktury tego fragmentu. Brak P, PP, PEtn w badanej strukturze,

Autoreferat

zastąpiony został resztami kwasów uronowych, co jest cechą charakterystyczną dla wszystkich do tej pory zidentyfikowanych struktur oligocukrów rdzeni *P. shigelloides*. Zidentyfikowano identyczną strukturę jaką opisano wcześniej w oligocukrach rdzeni *P. shigelloides* serotypów O54 oraz O37 (Załącznik 3, I.2.1[13]). Równocześnie, analiza strukturalna lipidu A wykazała taką samą strukturę jaka została zidentyfikowana w lipidach A serotypów O37 oraz O54 (wyniki własne). Obserwowany konserwatyzm oligosacharydów rdzeni wśród LPS *P. shigelloides* z równoczesnym uwzględnieniem znacznego konserwatyizmu wśród lipidów A, otwiera doskonałą możliwość badania wpływu składników cukrowych na aktywność biologiczną tych cząsteczek, znacząco istotną z punktu widzenia poszukiwania immunogennych struktur wspólnych dla wielu szczepów bakteryjnych, istotnych dla diagnostyki i profilaktyki zakażeń bakteryjnych.

W strukturze antygeny O *P. shigelloides* O24 zidentyfikowano cztery reszty cukrowe, wchodzące w skład tetrasacharydowej, rozgałęzionej biologicznej podjednostki:



Analiza frakcji oligosacharydu rdzenia podstawionego pojedynczą podjednostką antygeny O umożliwiła identyfikację miejsca podstawienia oligocukru rdzenia powtarzającą się podjednostką poprzez resztę $\rightarrow 3$)- α -D-QuipNAc-(1 $\rightarrow$. Identyfikacja reszty $\rightarrow 3$)- α -FucpNAc-(1 $\rightarrow$ podczas analizy frakcji O-polisacharydowej (antygeny O) wskazała na miejsce podstawienia kolejną podjednostką, równocześnie potwierdzając pełną strukturę biologicznej podjednostki w badanym serotypie O24.

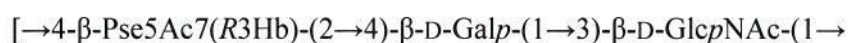
Wyniki przeszukiwania cukrowych baz danych, wykazały, że dokładnie taką samą strukturą opisana została w kapsularnym polisacharydzie klinicznego izolatu *Vibrio vulnificus* BO62316. Wskazuje to na przekazywanie sobie plazmidów przez różne szczepy bakterii na drodze ewolucji. Kolejnym przykładem na podobieństwo cukrowych fragmentów zaobserwowano w przypadku LPS *P. shigelloides* O17, którego podjednostka antygeny O została już wcześniej zidentyfikowana u *Shigella sonnei* fazy I (Załącznik 3, I.2.1[14]).

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

Kaszowska M., Stojkovic K., Niedziela T., Lugowski C. The O-antigen of *Plesiomonas shigelloides* serotype O36 containing pseudaminic acid. *Carbohydr Res.* 2016, 434, 1-5.

Celem pracy była analiza strukturalna pełnej cząsteczki LPS *P. shigelloides* O36 (SB 4051), tj. zidentyfikowanie struktury podjednostki antygeny O, oligosacharydu rdzenia oraz lipidu A. Po oddzieleniu hydrofobowego lipidu A, mieszaninę oligo- i polisacharydów frakcjonowano za pomocą sączenia molekularnego. Otrzymane frakcje poli- i oligosacharydów analizowano kolejno za pomocą technik instrumentalnych spektroskopii ^1H - ^{13}C NMR oraz spektrometrii mas MALDI-TOF, uzupełniając badania metodami analizy chemicznej. Po rozdzieleniu mieszaniny poli- i oligosacharydów analizowano: (I) frakcję polisacharydu O-swoistego (z niemożliwą do identyfikacji liczbą powtarzających się podjednostek), (II) frakcję oligosacharydu rdzenia podstawioną dwiema podjednostkami antygeny O (analiza miejsca podstawienia kolejną podjednostką antygeny O), (III) frakcję oligosacharydu rdzenia podstawioną jedną powtarzającą się podjednostką antygeny O, (IV) frakcję oligosacharydu rdzenia podstawioną niekompletną podjednostką antygeny O (analiza tej frakcji umożliwiła zidentyfikowanie miejsca podstawienia oligosacharydu rdzenia antygenem O, (V) frakcję kompletnego oligosacharydu rdzenia oraz (VI) frakcję oligosacharydu rdzenia pozbawioną jednej reszty terminalnej β -D-GlcpNAc (związana z heterogennością tego fragmentu). Zidentyfikowano undekasacharydowy oligosacharyd rdzenia oraz trójcukrową powtarzającą się podjednostkę antygeny O:



z nietypową resztą $\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-Pse5Ac7(R3Hb)}\text{-(2}\rightarrow$, pochodną kwasu pseudomininowego, która jest często identyfikowana w bakteryjnych glikanach oraz glikoproteinach.

Badania heterogenności lipidu A wykazały populacje jonów reprezentujących trzy typy cząsteczek obecnych w badanym szczepie *P. shigelloides* O36, wynikające z obecności trzech podstawników acylowych o strukturach: (L_I) 14:0(3-O-9c-16:1), (L_II) 14:0(3-O-14:0), (L_III) 14:0(3-O-12:0) w pozycji N-2'. Wykorzystując specjalnie przygotowaną matrycę otrzymano za pomocą spektrometrii MALDI-TOF widmo pełnej cząsteczki LPS *P. shigelloides* O36, które potwierdziło obecność heterogenności w lipidzie A oraz masy oligosacharydu rdzenia i powtarzającej się podjednostki antygeny O.

ZAŁĄCZNIK 2

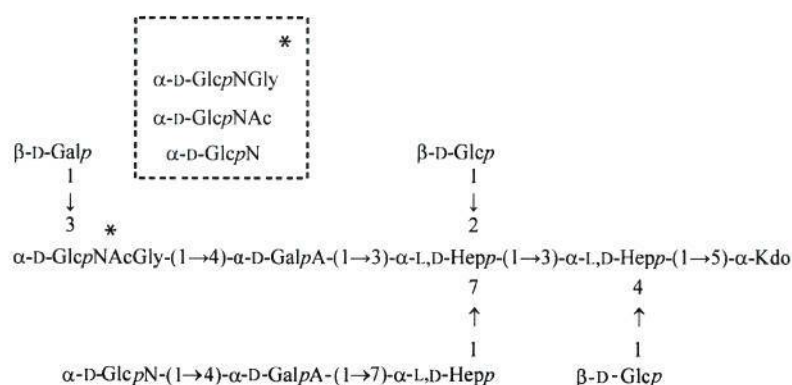
Autoreferat

Kaszowska M., de Mendoza-Barberá E., Maciejewska A., Merino S., Lugowski C., Tomás J.M. The complete structure of the core oligosaccharide from *Edwardsiella tarda* EIB 202 lipopolysaccharide. *Int J Mol Sci.* 2017, 18 (6), 1163.

Celem pracy była analiza strukturalna oligosacharydu rdzenia *E. tarda* EIB 202 za pomocą spektroskopii ^1H - ^{13}C NMR, spektrometrii mas ESI MSⁿ oraz MALDI-TOF. Przeprowadzono też analizę genomową klasteru genów *waa* (genów związanych z biosyntezą fragmentu oligocukru LPS) patogenego szczepu.

Przeprowadzone analizy strukturalne umożliwiły identyfikację undekasacharydowego oligocukru rdzenia pozbawionego ujemnie naładowanych grup P, PP oraz PEtn. Tak jak w przypadku wszystkich do tej pory poznanych struktur oligosacharydów rdzeni *P. shigelloides*, również pozbawionych tych grup, zidentyfikowano w analizowanej strukturze dwie reszty kwasów uronowych, z ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi.

Cechą charakterystyczną tego szczepu jest znaczna heterogenność, związana zarówno z częściowym brakiem terminalnej reszty β -D-Galp, jak również z obecnością jednej z reszt α -D-GlcNAc lub α -D-GlcN w strukturze. Dodatkowo, heterogenność w strukturze związana jest z obecnością częściowo podstawianego oligocukru przez glicynę, której lokalizacja została ustalona za pomocą MALDI MS/MS. Analizy MALDI MS/MS umożliwiły identyfikację glicyny na resztach α -D-GlcNAc lub α -D-GlcN w badanych glikoformach oligocukrów rdzenia.



W pracy zidentyfikowano także geny odpowiedzialne za biosyntezę szkieletu cukrowego oligocukru rdzenia *E. tarda* EIB 202, które potwierdziły strukturę otrzymaną metodami analizy instrumentalnej. Pomimo, identyfikacji wszystkich genów obecnych w klasterze *waa*, odpowiedzialnych za biosyntezę oligocukru, ciągle poszukuje się położenia genu/ów odpowiedzialnego/ych za obecność w tych strukturach glicyny. Analiza widm ^1H - ^{13}C NMR

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

oraz spektrometrii mas (MALDI-TOF/ESI MSⁿ) są wciąż jedyną możliwością ustalenie lokalizacji tych niecukrowych podstawników w badanych strukturach LPS. Kontynuacją badań z *E. tarda* EIB 202 związana jest właśnie z próbą identyfikacji genu/genów odpowiedzialnych za obecność glicyny w strukturze.

Kaszowska M., Wojcik M., Siednienko J., Lugowski C., Lukasiewicz J. Structure-activity relationship of *Plesiomonas shigelloides* lipid A to the production of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 by human and murine macrophages. *Front Immunol.* 2017, 8, 1741.

Celem publikacji było zdefiniowanie wpływu różnych podstawników lipidu A *P. shigelloides* na aktywność biologiczną. W pracy przedstawiono analizę podobieństwa 85 lipidów A *P. shigelloides* (wszystkich dostępnych w zasobach Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek) za pomocą metod spektrometrii mas MALDI-TOF, ESI MSⁿ. Zidentyfikowano cztery typy lipidów A (LA I-IV) wśród badanych szczepów *P. shigelloides*, co wskazuje na znaczny konserwatyzm tego fragmentu LPS.

We wszystkich badanych strukturach zidentyfikowano główny jon odpowiadający strukturze disacharydu (α -D-GlcpN-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-GlcpN) podstawionego sześcioma resztami kwasów tłuszczowych oraz dwiema grupami fosforanowymi (LA I). Dwa kolejne typy lipidów A *P. shigelloides* posiadają dodatkowo podstawienie PEtn (LA II) lub resztą szesnastowęglowego kwasu palmitynowego (16:0) (LA III). Dodatkowo, zidentyfikowano LA IV, który reprezentuje strukturę lipidu A podstawianą równocześnie PEtn oraz 16:0.

W każdym z badanych szczepów zidentyfikowano heterogenność związaną z obecnością lipidów A z resztami kwasów tłuszczowych (R) 12:0, 14:0, 9*c*-16:1/16:0 podstawiających amidowo związaną w pozycji N-2' pierwszorzędową resztę kwasu 14:0[3-(R)-OH]. Do badań wybrano szczepy w których zidentyfikowano najniższy poziom heterogenności opierając się na analizie widm MALDI TOF. Zidentyfikowano procentowy udział PEtn: 42% (LA II), 16:0: 51% (LA III) oraz PEtn/16:0: 4% / 7% (LA IV) w lipidach A wybranych do badań.

Wpływ zdefiniowanych struktur lipidów A *P. shigelloides* (LA I-IV) na aktywność biologiczną został zbadany poprzez oznaczenie i porównanie poziomu wybranych prozapalnych cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) wydzielanych podczas aktywacji ludzkich oraz mysich makrofagów. Kontrolą pozytywną był zdefiniowany lipid A *E. coli* wyizolowany z serotypu O55, silny aktywator TLR4/MD-2. Podobieństwo lipidów A *P. shigelloides* do lipidu A *E. coli* O55, związane jest z identycznym szkieletem cukrowym, obecnością dwóch grup fosforanowych oraz asymetrycznym rozkładem sześciu reszt kwasów tłuszczowych.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

Różnice między tymi strukturami związane są z rodzajem reszt kwasów tłuszczowych (długością łańcuchów węglowych) podstawiających szkielet cukrowy.

To pierwsza publikacja opisująca wpływ zdefiniowanych struktur lipidów A *P. shigelloides* na aktywność biologiczną mierzoną poziomem wydzielanych prozapalnych cytokin przez ludzkie i mysie makrofagi.

Zaobserwowano, że heterogenność lipidów A związana z obecnością reszt kwasów (*R*) 12:0, 9*c*-16:1/16:0 w pozycji N-2' podstawiających pierwszorzędową resztę kwasu 14:0[3-(*R*)-OH] nie wpływa znacząco na aktywność *in vitro* zarówno w ludzkich jak i w mysich makrofagach. LA I okazał się silnym aktywatorem zarówno mysich jak i ludzkich makrofagów, w przypadku ludzkich makrofagów porównywalny z LA O55. Obecność PEtn w LA II nie wpływa znacząco na poziom wydzielanych cytokin w ludzkich makrofagach w porównaniu z LA I, natomiast podnosi poziom aktywności biologicznej w mysich makrofagach. Podstawienie 16:0 znacząco zmniejsza aktywność zarówno w ludzkich (ok. 2-4 razy) jak i mysich (ok. 2-5 razy) komórkach. Dla LA IV wykazano, że 7% podstawienie lipidu A przez 16:0 wystarczy by znacząco obniżyć poziom wydzielanych cytokin. Wykazano, że obecność dodatkowych podstawników w lipidach A *P. shigelloides* wpływa na aktywność biologiczną poprzez wpływ na zmianę konformacji cząsteczki podczas interakcji z kompleksem TLR4/MD-2 na powierzchni komórek. Wykorzystanie ludzkich oraz mysich makrofagów wykazało różnice w aktywacji między gatunkami, które wynikają z różnic w budowie receptorów na powierzchni tych komórek.

Palusiak A., Maciejewska A., Lugowski C., Rozalski A., **Kaszowska M.** The new structure of core oligosaccharide presented by *Proteus penneri* 40A and 41 lipopolysaccharides. *Int J Mol Sci.* 2018, 19 (3), 676.

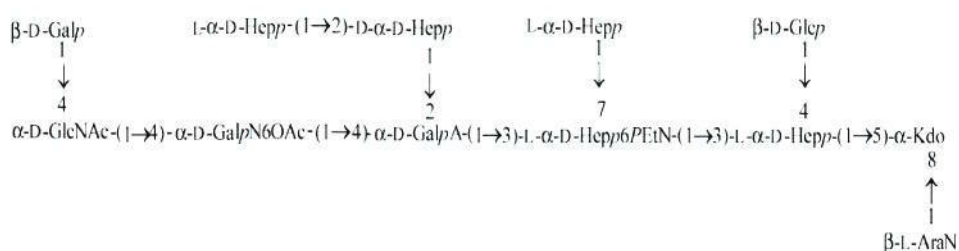
W pracy przedstawiono analizę strukturalną nowego typu oligosacharydu rdzenia wśród *P. penneri* wybranego spośród 40 LPS *P. penneri* oraz *P. mirabilis* reprezentujących różne serotypy i serogrupy. Poszukiwanie podobieństw z oligocukrem rdzenia *P. penneri* 40A (wykorzystując przygotowany koniugat oligocukru 40A z TT) przeprowadzono za pomocą metod immunochemicznych (immunoblotting/ELISA), które wskazały na podobieństwo we fragmencie rdzenia z *P. penneri* 41.

Wykorzystując analizy spektroskopii ^1H - ^{13}C NMR i spektrometrii ESI MSⁿ analizowano kolejno: (I) struktury kompletnych oligocukrów rdzeni obu szczepów oraz (II) struktury de-*O*-acylowanych oligocukrów rdzeni obu szczepów. De-*O*-acylacja oligocukrów była konieczna

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

z powodu obserwowanej heterogenności, znacznie utrudniającej analizy a wynikającej z obecności niestechiometrycznego podstawienia grupą OAc w obu badanych LPS *P. penneri*. Identyfikacja miejsca podstawienia grupą OAc wymagała porównania struktur oligosacharydów przed oraz po przeprowadzonej de-O-acetylacji. Analizy *P. penneri* 40A oraz 41 wykazały identyczne struktury dodekasacharydów w obu badanych szczepach.



Analizy ESI MS/MS dla wyselekcjonowanych jonów reprezentujących kompletne struktury oligocukrów rdzeni oraz jonów reprezentujących struktury pozbawione grup OAc potwierdziły obecność grupy OAc obecnej na reszcie α -D-GalpN w pozycji 6 w badanych strukturach.

Przedstawione prace wpisują się w nurt badawczy nad strukturami lipopolisacharydów, którego kierunek wyznacza również Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek IITD PAN we Wrocławiu. Znajomość kompletnej budowy chemicznej cząsteczek LPS jest pierwszym i niezbędnym etapem do ustalenia zależności pomiędzy strukturą a ich funkcją (aktywnością biologiczną). Badanie struktur endotoksyn jest niezwykle istotne dla poznawania oraz zrozumienia mechanizmów rozwoju sepsy i wstrząsu septycznego, stanowiąc równocześnie podstawę do opracowywania nowych metod diagnostycznych oraz skutecznych strategii terapeutycznych przeciwko zakażeniom bakteryjnym.

IV. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO BADAWCZYCH

PODSUMOWANIE

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie współautorstwo w 17 pracach opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*, oraz autorstwo w 1 pracy przeglądowej w czasopiśmie spoza bazy *JCR*. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych byłam współautorem w 1 pracy opublikowanej w czasopiśmie znajdującej się

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

w bazie *JCR*, oraz autorem 1 pracy spoza bazy *JCR* (praca przeglądowa). Po uzyskaniu stopnia doktora byłam współautorem w 16 pracach oryginalnych (pierwszy autor - 7 prac, autor korespondencyjny – 8 prac).

Mój dorobek naukowy obejmuje 26 komunikatów zjazdowych, 4 referaty wygłoszone na międzynarodowych konferencjach naukowych (w tym na jednej na zaproszenie Organizatora, i na jednej swoim referatem otwierałam sesję), oraz 1 europejski i 2 krajowe zgłoszenia patentowe. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) prac oryginalnych wynosi 54,603 (punkty MNiSW: 535). Do dnia 21 maja 2018 r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane 106 razy, w tym 95 razy wyłączając autocytowania. Łączny IF pięciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi 17,442, przy liczbie cytowań 3.

Ponadto, w ramach działalności naukowej uczestniczyłam w realizacji 7 projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki Szkolnictwa Wyższego (1), Komitet Badań Naukowych (2), Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (3), i projektu finansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (1).

Obecnie w ramach działalności naukowej jestem kierownikiem projektu badawczego MINIATURA finansowanego przez NCN, głównym wykonawcą w projekcie badawczym OPUS (NCN) oraz wykonawcą w projekcie POIR finansowanym przez NCBiR.

IV.1. PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Pracę badawczą jak również magisterską realizowałam pod kierunkiem dr hab. Wojciecha Jachymka w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Tematem wiodącym Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek są od wielu lat badania strukturalne oraz immunochemiczne endotoksyn bakteryjnych. Praca magisterska zatytułowana: „Badania immunochemiczne lipopolisacharydu *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 39/89 (O37)” dotyczyła analizy strukturalnej wybranego serotypu O. Wybór serotypu O, podyktowany został wstępnymi badaniami z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko oligosacharydowi rdzenia *P. shigelloides* O54, którego struktura była pierwszą zidentyfikowaną wśród *P. shigelloides*. Przeprowadzono badania podobieństwa antygenowego we fragmencie oligosacharydu rdzenia wśród 68 dostępnych w kolekcji przedstawicieli gatunku *P. shigelloides*. Głównym celem pracy była analiza strukturalna oligosacharydu rdzenia *P. shigelloides* O37, która wykazała identyczną strukturę

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

z tym fragmentem w *P. shigelloides* O54, wskazując równocześnie na pewien konserwatyzm tego fragmentu wśród szczepów *P. shigelloides*.

Po ukończeniu studiów magisterskich w 2002 roku na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, kierunek Biotechnologia, specjalność: Biotechnologia molekularna i biokataliza rozpoczęłam studia doktoranckie w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek IITD PAN we Wrocławiu pod opieką prof. Czesława Ługowskiego.

Głównym nurtem podjętych badań podczas realizacji pracy doktorskiej była kontynuacja badań immunochemicznych wybranych lipopolisacharydów *P. shigelloides*: serotypów O13 oraz O37. Badania z pierwszym z wymienionych serotypów, O37 rozpoczęłam już podczas mojej pracy magisterskiej, a w pracy doktorskiej przedstawiłam kompletną strukturę tej cząsteczki LPS.

Do najważniejszych wyników uzyskanych przeze mnie podczas pracy doktorskiej należą:

- ✓ ustalenie struktury cząsteczki SR-LPS (forma półszorstka, *semi-rough*) *P. shigelloides* O37 – poprzez analizę serii wzajemnie dopełniających się analiz strukturalnych: (I) oligocukru rdzenia podstawionego jedną podjednostką łańcucha O-swoistego (zidentyfikowanie sposobu połączenia podjednostki antygeny O z oligocukrem rdzenia), (II) oligocukru rdzenia (zidentyfikowanie heterogenności tego regionu LPS), (III) de-*N-O*-acylowanego LPS (identyfikacja sposobu podstawienia lipidu A oligocukrem rdzenia, identyfikacja obecności dodatkowych reszt Kdo w strukturze, poznanie struktury cukrowego szkieletu), (IV) lipidu A (zidentyfikowanie amidowo i estrowo związanych reszt kwasów tłuszczowych),
- ✓ ustalenie struktury cząsteczki S-LPS (forma gładka, *smooth*) *P. shigelloides* O13 – poprzez analizę serii wzajemnie się dopełniających analiz strukturalnych: (I) polisacharydu O-swoistego (ustalenie struktury powtarzającej się podjednostki), (II) oligocukru rdzenia podstawionego jedną podjednostką łańcucha O-swoistego, (III) oligocukru rdzenia, (IV) de-*N-O*-acylowanego LPS, oraz (V) lipidu A. Zidentyfikowano nowy typ oligocukru rdzenia wśród *P. shigelloides*,

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

- ✓ przygotowanie koniugatu oligocukru rdzenia *P. shigelloides* O13 z białkiem nośnikowym (OS13-TT), w celu otrzymania surowic odpornościowych, które następnie posłużyły do poszukiwania podobieństw strukturalnych wśród innych przedstawicieli gatunku *P. shigelloides*,
- ✓ identyfikacja podobieństw serologicznych wśród przedstawicieli *P. shigelloides* – wykorzystanie surowic odpornościowych wykazało podobieństwa serologiczne w obrębie struktur rdzeniowych oraz w obrębie wielocukru O-swoistego badanych LPS *P. shigelloides* z pozostałymi przedstawicielami gatunku.

Ze względu na różnice w budowie i podatność na swoiste degradacje postępowanie z każdym z tych preparatów wymagało indywidualnego dostosowania procedur w cukrowej i metylacyjnej analizie jak i wymaganych swoistych degradacji. Wykonałam i zinterpretowałam zestawy widm jedno- i dwuwymiarowych eksperymentów NMR: typu ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C -HSQC-DEPT, ^1H - ^{13}C -HSQC-TOCSY, ^1H - ^1H NOESY oraz ^1H - ^{13}C HMBC dla wszystkich fragmentów badanych LPS *P. shigelloides*.

Podczas studiów doktoranckich odbyłam trzytygodniową pracę badawczą na Wydziale Chemii, SLU w Uppsali, w Szwecji podczas której poznałam w praktyce wykorzystanie techniki spektrometrii mas MALDI-TOF i spektroskopii NMR w analizie strukturalnej lipopolisacharydów. Otrzymane wyniki prezentowałam jako referaty na dwóch międzynarodowych konferencjach (Załącznik 3, VIII.1[1], [2]). W 2006 r. byłam laureatką stypendium konferencyjnego KOLUMB (edycja zimowa 2006) organizowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (FNP). Dzięki temu stypendium miałam możliwość prezentowania moich wyników podczas ustnej prezentacji podczas XXIIIrd International Carbohydrate Symposium (ICS 2006), Whistler, w Kanadzie.

W 2006 roku obroniłam rozprawę doktorską pt. „Badania immunochemiczne lipopolisacharydów O13, O37”. Wyniki uzyskane w rozprawie zostały opublikowane w formie dwóch prac już po uzyskaniu stopnia doktora (Załącznik 3, I.2.1[12], [13]). Praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową IITD PAN we Wrocławiu.

IV.2. PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po obronie pracy doktorskiej w IITD PAN we Wrocławiu odbyłam 1,5 roczne stypendium post-doc w Zakładzie Chemii, SLU w Uppsali (Szwecja). W tym czasie odbyłam dwumiesięczny specjalistyczny kurs NMR w Biological Medicine Center w Uppsali

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

(Szwecja). Podczas pobytu w SLU zdobyłam doświadczenie w praktycznym zastosowaniu technik spektroskopii NMR przede wszystkim nowoczesnych metod STD NMR, HR MAS NMR oraz metod obróbki danych z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania w stopniu umożliwiającym samodzielne prowadzenie prac badawczych. Wynikiem tego wyjazdu były dwie prace oryginalne opublikowane po moim powrocie, w których wykorzystałam poznany warsztat metod NMR (Załącznik 3, I.2.1[15], [16]).

Po powrocie, większość tematów badawczych realizowałam/realizuję we współpracy z koleżankami i kolegami z IITD PAN we Wrocławiu oraz z innych ośrodków naukowych (Załącznik 4, V). Mój wkład w realizację poszczególnych tematów badawczych, które zaowocowały opublikowaniem wyników lub ich prezentacjami na zjazdach naukowych, szczegółowo został opisany w Załączniku 3. Część z tych tematów była/jest przedmiotem prac inżynierskich, magisterskich i doktorskich w przypadku których pełniłam/pełnię funkcję promotora (praca inżynierska/magisterska) lub promotora pomocniczego (praca doktorska) (Załącznik 4, I.1-3).

Od wielu lat wykorzystuję mój warsztat naukowy do:

- ✓ **analizy strukturalnej, badań właściwości immunochemicznych oraz aktywności biologicznej wybranych fragmentów LPS *P. shigelloides*,**

Kontynuacja badań prowadzonych podczas mojej pracy doktorskiej, polegająca na uzupełnieniu wyników o: (I) kompletną interpretację widm NMR dla frakcji antygeny O LPS *P. shigelloides* O37 oraz (II) przeprowadzenie analiz modelowania molekularnego (MM2 force field), które umożliwiły identyfikację konfiguracji nietypowego podstawnika w strukturze α -D-Lenp [(2S)-O-(4-oxopentanoic acid)- α -D-Glcp] zaowocowała opublikowaniem w 2013 roku pełnej struktury LPS *P. shigelloides* O37. Praca była pierwszym doniesieniem dotyczącym obecności α -D-Lenp w strukturach LPS (Załącznik 3, I.2.1[13]). Uzupełnione i opublikowane zostały również wyniki dotyczące analizy strukturalnej oligosacharydu rdzenia LPS *P. shigelloides* O13 (Załącznik 3, I.2.1[12]).

Brałam aktywny udział w badaniach dotyczących analizy wybranych fragmentów LPS – polisacharydów O-swoistych i oligocukrów rdzeni LPS *P. shigelloides* O24 (praca 1) (Załącznik 3, I.2.1[10]), O36 (praca 2) (Załącznik 3, I.2.1[7]) oraz O17 (Załącznik 3, I.2.1[14]). Dwie z tych prac zawarte są w cyklu publikacji mojej rozprawy habilitacyjnej (prace 1, 2).

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

Wśród wszystkich 20 do tej pory opublikowanych prac oryginalnych dotyczących struktur LPS *P. shigelloides* bądź ich fragmentów (antygenów O/oligosacharydów rdzenia, lipidów A), 14 opublikowano w ramach badań strukturalnych LPS prowadzonych w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek, a z tego w 6 byłam jednym ze współautorów.

Badania dotyczące struktur LPS *P. shigelloides* wykazały wiele interesujących cech, wpływających na aktywność biologiczną LPS *P. shigelloides* w zależności od ich struktury (długości łańcuchów O-swoistych, rodzaju reszt cukrowych oligosacharydu rdzenia i antygeny O, rodzaju dodatkowych niecukrowych podstawników oraz charakteru hydrofobowego/hydrofilowego cząsteczki). Nietypową cechą badanych oligosacharydów okazał się brak grup fosforanowych, równocześnie w tych strukturach zidentyfikowano reszty kwasów uronowych, których grupy karboksylowe pełnią funkcję ujemnie naładowanych reszt, istotnych w utrzymaniu struktury bakteryjnej błony komórkowej.

W toku moich badań zidentyfikowano cztery typy lipidów A wśród 85 dostępnych serotypów O *P. shigelloides*, wskazując na znaczny konserwatyzm tego fragmentu. Zidentyfikowano heterogenność związaną z obecnością różnych reszt drugorzędowych kwasów tłuszczowych. Zbadano wpływ różnic strukturalnych lipidów A *P. shigelloides* na aktywację mysich oraz ludzkich makrofagów (praca 3) (Załącznik 3, I.2.1[2]).

Wykorzystanie poliklonalnych surowic przeciwko poznanym oligosacharydom rdzenia *P. shigelloides* O13, O17, O51, O54, O74, umożliwiło wskazanie podobnych epitopów we fragmentach oligocukrów rdzeni wśród pozostałych LPS *P. shigelloides* a przeprowadzone badania strukturalne wybranych cząsteczek doprowadziły do wskazania trzech grup LPS posiadających w swojej strukturze identyczne fragmenty lipidów A oraz oligosacharydów rdzenia. Wybór tych grup wykonano w celu zbadania wpływu zdefiniowanych fragmentów cukrowych LPS *P. shigelloides* na aktywność biologiczną. Uczestniczę/uczestniczyłam w analizach strukturalnych większości wytypowanych do planowanych badań LPS *P. shigelloides*: (I) grupa 1: serotypy O54, O37, O24, O96 (dane własne, zidentyfikowana struktura oligocukru rdzenia); (II) grupa 2: serotypy O17, O36, O68 (dane nieopublikowane, zidentyfikowana struktura oligocukru rdzenia); (III) grupa 3: serotypy: O34, O51, O7 (dane nieopublikowane, zidentyfikowana struktura oligocukru rdzenia).

Wykorzystanie w tym celu zdefiniowanych cząsteczek LPS *P. shigelloides* daje możliwość badania właściwości wielu cukrowych fragmentów LPS w interakcji z receptorem TLR4/MD-2 na powierzchni komórek. Znaczący konserwatyzm lipidów A, podobieństwo

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

oligocukrów rdzeni oraz różnorodność antygenów O (uwzględniając często bardzo nietypowe reszty cukrowe w strukturach) *P. shigelloides* są doskonałym warsztatem do tak zaplanowanych badań.

Wyniki wstępnych badań zależności struktury LPS *P. shigelloides* a aktywności biologicznej zostały prezentowane przeze mnie podczas międzynarodowej konferencji 12th International Symposium of *Aeromonas* and *Plesiomonas* (ISAP 2017), 21-23 June, Mexico City, Mexico (wykład na zaproszenie Organizatora) (Załącznik 3, VIII.2).

✓ **analizy strukturalnej, badań właściwości immunochemicznych wybranych fragmentów LPS *K. pneumoniae*, *E. tarda*, *P. penneri*, *E. coli***

W latach 2012-2015 uczestniczyłam w projekcie europejskim (Klebsicure), którego celem było opracowanie strategii terapeutycznej polegającej na biernej immunizacji przy użyciu przeciwciał monoklonalnych, skierowanej przeciwko stale nowo pojawiającym się infekcjom wywoływanym przez lekooporne szczepy *Klebsiella* spp., którym towarzyszy wysoka śmiertelność. *K. pneumoniae* należą do jednych z najważniejszych patogenów wywołujących infekcje szpitalne. Zagrożenie ze strony tych lekoopornych szczepów *Klebsiella* stanowi istotny problem medyczny, szczególnie na oddziałach intensywnej terapii. Nadrzędnym celem projektu była identyfikacja wypreparowanych antygenów O *K. pneumoniae*, które następnie zostały wykorzystane do przygotowania biotynylowanych sond do selekcji przeciwciał monoklonalnych.

W projekcie skupiono się na trzech najczęściej występujących serotypach *K. pneumoniae*: O1, O2, O3. Podjęto próbę wyjaśnienia modyfikacji strukturalnych serotypów O1 oraz O2 zależnych od obecności operonu *gmlABC*, który odpowiada za modyfikacje powtarzającej się podjednostki antygeny O. Szczegółowe analizy strukturalne za pomocą spektroskopii ¹H-¹³C NMR, spektrometrii MALDI-TOF oraz metod analizy chemicznej wykazały obecność modyfikacji strukturalnej antygeny O, polegającej na obecności dodatkowej terminalnej reszty α-D-Galp w strukturze do tej pory znanego D-galaktanu I (D-gall). Tak zmodyfikowaną podjednostkę nazwano D-galaktanem III (D-galIII). Obecność D-galIII zidentyfikowano w serotypie O1 oraz O2 (Załącznik 3, 1.2.1[5], [9]). Obecność *gmlABC* wśród szczepów *K. pneumoniae* O2 jest zjawiskiem o istotnym znaczeniu, gdyż identyfikuje się go w 32 szczepach z 47 sprawdzonych izolatów klinicznych, a co więcej aż w 83% szczepach należących do hiperepidemicznego klonu *K. pneumoniae* ST258.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

Kompletne analizy strukturalne za pomocą spektroskopii ^1H - ^{13}C NMR oraz spektrometrii MALDI-TOF dla frakcji antygenów O trzech szczepów o serotypie O3 umożliwiły identyfikację różnych wariantów badanych podjednostek antygeny O tj. zbudowane one były kolejno z trzech, czterech oraz pięciu reszt mannoz w powtarzającej się podjednostce antygeny O. Ponadto, dla każdego z wariantów zidentyfikowano terminalną podjednostkę antygeny O zakończoną resztą MeP. Informacje na temat struktury tych podjednostek, umożliwiły liderowi projektu analizę podstaw genetycznych biosyntezy antygenów O3 (Załącznik 3, I.2.1[4]).

Równocześnie, uczestniczyłam w identyfikacji serotypów O otrzymanych izolatów klinicznych *K. pneumoniae* za pomocą HR-MAS NMR bezpośrednio na powierzchni komórek bakteryjnych oraz wykorzystując niezdegradowane preparaty LPS. Wykazano możliwość stosunkowo szybkiej identyfikacji serotypu O *K. pneumoniae* na podstawie widm ^1H oraz ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT dla LPS przy użyciu HR-MAS NMR.

Współpraca z zespołem prof. Juana M. Tomása (Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet w Barcelonie, Hiszpania) zaowocowała identyfikacją nowego typu oligocukru rdzenia wśród *E. tarda*. Przeprowadzone przeze mnie analizy strukturalne za pomocą spektroskopii ^1H - ^{13}C NMR oraz spektrometrii mas MALDI-TOF, wskazały na heterogenność tego fragmentu LPS związaną z obecnością dwóch populacji struktur rdzeniowych jak również z niestechiometrycznym podstawieniem glicyną, wpływającym na zwiększenie heterogenności tego fragmentu. W pracy uwzględniono również badania dotyczące charakterystyki genów odpowiedzialnych za biosyntezę oligosacharydu rdzenia *E. tarda* 202 (praca nr 4) (Załącznik 3, I.2.1[3]).

Współpraca z dr Agatą Palusiak (Uniwersytet Łódzki) zaowocowała identyfikacją nowego typu oligocukru rdzenia wśród *P. penneri*. Przeprowadzone analizy strukturalne za pomocą spektroskopii ^1H - ^{13}C NMR i spektrometrii mas ESI MSⁿ wykazały obecność nowego typu oligocukru rdzenia wśród 40 różnych przedstawicieli *P. penneri* oraz *P. mirabilis* (praca nr 5). (Załącznik 3, I.2.1[1]).

W latach 2010-2014 uczestniczyłam w projekcie NCBIr w którym poszukiwano substancji czynnej pochodzenia bakteryjnego obecnej w lizacie bakteriofagowym wykazującej aktywności immunostymulujące i przeciwpierzutowe. Wskazana substancja

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

czynna została wyizolowana z lizatu bakteriofagowego, stanowiącego mieszaninę produktów rozpadu bakteriofaga T4, bakterii Gram-ujemnej – *E. coli* B oraz podłoża hodowlanego.

Podczas trwania projektu zidentyfikowano kompletną strukturę oligosacharydu rdzenia *E. coli* B (do tej pory w literaturze opublikowana była błędna struktura tego fragmentu) wykorzystując technikę spektrometrii mas MALDI-TOF, ESI MSⁿ oraz spektroskopii ¹H, ¹³C NMR. Analizy wykazały heterogenność w badanym oligosacharydzie związaną z niestechiometrycznym podstawieniem przez PEtn. Glicynę w tej strukturze, zidentyfikowano za pomocą spektrometrii MALDI MS/MS na reszcie heptozy (Załącznik 3, I.2.1[11]).

We frakcji wykazującej aktywności przeciwpierwotowe zidentyfikowano de-*O*-acylowany lipooligosacharyd (LOS-OH) *E. coli* B. Częsteczka ta powstaje w wyniku usunięcia czterech reszt kwasów tłuszczowych ze struktury lipidu A *E. coli* B. LOS-OH *E. coli* B zbudowany jest z oligocukru rdzenia, połączonego wiązaniem kowalencyjnym z dwucukrem →6)-β-D-GlcpN4P-(1→6)-α-D-GlcpN1P podstawionym w pozycji N2 i N2' resztami kwasu R-3-hydroksytetradekanowego [14:0(3-OH)] (Załącznik 3, II.[2]). W trakcie projektu powstało również zgłoszenie patentowe dotyczące białka bakteriofagowego wiążącego endotoksyny oraz jego zastosowanie, w którym wykorzystywano zdefiniowaną cząsteczkę LOS *E. coli* B (Załącznik 3, II.[3]).

W latach 2009-2014 brałam aktywny udział w zadaniu badawczym dla Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ pt.: „Szczepionki przeciwbakteryjne nowej generacji: otrzymywanie, charakterystyka immunochemiczna, właściwości ochronne” w ramach projektu „Biotechnologia i zaawansowane technologie medyczne”. Koordynowane przeze mnie badania dotyczyły przygotowania koniugatu oligocukru rdzenia *E. coli* R3 z toksoidem tężcowym (OSR3-TT), jako potencjalnego składnika szczepionki antyendotoksynowej. Charakterystyka takich przeciwciał jest istotna z punktu widzenia zastosowania tych struktur jako antygeny szczepionkowe. W izolatach *E. coli* z różnych źródeł rdzeń typu R1 występuje najczęściej natomiast w strukturach LPS wielu izolatów klinicznych *E. coli* identyfikuje się oligosacharyd rdzenia typu R3, którego cząsteczka ma charakter zwitterjonu, co może mieć istotne znaczenie podczas interakcji z receptorami na komórkach układu immunologicznego. Struktury cukrowe o charakterze zwitterjonu są jedynymi cukrowymi strukturami rozpoznawanymi przez receptory TCR na limfocytach T (tj. są T-zależne). Przygotowane

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

i zidentyfikowane koniugaty OSR3-TT wykorzystuję obecnie w poszukiwaniu izolatów klinicznych *E. coli* z typem rdzenia R3.

Badania z LPS *E. coli* kontynuuję w obecnie wykonywanym projekcie MINIATURA, gdzie opracowywana jest wydajna i skuteczna metoda otrzymywania zdefiniowanych glikoform LPS na przykładzie *E. coli* O111 (typ oligocukru R3). Otrzymane glikoformy LPS zostaną wykorzystane do zbadania ich kinetyki oddziaływań z ludzkim kompleksem TLR4/MD-2 - za pomocą powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR). Umożliwi to poznanie wpływu zdefiniowanych składników cukrowych LPS *E. coli* O111 w interakcjach z rozpoznającym je receptorem na komórkach a tym samym ich wpływu na odpowiedź immunologiczną zakażonego organizmu. Zwitterjonowy charakter cząsteczek (typ rdzenia R3) może mieć istotne znaczenie podczas aktywacji cząsteczek prezentujących antygen, które prezentując za pomocą MHCII struktury zwitterjonowe aktywują limfocyty T do rozpoznawania tych struktur (przez receptor TCR).

Obecnie uczestniczę w projekcie Opus (2015-2018), którego celem są badania strukturalne związane z ogólnym schematem struktury endotoksyn bakteryjnych, tj. odpowiedzi na pytania dotyczące istnienia połączeń pomiędzy LPS a innymi antygenami powierzchniowymi, takimi jak enterobakteryjny wspólny antygen (ECA, *enterobacterial common antigen*), antygen K (antygen kapsularny, antygen otoczkowy), czy antygen M (CA, *colanic acid*), tj. występowania cząsteczek ECA_{LPS}, K_{LPS}, czy M_{LPS}. Zbadano panel szczepów szorstkich i gładkich bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* istotnych z punktu widzenia infekcji szpitalnych i wybranych z grupy obejmującej *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Shigella* spp., *P. shigelloides*. Analizy strukturalne prowadzone są metodami spektrometrii mas (MALDI-TOF i ESI-MS) oraz spektroskopii NMR (po wcześniejszym wyizolowaniu frakcji ECA_{LPS}). Ustalono kompletne struktury ECA_{LPS} w szorstkich szczepach *E. coli* R1 i R2. W szorstkim szczepie *E. coli* R3 nie zidentyfikowano ECA_{LPS} natomiast w przypadku szczepu *E. coli* R4 obecność tej struktury została zidentyfikowana jednak w mieszaninie z frakcją oligosacharydu rdzenia stąd obecnie prowadzone są próby wyizolowania frakcji ECA_{LPS}. Otrzymane wyniki były prezentowane podczas dwóch międzynarodowych konferencji naukowych (Załącznik 3, VIII.2[3], IX.2[20]).

21.05.2018

data

Marta Kaszowska

dr inż. Marta Kaszowska