

AUTOREFERAT

dr inż. Mariola Paściak

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polska Akademia Nauk

Wrocław, 23 lutego 2015

1. Mariola Paściak

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

1998 doktor nauk biologicznych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

rozprawa doktorska pt. „Markery glikolipidowe *Propionibacterium propionicum*”, promotor: prof. dr hab. Halina Mordarska

1992 magister inżynier Inżynierii Materiałowej, Politechnika Wrocławska, Wydział Podstawowych Problemów Techniki

praca magisterska pt. „Akumulacja wybranych metali w biomacie promieniowca *Streptomyces pilosus*”, promotor: dr Zbigniew Gołąb

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2010- Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, asystent

2002-2010 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, adiunkt

1993-2000 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, asystent

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:

Markery glikolipidowe aktynobakterii – analiza strukturalna, immunochemiczna oraz znaczenie w taksonomii i diagnostyce

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Paściak M.**, Holst O., Lindner B., Mordarska H., Gamian A. Novel bacterial polar lipids containing ether-linked alkyl chains, the structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T). **J. Biol. Chem.** 2003, 278, 3948-3956. **IF¹ 6,482 / MNiSW²: 21 / liczba cytowań³: 13**
2. **Paściak M.**, Holst O., Lindner B., Mierzchała M., Grzegorzewicz A., Mordarska H., Gamian A. Structural and serological characterization of the major glycolipid from *Rothia mucilaginosa*. **Biochim. Biophys. Acta**, 2004, 1675: 54-61. **IF 3,369 / MNiSW: 30 / liczba cytowań: 10**
3. Huang Y., **Paściak M.**, Liu Z., Xie Q., Gamian A. *Amycolatopsis palatopharyngis* sp. nov., a potentially pathogenic actinomycete isolated from a human clinical source. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2004, 54, 359-363. **IF 2,456 / MNiSW: 20 / liczba cytowań: 15**
4. Gu Q., **Paściak M.**, Luo H., Gamian A., Liu Z., Huang Y. *Ruania albidiflava* gen. nov., sp. nov., a novel member of the suborder *Micrococccineae*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 2007, 57, 809-814. **IF 2.384 / MNiSW: 20 / liczba cytowań: 5**
5. **Paściak M.**, Sanchez-Carballo P., Duda-Madej A., Lindner B., Gamian A., Holst O. Structural characterization of the major glycolipids from *Arthrobacter globiformis* and *Arthrobacter scleromae*. **Carbohydr. Res.** 2010, 345, 1497-1503. **IF 1,898 / MNiSW: 32 / liczba cytowań: 4**
6. **Paściak M.**, Kaczyński Z., Lindner B., Holst O., Gamian A. Immunochemical studies of trehalose-containing major glycolipid from *Tsukamurella pulmonis*. **Carbohydr. Res.** 2010, 345, 1570-1574. **IF 1,898 / MNiSW: 32 / liczba cytowań: 2**
7. **Paściak M.**, Pawlik K., Gamian A., Szponar B., Skóra J., Gutarowska B. An airborne actinobacteria *Nocardiosis alba* isolated from bioaerosol of a mushroom compost facility. **Aerobiologia** 2014, 30, 413-422. **IF⁴ 1,202 / MNiSW⁴: 25 / liczba cytowań: 0**

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 dn. 16.02. 2015 r.

⁴ Dane z roku 2013.

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

Cel naukowy:

Ustalenie struktury i charakterystyka immunochemiczna markerów glikolipidowych aktynobakterii, poznanie ich potencjału chemiotaksonomicznego do wykorzystania w identyfikacji nowych, nieznanymi wcześniej taksonów aktynobakterii oraz w ustalaniu etiologii zakażeń oportunistycznych.

PRZEDSTAWIONY CYKL PRAC OBEJMUJE ZAGADNIENIA BADAWCZE, STANOWIĄCE PRZEDMIOT MOICH ZAINTERESOWAŃ NAUKOWYCH:

- analiza strukturalna kompletnych struktur glikolipidów aktynobakterii
- ustanowienie nowych jednostek taksonomicznych w klasie *Actinobacteria*: gatunków i rodzaju
- wykorzystanie związków lipidowych do identyfikacji szczepów klinicznych i środowiskowych
- diagnostyka zakażeń wywoływanych przez promieniowce oportunistyczne

Wprowadzenie

Mikroorganizmy uczestniczą we wszelkich przejawach życia na Ziemi: odpowiadają za obieg pierwiastków w przyrodzie i ich konwersję do form przyswajalnych dla żyjących organizmów, zasiedlają ekstremalnie różne nisze ekologiczne. Złożone konsorcja bakteryjne są ściśle związane ze środowiskiem gleb, wód, roślin i zwierząt.

Mikroorganizmy towarzyszyły ssakom w ich rozwoju ewolucyjnym tworząc wyspecjalizowane mikrobiomy, które aktywnie dostosowywały się do gospodarza kształtując jego układ odpornościowy. Poprzez miliony lat olbrzymia większość z tych mikroorganizmów przyjęła funkcje flory komensalnej i mutualistycznej, a tylko nieliczne gatunki stały się patogenne dla człowieka. Najbardziej spektakularnym przykładem koewolucji ssaków i bakterii patogennych jest *Mycobacterium tuberculosis*: początkowo uważano, że gruźlica pojawiła się wraz z rozwojem rolnictwa i udomowieniem zwierząt, w epoce neolitu, czyli około 10 000 lat temu, ale ostatnie prace sugerują, że mogło to nastąpić ponad 50 000 lat temu w Afryce⁵, skąd prątki rozprzestrzeniły się wraz z migracją ludzi na inne kontynenty.

Ludzki mikrobiom stanowią bakterie, archebakterie, grzyby i wirusy zamieszkujące różne okolice ciała: jamę ustną i przewód pokarmowy, skórę i układ moczowo-płciowy. Ostatnie lata przynoszą wiele danych dotyczących interakcji mikrobiomu z organizmem gospodarza i jego kluczowej roli w rozwoju i

⁵ Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, et al. High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. PLoS Biol 2008, 6, e311.

funkcjonowaniu układu odpornościowego, etiopatogenezie chorób, rozwoju nowotworów oraz mechanizmach zwalczania drobnoustrojów patogennych.

Na podstawie badań dostępnych izolatów bakteryjnych oraz analizy sekwencji zdeponowanych genomów bakteryjnych ustalono, że ponad 88% zidentyfikowanych mikroorganizmów należy do 4 podstawowych typów systematycznych (phylum): *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*⁶.

Aktynobakterie - rola w środowisku i znaczenie

Przedmiotem moich zainteresowań naukowych są promieniowce (aktynobakterie) – bakterie Gram-dodatnie, należące do klasy *Actinobacteria*. Były one rozpoznawane już ponad 100 lat temu na podstawie kryteriów morfologicznych. Wytwarzanie grzybni powietrznej upodabniało je do grzybów i dopiero szczegółowa analiza składu ściany komórkowej dostarczyła niezbitych dowodów ich przynależności do bakterii właściwych. Obecnie na podstawie analizy 16S rRNA typ *Actinobacteria* reprezentuje największą jednostkę systematyczną w domenie *Bacteria*. Przedstawiciele aktynobakterii wykazują duże zróżnicowanie morfologiczne: występują w formie ziarniaków (*Micrococcus*), mogą wykazywać morfologię pałeczkowato-ziarniakowatą (*Arthrobacter*), mogą wytwarzać fragmentującą grzybnię podstawową (*Nocardia*, *Rhodococcus*), bądź też wyraźnie wykształconą grzybnię podstawową i powietrzną (*Streptomyces*, *Micromonospora*)⁷.

Drobnoustroje te są wszechobecne w przyrodzie, występują przede wszystkim w glebie, wodach słonych i słodkich, kompoście i oborniku. Przeważająca większość należy do saprofitów, ale niektóre są pasożytami lub tworzą mutualistyczne powiązania z roślinami i zwierzętami. Mikroorganizmy rodzaju *Frankia* są symbiontami roślin i uczestniczą m. in. w procesie wiązania azotu atmosferycznego.

Dzięki potężnemu aparatowi enzymatycznemu aktynobakterie uczestniczą w dekompozycji materii organicznej rozkładając tak złożone naturalne polimery jak lignina, celuloza i chityna. Mogą również rozkładać wytwarzane przez człowieka związki, powodujące zanieczyszczenie środowiska. Aktynobakterie korynopodobne wytwarzają lipidy trehalozowe o właściwościach surfaktantów, użyteczne w usuwaniu skutków skażeń ropą naftową⁸. Niektóre promieniowce, np. *Nocardia*, izolowane są z osadu czynnego, gdzie biorą aktywny udział w procesach oczyszczania ścieków.

Szacuje się, że około 80% antybiotyków pochodzenia naturalnego to metabolity aktynobakterii. Pierwszym odkrytym antybiotykiem-metabolitem wtórnym promieniowców była aktynorodyna, a kolejnym - streptomycyna, do dziś stosowana jako lek przeciwgruźliczy. Antybiotyki o zróżnicowanym spektrum aktywności i swoistości biologicznej były pozyskiwane z izolatów glebowych z rodzajów *Streptomyces*, a także *Actinoplanes*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis* i *Micromonospora*.

Aktynobakterie są również istotnym producentem witamin i enzymów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych. Należą do nich peptydazy i lipazy stosowane w przemyśle mleczarskim do

⁶ Rinke C et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 2013, 25; 499, 431-437.

⁷ Goodfellow M, Williams ST. Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 1983, 37, 189-216.

⁸ Christofi N, Ivshina IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J Appl Microbiol* 2002, 93, 915-929.

produkcji serów, glikozydazy i izomerazy glukozy, niezbędne w produkcji syropów owocowych oraz nukleazy restrykcyjne stosowane w biologii molekularnej.⁹

Duże zainteresowanie wzbudzają aktynobakterie środowisk wodnych, zwłaszcza ekosystemów morskich, będące źródłem nowych metabolitów. Burzliwy rozwój metod genotypowania w ostatnich latach pozwolił na określenie sekwencji nukleotydowych tysięcy mikroorganizmów, których nie można było wyhodować w warunkach laboratoryjnych. W bazie NCBI zdeponowano ponad 3000 genów szczepów aktynobakterii związanych z organizmami morskimi. Aktynobakterie te są źródłem nowych związków o niespotykanych aktywnościach anty-drobnoustrojowych, anty-nowotworowych, antywirusowych oraz skierowanych przeciwko pasożytom¹⁰.

Intensywnie poszukiwane są kolejne szczepy będące bogatym źródłem aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych i enzymów niezbędnych do degradacji ksenobiotyków lub usuwania skażenia środowiska.

Aktynobakterie patogenne i szczepy oportunistyczne

Do klasy *Actinobacteria* należą bezwzględne patogeny człowieka takie jak *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *Nocardia asteroides*, *Corynebacterium diphtheriae* i *Actinomyces israelii*, odpowiedzialne za wywoływanie gruźlicy, trądu, nocardiozy, błonicy i promienicy. Gruźlica jest główną przyczyną śmiertelności na świecie, uważa się, że odpowiada za 1,8 mln zgonów rocznie. Szacuje się, że około 1/3 populacji może być zarażona *M. tuberculosis*, a jedynie mały odsetek zakażonych osób rozwija aktywną postać choroby. Oprócz znanych od dawna chorobotwórczych gatunków aktynobakterii pojawiają się nowe taksony, nie brane dotąd pod uwagę jako ważne z klinicznego punktu widzenia. W ostatnich latach zwiększyła się liczba wywoływanych przez nie zakażeń egzo- i endogennych, miejscowych bądź układowych, chronicznych bakteriemii lub komplikacji pourazowych¹¹. Większość aktynobakterii należy do tzw. bakterii oportunistycznych. W predysponujących przypadkach, np. upośledzonego funkcjonowania układu odpornościowego, urazów fizycznych lub wyczerpania organizmu drobnoustroje te wnikają do tkanek gospodarza, po czym następuje powolny, rzadko ostry proces zakażenia. Niektóre promieniowce oportunistyczne, np. *Actinomyces*, *Rothia*, *Propionibacterium* uważane są za część flory fizjologicznej, inne, bytujące w glebie, mogą zakażać organizm gospodarza w wyniku kontaktu po przerwaniu ciągłości tkanek lub jako choroby odzwierzęce.

Do wywoływanych przez te bakterie schorzeń, określanych jako aktynobakteriozy, należą też niektóre choroby uczuleniowe¹². Rzeczywista częstość zakażeń wywoływanych przez aktynobakterie (z wyłączeniem gruźlicy) jest trudna do oszacowania, gdyż trudności diagnostyczne wpływają na zaniżanie częstości ich występowania. Ponadto pokrewieństwo filogenetyczne w obrębie klasy *Actinobacteria*, trudności hodowlane, a często także niespecyficzne objawy kliniczne sprawiają, że etiologia tych zakażeń jest trudna do ustalenia.

⁹ Mordarska H, Paściak M. Promieniowce w przyrodzie i w biotechnologii. *Biotechnologia* 2002, 4, 142-164.

¹⁰ Valliappan K, Sun W, Li Z. Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, 98, 7365-77.

¹¹ Mordarska H, Szponar B, Paściak M, Gamian A. Promieniowce chorobotwórcze i bakterie promieniowcopodobne: problemy taksonomiczne, diagnostyczne i kliniczne. *Mikrobiologia Medycyna*, 1999, 2, 3-10.

¹² Funke G, von Graevenitz A, Clarridge JE, Bernard KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 1997, 10, 125-159.

Istotne z punktu widzenia mikrobiologii klinicznej jest zatem poznanie mechanizmów odpowiedzi odpornościowej towarzyszących tym zakażeniom oraz funkcji biologicznej poszczególnych komponentów strukturalnych aktynobakterii.

Taksonomiczne markery aktynobakterii

Wiarygodna identyfikacja szczepów izolowanych z próbek klinicznych lub środowiskowych możliwa jest dzięki zastosowaniu metod taksonomicznych. Informacje taksonomiczne pozwalają na zrozumienie bioróżnorodności i powiązań pomiędzy organizmami żyjącymi w różnych ekosystemach.

Obecnie obowiązująca klasyfikacja mikroorganizmów polega na uwzględnieniu charakterystyki fenotypowej, chemiotaksonomicznej i genotypowania, które razem stanowią wielofazową strategię taksonomiczną¹³. Ma ona bardzo duże znaczenie w przypadku opisywania nowych, niezidentyfikowanych wcześniej taksonów, gdyż kompleksowa charakterystyka umożliwia dokładne umiejscowienie organizmu w istniejącej hierarchii taksonomicznej, która odzwierciedla pokrewieństwo filogenetyczne mikroorganizmów.

Do charakterystyki fenotypowej należy morfologia i określenie potencjału metabolicznego, tj. cech fizjologicznych i biochemicznych. Ważnymi parametrami są kształt i wielkość komórki, wynik barwienia komórki, ustalenie optymalnych warunków wzrostu.

Metody chemiotaksonomiczne oparte są na analizie chemicznej markerów strukturalnych osłon komórkowych bakterii, takich jak peptydoglikan, kwasy tłuszczowe, lipidy polarne i chinony izoprenoidowe.

Peptydoglikan

Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich, w tym aktynobakterii, zawiera różne typy peptydoglikanu, które mogą być rodzajowo lub gatunkowo specyficzne, natomiast u bakterii Gram-ujemnych peptydoglikan jest mniej zróżnicowany. Drobnoustroje z rodzaju *Mycobacterium* i *Nocardia* zawierają N-glikolilową resztę kwasu muraminowego zamiast N-acetylowej, co jest wykorzystywane w taksonomii (istnieją proste testy na oznaczanie tych związków).

U bakterii Gram-dodatnich w trzeciej pozycji łańcucha peptydowego może występować: mezo-DAP (kwas diaminopimelinowy), L-Lys, kwas L-aminomastowy, LL-DAP lub rzadziej L-Orn. Detekcja obecności DAP i identyfikacja jego izomeru jest jedną z najbardziej przydatnych analiz chemiotaksonomicznych dla bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza aktynobakterii. Równie przydatna jest analiza cukrów występujących dodatkowo w ścianie komórkowej i określenie typu ściany komórkowej.¹⁴

¹³ Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 1996, 60, 407-438.

¹⁴ Paściak M, Mordarska H, Szponar B, Gamian A. Metody chemiotaksonomiczne w rozpoznawaniu zakażeń wywołanych przez aktynobakterie. *Post Hig Med Dosw* 2007, 61, 403-412.

Lipidy polarne

W komórkach drobnoustrojów obecne są lipidy o różnym składzie chemicznym i właściwościach. Lipidy polarne: gliko- i fosfolipidy są głównym składnikiem dwuwarstwy lipidowej błon komórkowych, występują powszechnie i często są brane pod uwagę w identyfikacji i klasyfikacji. U aktynobakterii można wyróżnić 5 typów fosfolipidowych na podstawie obecności markerowych fosfolipidów¹⁴. Z kolei sfingofosfolipidy występują w ograniczonej liczbie taksonów i też mogą być związkami markerowymi. Odrębną grupę związków lipidowych stanowią lipopolisacharydy, występujące u przedstawicieli niemal wszystkich bakterii Gram-ujemnych.

Z uwagi na fakt, że glikolipidy stanowią znaczną część masy ściany komórkowej (szacuje się że mogą stanowić do 10% suchej masy komórki) oraz łatwo ulegają ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi, w stosunkowo krótkim czasie uzyskuje się je i poddaje analizie za pomocą technik chromatograficznych (TLC). Uzyskany z całych komórek ekstrakt lipidowy pozwala na porównanie lipidów polarnych różnych mikroorganizmów.¹⁵

Kwasy tłuszczowe

Częścią składową lipidów są kwasy tłuszczowe – traktowane odrębnie – jako istotne markery taksonomiczne. Zidentyfikowano ponad 300 różnych chemicznych struktur tych związków. W chemiotaksonomicznej charakterystyce ważna jest długość łańcucha, pozycja wiązań podwójnych, obecność grup cyklopropanowych, hydroksylowych oraz obecność innych podstawników. Stosowanym od kilkadziesiąt lat markerem rzędu *Corynebacterineae* są kwasy mikołowe (α -rozgałęzione, β -hydroksylowe kwasy tłuszczowe). Długość łańcucha alifatycznego jest rodzajowo swoista, a w obrębie taksonu *Mycobacterium*, w którym występują dodatkowe grupy funkcyjne np. keto, metoksy, epoksy – nawet gatunkowo swoista. Warto dodać, że kwasy nokardiomikołowe zostały po raz pierwszy wyizolowane ze szczepów *Nocardia* przez prof. Halinę Mordarską z IITD we Wrocławiu, nazwane wówczas LCN-A (lipid charakterystyczny dla *Nocardia*)¹⁶. Innym spektakularnym przykładem są kwasy 3-hydroksylowe, występujące tylko w lipopolisacharydach, długość łańcucha tych związków jest rodzajowo swoista w obrębie bakterii Gram-ujemnych. Profil kwasów tłuszczowych występujących w komórkach drobnoustrojów jest stabilnym parametrem, o ile zachowane są standardowe warunki hodowli drobnoustrojów.

Chinony izoprenoidowe

Odrębną klasę związków stanowią chinony izoprenoidowe, występujące w błonie komórkowej bakterii i odpowiedzialne za transport elektronów. Są one zróżnicowane strukturalnie w obrębie bakterii Gram-dodatnich, a zwłaszcza aktynobakterii. Występują dwa podstawowe typy strukturalne naftochinony i benzochinony. Różnice w długości łańcucha izoprenyloвого, występowanie w konformacji cyklicznej, nasycenie lub uwodornienie łańcucha izoprenyloвого, mogą charakteryzować organizmy na różnych poziomach taksonomicznych.

¹⁵ Mordarska H. Taxonomic value of glycolipids of actinomycetes and allied taxa. *The Actinomycetes 1985/1986*, 19, 11-32.

¹⁶ Mordarska H, Mordarski M, Goodfellow M. Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J Gen Microbiol* 1972, 71, 77-86.

Genotypowanie

Metody oparte na analizie genomu, takie jak zawartość par GC w DNA, hybrydyzacja DNA-DNA i analiza sekwencji 16S rRNA uzupełniają charakterystykę taksonomiczną. Oznaczanie zawartości G + C w genomie jest stosowane na wyższym taksonomicznie poziomie klasyfikacji i przyjmuje się zasadę, że organizmy różniące się zawartością par GC ponad 10% należą do różnych rodzajów. Hybrydyzacja DNA-DNA uważana jest za „złoty standard” w taksonomii, jednak sprawia ona wiele problemów metodycznych i uzyskane wyniki nie zawsze są powtarzalne.

Gen 16S rRNA jest efektywnym markerem molekularnym ponieważ jest powszechny, funkcjonalnie stabilny, wysoce konserwatywny i mało podatny na horyzontalny transfer genów. Z tych powodów stosuje się go w definicji gatunku, która zakłada, że należące do niego organizmy posiadają nie mniej niż 3% różnicę w sekwencji 16S DNA i wartość hybrydyzacji DNA-DNA powyżej 70%.

Powszechną praktyką w ostatnich dwóch dekadach jest stosowanie jedynie porównawczej analizy genu 16S rRNA do identyfikacji szczepu. Należy jednak podkreślić, że większość drobnoustrojów wymaga bardziej kompleksowych analiz do klasyfikacji i identyfikacji, czyli wielofazowej strategii taksonomicznej.

Wraz ze zwiększeniem szybkości analizy i obniżeniem kosztów sekwencjonowania w ostatnich latach coraz więcej genomów bakteryjnych jest sekwencjonowanych a informacje zwarte w bazach danych są ogólnie dostępne. Pomimo tych zalet wydaje się jednak mało prawdopodobne, żeby sekwencjonowanie genomu mogło być dostępne i rutynowo stosowane w większości laboratoriów. Niezaprzeczalnie informacje zawarte w genomie są cennym źródłem informacji taksonomicznych, toteż postuluje się zastąpienie testu hybrydyzacji DNA-DNA porównywaniem średniej identyczności sekwencji nukleotydów¹⁷ (ANI, Average Nucleotide Index) konserwatywnych genów obecnych w genomach bakteryjnych. Innym parametrem opartym na sekwencji genomu proponowanym do rozróżniania gatunków jest indeks różnic genomowych oparty na analizie konserwatywnego rdzenia genomu DNA i proporcji wspólnego DNA dwóch genów (maximal unique matches index)¹⁸. Zastosowanie analizy całych genomów ma jeszcze pewne ograniczenia, przede wszystkim w bazach danych nie są reprezentowane wszystkie taksony bakteryjne. Do tej pory ograniczono się do analizy genomowej szczepów ważnych z punktu widzenia mikrobiologii klinicznej i biotechnologii, a w grupie tej szczepy typowe nie są niestety w większości reprezentowane, ponadto można też kwestionować jakość deponowanych sekwencji genomowych.

Podsumowując, pomimo iż taksonomia może być w przyszłości oparta na analizie pokrewieństwa filogenetycznego całych genomów bakteryjnych, uważa się, że parametry fenotypowe i chemiotaksonomiczne pozostaną ważnym kryterium taksonomicznym¹⁹.

¹⁷ Konstantinidis KT, Tiedje JM. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102, 2567-2572.

¹⁸ Deloger M, El Karoui M, Petit MA. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *J Bacteriol* 2009, 191, 91-99.

¹⁹ Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC, Padhmanabhan R et al. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014, 64, 384-391.

Wielofazowa strategia taksonomiczna została zastosowana do identyfikacji aktynobakterii w pracach (Zał. 5: poz. **3, 4, 7**). W pracach (Zał. 5: poz. 3 i 4, **Publikacja nr 3 i 4**) lipidy polarne, w tym glikolipidy, posłużyły do charakterystyki nowego rodzaju *Ruania* oraz gatunku *R. albidiflava* oraz do identyfikacji aktynobakterii wyizolowanych z materiału klinicznego jako *Amycolatopsis palatopharyngis*, zaś w publikacji (Zał. 5: poz. 7, **Publikacja nr 7**), szczep wyizolowany z białego kompostu został sklasyfikowany jako *Nocardiosis alba*.

Różnorodność strukturalna i funkcjonalna glikolipidów aktynobakterii

Glikolipidy stanowią heterogenną grupę cząsteczek i znamienne jest, że występują we wszystkich organizmach żywych – od prokariotycznych (*Bacteria* i *Archea*), do organizmów wyższych – *Eukaria*, w świecie roślin oraz zwierząt. Glikolipidy są związkami złożonymi z części cukrowej połączonej wiązaniem glikozydowym z lipidową resztą hydrofobową – acylovanym glicerolem, bądź alkoholem, ceramidem (u organizmów wyższych) lub sterolem.

Proste glikolipidy mogą być zbudowane z reszty węglowodanowej połączonej bezpośrednio z pojedynczym kwasem tłuszczowym lub alkoholem. U bakterii występuje ogromna różnorodność struktur tych związków, oprócz najbardziej powszechnych glikozyloglicerolipidów występują także glikopeptydolipidy i lipoarabinomannany oraz złożone cząsteczki lipopolisacharydów.

Glikozyloglicerydy to grupa związków posiadających w swej budowie sn-1,2-digliceryd, który połączony jest wiązaniem glikozydowym z resztami węglowodanowymi w pozycji C-3. Wśród bakterii Gram-dodatnich grupa tych związków jest szeroko rozpowszechniona. Najczęściej występują diglikozyloglicerydy, rzadziej tri- oraz tetraglikozyloglicerydy, natomiast związków z więcej niż 4. grupami cukrowymi dotychczas nie zidentyfikowano. Glikoglicerolipidy są zbudowane z jednej bądź dwóch przyłączonych do diacyloglicerolu reszt monocukrów lub ich pochodnych (np. kwas glukuronowego). Węglowodany – najczęściej glukoza, galaktoza i mannoza mogą występować w różnej konfiguracji anomerycznej i być połączone wiązaniem 1-2, 1-3, 1-4 bądź 1-6. Do glicerolu przyłączone są reszty kwasów tłuszczowych krótko- lub długołańcuchowych, prostych lub rozgałęzionych, nasyconych bądź nienasyconych. Zmienność strukturalna jest duża, a glikolipidy mogą mieć różną swoistość taksonomiczną.

W komórkach drobnoustrojów z rodzaju *Rothia*: *R. dentocariosa*²⁰ i *R. mucilaginoso* występują rodzajowo swoiste glikolipidy o rzadko spotykanej budowie dimannozyloacylomoglicerydu, różniące się pozycją podstawienia kwasów tłuszczowych w cząsteczce glicerolu (Zał. 5: poz. 2, **Publikacja nr 2**). W komórkach *Arthrobacter globiformis* i *A. scleromae* wykryto dwa markery glikolipidowe, glikolipid G1 o identycznej budowie jak *R. dentocarioso* oraz glikolipid G2 będący monogalaktozyloglicerydem (Zał. 5: poz. 5, **Publikacja nr 5**).

W osłonach komórkowych *Propionibacterium propionicum* zostały wykryte i opisane unikatowe lipidy eterowe typu alkilogliceroli, reprezentujące nową klasę związków lipidowych, w których glicerol podstawiony jest kwasem tłuszczowym w pozycji O-2, natomiast w pozycji O-3, połączony jest z łańcuchem alkilowym poprzez wiązanie eterowe (Zał. 5: poz. 1, **Publikacja nr 1**). Te cztery glikolipidy

²⁰ Paściak M, Ekiel I, Grzegorzewicz A, Mordarska H, Gamian A. Structure of the major glycolipid from *Rothia dentocarioso*. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1594, 199-205.

główne są markerami taksonomicznymi specyficznymi dla gatunku, pozwalającymi na szybkie rozróżnienie pomiędzy *P. propionicum*, a innymi przedstawicielami tego rodzaju²¹.

Drugi podstawowy typ glikolipidów stanowią acylowane pochodne cukrowe, które wg ujednoczonego systemu klasyfikacji lipidów²² należą do klasy sacharolipidów. U przedstawicieli rzędu *Corynebacterineae* najpowszechniejsze są pochodne trehalozy. Jednym z nich jest 6,6-dimikolan α, α' -trehalozy (cord factor, czynnik wiązkowy) i jego pochodne, które występują u przedstawicieli *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Corynebacterium* i *Rhodococcus*. Glikolipid ten jest zbudowany z dwóch cząsteczek trehalozy, połączonych wiązaniem 1-1, do których przyłączone są długie łańcuchy kwasów mikołowych zawierających 60-90 atomów węgla w łańcuchu oraz często grupy cyklopropanowe. W rodzaju *Mycobacterium* występuje rodzina estrów trehalozy, do której należą sulfolipidy, diacylowana trehaloza (DAT), triacylowana trehaloza (TAT), poliacylowana trehaloza (PAT) oraz glikolipidy fenolowe.

Glikolipid z grupy sacharolipidów wykryto w komórkach *Tsukamurella pulmonis* (Zał. 5: poz. 6, **Publikacja nr 6**). W cząsteczce tego lipidu trehaloza estryfikowana jest dwoma resztami kwasów tłuszczowych: krótką zaledwie 4 węglową i dłuższą mieszczącą się w granicach 18-20 atomów węgla w łańcuchu.

Rola lipidów bakteryjnych

Glikolipidy bakteryjne pełnią ważne funkcje strukturalne, przede wszystkim stabilizują błonę komórkową oraz zapewniają sztywność powierzchni komórki.

Lipidy mogą funkcjonować jako czynniki wirulencji, antygeny bądź wzorce molekularne patogenów, rozpoznawane przez układ odpornościowy gospodarza. Układ odpornościowy odczytuje przez receptory rozpoznające wzorce PRRs (pattern recognition receptors) niezmiennie molekularne struktury unikalne dla mikroorganizmów, nazywane MAMP (microbe-associated molecular pattern) bądź PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Wzorce molekularne rozpoznawane przez PRR są zazwyczaj małymi, ale konserwatywnymi częściami makrocząsteczek, jak np. lipidy kotwiczące polimery bakteryjne w błonie komórkowej, monomery peptydoglikanu lub kwasów nukleinowych. Przykładami takich cząsteczek są LPS bakterii Gram-ujemnych, kwasy lipotejchojowe bakterii Gram-dodatnich, lipoglikan *M. tuberculosis*. Cząsteczki te są rozpoznawane przez rodzinę PRR nazywaną receptorami Toll-podobnymi (TLR). Ostatnio wykazano, że lipoglikany aktynobakterii: *Micrococcus luteus*, *Rothia mucilaginosa* oraz *Corynebacterium glutamicum*, zbudowane na glikozylowanym diacyloglicerolu, stanowią molekularne struktury unikalne dla mikroorganizmów (MAMPs) rozpoznawane przez TLR2 i indukują zależną od TLR2 odpowiedź wrodzoną²³. Wydaje się, że opisany w naszej pracy (Zał. 5: poz. 2, **Publikacja nr 2**) główny glikolipid *R. mucilaginosa* może być prekursorem tej makrocząsteczki.

²¹ Mordarska H, Paściak M. A simple method for differentiation of *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium propionicum*. FEMS Microbiology Letters 1994, 123, 325-330.

²² Fahy E, Subramaniam S, Brown H, Glass C, Merrill JA et al. A comprehensive classification system for lipids. J Lipid Res 2005, 46, 839-861.

²³ Blanc L, Castanier R, Mishra AK et al. Gram-positive bacterial lipoglycans based on a glycosylated diacylglycerol lipid anchor are microbe-associated molecular patterns recognized by TLR2. PLoS One 2013, 21, 8, e81593.

Lipidy mogą być prezentowane limfocytom T jako antygeny. Długo obowiązywał paradygmat, że receptory komórek T są przeznaczone jedynie do rozpoznawania białek, ale z czasem okazało się, że MHC klasy I i II mogą też prezentować glikopeptydy, pochodzące z glikoprotein i w efekcie aktywować komórki T specyficzne dla glikopeptydów. Zdolność do rozpoznawania antygenów lipidowych przez cząsteczki CD1 i prezentowania odpowiednim komórkom T odkryto stosunkowo niedawno, badając odpowiedź immunologiczną wywoływaną przez antygeny *Mycobacterium*²⁴. Pierwszymi opisanymi antygenami prezentowanymi przez cząsteczki CD1b były kwasy mikołowe²⁵. Wkrótce okazało się, że kolejne grupy lipidów, występujące w osłonach komórkowych prątków, mogą być prezentowane przez CD1b: fosfolipidy zawierające inozytol – lipoarabinomannan i fosfatydyloinozytolomannozydy²⁶ oraz glikolipidy zawierające kwasy mikołowe – glukozomonomikolany²⁷. Cechą charakterystyczną antygenów prezentowanych przez cząsteczki CD1b jest obecność wspólnego motywu strukturalnego: części hydrofilowej i dwóch łańcuchów kwasów tłuszczowych, które zapewniają hydrofobowość na przeciwnym końcu cząsteczki.

Badania ostatnich lat wyjaśniają udział lipidów *M. tuberculosis* w patogenezie gruźlicy. W komórkach tych bakterii lipidy stanowią ok 40% suchej masy komórki. Najpowszechniej występującym i jednocześnie najbardziej toksycznym lipidem jest dimikolan trehalozy (TDM). Podstawową funkcją lipidów prątków jest funkcja strukturalna i utrzymanie bariery przepuszczalności jako pierwszej linii obrony przed toksycznymi cząsteczkami produkowanymi przez gospodarza. Ponadto lipidy mają także znaczący udział w oddziaływaniach pomiędzy gospodarzem a patogenem, na każdym etapie cyklu życiowego. *M. tuberculosis* może pasożytować wewnątrz fagocytów - makrofagów i komórek dendrytycznych. Prątki dostają się do wnętrza komórek gospodarza przez receptory, takie jak receptory dla komplementu, receptory zmiatacze (scavenger), lektyny typu C²⁸. Różne glikolipidy osłon komórkowych *Mycobacterium* są ligandami dla tych receptorów: receptor dla komplementu typu 3 rozpoznaje glikolipid przez domenę lektynową, receptor mannozowy i DC-SIGN rozpoznaje lipoarabinomannan, natomiast receptory MARCO rozpoznają TDM. Glikolipidy reagują także z receptorami Toll – podobnymi (TLR): lipoarabinomannan jest słabym, a lipomannan silnym ligandem TLR2. Glikolipidy, np. TDM oraz lipoglikany blokują proces dojrzewania fagosomów. Wewnątrz komórki gospodarza *M. tuberculosis* uwalnia znaczące ilości białek i lipidów, które w różny sposób mogą modulować funkcje gospodarza przez uwalnianie cytokin pro lub przeciwzapalnych, apoptozę, lub tworzenie granulomy. Niektóre lipidy jak sulfolipidy czy lipidy trehalozowe, np. cord factor, indukują odpowiedź humoralną.

Podczas infekcji w organizmie gospodarza stymulowane są zarówno konwencjonalne, jak i niekonwencjonalne limfocyty T. Konwencjonalne komórki T rozpoznają antygeny białkowe prezentowane przez cząsteczki MHC klasy II lub I na komórkach prezentujących antygen, podczas gdy niekonwencjonalne komórki T rozpoznają antygeny lipidowe prezentowane przez cząsteczki CD1.

²⁴ Porcelli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 1992, 360, 593-597.

²⁵ Beckman EM, Porcelli S, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by GDI-restricted $\alpha\beta$ + T cells. *Nature* 1994, 372, 691-694.

²⁶ Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995, 269, 227-230.

²⁷ Moody DB, Reinhold BB, Guy MR, Beckman EM, Frederique DE et al. Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. *Science* 1997, 278, 283-286.

²⁸ Neyrolles O, Guilhot C. Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* 2011, 91, 187-195.

Badania *in vivo* wykazały, że komórki T zależne od CD1 pełnią funkcję ochronną podczas infekcji, ponieważ niszczą patogeny wewnątrzkomórkowe i wydzielają cytokiny prozapalne, które z kolei wzmagają bakteriobójczą aktywność makrofagów²⁹. Uważa się, że CD1 prezentujące glikolipidy bakteryjne stanowią uzupełniającą rolę względem konwencjonalnych mechanizmów zależnych od MHC w inicjacji i regulacji odpowiedzi immunologicznej na infekcję bakteryjną.

Badania te uświadomiły badaczom kluczowe znaczenie lipidów występujących w osłonach *Mycobacterium* jako determinantów odpowiedzi odpornościowej gospodarza. Związki lipidowe stanowią nową klasę antygenów, które mogą być użyte do tworzenia szczepionek podjednostkowych. Obiecujące próby użycia szczepionek opartych na lipidach przeprowadzono na świnkach morskich³⁰; dobrym kandydatem do szczepionki przeciwgruźliczej okazały się ostatnio sulfoglikolipidy, związki występujące w komórkach wirulentnego szczepu *M. tuberculosis*³¹.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW OPISANYCH W WYBRANYCH DO OCENY PUBLIKACJACH

Paściak M., Pawlik K., Gamian A., Szponar B., Skóra J., Gutarowska B. An airborne actinobacteria *Nocardiosis alba* isolated from bioaerosol of a mushroom compost facility. **Aerobiologia** 2014, 30, 413-422.

W pracy zastosowano wielofazową strategię taksonomiczną do analizy szczepu aktynobakterii wyizolowanego z bioaerozolu w zakładzie produkującym kompost pod uprawę pieczarek. Inspiracją badań były występujące u pracowników i właścicieli, mieszkających w bliskim sąsiedztwie zakładu, chroniczne bóle głowy oraz przypadki chronicznego zapalenia pęcherzyków płucnych. Przeprowadzone ilościowe i jakościowe badania bioaerozoli pobranych z różnych miejsc na terenie zakładu wykazały, że szczepy aktynobakterii były obecne we wszystkich testowanych lokalizacjach, natomiast nie były obecne w próbkach pobranych w dalszej odległości (1km) od zakładu. Analiza mikroorganizmów wyizolowanych z powietrza, powierzchni i kompostu wykazała we wszystkich lokalizacjach obecność szczepu wytwarzającego charakterystyczną grzybnię powietrzną. Przeprowadzono pełną analizę taksonomiczną, określono morfologię szczepu, wzrost na podłożach hodowlanych o różnym składzie. Charakterystykę fizjologiczną oraz wrażliwość na antybiotyki określono w porównaniu do dwóch kolekcyjnych szczepów *Nocardiosis*.

Analiza chemiotaksonomiczna szczepu wykazała, że profil markerów chemicznych odpowiada profilowi rodzaju *Nocardiosis*. W ścianie komórkowej wykryto obecność kwasu *mezo*-DAP, nie występowały natomiast taksonomicznie ważne cukry. Ustalono profil kwasów tłuszczowych, były to *izo* lub *anteizo* rozgałęzione kwasy o długości od C14:0 do C18:0, wraz z kwasem tuberkulo-stearynowym – metylorozgałęzionym kwasem C18:0. W profilu lipidów polarnych oznaczono taksonomicznie ważne fosfolipidy – fosfatydylocholinę i fosfatydylometanoloaminę oraz glikolipidy główne. Szczególnie cenna okazała się analiza profilu glikolipidowego za pomocą TLC, w której wykazano obecność dwóch

²⁹ Gilleron M, Stenger S, Mazon Z, Wittke F, Mariotti S et al. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 2004, 199, 649-659.

³⁰ Dascher CC, Hiromatsu K, Xiong X, Morehouse C, Watts G et al. Immunization with a mycobacterial lipid vaccine improves pulmonary pathology in the guinea pig model of tuberculosis. *Int Immunol* 2003, 15, 915-925.

³¹ Guiard J, Collmann A, Garcia-Alles LF, Mourey L, Brando T et al. Fatty acyl structures of *Mycobacterium tuberculosis* sulfoglycolipid govern T cell response. *J Immunol* 2009, 182, 7030-7037.

glikolipidów charakterystycznych dla rodzaju *Nocardiosis*³², oznaczonych we wcześniejszej pracy, oraz dwóch dodatkowych związków glikolipidowych.

Zwieńczeniem badań taksonomicznych była analiza sekwencji 16S RNA, która wykazała 99,9 % homologię z sekwencją typowego szczepu *N. alba* DSM 43377^T.

W pracy tej szczególnie istotny był aspekt narażenia zawodowego pracowników, gdyż dostępność dużej ilości spor promieniowców mogła być przyczyną problemów zdrowotnych. Przykładem jest *Saccharopolyspora rectivirgula* wywołująca chorobę zawodową – alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych, znaną pod nazwą „płuco rolnika”. Biodostępność szczepu *N. alba* może zatem stanowić potencjalne zagrożenie zawodowe pracowników zakładu produkującego kompost.

Huang Y., Paściak M., Liu Z., Xie Q., Gamian A. *Amycolatopsis palatopharyngis* sp. nov., a potentially pathogenic actinomycete isolated from a human clinical source. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2004, 54, 359-363.

W pracy zastosowano wielofazową strategię taksonomiczną do identyfikacji szczepu wyizolowanego z nacieku na podniebieniu miękkim pacjenta. Szczep był wyizolowany w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN, z posiewu materiału klinicznego.

Przedstawicielei rodzaju *Amycolatopsis* odróżnia się od pozostałych taksonów rodziny *Pseudonocardiaceae* stosując kombinację cech morfologicznych i chemiotaksonomicznych. Badany szczep był fakultatywnym beztlenowcem, wytwarzał grzybnię powietrzną przechodzącą w długie łańcuchy przypominające spory oraz wzrastał w szerokim zakresie temperatur i pH.

Przeprowadzona charakterystyka chemiotaksonomiczna wykazała zgodność z rodzajem *Amycolatopsis*. Badany izolat zawierał kwas *mezo*-DAP i taksonomicznie ważne w rodzaju *Amycolatopsis* cukry – arabinozę i galaktozę. Wśród lipidów polarnych oznaczono fosfatydyloetanolaminę – II typ fosfolipidowy wg Lechevaliera oraz mniejsze ilości fosfatydylo-glicerolu i fosfatydyloinozytolu. Istotny był także profil kwasów tłuszczowych z przeważającą ilością kwasu *izo* C16:0 (ponad 50% składu), ponadto *anteizo* C16:0 i C17:0 oraz nieobecność kwasów mikolowych. Przeprowadzono szczegółową charakterystykę fenotypową, w tym morfologiczną, i wyszczególniono właściwości fizjologiczne pozwalające na odróżnienie tych bakterii od pokrewnych taksonów rodzaju *Amycolatopsis*. Zwieńczeniem badań była analiza sekwencji 16S rDNA, która pozwoliła na przyporządkowanie szczepu do podrzędu *Pseudonocardineae* i rodziny *Amycolatopsis*, w której największe podobieństwo sekwencji z pokrewnymi taksonami wynosiło odpowiednio: 96,4% z *A. methanolica*, 96,32% z *A. thermoflava* i 96,16% z *A. eurytherma*. Ta unikalna pozycja filogenetyczna i umiarkowanie niskie podobieństwo sekwencji (nie przekraczające 97%) wskazywało, że szczep reprezentuje nowy takson w obrębie rodzaju *Amycolatopsis*.

Opisany nowy przedstawiciel *Amycolatopsis* został zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) i Chińskiej Kolekcji Mikroorganizmów (Chinese General Microbiological Collection Centre);

³² Mordarska H, Zakrzewska-Czerwińska J, Paściak M, Szponar B, Rowiński S. Rare, suppurative pulmonary infection caused by *Nocardiosis dassonvillei* recognized by glycolipid markers. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998, 21, 47-55.

sekwencja 16S rDNA została zdeponowana w bazie GenBank i jest dostępna dla szerokiego grona badaczy.

Gu Q., **Paściak M.**, Luo H., Gamian A., Liu Z., Huang Y. *Ruania albidiflava* gen. nov., sp. nov., a novel member of the suborder *Micrococccineae*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 2007, 57, 809-814.

W pracy zastosowano wielofazową strategię taksonomiczną do identyfikacji szczepu wyizolowanego z ziemi uprawnej pola bawełny w prowincji Shandong w Chinach. Po rozcieńczeniu próbek gleby wysiano je na podłoża stałe z ekstraktem drożdżowym i skrobią, które inkubowano przez tydzień w temp. 28°C i z nich izolowano szczep aktynobakterii. Szczep wytwarzał wypukłe, wilgotne kremowe kolonie. Komórki miały kształt małych ziarniaków, wzrastały w szerokim zakresie pH (5,5-12,5) i temperaturze 20-37°C.

Wstępne badania izomeru DAP w hydrolizatach komórek bakteryjnych, nie wykazały obecności tego aminokwasu i konieczna była izolacja ściany komórkowej oraz szczegółowa analiza peptydoglikanu. Ustalono, że w komórkach badanego szczepu występuje mureina typu A4α, z nowym typem mostka międzypeptydowego: L-Lys–Gly–L-Glu–L-Glu. Ta nowa cecha taksonomiczna uwiarygodniła utworzenie nowego taksonu – rodzaju *Ruania*. Analiza fosfolipidów wykazała obecność fosfatydylo-glicerolu i difosfatydyloglicerolu, czyli typu I wg Lechevaliera; wśród lipidów polarnych obecny był nieznanany glikolipid główny. Analiza kwasów tłuszczowych wykazała obecność kwasów rozgałęzionych izo/*anteizo* C15:0 - C17:0, oraz nienasyconego kwasu C18:1.

Analiza sekwencji 16S rRNA wykazała największe pokrewieństwo sekwencji z taksonem *Georgenia muralis* o wartości 94,2%. Porównanie wzorca znaczących nukleotydów w genie 16S rRNA, wykazało, że badany szczep nie należy do żadnej z rodzin i rodzajów podrzędu *Micrococccineae* i wskazywało, że reprezentuje on nowy rodzaj. Nazwę rodzajową zaproponowali współautorzy, dla uczczenia profesora Ruana, chińskiego mikrobiologa, zajmującego się taksonomią aktynobakterii, natomiast nazwę gatunkową nadano w odniesieniu do koloru kolonii. Nowy przedstawiciel rodzaju *Ruania* i gatunku *R. albidiflava* został zdeponowany w polskiej, chińskiej, niemieckiej i japońskiej kolekcji mikroorganizmów, sekwencję 16S rRNA tego szczepu zdeponowano w ogólnodostępnej bazie GenBank.

Potwierdzeniem użyteczności tych badań jest zaproponowanie w 2010r. nowej rodziny *Ruaniaceae*³³, która oprócz rodzaju *Ruania* zawiera nowy rodzaj *Haloactinobacterium*.

Paściak M., Holst O., Lindner B., Mierzchała M., Grzegorzewicz A., Mordarska H., Gamian A. Structural and serological characterization of the major glycolipid from *Rothia mucilaginosa*. **Biochim. Biophys. Acta** 2004, 1675, 54-61.

Celem tej pracy były badania strukturalne głównego glikolipidu wyizolowanego z komórek oportunistycznych bakterii *Rothia mucilaginosa*. Glikolipid ten jest markerem chemio- i immunotaksonomicznym odróżniającym *R. mucilaginosa* od innych ziarniaków Gram-dodatnich. Pierwszym etapem pracy była izolacja glikolipidu głównego z ekstraktu lipidowego za pomocą metod chromatograficznych TLC oraz HPLC. Określenie składu chemicznego związku było możliwe dzięki zastosowaniu procedur analitycznych, analizy składników lipidowych i cukrowych za pomocą GLC-MS

³³ Tang SK, Zhi XY, Wang Y, Wu JY, Lee JC et al. *Haloactinobacterium album* gen. nov., sp. nov., a halophilic actinobacterium, and proposal of *Ruaniaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010, 60, 2113-2119.

oraz metody enzymatycznej. Kompletną strukturę ustalono na podstawie analizy NMR, przeprowadzając eksperymenty jedno i dwu wymiarowe oraz spektrometrię mas MALDI-TOF. Glikolipid główny *R. mucilaginosa* jest dimannozyloacylomonoacyloglicerydem, którego część cukrową stanowi α -D-Manp-(1→3)- α -D-Manp-(1→3)-Gro, (Gro-glicerol). Wcześniejsze badania glikozyloglicerydów przeprowadzone w naszym zespole wykazały podobną strukturę w komórkach *R. dentocariosa* i *S. hirsuta*, czyli taką samą część cukrową z acylovaną wewnętrzną resztą mannozy, natomiast różne było miejsce acylacji glicerolu: w *R. dentocariosa* i *S. hirsuta* na węglu C-1, a w *R. mucilaginosa* na węglu C-2.

Ważną częścią pracy była analiza immunochemiczna reaktywności tych różnych glikolipidów z homo- i heterologicznymi poliwalentnymi surowicami króliczymi. Oprócz wspomnianych monoacyloglicerydów, do badań użyto glikolipid N1 *N. dassonvillei* o strukturze dimannozyloacyloglicerydu oraz glikolipid N2 *N. dassonvillei* będący acylovaną trehalozą. Do testów ELISA użyto surowic skierowanych przeciwko *R. mucilaginosa*, *R. dentocariosa*, *M. luteus* i *N. dassonvillei* (wybrano *M. luteus*, ponieważ z danych literaturowych wynika, że zawiera on dimannozyloacylogliceryd). Wszystkie analizowane surowice zawierały przeciwciała anty-glikolipidowe o dość niskim mianie. Glikolipidy *R. mucilaginosa* i *S. hirsuta* wykazywały podobną reaktywność z badanymi surowicami, w przeciwieństwie do glikolipidu N2 należącego do odmiennej grupy lipidów. Wykazano, że glikozyloglicerydy mają właściwości antygenowe i w surowicach poliklonalnych skierowanych przeciwko komórkom aktynobakterii są obecne przeciwciała anty-glikolipidowe.

Paściak M., Sanchez-Carballo P., Duda-Madej A., Lindner B., Gamian A., Holst O. Structural characterization of the major glycolipids from *Arthrobacter globiformis* and *Arthrobacter scleromae*. **Carbohydr. Res.** 2010, 345, 1497-1503.

Praca ta stanowi kontynuację badań nad glikozyloglicerydami rodziny *Micrococcaceae*. Wstępne badania za pomocą TLC wykazały taką samą ruchliwość chromatograficzną glikolipidu głównego, oznaczonego w obecnej pracy – G1, występującego w komórkach *R. dentocariosa*, *R. mucilaginosa*, *S. hirsuta* i *M. luteus*, natomiast w komórkach przedstawicieli *Arthrobacter* obecne były 2 glikolipidy główne G1 i G2, charakteryzujący się większą ruchliwością chromatograficzną. Celem tej pracy było określenie struktury głównych glikolipidów dwóch przedstawicieli rodzaju *Arthrobacter* – typowego szczepu *A. globiformis*, będącego izolatem glebowym oraz szczepu *A. scleromae* wyizolowanego od pacjenta ze zmian skórnych. Wcześniejsze prace wskazywały, że glikolipid główny *A. globiformis* należy do dimannozyloacyloglicerydów, jednak dokładana lokalizacja reszt kwasów tłuszczowych nie była określona.

Drugim aspektem badań było poszukiwanie różnic w budowie glikolipidów przedstawicieli tego samego rodzaju, ale reprezentujących szczepy bakterii środowiskowych i oportunistycznych. Aby osiągnąć założony cel przeprowadzono izolację glikolipidów głównych *Arthrobacter* i określono ich skład chemiczny. Analiza części cukrowej glikolipidów wykazała, że glikolipid G1 zawiera D-mannozę i glicerol w proporcji (2:1), natomiast G2 - galaktozę i glicerol w proporcji (1:1), połączenia pomiędzy cukrami wykazano w analizie metylacyjnej. Szczegółowa analiza za pomocą spektroskopii NMR i spektrometrii MALDI MS pozwoliła na uwidocznienie różnic strukturalnych. Widma ¹H NMR glikolipidu G1 obu szczepów były identyczne i nakładały się na siebie, a widma glikolipidu G2 obu szczepów były również bardzo podobne. Ustalono, że część cukrową glikolipidu G1 stanowił dimannozyd α -Manp(1→3)- α -Manp(1→3)-Gro (Gro-glicerol), a glikolipidu G2 - β -Galp-(1→3)-Gro, zidentyfikowano

też sygnały pochodzące od kwasów tłuszczowych. Analiza glikolipidów za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas MALDI-TOF MS z analizatorem cyklotronowego rezonansu jonów (MALDI FT ICR-MS) pozwoliła na zbadanie heterogenności kwasów tłuszczowych w badanych glikolipidach. Uzyskane wyniki były zgodne z analizą kwasów tłuszczowych, w której wykazano obecność kwasów rozgałęzionych *izo* i *anteizo* C15:0, C16:0 i C17:0. W glikolipidach G1 i G2 pochodzących z *A. scleromae*, obserwowano podstawienie kwasami C15:0 i C17:0, natomiast w glikolipidach pochodzących z *A. globiformis* obserwowano podstawienie dwoma kwasami C15:0. Porównując względną intensywność jonów molekularnych na widmie MALDI MS, glikolipid G2 obu szczepów wykazywał największą heterogenność kwasów tłuszczowych. Obecnie nie wiadomo, czy ta heterogenność ma implikacje biologiczne, ale stanowi to ciekawy punkt wyjścia do dalszych badań.

Zaskakującą obserwacją poczynioną podczas analizy glikozylogliceroli i zawartą w tej pracy jest to, że acyloldiglikozylomonoglicerydy mogą częściej występować w komórkach aktynobakterii czy nawet bakterii-Gram dodatnich, niż dotychczas uważano. W tym celu warto zweryfikować znane od lat 70 ubiegłego wieku struktury diglikozylodiglicerydów. Glikolipidy są markerami służącymi do szybkiej identyfikacji niektórych aktynobakterii, w świetle uzyskanych wyników okazało się, że glikolipid G2 (galaktozodigliceryd) jest markerem odróżniającym *Arthrobacter* spp. od innych przedstawicieli rodziny *Micrococcineae*, w tym rodzaju *Rothia*.

Paściak M., Kaczyński Z., Lindner B., Holst O., Gamian A. Immunochemical studies of trehalose-containing major glycolipid from *Tsukamurella pulmonis*. **Carbohydr. Res.** 2010, 345, 1570-1574.

W pracy określono strukturę chemiczną głównego glikolipidu aktynobakterii *Tsukamurella pulmonis*, należących do rzędu *Corynebacterineae*. Bakterie *T. pulmonis* wyizolowano z płwociny pacjentki chorej na płucną postać gruźlicy. Rodzaj *Tsukamurella*, podobnie jak blisko spokrewniony rodzaj *Mycobacterium* jest bogaty w związki lipidowe. Charakterystyczny glikolipid główny występował w trzech gatunkach *Tsukamurella*: *T. paurometabola*, *T. inchonensis* i *T. pulmonis*. Klasyczne podejście do analizy strukturalnej – czyli badanie składu chemicznego, analiza NMR oraz MALDI-TOF wykazało, że związek ten należy do klasy sacharolipidów i jest di-acylowaną trehalozą. Nie jest to cząsteczka symetryczna jak w przypadku dimikolanu trehalozy, gdyż kwasy tłuszczowe przyłączone są tylko do jednej reszty glukozy. W pozycji C-2 i C-3 glukozy estrowo przyłączone są dwie reszty kwasów tłuszczowych, dłuższy acyl 18-20 węglowy do C-2, a krótszy 4-5 węglowy do C-3. Te krótsze kwasy można było wykryć tylko za pomocą kombinacji technik – NMR i MALDI-TOF. Łańcuchy kwasów tłuszczowych w cząsteczce glikolipidu są heterogenne, występują w mieszaninie kwasów nasyconych i nienasyconych. W pracy tej kwasy tłuszczowe przeprowadzono w pochodne DMOX (4,4-dimetylo oksazolinę) i dzięki temu możliwe było ustalenie położenia wiązania podwójnego.

W komórkach aktynobakterii *T. paurometabolum*, *Rhodococcus wratislaviensis* i *Nocardiosis dassonvillei* występują acylowane pochodne trehalozy: w *N. dassonvillei* diacylowana trehaloza, a w *R. wratislaviensis*, trehaloza acylowana 4. resztami kwasów tłuszczowych. Przeprowadzone badania immunochemiczne wskazują, że w poliwalentnych surowicach króliczych występują przeciwciała przeciwko tym sacharolipidom o podobnych epitopach reagujące z glikolipidem *T. pulmonis*. Związek ten podobnie jak cała rodzina sacharolipidów zbudowana na estrach trehalozy u *Mycobacterium*, posiada właściwości immunogenne.

Paściak M., Holst O., Lindner B., Mordarska H., Gamian A. Novel bacterial polar lipids containing ether-linked alkyl chains, the structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T). **J. Biol. Chem.** 2003, 278, 3948-3956.

Praca dotyczyła ustalenia struktury czterech glikolipidów głównych gatunku *Propionibacterium propionicum*, występującego w jamie ustnej człowieka, który może wywoływać infekcje endogenne, przypominające typową promienicę. Może ona dotyczyć części szyjno-twarzowej, jamy brzusznej, kości oraz mózgu. Bakterie te mogą powodować trudności diagnostyczne ze względu na wymagania odżywcze, mikroaerofilny typ wzrostu i przedłużony czas hodowli, jak również ich polimorficzny charakter i zmienne barwienie metodą Grama. Szczegółowa analiza chemiczna czterech glikolipidów *P. propionicum* z użyciem zaawansowanych metod spektroskopii NMR oraz spektrometrii masowej wykazała, że są to związki o nieznanej dotąd w klasie aktynobakterii (a nawet w domenie *Bacteria*) unikalnej strukturze chemicznej. Glikolipidy G2 i G3 posiadają wspólny szkielet złożony z α -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 1)-Gro (Gro, glicerol), w którym glicerol w pozycji O-2 jest acylowany kwasem tłuszczowym, natomiast w pozycji O-3 jest podstawiony wiązaniem eterowym łańcuchem alkilowym. W glikolipidzie G3 dodatkowa reszta kwasu tłuszczowego jest przyłączona do O-6 terminalnej reszty glukozy. Glikolipidy G4 i G1 są strukturalnie podobne do glikolipidu G2, ale różnią się tym, że glikolipid G4 jest pozbawiony drugiej reszty glukozy, natomiast w glikolipidzie G1 nie występuje reszta kwasu tłuszczowego w pozycji O-2. Glikolipid G1 został otrzymany w bardzo małej ilości, nie pozwalającej na analizę metodą spektroskopii NMR i jego struktura została zaproponowana na podstawie jedynie analizy MALDI-TOF MS. Zastosowanie wysoko rozdzielczego spektrometru ESI-FT-ICR MS pozwoliło na jednoznaczne wykazanie, że w glikolipidzie G2 oprócz zidentyfikowanego głównego lipidu eterowego, występuje także w dużo mniejszej ilości lipid zawierający dwa wiązania estrowe. Warte jest podkreślenia iż różnica w masie cząsteczkowej tych dwóch lipidów zbudowanych z 15 węglowych kwasów tłuszczowych wynosiła zaledwie 0,037 jednostek masy.

Lipidy *P. propionicum* to glukozoglicerole zawierające eterowo związane łańcuchy alkilowe, a co ciekawsze, w cząsteczce glicerolu występują oba typy wiązań: eterowe i estrowe. Występowanie eterowych lipidów jest jedną z charakterystycznych właściwości domeny *Archea*. U tych organizmów występują głównie di- lub tetraetery zawierające długołańcuchowe rozgałęzione łańcuchy izoprenylowe. Wg mojej wiedzy lipidy zawierające wiązania estrowe nie występują u archebakterii. Lipidy *P. propionicum* mogą zatem stanowić pośredni etap w ewolucji od dieterów do monoeterów zawierających jedno wiązanie estrowe w cząsteczce glicerolu. Odkrycie nowych struktur glikolipidowych u *P. propionicum* jest dowodem, że użycie nowych technik analitycznych może spowodować rewizję znanych dotąd struktur lipidowych.

Ważnym etapem pracy było wykazanie właściwości biologicznych tych związków, reakcję w teście immunoenzymatycznym świadczącą o immunogenności, a także udział glikolipidu G3 w wywoływaniu nadwrażliwości typu późnego. Markery glikolipidowe *P. propionicum* są nie tylko markerami taksonomicznymi, ale także czynnikami etiologicznymi, które mogą brać udział w patogenezie wywoływanych przez nie chorób.

Cechą wspólną prezentowanych prac jest **kompleksowe podejście** zarówno do analiz strukturalnych glikolipidów, jak i identyfikacji nieznanymi izolatów bakteryjnych. Dla osiągnięcia celu należało zastosować szereg uzupełniających się metod mikrobiologicznych, biochemicznych oraz analizę instrumentalną. Uwzględnienie charakterystyki fenotypowej, chemiotaksonomicznej oraz analiza 16S rRNA pozwoliło na wiarygodną identyfikację badanych aktynobakterii. Analiza strukturalna również wymagała wieloetapowego podejścia; często dopiero zastosowanie kilku komplementarnych technik badawczych pozwalało na ostateczne ustalenie struktury związku. Do analizy glikolipidów nie wystarcza jedynie technika spektroskopii NMR, gdyż zdarza się, że sygnały pochodzące od grup CH₂ z łańcuchów kwasów tłuszczowych pokrywają się i z analizy samego widma NMR nie można określić dokładnej długości łańcuchów kwasów tłuszczowych. Informacje te można uzyskać zarówno z analizy izolowanych kwasów tłuszczowych, jak i analizy całej cząsteczki za pomocą spektrometrii mas.

ZA NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘTE REZULTATY UWAŻAM:

1. Ustanowienie nowej klasy lipidów polarnych aktynobakterii – posiadających eterowo związane łańcuchy alkilowe w cząsteczce lipidu oraz określenie kompletnych struktur czterech glikolipidów *Propionibacterium propionicum*.
2. Określenie kompletnych struktur glikozyloglicerydów: głównego glikolipidu występującego w komórkach *Rothia mucilaginosa* i dwóch głównych glikolipidów *Arthrobacter scleromae* i *A. globiformis*.
3. Określenie kompletnej struktury sacharolipidu – głównego glikolipidu występującego w komórkach *Tsukamurella pulmonis*.
4. Wykazanie właściwości immunogennych glikolipidów aktynobakterii.
5. Ustanowienie nowego rodzaju – *Ruania* w klasie *Actinobacteria*, domenie *Bacteria*.
6. Wykrycie nowego typu mureiny w peptydoglikanie ściany komórkowej *Ruania albidiflava* - L-Lys–Gly–L-Glu–L-Glu (A4α).
7. Ustanowienie nowych gatunków aktynobakterii środowiskowych i klinicznych: *Ruania albidiflava* i *Amycolatopsis palatopharyngis*.
8. Ustalenie pozycji taksonomicznej szczepu wyizolowanego z bioaerozolu, który stanowił potencjalne narażenie zawodowe pracowników.

Glikolipidy będące przedmiotem cyklu prac mogą znaleźć zastosowanie jako składniki szczepionek przeciwko chorobotwórczym aktynobakteriom, np. *P. propionicum* i *T. pulmonis*, ponadto mogą być zastosowane do opracowywania nowych testów diagnostycznych. Nie do przecenienia jest również rola jaką odgrywają w badaniach podstawowych - poszukiwania zależności pomiędzy strukturą chemiczną i ich funkcją w złożonych interakcjach z organizmem gospodarza.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Podsumowanie

Mój dorobek naukowy wraz z jednotematycznym cyklem publikacji obejmuje współautorstwo w 28 artykułach oryginalnych i przeglądowych: 16 pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (jako pierwszy autor – 6 prac, autor korespondencyjny – 5 prac), współautorstwo w 12 pracach spoza bazy JCR, w tym 8 artykułach przeglądowych, 50 komunikatach zjazdowych oraz 8 referatach wygłoszonych na międzynarodowych i krajowych konferencjach. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, impact factor) wszystkich prac wynosi 34,773, a suma punktów MNiSW: 396. Do dnia 16 lutego 2015r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane 106 razy (wyłączono autocytowania).

Łączny IF siedmiu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi 19,689 (MNiSW 180), przy ilości cytowań 49.

W ramach działalności naukowej byłam kierownikiem dwóch projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Uczestniczyłam w 1 międzynarodowym projekcie badawczym, byłam wykonawcą trzech projektów badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, brałam udział w 1 projekcie uczelnianym oraz dwóch projektach finansowanych ze środków UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

A) PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Bioakumulacja w biomasie *Streptomyces*

W latach 1987-1992 studiowałam na Politechnice Wrocławskiej, na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki, na kierunku Inżynieria Materiałowa. W ramach indywidualnego toku studiów realizowałam dodatkowo program kierunku Biotechnologia. Pracę magisterską wykonywałam w Instytucie Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiastków Ziemi Rzadkich PWR, pod opieką naukową dra Zbigniewa Gołąba. Praca dotyczyła zjawiska bioakumulacji metali z roztworów o różnej sile jonowej przez żywe i martwe komórki oraz izolowane ściany komórkowe promieniowców *Streptomyces pilosus*. We współpracy z prof. Adamem Jezierskim z Uniwersytetu Wrocławskiego analizowałam otoczenie chemiczne kompleksów wytwarzanych przez metale za pomocą techniki EPR. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Water Air and Soil Pollution* (Zał. 3³⁴ : I.1.1. **Art. 2**) pod moim panięmskim nazwiskiem Breitenbach.

Badania markerów glikolipidowych *Propionibacterium*

W 1993 roku rozpoczęłam pracę w Zakładzie Immunologii Chorób Zakaźnych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Dołączyłam do Laboratorium Aktywnościologii kierowanego przez prof. dr hab. Halinę Mordarską, które zajmowało się w tym czasie problemami mikrobiologicznymi i klinicznymi zakażeń wywołanych przez promieniowce, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania markerów glikolipidowych w diagnostyce. Rodzaj *Propionibacterium* obejmuje dużą grupę bakterii probiotycznych, z których część stanowi mikrobiom człowieka. Ponadto znane są liczne gatunki chorobotwórcze, do których należy *P. acnes*, odpowiedzialny m. in. za wywołanie trądziku młodzieńczego i szeregu zakażeń oportunistycznych oraz *P. propionicum*,

³⁴ Załącznik 3, Wykaz opublikowanych prac naukowych w języku polskim

wywołujący schorzenia promieniczopodobne. Analiza profilu lipidowego tych bakterii wykazała obecność charakterystycznych dla *P. propionicum* glikolipidów. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy przedstawiającej prostą metodę rozróżnienia pomiędzy *P. acnes* a *P. propionicum* (Załącznik 3: I.1.1. **Art. 1**) oraz przedstawione na konferencji (Załącznik 3: X.1. **konf. 1**), stały się inspiracją tematu pracy doktorskiej. Celem tego projektu było poznanie budowy chemicznej i właściwości biologicznych glikolipidów głównych *Propionibacterium propionicum*. Korzystając z dostępnych metod analizy chemicznej określiłam przynależność tych związków do grupy acylowanych pochodnych cukrowych, złożonych z 1 do 4 reszt glukozy, podstawionej rozgałęzionymi kwasami tłuszczowymi. Wykazałam ich wpływ na odpowiedź humoralną i komórkową poprzez stymulację produkcji cytokin zależnych od Th1 (IFN, TNF, IL-2) i Th2 (IL-6) przez komórki krwi obwodowej oraz wytwarzanie tlenku azotu. Uzyskane wyniki były prezentowane na konferencjach (Załącznik 3: X.1. **konf. 2,3** oraz Załącznik 3: X.2. **konf. 1,2**).

Markery glikolipidowe *Nocardiosis*

Kolejnym obiektem badawczym w tym czasie były promieniowce rodzaju *Nocardiosis* oraz interesujący szczep wyizolowany z ropnej infekcji płucnej. Przeprowadziłam analizę lipidów polarnych przedstawicieli *Nocardiosis* oraz ustaliłam ich właściwości immunogenne za pomocą testów immunoenzymatycznych na modelu króliczej surowicy odpornościowej. Wyniki tych badań zostały opublikowane (Załącznik 3: I.1.1. **Art. 3**) i przedstawione na konferencji (Załącznik 3: X.1. **konf. 4**). W pracy tej po raz pierwszy wykazaliśmy, że glikolipidy mogą być zastosowane do szybkiego rozpoznawania infekcji wywołanych przez aktynobakterie oportunistyczne. Podsumowanie znaczenia taksonomicznego i immunologicznego markerów lipidowych badanych w tym czasie w Laboratorium Aktynomikologii zostało zawarte w pracy przeglądowej (Załącznik 3: I.1.2. **Art. 1**).

B) PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych nadal uczestniczyłam w pracach Laboratorium Aktynomikologii, które w późniejszym czasie weszło w strukturę Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, kierowanego przez prof. dr. hab. Andrzeja Gamiana. Mój wkład w realizację poszczególnych tematów badawczych, które zaowocowały opublikowaniem wyników lub ich prezentacją na konferencjach naukowych, został szczegółowo opisany w Załączniku 3, a niektóre z tych tematów były przedmiotem prac magisterskich, w przypadku których pełniłam funkcję promotora (Załącznik 4).

Badania strukturalne glikolipidów aktynobakterii

Drobnoustroje z rodzaju *Rothia* należą do bakterii oportunistycznych, które u pacjentów z obniżoną sprawnością układu odpornościowego mogą wywoływać zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie płuc, jak również posocznice. Brałam udział w ustalaniu struktury głównego glikolipidu *Rothia dentocariosa*, który okazał się dimannozyloacylomonoglicerydem (Załącznik 3: I.2.1. **Art. 1**).

W roku 2000 odbyłam pierwszy z licznych staży naukowych w Centrum Badań Biomedycznych w Borstel, w Niemczech, w laboratorium Profesora Otto Holsta. Dzięki tej współpracy miałam możliwość wykonywania doświadczeń na niedostępnych wówczas w macierzystym Instytucie urządzeniach: spektrometrze masowym MALDI oraz spektroskopach NMR. Podczas stażu naukowego wykonywałam badania składu chemicznego i analizowałam struktury glikolipidów *Propionibacterium propionicum* i *Rothia mucilaginoso*. W roku 2002 odbyłam kolejny miesięczny staż naukowy i wykonywałam badania strukturalne lipidów z rodzaju *Oerskovia*. Większość uzyskanych wyników była opisana w publikacjach

stanowiących cykl habilitacyjny, ponadto niektóre z nich były prezentowane na konferencjach naukowych (Zał. 3: X.2. **konf. 8,18,20**).

W latach 2000-2003 brałam udział w projekcie dotyczącym gliko- i fosfolipidów prątko- i nokardiopodobnych należących do rodzajów *Gordonia*, *Tsukamurella* i *Oerskovia* (Zał. 3: VII, **proj. 3**), które wywołują gruźliczopodobne zakażenia oportunistyczne (Zał. 3: X.2. **konf. 9,18**). W ramach tego projektu brałam udział w ustalaniu lokalizacji komórkowej glikolipidów. Ustaliliśmy, że glikolipidy *S. hirsuta* i *P. propionicum* zlokalizowane są w błonie komórkowej (Zał. 3: X.2. **konf. 5,11**), natomiast glikolipidy *Rhodococcus equi* oraz *Gordonia bronchialis* w ścianie komórkowej. Ponadto badania ultrastruktur komórkowych *R. equi* i *G. bronchialis*, aktynobakterii posiadających kwasy mikołowe w ścianie komórkowej, wykazały podobieństwo z budową osłon komórkowych *Mycobacterium* (Zał. 3: X.2. **konf. 11,12**). Wyniki te były prezentowane na licznych konferencjach w formie plakatów (Zał. 3: X.2. **konf. 20,21**), jak również referatów plenarnych (Zał. 3: IX.2. **ref. 1**).

Oprócz analiz strukturalnych brałam udział w badaniu właściwości biologicznych glikolipidów głównych *N. dassonvillei* (Zał. 3: X.2. **konf. 6**) oraz *Bifidobacterium* (Zał. 3: X.2. **konf. 15,16**).

W roku 2005 odbyłam kolejny staż naukowy w Centrum Badań Biomedycznych w Borstel, podczas którego zajmowałam się głównie badaniami strukturalnymi glikolipidów *Tsukamurella pulmonis* oraz *Arthrobacter* spp. Wyniki tych badań były prezentowane na konferencjach (Zał. 3: X.2. **konf. 24,25,32**).

Po ustanowieniu nowego taksonu *Ruania* określiłam, że glikolipidy główne *R. albidiflava* należą do typu fosfoglicerydów. Wyniki te opublikowano (Zał. 3: I.2.2. **Art. 9,10**) oraz prezentowano na konferencji (Zał. 3: X.2. **konf. 33**).

W ramach projektu grantowego dotyczącego kwasów nokardiomikołowych (Zał. 3: VII, **proj. 5**), oprócz głównego tematu – kwasów mikołowych, badałam również glikolipidy, występujące w komórkach *Nocardia*. Skład chemiczny oraz właściwości immunogenne glikolipidów *N. asteroides* oraz *N. cyriacigeorgica* były prezentowane na konferencjach (Zał. 3: X.2. **konf. 22,36**).

Badania epidemiologiczne nokardioz i chorób promieniczopodobnych

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN w 2000 roku włączyło się do europejskiego programu epidemiologicznego badania nokardioz i chorób wywoływanych przez aktynobakterie. Uczestniczyłam w przygotowaniu ankiety dotyczącej ewidencjonowania tych chorób, a w ramach popularyzacji tego tematu byłam współautorem prac przeglądowych (Zał. 3: I.2.2. **Art. 1,2,3,4,5,6**). W tym okresie uczestniczyłam w identyfikacji przysyłanych izolatów, bądź izolacji aktynobakterii z próbek klinicznych z oddziałów szpitalnych i laboratoriów. Do identyfikacji szczepów wykorzystywałam metody chemiczne, tj. oznaczanie składników ściany komórkowej, cukrów, aminokwasów oraz lipidowe markery chemiotaksonomiczne: kwasy tłuszczowe, mikołowe, fosfo i glikolipidy (Zał. 3: X.2. **konf. 26,31**). Ciekawe przypadki aktynobakterioz były przedstawiane na licznych konferencjach naukowych, m. in. identyfikacja *Actinomyces* sp. z przypadku infekcji aktynomikotycznej (Zał. 3: X.2. **konf. 3,4**), szczepu zawierającego kwasy mikołowe wyizolowanego z zakażenia rany po zabiegu kardiochirurgicznym (Zał. 3: X.2. **konf. 7,10,13**), szczepów *Propionibacterium* sp. i *Actinomyces* sp. wyizolowanych z ropnych guzków z węzłów szyjnych oraz okolicy podżuchwowej (Zał. 3: X.2. **konf. 34**). Uczestniczyłam również w identyfikacji izolatu *Nocardia* pochodzącego z ropnia mózgu, rzadkiego przypadku nokardiozy u pacjentki immunokompetentnej, wyniki prezentowałam na konferencji (Zał.

3: IX.2 **ref. 5**), oraz przygotowałam manuskrypt pracy (dane nie opublikowane). Metody chemiotaksonomiczne używane do identyfikacji aktynobakterii wraz z wybranymi przykładami identyfikacji izolatów klinicznych przedstawiłam w artykule przeglądowym (Załącznik 3: I.2.2. **Art. 8**).

Identyfikacja aktynobakterii środowiskowych

W ramach współpracy z dr Ying Huang z Chińskiej Akademii Nauk w Pekinie, przeprowadzałam identyfikację chemiotaksonomiczną kilku izolatów środowiskowych. Jeden z nich, wyizolowany z próbki osadów ściekowych, pobranych z kolektora sanitarnego, opisaliśmy jako nowy takson w rodzaju *Rothia* – *R. amarae* (Załącznik 3: I.2.1. **Art. 2**). Innym ciekawym szczepem izolowanym z gleby prowincji Shandong, badanym w ramach tej współpracy, był nowy takson *Ruania*, umieszczony w cyklu prac.

W wyniku ciekawej współpracy z wrocławskimi archeologami brałam udział w identyfikacji bakterii ze stanowisk archeologicznych. W okolicy Wrocławia odkryto groby ze szczątkami ludzkimi datowanymi na ok. 2800 lat p.n.e. oraz przedmiotami pochodzącymi z okresu neolitu. W badaniach tych prowadziłam charakterystykę chemiotaksonomiczną i morfologiczną szczepów wyizolowanych ze szczątków kostnych szkieletu ludzkiego oraz warstw organicznych bezpośrednio do nich przylegających. Z próbek gleby pobranych z różnych fragmentów szkieletu wyizolowałam kilkanaście szczepów, które należały do rodzajów *Bacillus* oraz *Streptomyces*. Uzyskane wyniki prezentowałam na konferencji (Załącznik 3: X.2. **konf. 28,29,30**).

Identyfikacja aktynobakterii środowiskowych, m. in. szczepów izolowanych z zawilgoconych budynków lub izolowanych z kompostu, stanowiących potencjalne zagrożenie dla pracowników, była prezentowana na licznych konferencjach (Załącznik 3: X.2. **konf. 27,35,38,41,46** oraz Załącznik 3: I.2.2. **Art. 11**).

Byłam także współautorem i autorem korespondencyjnym pracy przeglądowej dotyczącej metod stosowanych w identyfikacji środowiskowych izolatów aktynobakterii, które mogą stanowić potencjalne narażenie zawodowe. Prawidłowa identyfikacja tych bakterii wymaga zastosowania wieloetapowej strategii taksonomicznej, ponieważ komercyjnie dostępne zestawy diagnostyczne często nie uwzględniają wielu gatunków izolowanych ze środowiska, dlatego poleca się ich uzupełnienie analizą markerów chemiotaksonomicznych. W pracy tej podaliśmy praktyczne procedury postępowania ze szczepami pochodzącymi z powietrza pobranego na terenie kompostowni, prób kompostu oraz materiału zebranego z powierzchni sprzętów w bibliotece (Załącznik 3: I.2.1. **Art. 12** i Załącznik 3: X.2. **konf. 39**).

Aktualnie obiektem moich zainteresowań jest identyfikacja bakterii za pomocą techniki spektrometrii mas MALDI-TOF. Wysokiej klasy spektrometr MALDI w IITD PAN pozwala na testowanie systemu i jego użyteczności do identyfikacji aktynobakterii. W ramach tego tematu byłam opiekunem naukowym dwóch prac magisterskich, w których zastosowaliśmy system MALDI-TOF Biotyper do identyfikacji bakterii z rzędu *Corynebacterineae* oraz środowiskowych przedstawicieli rodzaju *Nocardia*, *Saccharopolyspora* i *Amycolatopsis* (Załącznik 4). Istniejące komercyjne bazy danych widm masowych nie zawierają wielu przedstawicieli gatunków środowiskowych, gdyż zainteresowanie firm skupia się przede wszystkim na szczepach użytecznych w mikrobiologii klinicznej. Wykazaliśmy, że aby usprawnić identyfikację aktynobakterii, należy stworzyć własną bazę szczepów referencyjnych. Część tych wyników była prezentowana na konferencji (Załącznik 3: X.2. **konf. 46**) oraz referowana (Załącznik 3: IX.2. **ref. 6,8**).

Badania aktywności biologicznej lipidów *Bifidobacterium*

W ramach współpracy z dr Galiną Novik z Białoruskiej Kolekcji Mikroorganizmów w Mińsku, badałam właściwości immunogenne lipidów polarnych *Bifidobacterium*. Drobnoustroje te występujące w przewodzie pokarmowym człowieka były przedmiotem naszego zainteresowania ze względu na właściwości probiotyczne i ochronne wobec bakterii patogennych (Zał. 3: I.2.1. **Art. 6** oraz Zał. 3: X.2. **konf. 15,16**). Współpracę kontynuowałam, analizując skład lipidowy probiotycznych gatunków *B. longum*, a uzyskane wyniki były prezentowane na konferencjach (Zał. 3: X.2. **konf. 42,44**).

Kwasy nokardiomikolowe

Inspiracją projektu grantowego MNSiW dotyczącego kwasów nokardiomikolowych, realizowanego w latach 2002-2005, którego byłam kierownikiem (Zał. 3: VII, **proj. 5**), były prowadzone w naszym laboratorium badania epidemiologiczne częstości występowania zakażeń wywoływanych przez aktynobakterie, w tym nokardie. W roku 2003 uzyskałam stypendium DAAD na przeprowadzenie analiz kwasów nokardiomikolowych w Centrum Badań Biomedycznych w Borstel w Niemczech. W celu realizacji projektu zajęłam się izolacją i oczyszczaniem kwasów nokardiomikolowych trzech gatunków nokardii należących do *N. asteroides* complex, pochodzących z fazy logarytmicznego wzrostu oraz fazy stacjonarnej. Opracowałam nową metodę izolacji tych związków za pomocą HPLC, z użyciem fluorescencyjnych pochodnych PDAM (pirenylodiazometanu) (Zał. 3: X.2. **konf. 14**), za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF oraz spektroskopii NMR ustaliłam struktury tych związków: wykazałam obecność wiązań podwójnych i określiłam długość łańcuchów alifatycznych (Zał. 3: X.2. **konf. 17,19**). Otrzymałam królicze surowice odpornościowe skierowane przeciwko komórkom *Nocardia* i kwasom mikolowym oraz wykryłam przeciwciała skierowane przeciwko kwasom mikolowym (Zał. 3: X.2. **konf. 22,23**). Wykazana immunogenność kwasów mikolowych oraz glikolipidów pozwala stwierdzić, że markery te mogą być zastosowane w immunodiagnostyce nokardiozy. Kwasy mikolowe były także tematem trzech prac magisterskich, których byłam promotorem (Załącznik 4).

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe

W ramach współpracy z Kliniką Immunologii i Reumatologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wykonywałam badania poziomu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w surowicach dzieci chorujących na alergię oraz dzieci stosujących dietę wegetariańską. W opublikowanej pracy wykazaliśmy znamienne wyższy poziom kwasu linolenowego u dzieci wegetariańskich w porównaniu do grupy dzieci wykazujących alergię, co sugerowało odmienny metabolizm lipidów w obu grupach i w konsekwencji ochronny wpływ diety wegetariańskiej wobec alergii (Zał. 3: I.2.1. **Art. 10**). Współpraca jest kontynuowana, obecnie przedmiotem naszych zainteresowań jest rola wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w patogenezie młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów, zadanie to jest realizowane w ramach 2-letniego grantu uczelnianego U Med we Wrocławiu (Zał. 3: VII, **proj. 7**).

Badania strukturalne i właściwości biologicznych polisacharydów bakteryjnych

Mój udział w badaniach strukturalnych i immunochemicznych polisacharydów bakterii probiotycznych *Lactobacillus johnsonii* dotyczył określenia właściwości immunochemicznych egzopolisacharydów. W opublikowanej pracy (Zał. 3: I.2.1. **Art. 11**) wykazaliśmy, że polisacharydy wyizolowane z różnych szczepów tego samego gatunku mają odmienną strukturę chemiczną oraz różną reaktywność

serologiczną. Badania te są kontynuowane. Interesującą obserwacją jest, że glikolipidy główne wyizolowane z tych samych szczepów *L. johnsonii* mają jednakową strukturę chemiczną, są zatem bardziej konserwatywne niż polisacharydy. Wyniki te były prezentowane na konferencjach (Zał. 3: X.2. **konf. 40,43**), a manuskrypt pracy jest przygotowywany do druku.

W ramach projektu Biomed (Zał. 3: VII, **proj. 9**), prowadziłam badania dotyczące składu chemicznego, struktury i immunogenności polisacharydów z rodzaju *Nocardia* i *Actinomyces* (dane nie opublikowane, przygotowane do druku). Wstępne wyniki były przedstawione na konferencji (Zał. 3: X.2. **konf. 45**).

Działalność w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów

Od 2001 pełnię funkcję kuratora Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) znajdującej się w IITD PAN, której kierownikiem jest prof. dr hab. Andrzej Gamian. Moja rola polegała na udzielaniu konsultacji osobom zamawiającym szczepy kolekcyjne, na przygotowywaniu i zabezpieczaniu szczepów, przyjmowaniu depozytów patentowych oraz wydawaniu świadectw żywotności bakterii i innych stosownych dokumentów. W latach 2010-2014 brałam udział w projekcie współfinansowanym ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (Zał. 3: VII, **proj. 8**). Projekt dotyczył utworzenia Interoperacyjnej Elektronicznej Platformy, która zapewnia możliwość skatalogowania i upowszechnienia wszelkich danych dotyczących zasobów biologicznych Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów. Celem tego projektu było również zebranie i opracowanie w wersji elektronicznej rozproszonych danych literaturowych o poszczególnych gatunkach mikroorganizmów zgromadzonych w Kolekcji. Platforma jest pierwszym tego rodzaju przedsięwzięciem w Polsce, mającym na celu informowanie środowiska naukowego oraz jednostek komercyjnych o istniejących możliwościach korzystania z gatunkowego bogactwa drobnoustrojów.

Wrocław 23.02.2015

Paściak

dr Mariola Paściak