

AUTOREFERAT

dr inż. Jolanta Łukasiewicz

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

Wrocław, 8 marca 2012

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

1. Jolanta Łukasiewicz

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

08.07.1997 - dyplom mgr inż. na kierunku Biotechnologia, specjalność: Biotechnologia Molekularna i Biokataliza, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, tytuł pracy magisterskiej: "Badania strukturalne i serologiczne lipopolisacharydu *Hafnia alvei* PCM 1207". Promotor: Prof. dr hab. Czesław Ługowski, *dyplom ukończenia studiów z wyróżnieniem*.

21.11.2001 - stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN (IITD PAN) we Wrocławiu na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt.: "Budowa chemiczna i właściwości biologiczne lipopolisacharydu *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 113/92". Promotor: Prof. dr hab. Czesław Ługowski, *praca doktorska wyróżniona przez Radę Naukową IITD PAN*.

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

od 01.07.2011 asystent, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu; Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek.

2002 – 30.06.2011 adiunkt, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu; Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek.

1997 - 2002 asystent, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu; Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów Szczepionek.

03.1997-07.1997 laborant, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu; Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

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

a) Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 5, objęty tytułem:

„Struktury i aktywności biologiczne endotoksyn *Hafnia alvei* i *Plesiomonas shigelloides* o odmiennych planach budowy regionu rdzeń-lipid A”

1. **J. Lukaszewicz**, T. Niedziela, W. Jachymek, L. Kenne i C. Lugowski. Structure of the lipid A-inner core region and biological activity of *Plesiomonas shigelloides* O54 (strain CNCTC 113/92) lipopolysaccharide.

Glycobiology, 2006, 16: 538-550. IF¹ 3.668 / MNiSW²: 24

Indywidualny wkład w autorstwo: 80 %, autor korespondencyjny, wiodący udział w planowaniu eksperymentów i przygotowaniu pracy do druku, prowadzenie hodowli bakteryjnych, otrzymanie LPS i de-N,O-acylowanego LPS, uzyskanie i analiza widm NMR, analiza absolutnej konfiguracji kwasów tłuszczowych, wykonanie i analiza widm masowych MALDI-TOF, analiza aktywności biologicznych.;

2. **J. Lukaszewicz**, M. Dzieciatkowska, T. Niedziela, W. Jachymek, A. Augustyniuk, L. Kenne i C. Lugowski. Complete lipopolysaccharide of *Plesiomonas shigelloides* O74:H5 (strain CNCTC 144/92). 2. Lipid A, its structural variability, the linkage to the core oligosaccharide, and the biological activity of the lipopolysaccharide.

Biochemistry, 2006, 45: 10434-10447. IF 3.633 / MNiSW: 20

Indywidualny wkład w autorstwo: 70 %, autor korespondencyjny, wiodący udział w planowaniu eksperymentów i przygotowaniu pracy do druku, udział w przeprowadzeniu analizy jakościowej kwasów tłuszczowych, udział w wykonaniu i interpretacji eksperymentów NMR, wykonanie i analiza widm masowych MALDI-TOF i ESI-MSⁿ.

¹ Wartość współczynnika wpływu (*Impact Factor*), zgodnie z rokiem opublikowania.

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

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

3. **J. Lukaszewicz**, T. Niedziela, W. Jachymek, L. Kenne i C. Lugowski. Two Kdo-heptose regions identified in *Hafnia alvei* 32 lipopolysaccharide: the complete core structure and serological screening of different *Hafnia* O-serotypes.

Journal of Bacteriology, 2009, 191: 533-544. **IF 3.940 / MNiSW: 24**

Indywidualny wkład w autorstwo: 75 %, autor korespondencyjny, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i przygotowaniu pracy do druku, preparacja LPS, de-N,O-acylowanych LPS i oligocukrów, udział w wykonaniu i interpretacji eksperymentów NMR, wykonanie i interpretacja widm masowych, przygotowanie neoglikokoniugatu, immunizacja zwierząt, absorbcja przeciwciał i wykonanie badań serologicznych.

4. **J. Lukaszewicz**, W. Jachymek, T. Niedziela, L. Kenne i C. Lugowski. Structural analysis of the lipid A isolated from *Hafnia alvei* 32 and PCM 1192 lipopolysaccharides.

Journal of Lipid Research, 2010, 51: 564-74. **IF 6.115 / MNiSW: 32**

Indywidualny wkład w autorstwo: 80 %, autor korespondencyjny, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i przygotowaniu pracy do druku, izolacja i oczyszczanie LPS i lipidów A, udział w przeprowadzeniu analizy jakościowej kwasów tłuszczowych, wykonanie analiz MALDI-TOF MS i ESI-MS³ oraz interpretacja widm masowych.

5. A. Swierzko, **J. Lukaszewicz**, A. Maciejewska, W. Jachymek, T. Niedziela, M. Matsushita, M. Cedzynski i C. Lugowski. New functional ligands for ficolin-3 among lipopolysaccharides of *Hafnia alvei*.

Glycobiology, 2012, 22: 267-280. **IF 3.791³ / MNiSW: 32**

Indywidualny wkład w autorstwo: 60 %, autor korespondencyjny, udział w opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku, wiodący udział w planowaniu doświadczeń dotyczących badań strukturalnych i syntezy neoglikokoniugatu (kierownik projektu badawczego obejmującego zakres pracy), prowadzenie hodowli bakteryjnych, izolacja i oczyszczanie LPS, poli- i oligosacharydów, wykonanie i udział w interpretacji eksperymentów NMR, wykonanie i interpretacja widm masowych.

³ Wartość współczynnika wpływu za rok 2010.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

b) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Proponowana rozprawa habilitacyjna stanowi jednotematyczny cykl pięciu prac oryginalnych (Załącznik 5) poświęconych badaniom strukturalnym endotoksyn bakteryjnych. Endotoksyny (lipopolisacharydy, LPS) stanowią integralny składnik błony zewnętrznej osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Lipopolisacharydy są niezbędne do funkcjonowania i przeżywalności bakterii oraz odgrywają istotną rolę jako czynniki wirulencji bakterii Gram-ujemnych w przypadkach uogólnionych zakażeń, sepsy i wstrząsu septycznego.

Cząsteczki LPS, podobnie jak bakteryjne DNA, wirusowe RNA, glikolipidy mykobakterii, kwasy lipotejchajowe, mannany drożdży czy lipoproteiny bakterii Gram-dodatnich stanowią tzw. wzorce molekularne patogenów (*pathogen-associated molecular pattern, PAMP*), tj. struktury charakterystyczne dla drobnoustrojów i jednocześnie obce dla organizmów eukariotycznych. Ponadto o ważności PAMP dla drobnoustrojów świadczy fakt ich konserwatywności, nie podlegają one bowiem częstym zmianom w procesie ewolucji. W odpowiedzi na PAMP, komórki układu odpornościowego organizmów eukariotycznych wykształciły uniwersalny system receptorów zdolnych do rozpoznawania i indukcji reakcji obronnej skierowanej przeciwko PAMP. Należy tu wyróżnić receptory „Toll-like” (TLR), zamiatacze (*scavenger*), receptor mannozowy oraz wiele cząsteczek rozpuszczalnych rozpoznających wzorce molekularne PAMP, jak składniki układu dopełniacza, kolektyny oraz antybakteryjne peptydy. W przypadku wszystkich tego typu cząsteczek, to właśnie ich cechy strukturalne przekładają się na zdolność opisanych mechanizmów do szybkiej i niezawodnej reakcji.

Cząsteczki LPS izolowane z gładkich form bakterii, niezależnie od pochodzenia, charakteryzują się ogólnym planem budowy obejmującym trzy regiony:

(1) **łańcuch O-swoisty** (polisacharyd O-swoisty) - polimer złożony z powtarzających się podjednostek oligosacharydowych. Region ten wykazuje wysoką zmienność strukturalną i determinuje serologiczną swoistość LPS (swoistość O-antygenową);

(2) **oligocukier rdzenia** stanowiący centralną część LPS, który cechuje ograniczona zmienność w obrębie gatunku. W regionie tym wyróżnia się część dystalną względem lipidu A, nazywaną rdzeniem zewnętrznym lub regionem heksozowym, oraz część proksymalną względem lipidu

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

A, nazywaną rdzeniem wewnętrznym lub regionem heptozowym. Charakterystyczne podstawniki niecukrowe to m. in. grupy fosforanowe (P) i pirofosforanowe (PP), etanolamina (Etn) i glicyna.

(3) **lipid A** – region kotwiczący LPS w błonie zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Zbudowany jest u większości *Enterobacteriaceae* z dwucukru β -D-Glc_pN-(1→6)- α -D-Glc_pN podstawionego kwasami tłuszczowymi, grupami fosforanowymi oraz cukrowymi lub niecukrowymi podstawnikami, np. PEtn. Lipid A połączony jest z oligocukrem rdzenia wiązaniem ketozydowym pomiędzy cząsteczką Kdo oligocukru rdzenia i resztą β -D-Glc_pN na końcu nieredukującym szkieletu cukrowego lipidu A. Aktywność biologiczna LPS zależna jest od struktury lipidu A, który charakteryzuje się najmniejszą zmiennością strukturalną i stanowi centrum toksyczności LPS.

Obecne w organizmie ludzkim, zarówno dzielące się jak i martwe bakterie Gram-ujemne, uwalniają do krwiobiegu endotoksynę. Oddziaływanie LPS z receptorami obecnymi na powierzchni makrofagów/monocytów, limfocytów i komórek śródbłonna indukuje syntezę, a następnie uwalnianie czynników prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor*, TNF- α), interleukiny (IL-1, 6, 8), prostaglandyny, leukotrieny, czynnik aktywujący płytki krwi (*platelet-activating factor*, PAF), tlenek azotu i wolne rodniki tlenowe. Sposób w jaki endotoksyna ujawnia swoją aktywność biologiczną, niebezpieczną dla zainfekowanego organizmu, czyni z tej cząsteczki nietypową toksynę bakteryjną. Najważniejszą rolę odgrywa w tym procesie zaangażowanie składników układu odpornościowego gospodarza. LPS, w kontakcie z komórkami układu odpornościowego, stymuluje je do efektywnego zahamowania infekcji. Sytuacja staje się jednak niebezpieczna podczas uogólnionych zakażeń bakteryjnych, kiedy komórki docelowe dla LPS stymulowane są przez dużą liczbę obecnych w krwiobiegu cząsteczek endotoksyny. Dochodzi wtedy do nadprodukcji mediatorów, obniżenia ciśnienia krwi, wysokiej gorączki, rozsianego wewnątrznaczyniowego krzepnięcia krwi, a w konsekwencji śmiertelnego wstrząsu septycznego.

Kluczowym kompleksem receptorowym uczestniczącym w mechanizmach odporności wrodzonej, wiążącym lipid A cząsteczki LPS, jest kompleks CD14/TLR4/MD-2 obecny, między innymi, na powierzchni makrofagów, monocytów, neutrofilów i limfocytów B. Regionem LPS

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

wiązaniem przez kompleks CD14/TLR4/MD-2 jest lipid A. Pozostałe regiony endotoksyny wpływają modulująco na aktywność lipidu A. Warto jednak podkreślić, że wysoka zmienność strukturalna w obrębie łańcuchów O-swoistych pozwala bakteriom unikać składników zależnej od przeciwciał odporności nabytej. Niemniej jednak, struktury cukrowe niektórych łańcuchów O-swoistych i oligocukrów rdzeni mogą być rozpoznawane przez czynniki odporności wrodzonej, takie jak lektyny układu dopełniacza: lektyna wiążąca mannan (MBL, *mannan-binding lectin*) oraz fikolina-1 (M), -2 (L) i -3 (H). Lektyny wiążą swoiście określone struktury cukrowe na powierzchni mikroorganizmów i aktywują mechanizmy efektorowe, takie jak układ dopełniacza, aglutynacja, opsonizacja, fagocytoza lub modulują odpowiedź prozapalną lub alergiczną.

Przedstawiony do oceny cykl prac obejmuje trzy zagadnienia badawcze stanowiące przedmiot moich zainteresowań naukowych:

- **analiza strukturalna kompletnych struktur lipopolisacharydów,**
- **zależności między strukturą a aktywnością biologiczną lipopolisacharydów,**
- **swoistość oddziaływań endotoksyn ze składnikami układu dopełniacza.**

Przedłożony cykl publikacji obejmuje analizę strukturalną lipopolisacharydów dwóch gatunków Gram-ujemnych bakterii, *Hafnia alvei* i *Plesiomonas shigelloides*.

H. alvei jest oportunistycznym patogenem wywołującym infekcje (posocznica, sepsa, choroby układu oddechowego) u osób z obniżoną odpornością, noworodków i chorych z istniejącymi przewlekłymi chorobami i nowotworami. Bakterie te izoluje się w przypadkach mieszanych infekcji szpitalnych. Są one odpowiedzialne za groźne infekcje na fermach kurzych i hodowlach pstrągów. Lipopolisacharydy tych bakterii badano od lat skupiając się na charakterystyce łańcuchów O-swoistych i oligocukrów rdzeni.

Plesiomonas shigelloides wywołuje ostre infekcje jelitowe (biegunka podróżnych) i jest trzecim pod względem częstości występowania czynnikiem wywołującym tego typu zakażenia w Azji wschodniej w grupie obejmującej *Vibrio parahaemolyticus*, *Samonella* spp., *Campylobacter* spp., *Aeromonas* spp. i *Shigella* spp. Infekcje pozajelitowe wywoływane przez ten gatunek są rzadsze (zapalenie woreczka żółciowego, septyczne zapalenie stawów, zapalenie gałki ocznej, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i bakteriemia), ale w przypadkach zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i sepsy, są przyczyną wysokiej

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

śmiertelności. Lipopolisacharydy *P. shigelloides* są słabo poznane zarówno pod kątem struktury chemicznej, jak i aktywności biologicznej. Wyniki przedstawione w prezentowanych przeze mnie pracach stanowią jedne z pierwszych doniesień dotyczących struktury LPS *P. shigelloides*.

Cechą wspólną przedłożonych publikacji jest kompleksowe podejście do analizy strukturalnej lipopolisacharydów opisanych powyżej bakterii. Nadrzędnym celem było ustalenie pełnej struktury lipopolisacharydów, tzn. określenie struktur i połączeń pomiędzy poszczególnymi regionami LPS: łańcuchem O-swoistym, oligocukrem rdzenia i lipidem A. Wymogiem dla tego typu badań było wyjście poza schemat klasycznej analizy LPS, polegającej na ustalaniu struktury jedynie dla izolowanych fragmentów: polisacharydu O-swoistego, oligocukru rdzenia i lipidu A. Oddzielenie lipidu A od frakcji oligocukrów rdzenia i łańcuchów O-swoistych ułatwia obecność kwasolabilnego wiązania pomiędzy resztą Kdo oligocukru rdzenia a lipidem A. Podejście takie dominuje w piśmiennictwie poświęconym badaniom strukturalnym LPS. Niezależnie od pochodzenia LPS, jedynie analiza de-*N,O*-acylowanych pochodnych, uzyskanych w wyniku łagodnej hydrazynolizy i/lub hydrolizy 4M KOH, pozwala na zachowanie labilnych wiązań ketozydowych i odkrycie wcześniej niezidentyfikowanych składników i połączeń. Kluczem do pełnej charakterystyki strukturalnej tych cząsteczek było stosowanie szeregu uzupełniających się chemicznych metod analitycznych oraz nowoczesnych technik instrumentalnych, takich jak spektrometria mas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*), wielostopniowa spektrometria mas (MS^n) ze źródłem jonów ESI (*electrospray ionization*), spektrometria mas sprzężona z chromatografią gazową (GC-MS) oraz spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*nuclear magnetic resonance, NMR*). Ponadto podkreślenia wymaga fakt, że badanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną endotoksyn wymagało uprzedniej szczegółowej analizy lipidu A – regionu zaangażowanego w oddziaływanie LPS z receptorami komórek docelowych organizmu gospodarza. W przypadku obu wymienionych gatunków bakterii przedstawione prace stanowią pierwsze i jak dotychczas jedyne doniesienia opisujące w sposób szczegółowy analizę tak ważnego dla wirulencji tych Gram-ujemnych bakterii regionu.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

Za najważniejsze osiągnięte rezultaty uważam:

- Określenie struktur kompletnych lipopolisacharydów izolowanych z *P. shigelloides* O54 i O74, z uwzględnieniem wpływu ich budowy na ich charakter fizykochemiczny i aktywności biologiczne (np. hydrofobowość, podwyższona aktywność *in vivo*).
- Określenie kompletnych struktur form szorstkich endotoksyn izolowanych z *H. alvei* 32 i PCM 1192. Identyfikacja i lokalizacja trójcukrów zawierających Kdo w regionie zewnętrznym oligocukru rdzenia.
- Identyfikacja łącznika (dwucukier Hep-Kdo) wskazującego na sposób podstawienia oligocukru rdzenia polisacharydem O-swoistym w lipopolisacharydach *H. alvei*.
- Szczegółowa analiza heterogenności lipidów A *P. shigelloides* i *H. alvei*, wykonana po raz pierwszy w przypadku obu gatunków bakterii.
- Identyfikacja bakteryjnych ligandów dla dwóch składników drogi lektynowej dopełniacza, elementów wrodzonej odporności - ludzkiej fikoliny-3 (H) oraz białka wiążącego mannan (MBL) wśród lipopolisacharydów *H. alvei*. Otrzymane wyniki stanowiły pierwsze na świecie doniesienie na temat w pełni scharakteryzowanego pod względem strukturalnym ligandu dla fikoliny-3, co ma szczególne znaczenie biorąc pod uwagę znikomą wiedzę na temat specyficzności tej lektyny.
- Zaprojektowanie i otrzymanie neoglikokoniugatu białka nośnikowego z fragmentem LPS selektywnie rozpoznawanego wyłącznie przez fikolinę-3 i zastosowanie go do pomiaru stężenia i aktywności fikoliny-3 i jej kompleksów z MASP-2 w płynach ustrojowych (pomiaru wolne od wpływu na wiązanie pozostałych czynników drogi lektynowej układu dopełniacza: MBL, fikolina-1, fikolina-2).

W kolejnej części autoreferatu przedstawiono podsumowanie wyników opisanych w wybranych do oceny publikacjach.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

J. Lukasiewicz, T. Niedziela, W. Jachymek, L. Kenne i C. Lugowski. Structure of the lipid A-inner core region and biological activity of *Plesiomonas shigelloides* O54 (strain CNCTC 113/92) lipopolysaccharide. **Glycobiology**, 2006, 16: 538-550.

Celem pracy była analiza strukturalna pełnej cząsteczki LPS *P. shigelloides* O54 (szczep CNCTC 113/92), a w szczególności określenie połączenia między oligocukrem rdzenia i lipidem A, identyfikacja dodatkowych kwasolabilnych podstawników w regionie rdzenia i szczegółowa analiza heterogennej frakcji lipidu A. Przedstawiona praca jest pierwszym doniesieniem na temat pełnej struktury LPS tych słabo dotychczas scharakteryzowanych bakterii.

Trudność podjętych badań wynikała ze skomplikowanej budowy i heterogenności frakcji de-*N,O*-acylowanych fragmentów LPS, uzyskanych po usunięciu estrowo i amidowo związanych kwasów tłuszczowych w wyniku przeprowadzenia łagodnej hydrazynolizy, a następnie hydrolizy w obecności 4 M KOH. Frakcję homogenną uzyskano metodą chromatografii powinowactwa na złożu z immobilizowaną serotoniną, opracowaną przeze mnie we współpracy z prof. Czesławem Ługowskim. W metodzie tej wykorzystano opisywane w piśmiennictwie zjawisko oddziaływania serotoniny z resztami kwasu 2-keto-3-deoxy-oktulozonowego (Kdo). Zastosowana procedura degradacji pozwoliła zachować wszystkie obecne w cząsteczce LPS kwasolabilne wiązania ketozydowe, co pozwoliło następnie ustalić połączenie pomiędzy oligocukrem rdzenia i lipidem A. Ponadto, przy użyciu metod analizy chemicznej i spektrometrii mas MALDI-TOF, określono po raz pierwszy strukturę lipidu A *P. shigelloides*. W celu określenia miejsc podstawienia kwasami tłuszczowymi wykorzystano różnice w jonizacji lipidu A w trybie ujemnym i dodatnim podczas analizy przy pomocy spektrometrii MALDI-TOF. Interesującymi właściwościami badanej cząsteczki, odróżniającymi ją od większości dotychczas badanych LPS *Enterobacteriaceae*, był brak grup fosforanowych, obecność kwasów uronowych w regionie oligocukru rdzenia i heksoz w regionie rdzenia wewnętrznego.

Przeprowadzono także porównanie aktywności biologicznej badanego LPS w testach *in vitro* i *in vivo* z typowym dla rodziny *Enterobacteriaceae* LPS *E. coli* O55. Porównując LPS *P. shigelloides* 113/92 (brak P, PP, PPEtn w oligocukrze rdzenia) z LPS *E. coli* O55 (klasyczny

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

plan budowy LPS, obecność P, PP i PPEtn) można przypuszczać, że zwiększona aktywność *in vivo* LPS 113/92, przy podobnej aktywności *in vitro*, może wynikać z braku grup fosforanowych w oligocukrze rdzenia. Wiadomo, że brak grup fosforanowych nie wpływa na oddziaływanie lipidu A z receptorami makrofagów (układ *in vitro*), natomiast czyni LPS 113/92 bardziej odpornym na działanie neutralizujące kationowych antybakteryjnych peptydów w układzie *in vivo*.

J. Lukaszewicz, M. Dzieciatkowska, T. Niedziela, W. Jachymek, A. Augustyniuk, L. Kenne i C. Lugowski. Complete lipopolysaccharide of *Plesiomonas shigelloides* O74:H5 (strain CNCTC 144/92). 2. Lipid A, its structural variability, the linkage to the core oligosaccharide, and the biological activity of the lipopolysaccharide. **Biochemistry**, 2006, 45: 10434-10447.

Badania dotyczyły pełnej struktury LPS *P. shigelloides* O74:H5 (szczep CNCTC 144/92), a przede wszystkim określenia wiązania pomiędzy oligocukrem rdzenia i lipidem A. Analizie strukturalnej przy użyciu metod chemicznych i instrumentalnych (NMR, MALDI-TOF MS, ESI-MSⁿ) poddano de-*N,O*-acylowany LPS, potwierdzając opublikowaną wcześniej strukturę oligocukru rdzenia (Zał. 3, I.2.1 [13]) i identyfikując dodatkową terminalną resztę Kdo, która tracona jest w przypadku klasycznego podejścia do analizy strukturalnej LPS (kwaśna hydroliza). Podobnie jak w przypadku LPS 113/92, nie stwierdzono obecności niecukrowych podstawników, takich jak P, PP i PPEtn, typowych dla „klasycznego” planu budowy LPS *Enterobacteriaceae*. Region lipidu A badanych frakcji LPS charakteryzował się dużą heterogennością wynikającą z obecności trzech dominujących form lipidu A, w których różnice dotyczyły podstawników acylowych o strukturach 14:0(3-*O*-9c-16:1), 14:0(3-*O*-14:0) lub 14:0(3-*O*-12:0) w pozycji N-2'. Szczegółową analizę strukturalną zidentyfikowanych form przeprowadzono przy użyciu techniki ESI-MSⁿ. Uwagę zwraca fakt, że identyfikacja w strukturze lipidu A rzadko spotykanego składnika, kwasu *cis*-9-heksadekanowego (9c-16:1), może wskazywać na związek takiej modyfikacji z mechanizmami patogenezы tego gatunku, co ma także miejsce u *Yersinia* spp., *E. coli* i *Salmonella* i jest elementem indukowanym w odpowiedzi na niską temperaturę bytowania patogenu, modulującym płynność błony zewnętrznej ściany komórkowej tych bakterii. Dodatkowo, lipopolisacharydy

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

144/92 stanowiły pierwszy przypadek w analizowanej grupie endotoksyn *P. shigelloides*, w których podczas otrzymywania LPS metodą ekstrakcji wodno-fenolowej, uzyskiwano preparat zarówno z fazy wodnej, jak i fenolowej. W świetle obecnie prowadzonych badań jest to niezwykle intrygująca i jak pokazują kontynuowane badania, powszechna cecha LPS *P. shigelloides*, która wskazuje na słuszny kierunek poszukiwania jej ewentualnej roli w patogenezie tego gatunku. Interesujące właściwości fizykochemiczne badanych LPS skłoniły nas do podjęcia próby oceny aktywności biologicznych frakcji wodnej i fenolowej LPS w testach *in vitro*. Lipopolisachrydy izolowane z fazy wodnej i fenolowej wykorzystano do stymulacji makrofagopodobnej linii komórkowej J774.A1, podczas której mierzono poziom TNF- α , IL-6 i NO (główne cytokiny, których wytwarzanie indukowane jest poprzez oddziaływanie LPS z kompleksem receptorowym CD-14/TLR-4/MD-2). Obserwowano istotne różnice statystyczne między badanymi preparatami LPS. Biorąc pod uwagę hydrofobowy charakter większości izolowanych LPS *P. shigelloides*, można przypuszczać, że na aktywność biologiczną takich cząsteczek będzie miał wpływ charakter agregatów tworzonych w środowisku wodnym, który będzie różny w przypadku LPS izolowanego z fazy fenolowej i wodnej.

J. Lukaszewicz, T. Niedziela, W. Jachymek, L. Kenne i C. Lugowski. Two Kdo-heptose regions identified in *Hafnia alvei* 32 lipopolysaccharide: the complete core structure and serological screening of different *Hafnia* O-serotypes. **Journal of Bacteriology**, 2009, 191: 533-544.

Opisane w pracy badania strukturalne dotyczyły określenia lokalizacji w strukturze lipopolisacharydów *H. alvei* 32 i PCM (*Polish Collection of Microorganisms*) 1192 kwasolabilnego trójcukru zawierającego Kdo:



Tego typu trójcukry były wcześniej identyfikowane we frakcjach oligocukrów LPS *H. alvei* otrzymywanych w wyniku klasycznej procedury degradacji LPS (kwaśna hydroliza), jednak ze względu na kompleksowość wymaganych analiz nie ustalono ich lokalizacji w strukturze LPS. Analizie strukturalnej przy pomocy spektroskopii NMR oraz spektrometrii masowej MALDI-TOF i ESI-MS poddano de-*N,O*-acylowane LPS 32 i 1192, w których zachowano kwasolabilne wiązania pomiędzy resztami Kdo a pozostałymi składnikami cząsteczki. Wykazano, że ww.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

trójcukier stanowi integralną, dystalną część regionu zewnętrznego oligocukru rdzenia. Biorąc pod uwagę wyniki analiz strukturalnych polisacharydu O-swoistego *H. alvei* przedstawione w pracy nr 5 cyklu publikacji, wszystko wskazuje na to, że tego typu fragmenty stanowią łącznik pomiędzy polisacharydem O-swoistym a oligocukrem rdzenia (Zał. 3, IX.2.[4], wyniki nieopublikowane). Opierając się na różnicach strukturalnych między LPS 32 (ww. trójcukier) i PCM 1207 (dwucukier L- α -D-Hep-(1 \rightarrow 4)- α -Kdo-(2 \rightarrow), dane nieopublikowane, Zał. 3 IX.2 [4]), oczyszczono metodą chromatografii powinowactwa poliklonalne przeciwciała swoiście rozpoznające terminalną resztę α -D-Galp6OAc w ww. trójcukrze. Przeciwciała te wykorzystano jako narzędzie w przesiewowych poszukiwaniach obecności takiego trójcukru w lipopolisacharydach izolowanych z 37 szczepów *H. alvei*. Obecność poszukiwanego trójcukru stwierdzono również, poza LPS 32 i 1192, w LPS *H. alvei* 974, PCM 1188, PCM 1198, PCM 1204 i PCM 1214. Przedstawiona praca stanowi pierwsze doniesienie wskazujące na lokalizację tego typu kwasolabilnych elementów w lipopolisacharydach *H. alvei*. Ich obecność wydaje się być cechą charakterystyczną endotoksyn *H. alvei*, co wykazano w przeprowadzonych badaniach immunoenzymatycznych. To rzadka cecha u *Enterobacteriaceae*, a obecność reszt Hep i Kdo w regionie zewnętrznym oligocukru rdzenia LPS wykazano dotychczas jedynie u *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* i *Rhizobium etli*.

J. Lukaszewicz, W. Jachymek, T. Niedziela, L. Kenne i C. Lugowski. Structural analysis of the lipid A isolated from *Hafnia alvei* 32 and PCM 1192 lipopolysaccharides. **Journal of Lipid Research**, 2010, 51: 564-74.

Publikacja dotyczyła szczegółowej analizy instrumentalnej lipidu A czterech lipopolisacharydów *H. alvei* 32 i PCM 1192, 1206, 1207. Punktem wyjścia dla opisanych analiz była znajomość budowy szkieletu cukrowego badanych lipidów A, która określono określonej w badaniach strukturalnych de-*N,O*-acylowanego LPS 32 (Zał. 3, I.2.1 [16]). Skład amidowo- i estrowo związanych kwasów tłuszczowych ustalono przy pomocy GC-MS. Przy użyciu wielostopniowej spektrometrii mas (ESI-MSⁿ) zidentyfikowano miejsca podstawienia szkieletu cukrowego kwasami tłuszczowymi. Analizom ESI-MSⁿ poddano heterogenną

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

mieszanie kilku populacji lipidu A, co umożliwiło określenie dokładnej struktury zarówno form heksa-, jak i heptaacylowanych oraz mono- i bisfosforylowanych. Praca ta stanowiła pierwsze doniesienie dotyczące struktury lipidu A w LPS *H. alvei*. Wykazano obecność struktur podobnych do lipidów A spotykanych w LPS *E. coli*, czyli takich, które potencjalnie mogą wykazywać pełną aktywność biologiczną typową dla endotoksyn bakteryjnych o klasycznym typie budowy lipidu A. Ponadto, wykazano obecność formy heptaacylowanej, która charakteryzowała się obecnością drugorzędowego kwasu tłuszczowego 16:0 w pozycji N-2 proksymalnej reszty GlcN szkieletu cukrowego lipidu A. Tego typu modyfikacja, nazywana palmitylacją, z towarzyszącym jej często podstawieniem 4-amino-4-deoxy-L-arabinopyranozą (Ara_pN) i Etn, pozwala bakteriom Gram-ujemnym (np. *Salmonella* spp.) unikać mechanizmów obronnych układu odpornościowego gospodarza, umożliwiając bytowanie bakterii we wnętrzu makrofaga, czy komórek śródbłónka. Ostatnie doniesienia wskazują na zdolność *H. alvei* do inwazji i namnażania się w ludzkich komórkach śródbłónka. Ponadto, obecność heptaacylowanych form zwiększa stabilność ściany komórkowej, co w połączeniu

z nagromadzeniem dodatnich ładunków w szkielecie lipidu A (Etn i Ara_N) utrudnia skuteczną odpowiedź kompleksu receptorowego CD14/TLR4 i działanie kationowych peptydów antybakteryjnych powodujących dezintegrację ściany komórkowej, a następnie rozpad komórki bakteryjnej. Zjawisko palmitylacji wykorzystywane jest w procesie patogenezy przez bakterie, takie jak *Salmonella enterica* serowar Typhimurium, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*, *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*.

A. Swierzko, J. Lukasiewicz, A. Maciejewska, W. Jachymek, T. Niedziela, M. Matsushita, M. Cedzynski i C. Lugowski. New functional ligands for ficolin-3 among lipopolysaccharides of *Hafnia alvei*. **Glycobiology**, 2012, 22: 267-280.

Przedstawiona praca dotyczy oddziaływania dwóch istotnych dla wrodzonej odporności cząsteczek: ludzkiej fikoliny-3 (fikoliny H) – kluczowego, słabo scharakteryzowanego elementu układu dopełniacza oraz lipopolisacharydów wyizolowanych z 45 szczepów

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

H. alvei. Wstępem do identyfikacji nowych ligandów fikoliny-3 były zapoczątkowane przede mną badania strukturalne lipopolisacharydów *H. alvei*. Okazało się, że większość lipopolisacharydów tego gatunku bakterii oddziałuje z ludzką MBL, jednym z kluczowych aktywatorów drogi lektynowej dopełniacza (Zał. 3, IX.2 [5 i 6], wyniki nieopublikowane). Ocena specyficzności wiązania wybranych LPS *H. alvei* z MBL wymagała doświadczeń kontrolnych opisujących oddziaływanie tych lipopolisacharydów z pozostałymi aktywatorami lektynowej drogi układu dopełniacza: fikoliną-1 (M), fikoliną-2 (L) i fikoliną-3 (H). W wyniku przeprowadzonych badań przesiewowych zidentyfikowano 4 lipopolisacharydy *H. alvei* (LPS 23, PCM 1200, PCM 1203 i PCM 1205), rozpoznawane przez fikolinę-3. Oddziaływanie to było specyficzne i dotyczyło łańcuchów O-swoistych. Stanowiło bardzo ciekawe odkrycie dotyczące specyficzności tych lektyn. Praca ta stanowi bowiem pierwsze tak szczegółowe doniesienie na temat struktury chemicznej ligandów rozpoznawanych przez fikolinę-3. Specyficzność fikoliny-3 względem ligandów wciąż jest bardzo słabo scharakteryzowana. Dotychczas spośród ligandów tej lektyny identyfikowano jedynie polisacharyd izolowany z *Aerococcus viridans* 86965 (brak danych na temat struktury), N-acetylowane BSA (ligand niewystępujący w naturze) oraz antygeny powierzchniowe komórek linii białaczkowej apoptotycznych limfocytów T (linii komórkowej Jurkat, brak danych na temat struktury chemicznej rozpoznawanych cząsteczek). Donoszono również, że fikolina-3 prawdopodobnie wiąże się z LPS *Salmonella* serowar Minnesota i Typhimurium oraz *E. coli*, co wykazano jedynie pośrednio w testach na aglutynację i hamowanie aglutynacji ludzkich erytrocytów.

Wykazano zdolność badanych kompleksów LPS/fikolina-3 do inicjacji drogi lektynowej układu dopełniacza w sposób selektywny, niezależny od innych kluczowych elementów dopełniacza: MBL, fikoliny-1 i -2 oraz immunoglobulin. Selektywność zidentyfikowanych ligandów pozwoliła na zaprojektowanie neoglikokoniugatu frakcji polisacharydu O-swoistego (PS1) z białkiem (BSA, *bovine serum albumin*) w celu otrzymania narzędzia diagnostycznego służącego do pomiarów stężenia i aktywności fikoliny-3 w płynach ustrojowych. Biorąc pod uwagę fakt, że dotychczas opisano zaledwie kilka ligandów dla fikoliny-3, słabo scharakteryzowanych pod względem struktury, otrzymane wyniki stanowią istotny wkład w badania prowadzące do określenia wspólnych i typowych cech ligandów wiązanych przez tę lektynę. Praca składa się z części biologicznej oraz części dotyczącej analizy strukturalnej

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

polisacharydów O-swoistych otrzymywanych w wyniku kwaśnej hydrolizy LPS 1200. W projektowaniu odpowiedniego ligandu kluczową rolę odegrały wyniki moich wcześniejszych badań nad kompletnymi strukturami lipopolisacharydów *H. alvei* (Załącz. 3, I.2.1 [16] oraz IX.2 [4,5,6]). Analizie poddano frakcje polisacharydów O-swoistych zbudowanych z różnej liczby podjednostek. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły strukturę podjednostki łańcucha O-swoistego, doprowadziły do określenia struktury biologicznej podjednostki oraz zidentyfikowania nowego typu łącznika, zawierającego resztę Kdo, pomiędzy łańcuchem O-swoistym a oligocukrem rdzenia, stanowiącego fragment następującej struktury: *łańcuch O-swoisty-[L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 8)]-(1 \rightarrow 7)- α -Kdop-(2 \rightarrow ?)*-oligocukier rdzenia. Zawarte w pracy wyniki analiz strukturalnych wskazują na ogólny plan budowy większości LPS *H. alvei*, niezależnie od motywów zawierających Kdo znajdujących się w szorstkich formach LPS (dwucukier, trójcukier liniowy i rozgałęziony). Wyniki te stanowią uzupełnienie badań przedstawionych przeze mnie w postaci trzech referatów na konferencjach międzynarodowych (Załącz. 3, IX.2 [4,5,6]). Wskazują one na ogólny plan budowy gładkiego LPS *H. alvei* o typowej strukturze oligocukru rdzenia.

Wykazano ponadto, że lipopolisacharydy *H. alvei* zdolne są do aktywacji układu dopełniacza poprzez oddziaływanie z fikoliną-3 i MBL, odpowiednio w regionie łańcuchów O-swoistych i regionie oligocukrów rdzenia.

Obecność elementu Hep-Kdo w regionie zewnętrznym oligocukru rdzenia umożliwiła zaprojektowanie neoglikokoniugatu zawierającego ligand pozbawiony części rdzeniowej LPS, który zapewnia selektywne wiązanie fikoliny H i umożliwia selektywny (niezależny od pozostałych fikolin) pomiar stężenia i aktywności fikoliny H w płynach ustrojowych. Zaproponowane rozwiązanie stało się przedmiotem krajowego zgłoszenia patentowego P.391475 oraz zgłoszenia międzynarodowego PCT/PL2011/050024 (Załącz. 3, III [1-3]). W obliczu pojawiających się doniesień o roli fikoliny H w modulowaniu odporności i konsekwencjach jej niedoborów, otrzymany neoglikokoniugat może z powodzeniem zastąpić dostępne i droższe systemy diagnostyczne oparte na dwóch przeciwciałach monoklonalnych i teście ELISA typu "sandwich". Koniugat zastosowano z powodzeniem do pomiaru stężenia i aktywności fikoliny-3 w surowicach krwi pępowinowej noworodków,

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

wskazując na zależności pomiędzy poziomem fikoliny-3 a wagą urodzeniową i wiekiem ciążowym (Zał. 3, I.2.1 [20 i 21] oraz X.2 [29-33]).

W każdej z powyższych prac dalekie od klasycznego, nierutynowe podejście do analizy strukturalnej LPS było niezbędne dla ustalenia kompletnej struktury badanych cząsteczek, wyjaśnienia zależności między budową LPS a obserwowanymi aktywnościami biologicznymi lub identyfikacji elementów, które można łatwo przeoczyć skupiając się jedynie na analizie produktów degradacji LPS. Rutynowe podejście do analiz strukturalnych LPS (analiza wyizolowanych regionów) skutkowało przez lata brakiem odpowiedzi na parę istotnych pytań dotyczących endotoksyn. W przypadku lipopolisacharydów *H. alvei*, cząsteczek szeroko badanych w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek, pytania dotyczyły budowy lipidu A, ogólnego planu budowy endotoksyn tego gatunku i miejsca lokalizacji dwu- i trójcukrów zawierających Kdo, które w postaci izolowanej identyfikowane były już w 1994 r. W przypadku lipopolisacharydów *P. shigelloides*, z powodu szczątkowej informacji dotyczącej struktur endotoksyn tego gatunku, charakterystyki strukturalnej wymagały wszystkie regiony LPS. Istnienie licznych strukturalnych niuansów w lipopolisacharydach nie pozostaje bez wpływu na ich aktywność biologiczną, a wyniki badań strukturalnych stanowią drogowskaz dla interpretacji danych uzyskiwanych w testach *in vitro* i *in vivo*. Dobrym przykładem dla zależności aktywności od struktury jest lipid A, który mimo iż stanowi najbardziej konserwatywny region endotoksyny podlega opisanym modyfikacjom, które w zależności od ich charakteru potrafią obniżyć 10-100-krotnie jego aktywność biologiczną w testach *in vitro* przekazywania sygnału przez kompleks receptorowy CD14/TLR4/MD-2. Dlatego też wykorzystując komercyjne preparaty LPS *E. coli* O55 jako standardy w ocenie wrażliwości linii komórkowej na LPS powinno się uwzględniać wypadkową naturę obserwowanych efektów dla mieszaniny różnych form LPS O55, z których każda forma osobno może wykazywać antagonistyczne lub agonistyczne oddziaływanie z receptorem. Ponadto, biorąc pod uwagę procentowy udział tych form i ich częściową labilność w warunkach kwaśnej hydrolizy, wiedza na temat struktury tego regionu w natywnej cząsteczce ma istotne znaczenie w badaniach mechanizmów patogenyzy zależnych od reakcji wrodzonego układu

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

odpornościowego gospodarza (przekazywanie sygnału na drodze rozpoznania lipidu A przez np. CD14/TLR4/MD2).

Wybrane przeze mnie prace wpisują się w nowy nurt badawczy nad strukturami lipopolisacharydów, którego kierunek wyznacza również Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek w IITD PAN we Wrocławiu. Nowoczesne metody instrumentalne pozwalają wnikać w istotne dla aktywności szczegóły strukturalne natywnych cząsteczek LPS. Badania dotyczące endotoksyn mają istotne odniesienia kliniczne umożliwiające zrozumienie mechanizmów rozwoju sepsy i wstrząsu septycznego, na poziomie molekularnym, oraz stanowią podstawę dla opracowania nowych metod diagnostycznych i strategii terapeutycznych przeciwko zakażeniom bakteryjnym.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Podsumowanie.

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w **20** anglojęzycznych pracach oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (w tym **16** pracach oryginalnych opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora: pierwszy autor - **9** prac, autor korespondencyjny - **7** prac), współautorstwo w **3** pracach przeglądowych, **28** komunikatów zjazdowych, **6** referatów wygłoszonych na międzynarodowych konferencjach naukowych, **1** patent krajowy, **1** krajowe zgłoszenie patentowe oraz **1** międzynarodowe zgłoszenie patentowe. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, *impact factor*) prac oryginalnych wynosi **69.231** (punktacja MNiSW: **416** pkt.). Do dnia 8 marca 2012 r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane **160** razy (wyłączono autocytowania). Łączny IF pięciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi **21.147**, przy ilości cytowań **23**. Ponadto, w ramach działalności naukowej uczestniczyłam w **7** zrealizowanych projektach badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, oraz w **4** projektach badawczych realizowanych w chwili obecnej, w tym jednym projekcie rozwojowym finansowanym z funduszy Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (2010-2013) oraz projekcie finansowanym ze środków UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka we współpracy z WCB EIT+ (2009-2014).

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

W przypadku 2 z ww. projektów pełniłam lub pełnię funkcję kierownika projektu badawczego.

a) Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę badawczą, jak również pracę dyplomową, realizowałam pod kierunkiem prof. dr hab. Czesława Ługowskiego w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Tematem wiodącym tego laboratorium są immunochemiczne i biologiczne właściwości endotoksyn bakteryjnych. Realizowana przeze mnie praca magisterska, zatytułowana „Badania strukturalne i serologiczne LPS *Hafnia alvei* PCM 1207” dotyczyła analizy strukturalnej i serologicznej regionów LPS, takich jak łańcuch O-swoisty i oligocukier rdzenia.

Po ukończeniu studiów, w 1997 r., rozpoczęłam pracę w IITD PAN we Wrocławiu na stanowisku asystenta w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek. Angażowałam się we wszystkie kierunki prowadzonych badań - od analiz strukturalnych lipopolisacharydów w formie zdegradowanej i natywnej, przez pionierskie na skalę światową analizy lipopolisacharydów bezpośrednio na komórkach bakteryjnych przy użyciu techniki HR-MAS (*high-resolution magic angle spinning*) NMR, po projektowanie potencjalnych składników szczepionek antyendotoksynowych oraz analizy immunochemiczne uzyskiwanych przeciwciał. Kluczowym elementem realizowanych prac badawczych była wieloletnia współpraca z prof. Lennartem Kenne ze Szwedzkiego Uniwersytetu Rolniczego w Uppsali i możliwość korzystania z niedostępnych wówczas w naszym laboratorium spektroskopów NMR i spektrometrów masowych.

Rozpoczęte w ramach mojej pracy magisterskiej badania nad łańcuchem O-swoistym LPS *H. alvei* PCM 1207 zaowocowały ustaleniem struktury pentasacharydowej podjednostki łańcucha O-swoistego LPS *H. alvei* 1207 (Zał. 3, I.1.1 [1]). Ciekawym składnikiem analizowanej struktury okazał się fosfoglicerol podstawiający jedną z reszt N-acetylogalaktozaminy (β -D-GalNAc). Wykazałam także, że za obserwowaną reakcję krzyżową poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko zabitym komórkom *H. alvei* 1207 z regionem polisacharydu O-swoistego LPS *Citrobacter* O16 odpowiedzialny jest

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

wspólny dla obu LPS element strukturalny $\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc3PGro-(1}\rightarrow$. Ponadto ustalono, że w przypadku obu struktur fosfoglicerol występuje w konfiguracji D. Warto nadmienić, że pierwsze wyniki dotyczące udanej próby uzyskania jednowymiarowych widm techniką HR-MAS NMR opublikowano dla LPS 1207. Zawarta w nich informacja strukturalna pozwalała na wstępne porównanie składu polisacharydu O-swoistego otrzymanego za pomocą chemicznej degradacji LPS z regionem łańcucha O-swoistego obecnym w natywnej cząsteczce LPS. Powodzenie tej próby umożliwiło śledzenie ewentualnych zmian w strukturach regionów LPS (utrata labilnych składników, stopień O-acetylacji), do których może dochodzić podczas chemicznej obróbki LPS dla celów ich analizy strukturalnej. Otworzyło to drogę dla pierwszych prób porównywania oraz oceny struktur O-antygenów *in situ*, bez konieczności przeprowadzania czasochłonnych preparacji i analiz strukturalnych.

Kolejne próby wykorzystania techniki HR-MAS NMR dotyczyły składników polisacharydu O-swoistego *in situ*, w LPS związanym z komórką bakteryjną (analiza zawiesin bakterii *Yokenella regensburgei*). Tym razem obok jednowymiarowych widm ^1H NMR, udało się uzyskać widma typu NOESY i HSQC, o jakości umożliwiającej wstępną analizę strukturalną polisacharydów O-swoistych (Zał. 3, I.1.1 [2]).

W roku 1997, dzięki współpracy z dr Ewą Aldową z Narodowego Instytutu Zdrowia w Pradze, zespół nasz otrzymał kolekcję 69 szczepów *P. shigelloides* – Gram-ujemnych bakterii odpowiedzialnych za jelitowe i pozajelitowe infekcje u ludzi i zwierząt. Gatunek ten, jak zaznaczyłam wcześniej, zwrócił naszą uwagę ze względu na wywoływanie poważnych infekcji oraz brak informacji na temat jego LPS. Jedyne dane pochodzące z lat 90. dotyczyły struktur łańcuchów O-swoistych *P. shigelloides* O17 oraz szczepów 22074 i 12254. W pracy tej ustalono, że podjednostka łańcucha O-swoistego *P. shigelloides* O17 posiada strukturę identyczną z podjednostką łańcucha O-swoistego LPS *S. sonnei* fazy I. Dodatkowo, porównawcze badania genomów obu szczepów wykazały obecność niemal identycznych regionów DNA kodujących łańcuch O-swoisty, a tym samym wskazywały na wspólne pochodzenie tego fragmentu DNA u obu szczepów. Dysponowanie tak dużą kolekcją O-serotypów *P. shigelloides* stanowiło idealny poligon doświadczalny w badaniach HR-MAS

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

NMR z materiałem pochodzenia bakteryjnego o nieznanach strukturach LPS i jednocześnie bogate źródło struktur cukrowych antygenów bakteryjnych.

Przedmiotem mojej pracy doktorskiej był, pierwszy z praskiej kolekcji, patogenny dla człowieka szczep *P. shigelloides* CNCTC 113/92 o serotypie O54:H2. W celu ustalenia struktury pełnej cząsteczki LPS 113/92 przeprowadziłam serię wzajemnie dopełniających się analiz strukturalnych dla 6 fragmentów LPS 113/92: (i) polisacharydu O-swoistego (ustalenie struktury podjednostki łańcucha O-swoistego), (ii) oligocukru rdzenia podstawionego jedną podjednostką łańcucha O-swoistego (sposób połączenia łańcucha O-swoistego z oligocukrem rdzenia, sekwencja biologicznej podjednostki łańcucha O-swoistego), (iii) dwóch frakcji oligocukru rdzenia (heterogenność tego regionu), (iv) de-*N,O*-acylowanego LPS (sposób podstawienia lipidu A oligocukrem rdzenia, obecność dodatkowych reszt Kdo, struktura szkieletu cukrowego lipidu A) oraz (v) lipidu A (identyfikacja amidowo- i estrowo- związanych kwasów tłuszczowych). Ze względu na różnice w budowie i podatność na swoiste degradacje postępowanie z każdym z tych preparatów wymagało indywidualnego dostosowania procedur zarówno w analizie cukrowej i metylacyjnej (identyfikacja składników cukrowych przekształconych w lotne pochodne, chromatografia GC-MS), jak i swoistych degradacji (de-*N,O*-acylacja LPS). Wykonałam i zinterpretowałam, we współpracy z kolegami z Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek, zestawy jedno- i dwuwymiarowych eksperymentów NMR, m.in. typu $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-DEPT, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY i $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC.

Do najważniejszych wyników uzyskanych przeze mnie podczas wykonywania mojej pracy doktorskiej należą:

- ustalenie struktury podjednostki łańcucha O-swoistego LPS *P. shigelloides* CNCTC 113/92 (serotyp O54). Wykazałam obecność nietypowych dla tego regionu LPS składników, takich jak 6-deoksy- β -D-heptoza i β -D-*glicero*-D-*manno*-heptoza oraz rzadko występującej reszty cukrowej: β -D-Galf. Wykazałam za pomocą HR-MAS NMR identyczność struktury łańcuchów O-swoistych w cząsteczkach LPS wolnych i związanych z komórką bakteryjną (Zał. 3, I.1.1 [4]).
- Ustalenie struktury oligocukru rdzenia oraz oligocukru rdzenia podstawionego jedną podjednostką łańcucha O-swoistego. Zidentyfikowano resztę cukrową podstawiającą

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

oligocukier rdzenia, ustalając tym samym sekwencję biologicznej podjednostki wielocukru O-swoistego. Wykazane przeze mnie cechy strukturalne oligocukru rdzenia: (i) brak grup fosforanowych, pirofosforanowych oraz podstawienia PPEtn, (ii) obecność kwasu uronowego i heksozamin w regionie rdzenia zewnętrznego (α -D-GalpA i α -D-GlcpN) oraz (iii) występowanie dwóch glikoform, z których jedna z dodatkową resztą β -D-Glcp stanowi miejsce podstawienia dla pierwszej podjednostki polisacharydu O-swoistego. Było to pierwsze doniesienie na temat oligocukru rdzenia w LPS *P. shigelloides* (Zał. 3, I.1.2. [7]).

- Charakterystyka pokrewieństwa antygenowego regionów rdzeniowych i wielocukrów O-swoistych osiemnastu preparatów LPS z użyciem monoswoistych przeciwciał. Wskazano trzy preparaty LPS, które posiadają prawdopodobnie oligocukier rdzenia identyczny z LPS 113/92. Przeciwciała uzyskano w wyniku immunizacji zwierząt przygotowanym uprzednio koniugatem oligocukru rdzenia z białkiem nośnikowym - toksoidem tężcowym (TT) (Zał. 3, I.1.2. [7]). W cytowanej pracy zakres poszukiwań podobieństw antygenowych w regionach rdzeniowych LPS rozszerzono do 69 O-serotypów *P. shigelloides*.
- Wstępna analiza regionu oligocukier rdzenia-lipid A dla de-N,O-acylowanych frakcji LPS 113/92 (analiza NMR) oraz izolowanej frakcji lipidu A (ustalenie składu kwasów tłuszczowych, wstępne analizy przy użyciu spektrometrii mas).
- Ocena aktywności biologicznych LPS 113/92 w testach *in vitro* (z wykorzystaniem linii komórek makrofagopodobnych J774.A1) i *in vivo* (myszy Balb/c) oraz porównanie ich z aktywnościami LPS o znanej budowie i aktywności biologicznej (LPS *E. coli* O55 i O100). Wykazałam, że badany LPS silniej stymuluje makrofagopodobne komórki do produkcji TNF- α , IL-6 i NO. Dawka LD50 (*lethal dose*) LPS 113/92 w teście *in vivo* była dziesięciokrotnie mniejsza niż dla endotoksyn *E. coli* O55 i O100. Badany LPS *P. shigelloides* 113/92 wykazywał słabsze właściwości mitogenne wobec mysich splenocytów w porównaniu z *E. coli* O55 i O100, porównywalne z LPS *Yokenella regensburgei* 2476, zawierającym w oligocukrze rdzenia kwas uronowy i również pozbawionym grup fosforanowych.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

Pracę doktorską pt: „Budowa chemiczna i właściwości biologiczne LPS *Plesiomonas shigelloides* CNCTC 113/92”, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. Czesława Ługowskiego, obroniłam w 2001 r. z wyróżnieniem nadanym przez Radę Naukową IITD PAN. Uzyskane wyniki prezentowane były na kilku międzynarodowych konferencjach naukowych (Zał. 3, IX.1. [1], X.1 [7, 13, 14, 23]).

b) Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie doktoratu, w latach 2002 – 2003 byłam dwukrotną beneficjentką krajowego stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla młodych naukowców. Moje zainteresowania naukowe po uzyskaniu stopnia doktora dotyczą zagadnień opisanych poniżej. Większość tematów badawczych realizowałam we współpracy z koleżankami i kolegami z IITD PAN oraz z innych ośrodków naukowych. Mój wkład w realizację poszczególnych tematów badawczych, które zaowocowały opublikowaniem wyników lub ich prezentacjami na zjazdach naukowych, został szczegółowo opisany w **Załączniku 3**. Część z tych tematów była/jest przedmiotem prac magisterskich i doktorskich, w przypadku których pełniłam funkcję promotora lub opiekuna naukowego (Załącznik 4, VII i VIII).

- **Analiza strukturalna izolowanych regionów lipopolisacharydów oraz identyfikacja epitopów rozpoznawanych przez swoiste przeciwciała.** Badania dotyczyły analizy strukturalnej izolowanych regionów LPS *H. alvei*, *P. shigelloides* i *Y. regensburgei*. Podjęto również próbę wyjaśnienia podstaw molekularnych krzyżowych reakcji serologicznych poliklonalnych przeciwciał z LPS *H. alvei* PCM 1200, 1203 i 1205 (Zał. 3, I.2.1 [9]). Ustaliliśmy, że struktura polisacharydów O-swoistych LPS 1200 i 1203 jest identyczna ze strukturą LPS 1205. Ocena stopnia O-acetylacji przeprowadzona dla polisacharydów O-swoistych zarówno w formie wyizolowanej, jak również obecnej na komórkach bakteryjnych (badania techniką HR-MAS NMR), pozwoliła wyjaśnić różnice w reakcjach krzyżowych obserwowanych w immunoblotingu dla trzech badanych LPS oraz surowic anty-*H. alvei* 1200 i anty-*H. alvei* 1203. Okazało się, że za swoistość oddziaływań monoswoistych absorbowanych surowic odpowiedzialne były różnice w podstawieniu łańcuchów O-swoistych grupami O-acetylowymi, a nie sekwencja i charakter reszt cukrowych, co było powodem zaklasyfikowania wymienionych szczepów do trzech odrębnych O-serotypów.

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

W przypadku badań strukturalnych nad oligocukrami rdzeni LPS *Y. regensburgeri* PCM 2467, 2477, 2478 i 2494 (Zał. 3, I.2.1 [19]), wyjaśniliśmy brak reakcji między poliklonalną surowicą skierowaną przeciwko szczepowi PCM 2476 a LPS 2477. Analiza strukturalna oligocukrów rdzeni wyizolowanych z obu szczepów wykazała, że są to struktury o niemal identycznej budowie i różnią się jedynie terminalnym cukrem: α -D-Glcp w LPS 2476 i α -D-Galp w LPS 2477. Różnica ta występująca w obrębie epitopu sprawiała, że przeciwciała otrzymane na pełne komórki bakteryjne tych szczepów swoiście odróżniały dwa typy oligocukrów rdzenia LPS *Y. regensburgeri*. Co ciekawe, oligocukry te są kolejnym przykładem struktur pozbawionych podstawników typowych dla tego regionu LPS u *Enterobacteriaceae*, takich jak grupy P, PP czy PPEtn.

Dostępność kolekcji szczepów *P. shigelloides* umożliwiła dalsze badania nad strukturami lipopolisacharydów tego gatunku. Kontynuacja badań prowadzonych podczas mojej pracy doktorskiej, polegająca na uzupełnieniu otrzymanych wyników o: (i) kompletną interpretację widm NMR dla de-*N,O*-acylowanego LPS 113/92, (ii) informacje na temat absolutnej konfiguracji hydroksy-kwasów tłuszczowych i (iii) szczegółowa analizę rozłożenia kwasów tłuszczowych w obrębie szkieletu cukrowego lipidu A w oparciu o dwie techniki spektrometrii masowej: ESI-MSⁿ i MALDI-TOF (Zał. 3, X.2 [23]). Podczas analizy rozłożenia kwasów tłuszczowych w obrębie szkieletu cukrowego lipidu A przy pomocy spektrometrii masowej MALDI-TOF wykorzystałam różnice w jonizacji lipidu A w trybie dodatnim i ujemnym. Uzyskane wyniki zaowocowały opublikowaniem w 2006 r. pełnej struktury LPS 113/92 wraz z połączeniami podjednostka łańcucha O-swoistego-oligocukier-rdzenia-lipid A. Było to pierwsze doniesienie na temat kompletnej struktury LPS *P. shigelloides*, a praca ta weszła w skład opisanego na wstępie cyklu publikacji będącego przedmiotem mojej rozprawy habilitacyjnej (praca nr 1). Stosowana przeze mnie strategia analizy lipidów A *P. shigelloides* przy pomocy spektrometrii mas została zaprezentowana przeze mnie na dwóch konferencjach naukowych (Appendix 3, IX.2. [3] and X.2 [23]).

Kontynuacja badań dotyczyła również wyizolowanych regionów LPS - polisacharydów O-swoistych i oligocukrów rdzeni LPS szczepów CNCTC 144/92 (O74), CNCTC 39/89 (O37) i CNCTC 110/92 (O51). Analiza pierwszego z badanych szczepów (CNCTC 144/92) wykazała charakterystyczną cechę dla LPS tego gatunku. Wiadomo, że większość preparatów LPS,

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

izolowanych zarówno z szorstkich form bakterii (LPS z kompletnym oligocukrem rdzenia), jak i gładkich form (LPS zawierający polisacharyd O-swoisty), podczas klasycznej procedury izolacji LPS - ekstrakcji wodno-fenolowej, znajdujących jest w fazie wodnej. Natomiast wymienione lipopolisacharydy *P. shigelloides* znajdowane były zarówno w fazie wodnej i fazie fenolowej, z ilościową przewagą dla fazy fenolowej. Wskazywało to na hydrofobowy charakter tych cząsteczek. Poszukiwanie strukturalnych podstaw dla obserwowanego zjawiska było głównym celem prowadzenia analiz strukturalnych dla wymienionych LPS tego gatunku. Ustaliliśmy struktury łańcuchów O-swoistych i oligocukru rdzenia LPS 144/92 (O74) (Zał. 3, I.2.1 [13]) i łańcuchów O-swoistych LPS 110/92 (Zał. 3, I.2.1 [17]). Struktury polisacharydów O-swoistych analizowano dla obu form LPS, izolowanych z fazy wodnej i fenolowej. Obie podjednostki łańcuchów O-swoistych stanowiły trójczłonowe o rzadkich składnikach, jak np. kwas 2,3-diamino-2,3-dideoksy-glukuronowy (O51) i γ -laktam kwasu 4-hydroksy-3-metylo-5-okso-pyrolidokarboksyłowego (O74). W przypadku obu LPS wykazaliśmy, że zaobserwowany charakter „hydrofobowy” zależy od struktury polisacharydów O-swoistych, dotyczy dłuższych cząsteczek LPS, zawierających większą liczbę podjednostek łańcucha O-swoistego o wysokim stopniu podstawienia m.in. grupami N- i O-acetylowymi i spowodowany jest małą liczbą wolnych grup hydroksylowych (jedna grupa na podjednostkę).

- **Analiza strukturalna lipopolisacharydów *in situ* za pomocą techniki HR-MAS NMR**

Technika HR-MAS NMR pozwala na obserwację badanych cząsteczek w formie natywnej, na powierzchni bakterii lub w formie izolowanej, ale niezdegradowanej. Technikę tę wykorzystaliśmy w większości prac poświęconych analizie strukturalnej. Wykazaliśmy, że można ją stosować do oceny potencjalnych modyfikacji wprowadzanych podczas degradacji LPS izolowanych nie tylko z form gładkich bakterii (Zał. 3, I.1.1 [1,2,4], I.2.1 [9 i 17]), ale również form szorstko-gładkich, takich jak lipooligosacharydy (LOS) *B. pertussis* (Zał. 3, I.2.1 [10]). Wzbogacenie hodowli bakteryjnej w znakowaną izotopem ^{13}C glukozę umożliwiło dodatkowo wykonanie i interpretację widm dwuwymiarowych NMR dla LPS (Zał. 3, I.1.1 [4]).

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

- **Projektowanie i charakterystyka immunochemiczna potencjalnych składników szczepionek antyendotoksynowych**

Badania były kontynuacją prac nad indukowaniem przeciwciał antyendotoksynowych. Strategia badań polegała na wykorzystaniu jako antygenów wybranych oligocukrów rdzeni (region LPS o ograniczonej zmienności). Prace dotyczyły zastosowania jako składnika szczepionki antyendotoksynowej (prewencja zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi, *E. coli*, *S. sonnei*, *S. flexnerii* i *B. pertussis*) neoglikokoniugatów oligocukrów rdzeni z białkiem nośnikowym (TT).

Koordinowane przeze mnie badania dotyczyły koniugatu kompletnego oligocukru rdzenia LOS szorstkiego mutantu *E. coli* R4 z TT, jako potencjalnego składnika szczepionki antyendotoksynowej. Temat ten stanowił uzupełnienie serii badań opublikowanych przez pracowników Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek w 1996 r. dotyczących neoglikokoniugatów oligocukrów rdzeni LOS *E. coli* R1, R2, R3 i J5 z TT. Biorąc pod uwagę fakt, że występowanie poszczególnych oligocukrów rdzeni *E. coli* wśród izolatów klinicznych szacuje się na około 70% (R1), 11% (R2), 11% (R3) i 3% (R4), charakterystyka takich przeciwciał wydaje się być istotna z punktu widzenia zastosowania tych struktur jako antygenów szczepionkowych. Wykazaliśmy ochronne właściwości i szerokie spektrum działania przeciwciał uzyskanych przeciwko przygotowanemu neoglikokoniugatowi, ich zdolność do rozpoznawania wspólnych epitopów na powierzchni żywych komórek innych gatunków bakterii Gram-ujemnych i neutralizacji toksycznych efektów działania endotoksyn *E. coli* o innych typach oligocukrów rdzenia (tj. R1 i R2) i łańcuchów O-swoistych w testach *in vivo* i *in vitro* (Zał. 3, I.2.1 [8], IX.1 [2], X.1 [9]).

W ramach realizacji projektu badawczego Młodego Pracownika Nauki, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych pt. "Swoistość serologiczna i aktywność antylipopolisacharydowa przeciwciał skierowanych przeciwko oligocukrowi rdzenia endotoksyny *Escherichia coli* J5" podjęłam próbę wyjaśnienia sprzecznych doniesień literaturowych na temat możliwości wykorzystania szorstkiego mutantu *E. coli* J5 o niekompletnej strukturze oligocukru rdzenia w LOS (typ rdzenia *Salmonella* Rc) lub izolowanych z tych bakterii nietoksycznych pochodnych LOS jako składników szczepionek o działaniu antyendotoksynowym. Wykazałam, że aktywność antyendotoksynowa uzyskanych

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

surowic, mierzona jako stopień zahamowania produkcji cytokin przez komórki docelowe dla LPS, nie jest skorelowana z wysokimi mianami przeciwciał w teście ELISA. Uzyskane wyniki pozwalały częściowo wytłumaczyć niepowodzenia związane z wykorzystaniem szorstkiego mutantu *E. coli* J5 w indukcji ochronnych przeciwciał przeciwko Gram-ujemnym infekcjom (Zał. 3, I.2.1 [6], IX.1 [2], X.1 [8]). Wyniki tych badań są o tyle ciekawe, że wciąż ukazują się prace dotyczące użyteczności szorstkich mutantów z LOS o niekompletnej strukturze rdzenia jako szczepionek przeznaczonych do prewencji infekcji powodowanych pałeczką *E. coli*, jak również wykorzystania w tym celu monoklonalnych przeciwciał skierowanych na epitopy rdzenia wewnętrznego.

W projekcie związanym z prewencją krztuśca, choroby zakaźnej wieku dziecięcego, wywoływanej przez pałeczkę *B. pertussis*, otrzymano i sprawdzono testami serologicznymi i testami *in vitro* na aktywność antyendotoksynową przeciwciała uzyskane na potencjalny składnik bezkomórkowej szczepionki przeciw krztuścowi (Zał. 3, I.2.1 [10]). Badania te wpisują się w poważny problem jednoczesnego wzrostu zachorowań i obniżających się, w wyniku dryfu antygenowego składników białkowych, właściwości ochronnych obecnych na rynku bezkomórkowych szczepionek przeciwko krztuścowi. Wykazaliśmy, że wyizolowany pentasacharyd - nietoksyczny fragment LOS *B. pertussis*, skoniugowany z toksoidem tężcowym jest potencjalnym antygenem szczepionkowym i mógłby poprawić skuteczność szczepionki do poziomu porównywalnego ze szczepionką pełnokomórkową, wykazującą jednak niebezpieczne efekty uboczne. Uzyskane przeciwciała znakowały z wysoką intensywnością fluorescencji ponad 95% populacji żywych komórek bakteryjnych oraz wykazywały aktywność neutralizującą względem natywnej endotoksyny *B. pertussis* w testach *in vitro* hamowania produkcji NO, TNF- α , IL-6 przez mysią linię makrofagopodobną J774.A1 stymulowaną LOS *B. pertussis*. Praca ta zawierała również pierwsze na świecie doniesienie dotyczące wykorzystania techniki STD (*ang. saturation transfer difference*) NMR do identyfikacji epitopów odpowiedzialnych za reakcję poliklonalnych przeciwciał z antygenem cukrowym.

- **Badania nad monofosforylowaną pochodną lipidu A jako składnikiem adiuwantu**

Temat ten, prowadzony we współpracy z Laboratorium Immunobiologii IITD PAN, dotyczył nowego adiuwantu (substancji zwiększającej odpowiedź odpornościową na

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

podawany w szczepionce antygen), tj. kompleksu laktoferyny bydlęcej (BLF) z monofosforylowanym lipidem A (MPL) oraz charakterystyki jego właściwości adiuwantowych i fizykochemicznych. Sam MPL stanowi opatentowany adiuwant dla szczepionek i jest obecnie poddawany próbom klinicznym. Badania wykazały możliwość zastosowania tego kompleksu jako składnika wysoce oczyszczonych antybakteryjnych szczepionek zawierających rekombinowane lub pochodzące z drobnoustrojów antygeny. Sprawdzone wpływ BLF i MPL na odpowiedź układu odpornościowego w kilku testach biologicznych, m.in. analizowano skuteczność połączenia BLF z MPL w stymulacji odpowiedzi humoralnej (Th2) i komórkowej (Th1) u myszy BALB/c i CBA. Wykazano, że aktywność BLF-MPL była porównywalna z kompletnym adiuwantem Freund'a (Zał. 3, I.1.2 [12]). Użyteczność kompleksu w szczepionce wykazano na modelu doświadczalnej infekcji myszy bakteriami *P. shigelloides* (Zał. 3, I.1.2 [15]). Badany adiuwant nie tylko zwiększał stężenia surowiczych przeciwciał rozpoznających patogen, ale jednocześnie nasilał fagocytozę, dzięki czemu zwierzęta lepiej zwalczały zakażenie. Istnienie kompleksów LF z MPL dowiedziono w elektroforezie w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a kinetykę oddziaływania scharakteryzowano techniką plazmonowego rezonansu powierzchniowego (SPR, *ang. surface plasmon resonance*) przy użyciu aparatu Biacore™ dla układu z immobilizowaną laktoferyną i analitami w postaci rozpuszczalnych kompleksów LPS *H. alvei* z trójetyloaminą. Otrzymany adiuwant chroniony jest polskim patentem PL369093.

- **Badania swoistości oddziaływań składników układu dopełniacza z endotoksynami bakteryjnymi**

Badania dotyczą istotnych dla wrodzonej odporności cząsteczek: ludzkiej MBL i fikoliny-3 - kluczowych elementów układu dopełniacza oraz lipopolisacharydów *H. alvei*. We współpracy z prof. Anną Świerżko i prof. Maciejem Cedzyńskim z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi podjęto próbę oceny swoistości tych oddziaływań. Pierwszym etapem była identyfikacja LPS *H. alvei* wiązanych przez MBL i fikolinę-3 (praca nr 5), ustalenie regionów LPS biorących udział w oddziaływaniu, a także ocena aktywności biologicznej kompleksów MBL-LPS, tj. zdolności do aktywacji drogi lektynowej dopełniacza i wywoływania wstrząsu anafilaktoidalnego u myszy (Zał. 3, IX.2, [5 i 6], wyniki

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

nieopublikowane). Uzyskane dotychczas wyniki pokazały, że sama obecność miejsc wiążących dla MBL jedynie w regionie zewnętrznym oligocukru rdzenia jest charakterystyczna dla LPS *H. alvei* i wystarczająca do wywołania reakcji anafilaktoidalnej. Poczynione obserwacje mogą mieć znaczenie w badaniach nad rolą dopełniacza w rozwoju sepsy oraz wstrząsu septycznego oraz zależnej od MBL aktywacji płytek krwi i śródbłonna komórek płuc w patologii zespołu ostrej niewydolności oddechowej, który towarzyszy sepsie. Badania strukturalne LPS *H. alvei* 1200 oraz wykorzystanie oddziaływania z fikoliną-3 do pomiaru stężenia i aktywności tej lektyny w płynach ustrojowych stanowią fragment proponowanej przeze mnie rozprawy habilitacyjnej (publikacja nr 5) i zostały szczegółowo opisane w pierwszej części autoreferatu.

8 marca 2012 r.

Data

J. Łukasiewicz

Dr inż. Jolanta Łukasiewicz