

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko.

Adrianna Raczkowska

nazwisko panieńskie: Górka

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.

- 23.06.2003: nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Zależność ekspresji czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica* Ye9 od aktywności regulonu maltozowego oraz operonu *ompB*”. Promotorem w przewodzie doktorskim był prof. dr hab. Jerzy Hrebenda (Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski), a recenzentami: prof. dr hab. Antoni Różalski (Instytut Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki) oraz prof. dr hab. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka (Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski).

Rozprawa doktorska została wyróżniona nagrodą indywidualną J.M. Rektora Uniwersytetu Warszawskiego z okazji Święta UW.

- 06.1998: tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ warunków środowiskowych na ekspresję czynników zjadliwości *Yersinia enterocolitica* O9” Opiekunem pracy był prof. dr hab. Jerzy Hrebenda.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 01.10.2003-30.09.2004: adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej, Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
- 01.10.2004 do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej, Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
w tym:
03.2007- 05.2007 (3 miesiące): urlop macierzyński
09.2010- 02.2011 (6 miesięcy): zwolnienie lekarskie z powodu choroby nowotworowej
03.2011- 06.2011 (4 miesiące): urlop dla poratowania zdrowia
07.2015- 12.2015 (6 miesięcy): zwolnienie lekarskie z powodu choroby nowotworowej
- 10.1998-06.2003: studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

w tym:

09.2001- 12.2001 (4 miesiące): urlop macierzyński

- 10.1993-06.1998: studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego.

Rola szlaku sygnałowego EnvZ/OmpR *Yersinia enterocolitica* w regulacji ekspresji genów białek powierzchniowych biorących udział w procesie patogenezы

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczególnym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy.

- i. Brzostek K., **Raczkowska A. 2007.** The YompC protein of *Yersinia enterocolitica*: molecular and physiological characterization. *Folia Microbiol.* 52: 73-80.

IF₂₀₀₇ – **0,989**; IF_{5-letni} – **0,883**; punktacja MNiSW - **15**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 11

Wkład habilitanta: **70%**. Współautorstwo koncepcji badań; planowanie doświadczeń; wykonanie pracy eksperymentalnej; przygotowanie tabel, schematów i rycin; udział w opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu; odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- ii. Brzostek K., Brzóstkowska M.** , Bukowska I.* , Karwicka E.* , **Raczkowska A. 2007.** OmpR negatively regulates expression of invasin in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiol. SGM* 153: 2416-2425.

IF₂₀₀₇ – **3,110**; IF_{5-letni} – **3,396**; punktacja MNiSW - **30**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 29

Wkład habilitanta: **40%**. Współautorstwo koncepcji badań i planowanych doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; opieka nad badaniami wykonanymi przez studentki (Brzóstkowska M., Bukowska I., Karwicka E.), których wyniki weszły w skład publikacji; przygotowanie tabeli, schematów, rycin i wykresów; udział w opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

- iii. **Raczkowska A.**, Skorek K.***, Bielecki J., Brzostek K. **2010**. OmpR controls *Yersinia enterocolitica* motility by positive regulation of *flhDC* expression. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99: 381-394.

IF₂₀₀₇ – **1,673**; IF_{5-letni} – **1,983**; punktacja MNiSW - **20**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 14

Wkład habilitanta: **40%**. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; przeprowadzenie analiz bioinformatycznych oraz badań w transmisyjnym mikroskopie elektronowym; opieka nad badaniami wykonanymi przez studentkę (Skorek K.), których wyniki weszły w skład publikacji; przygotowanie tabeli, rycin i wykresów; udział w opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

- iv. **Raczkowska A.**, Skorek K.***, Brzostkowska M.***, Łasińska A., Brzostek K. **2011**. Pleiotropic effects of a *Yersinia enterocolitica ompR* mutation on adherent-invasive abilities and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 321:43-49

IF₂₀₁₁ – **2,044**; IF_{5-letni} – **2,295**; punktacja MNiSW - **20**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 12

Wkład habilitanta: **40%**. Współautorstwo koncepcji badań i planowanych doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; opieka nad badaniami wykonanymi przez studentki (Brzostkowska M., Skorek K.), których wyniki weszły w skład publikacji; przygotowanie tabeli, rycin i wykresów; udział w opracowaniu i interpretacji wyników.

- v. **Raczkowska A.**, Brzostkowska M.***, Kwiatek A., Bielecki J., Brzostek K. **2011**. Modulation of *inv* gene expression by the OmpR two-component response regulator protein of *Yersinia enterocolitica*. *Folia Microbiol.* 56: 313-319.

IF₂₀₁₁ – **0,677**; IF_{5-letni} – **0,930**; punktacja MNiSW - **15**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 4

Wkład habilitanta: **70%**. Współautorstwo koncepcji pracy; projekt i wykonanie części prac eksperymentalnych; opieka nad doświadczeniami wykonywanymi przez studentkę (Brzostkowska M.), których wyniki weszły w skład publikacji; przygotowanie tabeli, ryciny i wykresu; udział w opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu; odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- vi. Brzostek K., Skorek K.***, **Raczkowska A.** **2012**. OmpR, a central integrator of several cellular responses in *Yersinia enterocolitica*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 954: 325-334.

IF₂₀₁₂ – **1,825**; IF_{5-letni} – **1,811**; punktacja MNiSW - **25**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 6

Wkład habilitanta: **25%**. Napisanie rozdziałów: 40.2.3 The role of OmpR in the ability of *Y. enterocolitica* to survive various environmental and host-associated stresses; 40.2.4 OmpR negatively regulates expression of the *inv* gene encoding invasion; 40.2.7 Pleiotropic effects of an *ompR* mutation on the adherent-invasive abilities of *Y. enterocolitica*; jak również analiza białek osłon szczepów *Y. enterocolitica*.

- vii. **Raczkowska A.**, Trzos J.*, Lewandowska O.*, Nieckarz M.***, Brzostek K. **2015**. Expression of the AcrAB components of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump of *Yersinia enterocolitica* is subject to dual regulation by OmpR. *PLoS One* 20;10(4):e0124248. doi: 10.1371/journal.pone.0124248.

IF₂₀₁₅ – **3,057**; IF_{5-letni} – **3,535**; punktacja MNiSW - **40**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) - 2

Wkład habilitanta: **75%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji pracy; projekt i wykonanie części prac eksperymentalnych; opieka nad doświadczeniami wykonywanymi przez studentki (Trzos J., Lewandowska O., Nieckarz M.), których wyniki weszły w skład publikacji; przygotowanie tabeli, ryciny i wykresu; opracowanie i interpretacja wyników oraz przygotowanie manuskryptu; odpowiedzi na uwagi recenzentów.

* studenci wykonujący prace dyplomowe w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

** doktoranci Zakładu Mikrobiologii Stosowanej (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania – **13,375**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego - **165**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) - **78**

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

WSTĘP

Y. enterocolitica jest ludzkim enteropatogenem, czynnikiem etiologicznymi jersiniozy, odzwierzęcej choroby zakaźnej. Jersinioza jest trzecią pod względem częstości występowania zoonozą w Europie (raport EFSA, 2015). W ciągu ostatnich kilku lat również w Polsce zaobserwowano znaczny wzrost infekcji wywołanych przez te pałeczki. *Y. enterocolitica* należy do rodzaju *Yersinia*, obok dwóch innych patogennych gatunków, tj. *Y. pseudotuberculosis*, wywołująca rodencjozę oraz *Y. pestis*, czynnik etiologiczny dżumy. *Y.*

enterocolitica jest heterogennym gatunkiem, w obrębie którego wyróżniono ponad 70 serotypów i sześć biotypów o różnym stopniu zjadliwości (Bottone, 1997). *Y. enterocolitica* syntetyzuje wiele czynników wirulencji, które kodowane są na chromosomie lub plazmidzie zjadliwości pYV. Do najważniejszych należą: inwazyjna Inv, adhezyny, YadA i Ail, a także cytotoksyczne białka Yop, które transportowane są do komórki eukariotycznej systemem sekrecji III Typu (Cornelis, 2002). Ważną cechą *Y. enterocolitica* jest zdolność do syntezy rzęsek, które służą do poruszania się w środowisku płynnym, co umożliwia efektywne rozprzestrzenianie się i kolonizację nowych nisz ekologicznych.

Jersinioza może przybierać różne postaci chorobowe, w zależności od wieku zainfekowanych osób i stanu fizycznego chorego, tj. począwszy od stanów biegunkowych z tendencją do samoustąpienia do ciężkich zakażeń z bakterią włącznie. Groźne dla człowieka są także powikłania, a mianowicie rumień guzowaty, rumień wielopostaciowy, reaktywne zapalenie stawów, zapalenie tęczówki czy zapalenie kłębuszków nerkowych. Naturalnym rezerwuarem *Y. enterocolitica* są domowe i dziko żyjące zwierzęta. Najczęściej patogenne szczepy są izolowane od świń, psów oraz kotów (Bottone, 1997). *Y. enterocolitica* jest zdolna do wzrostu w temperaturze 4°C, w związku z tym mięso przechowywane w chłodniach może stanowić źródło zakażenia. Do wnętrza organizmu człowieka pałeczki *Y. enterocolitica* dostają się wraz z zakażonym pożywieniem lub wodą i przechodzą przez kolejne odcinki układu pokarmowego. Miejszem inwazji, jak wielu innych enterobakterii, jest tkanka nabłonkowa jelita, a w szczególności komórki M (Jepson i Clarck, 1998). Po przedostaniu się przez warstwę nabłonka pałeczki *Yersinia* docierają do zorganizowanych struktur limfatycznych zwanych kępkami Peyera. W grudkach limfatycznych patogen napotyka m. in. makrofagi i neutrofile, które stanowią pierwszą linię obrony w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza (Brubaker, 1991). Dzięki syntezie cytotoksycznych białek Yop, które podlegają sekrecji i translokacji na teren cytoplazmy komórek żernych, *Y. enterocolitica* hamuje proces fagocytozy oraz reakcję obronną organizmu gospodarza (Cornelis, 2002). Namnażanie się bakterii w układzie siateczkowo-śródbłonkowym, w obszarze węzłów chłonnych jamy brzusznej, prowadzi do stanów zapalnych oraz owrzodzeń.

Y. enterocolitica występuje powszechnie w środowisku naturalnym, równie łatwo przeżywa w środowisku zewnętrznym jak i w organizmie gospodarza, chociaż są to bardzo różne nisze ekologiczne. Proces adaptacji bakterii do zmieniających się warunków środowiska możliwy jest dzięki funkcjonowaniu różnorodnych mechanizmów regulacyjnych. W efektywnym odbiorze, przekazywaniu i przetwarzaniu sygnałów biorą udział dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału (TCSs), w tym szlak sygnałowy EnvZ/OmpR (Bourret i wsp., 1991).

System EnvZ/OmpR, prototypowy TCS, został zidentyfikowany i najlepiej scharakteryzowany u niepatogennej *Escherichia coli*. Układ ten złożony jest z dwóch białek. EnvZ to białko sensorowe odbierające bodźce ze środowiska. Posiada aktywność kinazy histydynowej zlokalizowanej w błonie wewnętrznej, która pod wpływem określonego sygnału ulega autofosforylacji, a następnie przekazuje grupę fosforanową na regulator odpowiedzi, tj. białko OmpR. Ufosforylowany regulator z kolei, w wyniku zaistniałych zmian konformacyjnych, wiąże się w postaci dimeru do DNA, regulując proces transkrypcji określonych genów (Kenney, 2002). System EnvZ/OmpR został odkryty u *E. coli* przy okazji badania osmoregulacji ekspresji genów dwóch głównych poryn dyfuzji ogólnej, OmpC i OmpF. Poryny te tworzą w błonie zewnętrznej hydrofilowe kanały umożliwiające transport niskocząsteczkowych związków do wnętrza komórki. Środowisko wodne odznacza się niską

osmolarnością, natomiast jelito organizmu gospodarza wysoką osmolarnością (Csonka i Epstein, 1996). W warunkach niskiej osmolarności obserwowano niski poziom ufosforylowanego OmpR w komórce, który wiąże się z wysokim powinowactwem do dwóch miejsc wiązania zlokalizowanych w obszarze promotora *ompF*, co prowadzi do indukcji ekspresji tego genu. Wzrost osmolarności przyczynia się do wzrostu ilości formy ufosforylowanej OmpR, co z kolei prowadzi do wysycenia przez ten regulator trzech miejsc wiązania w obszarze promotora *ompC*, charakteryzujących się niskim stopniem powinowactwa, a w konsekwencji umożliwia indukcję ekspresji tego genu. Równocześnie związanie ufosforylowanego OmpR z kolejnymi dwiema sekwencjami w obszarze promotora *ompF* skutkuje utworzeniem pętli DNA i zahamowaniem ekspresji *ompF* (Egger i wsp. 1997; Kenney, 2002).

Obecnie wiemy, że system EnvZ/OmpR zaangażowany jest w regulację transkrypcji kilkunastu genów/operonów u *E. coli* w odpowiedzi na zmiany osmolarności, ale również zmiany pH, temperatury czy stężenia składników odżywczych w środowisku. Jest to zarówno regulacja pozytywna jak i negatywna (Higashitani i wsp., 1993; Shin i Park, 1995; Jubelin i wsp., 2005; Vidal i wsp., 1998; Yamamoto i wsp., 2000). Ponadto okazało się, że w przypadku niektórych bakterii patogennych, należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, OmpR uczestniczy w kontroli zjadliwości. U *Shigella flexneri* reguluje ekspresję genów *vir*, których produkty uczestniczą w inwazji tkanki nabłonkowej jelita, natomiast u *Salmonella enterica* sv. Typhimurium reguluje ekspresję genów innego TCS, tj. SsrA/SsrB, ten z kolei warunkuje przeżycie oraz namnażanie patogenu wewnątrz makrofagów, jak również wywołanie ogólnoustrojowej infekcji (Bernardini i wsp., 1990; Lee i wsp., 2000; Garmendia i wsp., 2003; Feng i wsp. 2004).

Te doniesienia stały się impulsem do rozpoczęcia przeze mnie badań mających na celu identyfikację oraz określenie roli systemu EnvZ/OmpR w fizjologii *Y. enterocolitica*. Obiektem badań w naszej grupie badawczej jest szczep *Y. enterocolitica* będący izolatem klinicznym, należącym do serotypu O:9, biotypu 2 (Ye9). W ramach mojego doktoratu wykonywanego w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UW udało się zidentyfikować oraz zsekwencjonować operon *ompB* pochodzący ze szczepu Ye9. W skład tego operonu wchodzi dwa geny: *ompR* i *envZ*. Analiza *in silico* sekwencji aminokwasowej białek OmpR bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* wykazała wysoki stopień podobieństwa, co może świadczyć o istotnej roli tego regulatora w fizjologii tych mikroorganizmów. W kolejnym etapie badań skonstruowałam mutanta delecyjnego w szczepie Ye9 pozbawionego regulatora OmpR. Wstępna charakterystyka fenotypowa wykazała brak obydwu poryn OmpF i OmpC w mutancie *ompR* w osłonach bakteryjnych, podobnie jak to ma miejsce w przypadku *E. coli*. Następnie zaobserwowano, że białko OmpR uczestniczy w osmoregulacji syntezy/sekrecji cytotoksycznych białek Yop, istotnych czynników zjadliwości *Y. enterocolitica*. Wzrost osmolarności podłoża prowadził do zahamowania syntezy/sekrecji tych białek w szczepie dzikim, czego nie obserwowano w mutancie *ompR*. Dalsza charakterystyka mutantu *ompR* wykazała, że regulator ten uczestniczy w adaptacji bakterii do warunków stresowych, a także umożliwia bakterii przeżycie wewnątrz makrofagów (Brzostek i wsp., 2003).

Wyniki otrzymane w ramach mojego doktoratu stały się punktem wyjścia dla dalszym badań, których celem była weryfikacja hipotezy badawczej, zakładającej udział systemu transdukcji sygnału EnvZ/OmpR w regulacji innych procesów i właściwości fizjologicznych *Y. enterocolitica* determinujących zjadliwość tego gatunku bakterii. W publikacjach stanowiących podstawę prezentowanego osiągnięcia naukowego przedstawiono wyniki badań wskazujące na nowe cele działania OmpR, a tym samym procesy biologiczne ważne w

patofizjologii *Y. enterocolitica*, co niewątpliwie przyczyniło się do poszerzenia wiedzy na temat roli tego regulatora w przebiegu jersiniozy.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe:

Publikacja:

Brzostek K., Raczkowska A. 2007. The YompC protein of *Yersinia enterocolitica*: molecular and physiological characterization. *Folia Microbiol.* 52: 73-80.

Moje badania po doktoracie skoncentrowane były na określeniu roli systemu transdukcji sygnału EnvZ/OmpR w modulowanie procesu zjadliwości *Y. enterocolitica* poprzez regulację ekspresji genów białek powierzchniowych. W kręgu moich zainteresowań, na początku badań, znalazła się jedna z poryn dyfuzji ogólnej, mianowicie poryna OmpC. Białko to zbudowane jest z trzech monomerycznych podjednostek, które tworzą kanał w błonie zewnętrznej dla transportu substancji odżywczych, antybiotyków, czy też jonów (< 600 Da) (Brzostek i Hrebenda, 1988; Benz i Bauer, 1988; Nikaido, 1992). W celu wyjaśnienia roli OmpC w fizjologii *Y. enterocolitica* skonstruowałam mutanta pozbawionego tego białka w szczepie Ye9 i przeprowadziłam jego charakterystykę fenotypową. Wyniki badań pokazały, że brak poryny OmpC przyczynia się do wzrostu oporności pałeczek *Yersinia* na wybrane antybiotyki β-laktamowe z grupy cefalosporyn oraz tetracyklinę. W związku z tym zmiany w przepuszczalności błony zewnętrznej, będące konsekwencją zmian w poziomie syntezy OmpC, mogą mieć znaczenie w antybiotykooporności *Y. enterocolitica*. Jak wykazały badania u *Klebsiella pneumoniae*, jak również *Enterobacter aerogenes*, wystarczy nawet niewielka modyfikacja białka, polegająca np. na wprowadzeniu innego aminokwasu, która może prowadzić do zmiany ładunku w wewnętrznej domenie białka tworzącej kanał i zaburzać proces dyfuzji antybiotyku. Izolaty kliniczne *K. pneumoniae*, jak również *E. aerogenes*, posiadające w osłonach tak zmodyfikowane poryny nabywają fenotyp antybiotykooporności (Martinez-Martinez i wsp., 1996; Chevalier i wsp., 1999).

Kolejne wyniki badań wskazały na inne właściwości białka OmpC *Y. enterocolitica*. Analizowany mutant *ompC* cechował się obniżoną zdolnością adhezji do linii komórkowej HEp-2 w porównaniu do szczepu dzikiego. Obserwowany wysoki poziom białka OmpC w warunkach wysokiej osmolarności, czyli w warunkach panujących w jelicie cienkim, może dodatkowo świadczyć o zaangażowaniu tej poryny w proces adhezji *Y. enterocolitica*. Nie można jednak wykluczyć, że sam brak poryny OmpC w błonie zewnętrznej, może prowadzić do zaburzeń w strukturze osłon (aż milion cząsteczek OmpC może przypadać na komórkę), co w konsekwencji może obniżyć zdolności adhezyjne *Y. enterocolitica*. Przeprowadzona analiza filogenetyczna wykazała, iż białko OmpC *Y. enterocolitica* jest najbliższym spokrewnione z OmpC *K. pneumoniae* (Omp36). Poryna ta, jak również białko OmpC *S. enterica* sv. Typhimurium, czy OmpC *S. flexneri* biorą udział w procesie inwazji komórek organizmu gospodarza (Bernardini i wsp., 1993; Negm i Pistole, 1999). Wyniki powyższych badań wykazały, iż system EnvZ/OmpR uczestnicząc w regulacji ekspresji *ompC* i *ompF*, może modulować zdolności adhezyjne *Y. enterocolitica*. Ponadto, poczynione obserwacje zachęciły do zbadania roli systemu EnvZ/OmpR w regulacji ekspresji innych genów, w tym genów wirulencji. To zagadnienie stało się tematem moich kolejnych badań.

Główne osiągnięcia poznawcze

- Poryna OmpC *Y. enterocolitica* uczestniczy w transporcie antybiotyków β -laktamowych, należących do grupy cefalosporyn, oraz tetracyklin
- OmpC bierze udział w procesie adhezji *Y. enterocolitica* do komórek gospodarza

Publikacje:

Brzostek K., Brzóstkowska M., Bukowska I., Karwicka E., **Raczkowska A.** 2007. OmpR negatively regulates expression of invasin in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiol. SGM* 153: 2416-2425.

Raczkowska A., Brzóstkowska M., Kwiatek A., Bielecki J., Brzostek K. 2011. Modulation of *inv* gene expression by the OmpR two-component response regulator protein of *Yersinia enterocolitica*. *Folia Microbiol.* 56: 313-319.

Wśród czynników zjadliwości *Y. enterocolitica* ekspozowanych na powierzchni komórki patogenu szczególne miejsce zajmuje Inwazyjna Inv. Jest to białko błony zewnętrznej, które bierze udział w adhezji i inwazji tkanki nabłonkowej jelita gospodarza (Pepe i Miller, 1993). Miejscem jej bezpośredniego oddziaływania są komórki M występujące w nabłonku pokrywającym struktury limfatyczne błony śluzowej jelita (Jepson i Clarck, 1998). Inwazyjna w postaci homomultimeru wiąże się do receptorów $\beta 1$ integryn, co dostarcza sygnału do internalizacji bakterii, prowadzi do rearanżacji cytoszkieletu aktynowego komórki gospodarza i zamknięcia bakterii w pęcherzyku endosomu. Jest to proces inwazji zwany mechanizmem zamka błyskawicznego.

Ekspresja genu *inv* u *Y. enterocolitica* serotypu O:8 zależy w dużej mierze od osmolarności, jak również od temperatury, pH, dostępności składników odżywczych oraz fazy wzrostu (Pepe i wsp., 1994). Maksymalna ekspresja zachodzi w późnej fazie logarytmicznej w temperaturze 25°C w neutralnym pH, natomiast ulega znacznej redukcji w 37°C (Young i wsp., 1990). Obniżenie pH do wartości 5,5, prowadzi do indukcji ekspresji *inv* w 37°C (Pepe i wsp., 1994). Czynniki stresowe tj. wysoka osmolarność, niskie pH obniżają ekspresję *inv* w 25°C (Ellison i wsp., 2003).

Wśród znanych regulatorów koordynujących ekspresję genu inwazyjny znajdują się białka: RovA, H-NS oraz YmoA. RovA (ang. Regulator of virulence) to białko regulatorowe należące do rodziny MarA/SlyA, które bierze udział w pozytywnej regulacji ekspresji *inv*. Wiąże się w postaci dimeru do dwóch sekwencji zlokalizowanych w obszarze regulatorowym genu *inv* (od pozycji -207 do -50 powyżej miejsca startu translacji) (Ellison i wsp., 2004). Białka histonopodobne H-NS (ang. Histone-like Nucleoid Structuring) oraz YmoA (ang. *Yersinia* modulator) tworzą nukleoproteinowy kompleks represyjny, który powstaje zarówno w 25°C jak i w 37°C, uczestniczy w negatywnej regulacji ekspresji *inv* (Cornelis i wsp., 1991, Ellison i wsp. 2003). RovA i kompleks H-NS/YmoA konkurują o miejsce wiązania w obszarze promotora *inv*. RovA pełni funkcję aktywatora, jak również antyrepresora. Krytyczna dla procesu transkrypcji *inv*, jest prawdopodobnie koncentracja białka RovA w komórce. Wysoki poziom syntezy RovA w 25°C decyduje o skutecznej rywalizacji tego regulatora z kompleksem represyjnym o miejsce wiązania w genie *inv*. W 37°C dochodzi do zahamowania transkrypcji *inv* w wyniku niskiego poziomu RovA w komórce, które nie może efektywnie współzawodniczyć z kompleksem H-NS/YmoA (Ellison i Miller, 2006).

Obserwowana osmoregulacja ekspresji genu inwazyjny u *Y. enterocolitica* O:8 stała się inspiracją do podjęcia badań, których celem było wyjaśnienie roli systemu transdukcji

sygnału EnvZ/OmpR w regulacji ekspresji genu *inv* u *Y. enterocolitica* Ye9. Badania rozpoczęto od przeprowadzenia analiz sqRT-PCR, które wykazały, iż poziom mRNA dla genu *inv* szczepu dzikiego jest nieco wyższy w temperaturze 25°C niż 37°C. Wyraźną temperaturową różnicę w ekspresji *inv* zaobserwowano w mutancie *ompR*. Natomiast poziom transkryptu *inv* w 25°C w mutancie *ompR* był wyraźnie zwiększony w porównaniu do szczepu dzikiego. Efektu tego nie obserwowano w przypadku mutantu z nieaktywnym genem *envZ*. Badania aktywności promotora *inv* przy wykorzystaniu chromosomowej fuzji transkrypcyjnej *inv::lacZYA* potwierdziły istotny wzrost ekspresji *inv* w mutancie *ompR* w 25°C w porównaniu do szczepu dzikiego. Natomiast w przypadku 37°C obserwowano spadek poziomu ekspresji *inv* zarówno w szczepie dzikim, jak i mutancie *ompR*. Dodatkowo przeprowadzone analizy sugerowały, że sensor EnvZ nie bierze udziału w obserwowanej regulacji ekspresji genu inwazy. Wyniki powyższych badań potwierdziły udział OmpR w negatywnej regulacji transkrypcji *inv* w 25°C, jak również termoregulację ekspresji *inv* niezależną od aktywności OmpR.

Kolejne badania koncentrowały się na poznaniu roli EnvZ/OmpR w osmoregulacji genu *inv*. Badania wpływu osmolarności na ekspresję *inv* pozwoliły zaobserwować stopniowy spadek aktywności badanego promotora wraz ze wzrostem osmolarności w szczepie dzikim, natomiast w mutancie *ompR* początkowy wzrost, a następnie stały poziom ekspresji *inv* niezależnie od dalszego wzrostu osmolarności. Otrzymane wyniki świadczyły o częściowej osmoregulacji ekspresji genu inwazy z udziałem białka OmpR, a także wskazywały na możliwość istnienia dodatkowego regulatora kontrolującego transkrypcję *inv* w zależności od osmolarności środowiska. Nie można również wykluczyć możliwości, że stopień superskręcenia DNA zmieniający się w zależności od warunków środowiska moduluje transkrypcję *inv* (Higgins i wsp., 1988).

Ponieważ w negatywnej regulacji ekspresji *inv* *Y. enterocolitica* bierze udział kompleks represyjny H-NS/YmoA w dalszych badaniach podjęto się próby otrzymania mutantów insercyjnych w tychże genach w szczepie Ye9. Ponieważ nie udało się uzyskać mutantów, z problemem tym borykały się również inne grupy badawcze, zdecydowano o przebadaniu poziomu ekspresji fuzji *inv::lacZ* obecnej na plazmidzie pSL205 w układzie heterologicznym, tj. w szczepach *E. coli* różniących się poziomem aktywności trzech regulatorów: OmpR, H-NS oraz RovA. Na podstawie otrzymanych wyników wnioskowano, że RovA aktywuje ekspresję *inv* bez względu na obecność H-NS, natomiast OmpR hamuje ekspresję genu inwazy, a efekt ten jest niezależny od obecności aktywatora RovA.

W oparciu o analizy miejsc wiązania OmpR w genach regulonu OmpR *E. coli* została ustalona sekwencja konsensus wiązania tego regulatora składająca się z 20 par zasad, 5'-TTTACTTTTTG(T/A)ACATAT-3' (Maeda i wsp., 1991). Przeprowadzona analiza *in silico* sekwencji promotora genu *inv* *Y. enterocolitica* wykazała obecność jednego potencjalnego miejsca wiązania dla OmpR pokrywającego się z sekwencją -10 i -35 promotora *inv*, wykazującego 78% identyczności z sekwencją konsensus. Okazało się, iż sekwencja ta nie pokrywa się z żadnym z dwóch miejsc wiązania dla RovA czy kompleksu represyjnego H-NS/YmoA (Ellison i Miller, 2006). W celu określenia czy ufosforylowany w warunkach *in vitro* OmpR bezpośrednio wiąże się do sekwencji promotora *inv* przeprowadzono analizę tempa migracji kompleksów DNA/białko w żelu niedenaturującym, tzw. testy EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Test Assay). Okazało się, że OmpR specyficznie oddziałuje z promotorem *inv*, co świadczyło o bezpośredniej regulacji ekspresji genu inwazy z udziałem regulatora OmpR.

Główne osiągnięcia poznawcze

- Ekspresja genu inwazyjny *Y. enterocolitica* Ye9 zależy od temperatury, jest to regulacja niezależna od OmpR; kluczową rolę w regulacji transkrypcji *inv* w zależności od temperatury pełni RovA
- Ekspresja *inv* zależy od osmolarności, a mechanizm ten jest częściowo OmpR-zależny
- OmpR bierze udział w bezpośredniej, negatywnej regulacji ekspresji *inv* *Y. enterocolitica*; OmpR może pełnić rolę dodatkowego represora ekspresji *inv* w zależności od określonych czynników środowiskowych
- Proces fosforylacji OmpR prawdopodobnie jest częściowo niezależny od kinazy EnvZ; sensor EnvZ nie uczestniczy w obserwowanej regulacji ekspresji *inv*

Publikacje:

Raczkowska A., Skorek K., Bielecki J., Brzostek K. 2010. OmpR controls *Yersinia enterocolitica* motility by positive regulation of *flhDC* expression. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99: 381-394.

Raczkowska A., K. Skorek, M. Brzostkowska, A. Łasińska, K. Brzostek. 2011. Pleiotropic effects of a *Yersinia enterocolitica ompR* mutation on adherent-invasive abilities and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 321:43-49.

Brzostek K., Skorek K., Raczkowska A. 2012. OmpR, a central integrator of several cellular responses in *Yersinia enterocolitica*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 954: 325-334.

Szczególną rolę w procesie patogenezy, na pierwszym etapie infekcji *Y. enterocolitica*, pełnią obok inwazyjny, rzęski. Są to struktury zewnątrzkomórkowe, które występują powszechnie u bakterii i służą do poruszania się w środowisku płynnym, co ułatwia rozprzestrzenianie i zasiedlanie nowych nisz ekologicznych. U bakterii chorobotwórczych odgrywają istotną rolę w procesie patogenezy, umożliwiając kontakt z komórką eukariotyczną (Young i wsp., 2000). U *Y. enterocolitica* rzęski umieszczone są perytrychalnie. Aparat rzęskowy zakotwiczony w osłonach bakteryjnych składa się z 3 części: ciała podstawowego, haka i włókna rzęski. Buduje go kilkadziesiąt białek, których ekspresja zależy od białka FliA, tj. alternatywnego czynnika sigma 28 oraz nadrzędnego aktywatora transkrypcji, regulatora FlhDC (Young i wsp., 1999a).

Przeprowadzona charakterystyka fenotypowa mutantu delecyjnego *ompR* *Y. enterocolitica* Ye9 wykazała, iż brak regulatora w komórkach *Yersinia* prowadzi do zahamowania ruchliwości. Okazało się, że jest to mechanizm niezależny od funkcjonowania EnvZ, ponieważ mutant z nieaktywnym genem *envZ* pozostawał ruchliwy podobnie jak szczep dziki. Dodatkowo obserwacje mikroskopowe potwierdziły brak rzęski tylko w przypadku mutantu *ompR*. W oparciu o otrzymane wyniki postawiono hipotezę badawczą według, której OmpR może uczestniczyć w pozytywnej regulacji ekspresji operonu *flhDC*.

Regulon rzęskowy, najlepiej zbadany u *E. coli*, składa się z około 50 genów, które zgrupowane są w 3 główne klasy genów, których ekspresja zachodzi w sposób sekwencyjny, w ściśle określonym porządku. Na szczycie hierarchii znajduje się nadrzędny aktywator regulonu rzęski, heterotetramer FlhDC, którego ekspresja zależy u *E. coli* od aktywności wielu regulatorów, w tym OmpR (Shin i Park, 1995). FlhDC kontroluje ekspresję II i IIIa klasy genów oraz *fliA*, genu kodującego alternatywny czynnik Sigma 28, który z kolei kontroluje ekspresję IIIa i IIIb klasy genów (Iriarte i wsp., 1995, pr). Okazało się, iż w przypadku *Y. enterocolitica*, FliA moduluje również transkrypcję genów *inv* oraz *virF* (Horne i Pruss, 2006). VirF to główny

aktywator transkrypcji w 37°C plazmidowych genów zjadliwości *yop* oraz *yadA* (Cornelis i wsp., 1989). Analiza bioinformatyczna położenia genu *inv* w genomie *Y. enterocolitica* wskazała na lokalizację *inv* w obrębie genów regulonu rzęskowego (Badger i Miller, 1998).

Ponieważ brak rzęsek w mutancie *ompR* mógł wynikać z zahamowanej syntezy regulatora FlhDC, skonstruowano transkrypcyjne fuzje chromosomowe *flhDC::lacZ*, które przebadano następnie w szczepie dzikim oraz mutancie *ompR*. Po pierwsze zaobserwowano wyraźny spadek aktywności promotora *flhDC* w mutancie *ompR*, w porównaniu do szczepu dzikiego, co potwierdziło postawioną hipotezę, bowiem świadczyło o pozytywnej regulacji ekspresji *flhDC* z udziałem OmpR. Był to o tyle ciekawy wynik, gdyż u *E. coli* OmpR uczestniczy w negatywnej regulacji ekspresji *flhDC* (Shin i Park, 1995). Natomiast u *S. enterica* sv. Typhimurium OmpR nie ma wpływu na transkrypcję *flhDC* (Kutsukake, 1997). Ponadto wzrost temperatury, osmolarności oraz spadek pH prowadziły do zahamowania ekspresji *flhDC* zarówno w szczepie dzikim jak i mutancie *ompR*, a więc wydaje się, że OmpR odbiera jakiś inny sygnał ze środowiska, lub też kombinację sygnałów i w odpowiedzi indukuje ekspresję *flhDC*.

Analiza *in silico* sekwencji promotora operonu *flhDC* wykazała obecność dwóch potencjalnych miejsc wiązania dla OmpR pomiędzy sekwencją -10 promotora, a sekwencją startu translacji (ATG) tego operonu. Sekwencje te wykazują 61% identyczności z sekwencją konsensus wyznaczoną dla *E. coli*. W celu wykazania bezpośredniego oddziaływania OmpR z sekwencją promotora *flhDC* przeprowadzono w warunkach *in vitro* testy EMSA, które potwierdziły, iż w obrębie promotora *flhDC* znajduje się więcej niż jedno miejsce wiązania OmpR, ponieważ obserwowano stopniowe przesunięcie prążka w żelu, który odpowiadał utworzonym kompleksom OmpR/DNA. Równolegle badano czy fosforylacja ma wpływ na wiązanie się OmpR do wytypowanej sekwencji DNA. Badania te wykazały, że proces fosforylacji OmpR jest istotny i zwiększa stopień powinowactwa ufosforylowanego OmpR do DNA. Ponieważ wcześniejsze obserwacje sugerowały brak udziału sensora EnvZ w regulacji procesu ruchliwości, wydaje się więc, iż w przypadku kontroli ekspresji *flhDC* w warunkach *in vivo* OmpR może podlegać fosforylacji z udziałem innej spokrewnionej kinazy, lub też niskocząsteczkowych donorów grupy fosforanowej, tj. acetylofosforanu, którego poziom w komórce zależy od warunków wzrostu, w szczególności od rodzaju źródła węgla (McCleary i Stock, 1994). Opisano i dobrze udokumentowano w literaturze zjawisko „cross-talk” polegające na fosforylacji regulatora przez kinazę histydynową pochodzącą z innego szlaku sygnałowego (Bijlsman i Groisman, 2003). Taki mechanizm mógłby także odpowiadać za fosforylację OmpR, niezależnie od EnvZ, w komórkach *Y. enterocolitica*.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, iż OmpR pozytywnie reguluje ekspresję *flhDC* oraz negatywnie ekspresję *inv*. Wydaje się więc, że OmpR u *Y. enterocolitica*, w odpowiedzi na swoiste bodźce środowiskowe, może w sposób przeciwstawny regulować ruchliwość oraz syntezę inwazyjny i w ten sposób kontrolować proces patogenezy.

W celu zbadania fizjologicznych konsekwencji tej odwrotnej regulacji przeprowadzono kolejne doświadczenia, mianowicie testy adhezji i inwazji linii komórkowej HEp-2, jak również ocenę zdolności szczepów *Yersinia* do tworzenia biofilmu. Analizie poddano mutanta *ompR* oraz skonstruowane na potrzeby tych analiz, mutanty z nieaktywnymi genami *flhDC* i *inv*, które w pierwszej kolejności przetestowano pod względem fenotypu ruchliwości. Mutant *flhDC* był nieruchliwy, natomiast mutant *inv* pozostawał ruchliwy podobnie jak szczep dziki. W testach adhezji i inwazji wprowadzono etap wirowania, a otrzymane wyniki porównywano do wersji eksperymentu bez wirowania. Proces wirowania miał ułatwić bakteriom kontakt z komórkami eukariotycznymi niezależnie od tego czy są to szczepy

ruchliwe czy też mutanty nieruchliwe. We wszystkich wariantach eksperymentu mutant *inv* cechował się zdecydowanie obniżoną zdolnością do adhezji i inwazji komórek HEp-2, co jest zgodne z rolą jaką pełni inwazyjna w fizjologii *Y. enterocolitica*. Natomiast mutant *ompR* charakteryzował się obniżoną zdolnością adhezji w porównaniu do szczepu dzikiego i mutantu *flhDC*, pomimo nadekspresji genu inwazyjnego. Wydaje się więc, że inne adhezyny, których poziom syntezy zależy od aktywności OmpR, mogą uczestniczyć w procesie adhezji do komórek gospodarza. Dobrym kandydatem wydaje się być poryna OmpC, o czym wspominałam wcześniej. Jeśli chodzi o proces inwazji (wersja bez wirowania) obserwowano obniżoną zdolność do inwazji mutantu *ompR* jak i mutantu *flhDC*, co może być wynikiem braku rzęsek. Natomiast w wersji z wirowaniem, mutant *ompR* wykazywał zwiększoną zdolność do inwazji niż szczep dziki, ze względu na nadekspresję genu inwazyjnego. Mutant *flhDC* w tych warunkach cechował się wciąż obniżoną zdolnością inwazji w porównaniu do szczepu dzikiego i mutantu *ompR*. Wynik ten sugerował, iż FlhDC oprócz regulacji syntezy rzęski może być zaangażowany również w modulację właściwości inwazyjnych *Y. enterocolitica*. Dane literaturowe sugerują, iż FlhDC pełni funkcję globalnego regulatora zaangażowanego w metabolizm tego patogenu, jak również w sekrecję czynników zjadliwości przy udziale rzęskowego aparatu sekrecyjnego (Kapatral i wsp., 2004; Young i wsp., 1999b).

Oprócz zdolności adhezyjnych i inwazyjnych szczepów *Y. enterocolitica* w zależności od aktywności regulatora OmpR analizowano również proces tworzenia biofilmu. Biofilm to zespół organizmów, w tym przypadku jednego gatunku, zanurzonych w macierzy zewnątrzkomórkowej, wykazujących zdolność adhezji do powierzchni i siebie nawzajem. Wiele korzyści płynie dla bakterii z możliwości tworzenia biofilmu, m. in. zwiększona dostępność składników odżywczych, zwiększona oporność na czynniki bakteriobójcze itp. Wyniki przeprowadzonych badań sugerowały, że OmpR kontrolując proces syntezy rzęsek, adhezyny OmpC i inwazyjny Inv, może modulować zdolność *Y. enterocolitica* do tworzenia biofilmu. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadzono analizę zdolności do tworzenia biofilmu przez szczep dziki oraz mutanty *ompR*, *envZ*, *ompC* oraz *flhDC*. Utworzone 6 godz. oraz 24 godz. biofilmy badane były metodą ilościową (kolorymetryczną z fioletem krystalicznym), a także analizowane w skaningowym mikroskopie konfokalnym (SCLM). Obserwacje w SCLM pozwoliły na określenia grubości biofilmu oraz jego struktury przestrzennej. Otrzymane wyniki wskazały między innymi, iż niezależnie od czasu inkubacji mutant *ompR*, cechuje się obniżoną zdolnością do tworzenia biofilmu, podobnie jak mutant *flhDC*. W przypadku 24 godz. biofilmu mutant *ompR* radził sobie zdecydowanie słabiej niż mutant *flhDC*. Natomiast brak białka EnvZ nie miał wpływu na zdolność szczepu do formowania biofilmu. W przypadku analizy SCLM, zarówno mutant *ompR* jak i *flhDC* produkował cieńszy i mniej skondensowany biofilm niż szczep dziki. Wydaje się więc, że brak zdolności ruchu oraz obniżona adherencja mutantu *ompR*, a więc mniej efektywne wiązanie z powierzchnią, przekłada się na proces tworzenia biofilmu. Dodatkowo analizowany mutant *ompC* charakteryzował się wyraźnym dwuwarstwowym biofilmem, ale najstabilniej skondensowanym, co może świadczyć o udziale OmpC w procesie formowania biofilmu, jako istotnej adhezyny.

Podsumowując tę część badań można powiedzieć, że OmpR bierze udział w regulacji procesu adhezji i inwazji *Y. enterocolitica*, jak również tworzenia biofilmu, uczestnicząc bezpośrednio w regulacji syntezy adhezyny OmpC, inwazyjny Inv czy rzęsek, a być może również innych czynników istotnych w procesie patogenezы.

Główne osiągnięcia poznawcze

- OmpR bezpośrednio, pozytywnie reguluje transkrypcję operonu *flhDC*, niezależnie od aktywności sensora EnvZ
- Ekspresja *flhDC* zależy od temperatury, pH, osmolarności, a te mechanizmy regulacji są OmpR-niezależne
- Za fosforylację OmpR może odpowiadać, podobnie jak w przypadku regulacji ekspresji *inv*, albo inna spokrewniona kinaza albo niskocząsteczkowe donory grupy fosforanowej
- OmpR bierze udział w regulacji procesu adhezji i inwazji *Y. enterocolitica*
- Regulator OmpR, ale nie sensor EnvZ, reguluje proces tworzenia biofilmu
- Białko OmpC, jako kolejna adhezyna *Y. enterocolitica*, współuczestniczy w tworzenia biofilmu
- Rzęski mają istotne znaczenie dla formowania biofilmu *Y. enterocolitica*

Publikacja:

Raczkowska A., Trzos J., Lewandowska O., Nieckarz M., Brzostek K. 2015. **Expression of the AcrAB components of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump of *Yersinia enterocolitica* is subject to dual regulation by OmpR.** *PLoS One* 20;10(4):e0124248. doi: 10.1371/journal.pone.0124248.

W dalszych badaniach przeprowadzono identyfikację puli genów wchodzących w skład regulonu OmpR *Y. enterocolitica* techniką opisaną przez Robleto i wsp. (2003), w której wykorzystano samobójczy plazmid niosący minitranspozon Tn5-B22 z bezpromotorowym genem reporterowym *lacZ*. W metodzie tej, po wprowadzeniu plazmidu do komórek mutantu *ompR*, przypadkowa transpozycja mogła prowadzić do utworzenia fuzji promotora z genem reporterowym *lacZ*. Identyfikacja miejsc transpozycji oraz OmpR-zależnej regulacji ekspresji genów/operonów była możliwa dzięki wprowadzaniu do otrzymanej puli mutantów transpozonowych, *in trans* dzikiego allelu genu *ompR* i porównywaniu poziomu ekspresji genu reporterowego przed i po komplementacji mutacji *ompR*. Tym sposobem przeanalizowano 960 mutantów transpozonowych. Do dalszych analiz wytypowane zostały te mutanty, u których zaobserwowano zmiany w poziomie ekspresji *lacZ*. Zidentyfikowano pięć genów/operonów regulowanych pozytywnie i dwa negatywnie przez OmpR. Wśród nich szczególną uwagę zwrócił mutant AR83, u którego zaobserwowano wyraźny hamujący efekt działania OmpR. Wynik ten wskazywał na negatywną funkcję OmpR w regulacji tego genu/operonu. Dalsze analizy, m.in. miejsca transpozycji (AP-PCR, Arbitrary Primer PCR) oraz organizacji jednostki transkrypcyjnej (sqRT-PCR) wykazały, iż transpozycja w tym szczepie zaszła w obrębie operonu *acrRdsrE*, który koduje represor AcrR oraz hipotetyczne białko o wysokim stopniu homologii do białka DsrE *E. coli*. Białko AcrR jest represorem operonu *acrAB*, kodującego komponenty pompy *efflux* oporności wielolekowej AcrAB-TolC, tj., lipoproteinę AcrA oraz transporter AcrB (Ma i wsp., 1996; Blair i Piddock, 2009). Pompa AcrAB-TolC, występująca powszechnie u bakterii gramujemnych należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, uczestniczy w aktywnym usuwaniu szkodliwych dla komórki bakteryjnej związków, tj. chloramfenikolu, β -laktamów, tetracyklin, makrolidów, fluorochinolonów, rozpuszczalników organicznych czy detergentów (Nikaido, 1996; Li i Nikaido, 2004). Regulacja aktywności takiej pompy ma ważne znaczenie adaptacyjne i stanowi jeden z mechanizmów oporności bakterii na antybiotyki.

Równolegle do badań genetycznych przeprowadzono różnicową analizę składu białkowego osłon szczepu dzikiego i mutantu *ompR*, rosnących w różnych warunkach, co pozwoliło na identyfikację białka AcrB, którego synteza podlegała pozytywnej regulacji z udziałem OmpR. Wyniki przeprowadzonych wstępnych analiz pozwoliły wysunąć hipotezę badawczą, która zakładała udział OmpR w regulacji ekspresji genu regulatorowego *acrR*, a być może również niezależnie operonu *acrAB*. Ekspresja genów komponentów pomp typu *efflux* jest regulowana zazwyczaj przez lokalnie działający represor, jak również przez globalne ścieżki regulacyjne (Nikaido, 1996). Wiadomo, iż wśród znanych regulatorów transkrypcji *acrAB* u *E. coli* znajdują się białka MarA, Sox i Rob, natomiast u *S. enterica* sv. Typhimurium dodatkowo obecny jest jeszcze regulator RamA (Jair i wsp., 1996; Nikaido i wsp., 2008). W przypadku *Yersinia* spp. bardzo mało jest wiadomo na ten temat funkcjonowania pompy AcrAB-TolC, tym bardziej nieznanym jest mechanizm regulacji tych genów/operonów. Przeprowadzona analiza *in silico* genomu *Y. enterocolitica* wykazała obecność potencjalnych sekwencji kodujących geny regulatorów MarA, Rob i SoxS, ale nie RamA.

W celu zweryfikowania postawionej hipotezy o OmpR-zależnej regulacji funkcjonowania pompy AcrAB-TolC skonstruowano plazmidowe fuzje transkrypcyjne promotorów operonów *acrRdsrE* i *acrAB* z genem reporterowym *gfp*, które następnie przebadano w szczepie dzikim i mutancie *ompR*, w zależności od działania różnych czynników środowiskowych. Badania te wykazały, iż OmpR uczestniczy w negatywnej regulacji ekspresji *acrR* w fazie logarytmicznego wzrostu, ale nie w fazie stacjonarnej, oraz pozytywnej operonu *acrAB* niezależnie od fazy wzrostu bakterii. Ponadto temperatura reguluje transkrypcję operonu *acrAB*, ale nie *acrR*, niezależnie od OmpR. W 37°C zanotowano wyższą ekspresję *acrAB* niż w 25°C, obserwacja ta wydaje się być logiczna ponieważ w organizmie gospodarza bakterie są bardziej narażone na działanie różnych toksycznych substancji niż w środowisku zewnętrznym. W przypadku innych enterobakterii nie zaobserwowano procesu termoregulacji. Do czynników indukujących ekspresję *acrAB* u *E. coli* czy *S. enterica* sv. Typhimurium należą: sole żółci, NaCl, etanol, kwasy tłuszczowe, fluorochinolony, indol czy kwas salicylowy (Rosenberg i wsp., 2003; Nikaido i wsp., 2011). Dlatego w kolejnych doświadczeniach przebadano wpływ dziewięciu czynników stresowych na poziom ekspresji obu fuzji tj. soli żółci, deoksycholanu, indolu, etanolu, parakwatu, NaCl, wybranych fluorochinolonów oraz niskiego pH, jak również kombinacji niskiego pH i wysokiej osmolarności. Deoksycholan jest składnikiem soli żółci, indol to metabolit bakteryjny, który wydzielany na zewnątrz, pełni funkcję biologicznego oksydanta indukującego produkcję białek antyoksydacyjnych u bakterii, parakwat natomiast to generator ponadtlenkowy. Otrzymane wyniki badań pokazały, iż w zasadzie tylko sole żółci indukują w sposób istotny ekspresję *acrAB*, nieco słabiej deoksycholan, indol i parakwat, ale jest to mechanizm niezależny od OmpR.

W celu stwierdzenia czy OmpR kontroluje ekspresję *acrAB* za pośrednictwem represora AcrR, czy może również w sposób bezpośredni przeprowadzono testy EMSA. Analiza *in silico* genomu *Y. enterocolitica* wykazała obecność po jednym miejscu wiązania dla OmpR w obydwu operonach, które wykazują 45-50% identyczności ze znaną sekwencją konsensus dla tego białka. Operony *acrRdsrE* oraz *acrAB* u *Y. enterocolitica* zlokalizowane są obok siebie i są transkrybowane w odwrotnej orientacji. Jak się okazało potencjalne miejsce wiązania dla OmpR pokrywa się z miejscem wiązania dla AcrR oraz sekwencją -35 promotora w operonie *acrAB*, co może świadczyć o funkcji OmpR jako antyrepresora. Testy EMSA wykazały, że OmpR wiąże się specyficznie z sekwencją obydwu promotorów, chociaż z większym powinowactwem z promotorem *acrAB*, niż *acrRdsrE*, uczestnicząc w bezpośredniej regulacji ich ekspresji. Podsumowując, badania wykazały, że istnieje podwójny mechanizm OmpR-

zależnej pozytywnej regulacji ekspresji *acrAB*, w wyniku bezpośredniej aktywacji *acrAB* oraz hamowania ekspresji *acrR* dla lokalnego represora tego operonu. Przeprowadzone badania sugerują, iż nie tylko forma ufosforylowana białka OmpR ma zdolność do wiązania się z obydwoma badanymi promotorami. Dane literaturowe wskazują, iż fosforylacja OmpR, ale także innych regulatorów z TCS, wydaje się być niekiedy zbędna do oddziaływania regulatora z DNA (Desai i Kenney, 2017).

Główne osiągnięcia poznawcze

- OmpR pozytywnie reguluje ekspresję *acrAB* oraz negatywnie *acrRdsrE*
- Regulacja ekspresji *acrAB* ma charakter podwójny, bezpośredni oraz pośredni poprzez kontrolę ekspresji *acrR*, genu kodującego lokalny represor tego operonu
- Transkrypcja *acrAB*, ale nie *acrRdsrE* podlega termoregulacji; jest to mechanizm niezależny od aktywności OmpR
- Sole żółci są istotnym czynnikiem indukującym syntezę komponentów pompy AcrAB-TolC

PODSUMOWANIE

Wyniki badań wchodzące w skład mojej rozprawy habilitacyjnej pozwoliły na identyfikację genów regulonu OmpR *Y. enterocolitica*, których produkty warunkują ruchliwość, dyfuzję składników odżywczych, zdolność do adhezji/inwazji, tworzenia biofilmu, oporność na antybiotyki, sole żółci oraz inne substancje toksyczne dla bakterii. Niewątpliwie otrzymane wyniki poszerzyły wiedzę na temat roli regulatora OmpR w patofizjologii *Y. enterocolitica*. Plejotropowy efekt działania OmpR w komórkach *Y. enterocolitica* wskazuje na jego wysoki potencjał i możliwość pełnienia roli globalnego regulatora ekspresji genów, w tym również genów wirulencji. OmpR umożliwia efektywną adaptację *Y. enterocolitica* do warunków stresowych, czyli takich które panują w organizmie gospodarza. Prowadzone przeze mnie badania oprócz aspektu poznawczego mogą mieć również znaczenie aplikacyjne, ponieważ TCSs stanowią potencjalne cele działania dla różnego typu inhibitorów, które wykorzystane w leczeniu mogłyby wspomóc walkę z infekcjami bakteryjnymi, szczególnie w dobie szerzącej się antybiotykooporności. Powszechność występowania TCSs, wysoka konserwatywność komponentów tych systemów oraz ich brak w komórkach ssaczych może przemawiać za zastosowaniem tego typu rozwiązań w skutecznym zwalczaniu zakażeń bakteryjnych.

Realizacja niniejszego osiągnięcia była możliwa dzięki wykorzystaniu zarówno klasycznych, jak również nowoczesnych metod badawczych z zakresy fizjologii bakterii, biologii molekularnej, genetyki i bioinformatyki. Wymagało to ode mnie wiedzy i doświadczenia w konstrukcji mutantów insercyjnych, wektorów ekspresyjnych, izolacji i analizy RNA, prowadzenia hodowli tkankowych, jak również analiz *in silico* na poziomie sekwencji DNA. Prowadzone badania były możliwe dzięki pozyskaniu przez naszą grupę badawczą finansowania z Narodowego Centrum Nauki.

PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach planuję realizację projektów naukowych związanych z następującymi zagadnieniami:

- wyjaśnieniem udziału regulatora OmpR w kontroli ekspresji genów regulonu KdgR związanych z transportem i metabolizmem oligogalaturonianów, jak również genów regulonu Fur, uczestniczących w transporcie żelaza do komórek *Y. enterocolitica*. Badanie te są konsekwencją przeprowadzonych przez nas analiz proteomicznych osłon *Y. enterocolitica* w zależności od aktywności OmpR. Dzięki tym kompleksowym badaniom udało się wytypować kolejne białka, których synteza wydaje się być OmpR-zależna.
- określenie roli OmrA, małego regulatorowego sRNA, w regulacji ekspresji genów zjadliwości *Y. enterocolitica*. Wstępne wyniki badań wskazują na udział systemu EnvZ/OmpR w regulacji ekspresji *omrA*, w związku z tym istnieje możliwość kontroli ekspresji genów z udziałem OmpR również na poziomie potranskrypcyjnym.
- określeniem funkcji nowego systemu rzęskowego Flag-2 zidentyfikowanego u *Y. enterocolitica*, oraz wyjaśnieniem molekularnego mechanizmu kontroli ekspresji genów tego systemu. Badania te będą tematem mojego przyszłego, planowanego projektu badawczego.

LITERATURA

- Badger J.L., Miller V.L. 1998.** Expression of invasins and motility are coordinately regulated in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 180: 793-800.
- Benz R., Bauer K. 1988.** Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins. *Eur. J. Biochem.* 176: 1-19.
- Bernardini M.L., Fontaine A., Sansonetti P.J. 1990.** The two component regulatory system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 172: 6274-6281.
- Bernardini M.L., Sanna M.G., Fontaine A., Sansonetti P. 1993.** OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 61: 3625-3635.
- Bijlsman J.J., Groisman E.A. 2003.** Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* 11: 359-366.
- Blair J.M., Piddock L.J. 2009.** Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr. Opin. Microbiol.* 12: 512-519.
- Bottone E. J. 1997.** *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 257-276.
- Bourret R.B., Borkovich K.A., Simon M.I. 1991.** Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 401-441.
- Brubaker R.R. 1991.** Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin. Microbiol.* 4: 309-324.
- Brzostek K., Hrebenda J. 1988.** Outer-membrane permeability to β -lactam antibiotics in *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1535-1540.
- Brzostek K., Raczkowska A., Zasada A. 2003.** The osmotic regulator OmpR is involved in the response of *Yersinia enterocolitica* O:9 to environmental stresses and survival within macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 228: 265-271.

- Chevalier J., Pagès J.M., Malléa M. 1999.** *In vivo* modification of porin activity conferring antibiotic resistance to *Enterobacter aerogenes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 248-251.
- Cornelis G., Sluifers C., de Rouvroit C.L., Michiels T.J. 1989.** Homology between *virF*, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J. Bacteriol.* 171: 254-262.
- Cornelis G.R., Sluifers C., Delor I., Geib D., Kaniga K., Lambert de Rouvroit C., Sory M.P., Vanooteghem J.C., Michiels T. 1991.** *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol. Microbiol.* 5: 1023-1034.
- Cornelis G.R. 2002.** *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *Cell Biol.* 20 158: 401-8.
- Csonka L.N., Epstein W. 1996.** Osmoregulation. str. 1210-1223, F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, wydanie drugie ASM Press, Washington, D.C.
- Desai S.K., Kenney L.J. 2017.** To ~P or Not to ~P? Non-canonical activation by two-component response regulators. *Mol. Microbiol.* 103: 203-213.
- Egger L.A., Park H., Inouye M. 1997. Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* 2: 167-184.
- Ellison D.W., Lawrenz M.B., Miller V.L. 2004.** Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA. *Trends Microbiol.* 12: 296-300.
- Ellison D.W., Miller V.L. 2006.** H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. *J. Bacteriol.* 188: 5101-5112.
- Ellison D.W., Young B., Nelson K., Miller V.L. 2003.** YmoA negatively regulates expression of invasin from *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 185: 7153-7159.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2015.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13(12): 4329.
- Feng X., Walther D., Ortopeza R., Kenney L.J. 2004.** The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 54: 823-835.
- Garmendia J., Beuezon C.R., Ruiz-Albert J., Holden D.W. 2003.** The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiol.* 149: 1385-2396.
- Higashitani A., Nishimura Y., Hara H., Aiba H., Mizuno T., Horiuchi K. 1993.** Osmoregulation of the fatty acid receptor gene *fadL* in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 240: 339-347.
- Higgins C.F., Dorman C.J., Stirling D.A., Waddell L., Booth I.R., May G., Bremer E. 1988.** A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* 26: 569-584.
- Horne S.M., Prüss B.M. 2006.** Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid-encoded virulence genes. *Arch. Microbiol.* 185: 115-126.
- Iriarte M., Stainier I., Mikulskis A.V., Cornelis G.R. 1995. The *fliA* gene encoding sigma 28 in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 177: 2299-2304.
- Jair K.W., Yu X., Skarstad K., Thony B., Fujita N., Ishihama A., et al. 1996.** Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J. Bacteriol.* 178: 2507-2513.

- Jepson M.A., Clark M.A. 1998.** Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol.* 6: 359-365.
- Jubelin G., Vianney A., Beloin C. et al. 2005.** CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 2038–2049.
- Kapatral V., Campbell J.W., Minnich S.A., Thomson N.R., Matsumura P., Pruss B.M. 2004.** Gene array analysis of *Yersinia enterocolitica* FlhD and FlhC: regulation of enzymes affecting synthesis and degradation of carbamoylphosphate. *Microbiol.* 150: 2289-2300.
- Kenney L.J. 2002.** Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 135–141.
- Kutsukake K. 1997. Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 254: 440-448.
- Lee A.K., Detweiler C.S., Falkow S. 2000.** OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* 182: 771-781.
- Li X.Z., Nikaido H. 2004.** Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64: 159-204.
- Ma D., Alberti M., Lynch C., Nikaido H., Hearst E. 1996.** The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* 19: 101-112.
- Maeda S., Takayanagi K., Nishimura Y., Maruyama T., Sato K., Mizuno T. 1991.** Activation of the osmoregulated *ompC* gene by the OmpR protein in *Escherichia coli*: a study involving synthetic OmpR-binding sequences. *J. Biochem.* 110: 324-327.
- Martínez-Martínez L., Hernández-Allés S., Albertí S., Tomás J.M., Benedi V.J., Jacoby G.A. 1996.** *In vivo* selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 342-348.
- McCleary W.R., Stock J.B. 1994.** Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* 269: 31567–31572.
- Negm R.S., Pistole T.G. 1999.** The porin OmpC of *Salmonella typhimurium* mediates adherence to macrophages. *Can. J. Microbiol.* 45: 658-669.
- Nikaido E., Shirosaka I., Yamaguchi A., Nishino K. 2011.** Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to indole and paraquat. *Microbiol.* 157: 648-655.
- Nikaido H. 1992.** Porins and specific channels of bacterial outer membrane. *Mol. Microbiol.* 6: 435-442.
- Nikaido H. 1996.** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 5853–5859.
- Pepe J.C., Badger J.L., Miller V.L. 1994. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Mol. Microbiol.* 11: 123–135.
- Pepe J.C., Miller V.L. 1993.** *Yersinia enterocolitica* invasins: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6473–6477.
- Robledo E.A., López-Hernández I., Silby M.W., Levy S.B. 2003.** Genetic analysis of the AdnA regulon in *Pseudomonas fluorescens*: nonessential role of flagella in adhesion to sand and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 185: 453–460.
- Rosenberg E.Y., Bertenthal D., Nilles M.L., Bertrand K.P., Nikaido H. 2003.** Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol. Microbiol.* 48: 1609-1619.
- Shin S., Park C. 1995.** Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. *J. Bacteriol.* 177: 4696–4702.

- Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M., Lejeune P.J. 1998.** Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* 180: 2442-2449.
- Yamamoto K., Nagura R., Tanabe H., Fujita N., Ishihama A., Utsumi R. 2000.** Negative regulation of the *bolA* of *Escherichia coli* K-12 by the transcription factor OmpR for osmolarity response genes. *FEMS Microbiol. Letter.* 186: 257-262.
- Young V.B., Miller V.L., Falkow S., Schoolnik G.K. 1990.** Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 4: 1119-1128.
- Young G.M., Smith M.J., Minnich S.A., Miller V.L. 1999a.** The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J. Bacteriol.* 181: 2823–2833.
- Young G.M., Schmiel D.H., Miller V.L. 1999b.** A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6456-6461.
- Young G.M., Badger J.L., Miller V.L. 2000.** Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 68: 4323–4326.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Publikacje:

- Brzostek K., **Górka A.**, Rechnio M. **2000.** Physiological properties and production of siderophores detected in *Yersinia enterocolitica* strain 4-32. *Microbios* 101: 169-180.
- Brzostek K., **Raczkowska A.** **2001.** The level of Yop proteins secreted by *Yersinia enterocolitica* is changed in maltose mutants. *FEMS Microbiol. Lett.* 204: 95-100.
- Brzostek K., **Raczkowska A.**, Zasada A. **2003.** The osmotic regulator OmpR is involved in the response of *Yersinia enterocolitica* O:9 to environmental stresses and survival within macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 228: 265-271.

Pracę naukową w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej UW rozpoczęłam od badań mających na celu identyfikację związków o aktywności sideroforowej w szczepach *Y. enterocolitica* (Brzostek i wsp., 2000). Siderofory to niskocząsteczkowe chelatory jonów żelaza, które syntetyzowane przez bakterie uwalniane są do środowiska, a następnie po związaniu Fe^{3+} oddziałują z receptorami błony zewnętrznej, aby trafić z powrotem na teren cytoplazmy komórki bakteryjnej. W ten sposób patogeny radzą sobie z niedoborem żelaza w środowisku, a umiejętność asymilacji żelaza zapewnia im m. in. wzrost i efektywną kolonizację organizmu gospodarza. Wśród szczepów *Y. enterocolitica* są wysoce zjadliwe, wirulentne dla myszy (O:8, O:4), które syntetyzują siderofory, mianowicie yersiniabaktynę. Geny kodujące komponenty odpowiedzialne za syntezę yersiniabaktyny oraz jej pobieranie zlokalizowane są na wyspie patogenności HPI. Istnieją również takie szczepy *Y. enterocolitica*, które nie są zdolne do produkcji własnych sideroforów, ale są w stanie wykorzystywać obce chelatory żelaza dzięki syntezie odpowiednich receptorów dla ich wychwytu. Przeprowadzone badania pozwoliły na izolację nowej klasy sideroforów ze szczepu 4-32 *Y.*

enterocolitica. Związek ten o naturze hydrofilowej nie należał ani do sideroforów katecholowych ani hydroksamowych, jakie identyfikowane są wśród *Enterobacteriaceae*. Ponadto produkcja nowego typu sideroforu w tym szczepie podlegała osmoregulacji. W badaniach wykazano również, iż szczep 4-32 jest w stanie wykorzystywać egzogenne siderofory (np. aerobaktynę), natomiast nie syntetyzuje białka FyuA, będącego receptorem dla yersiniabaktyny. Możliwość syntezy własnych chelatorów żelaza, jak również korzystanie z obcych sideroforów zwiększa właściwości chorobotwórcze *Y. enterocolitica*.

Będąc na dwóch stażach naukowy w laboratorium prof. Jürgena Heesemanna w Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zajmowałam się tematyką związaną z funkcjonowaniem komponentów kodowanych przez wyspę patogenności HPI obecnej w serotypie O:8 *Y. enterocolitica*, co pogłębiło moją wiedzę na temat mechanizmów kontrolujących proces produkcji i pobierania yersiniabaktyny.

Kolejne prowadzone przeze mnie badania weszły w skład pracy doktorskiej, która dotyczyła dwóch zagadnień, a mianowicie określenie udziału regulonu maltozowego oraz regulatora OmpR w ekspresji czynników wirulencji *Y. enterocolitica* Ye9. Część dotyczącą udziału OmpR w fizjologii tego patogenu została przeze mnie opisana we Wstępie do wyżej przedstawionego osiągnięcia naukowego (Brzostek i wsp., 2003). Natomiast jeśli chodzi o regulon maltozowy to w toku badań prześledzono wpływ maltozy obecnej w podłożu, jak również mutacji transpozonowych o fenotypie Mal⁻, na poziom produkcji białek sekrecyjnych Yop, głównych determinantów patogenezy *Y. enterocolitica* (Brzostek i Raczkowska, 2001). Okazało się, że obecność maltozy w podłożu obniża poziom syntezy tych białek. Różnice ilościowe określano mierząc poziom aktywności enzymatycznej jednego z białek Yop, mianowicie YopH, będącej fosfatazą tyrozynową. Jest to jedno z najlepiej scharakteryzowanych białek efektorowych *Y. enterocolitica*, które na terenie cytoplazmy komórki gospodarza zaburza podstawowe mechanizmy przekazywania sygnału. Również wybrane mutanty transpozonowe o fenotypie Mal⁻, które wykazywały zaburzenia w procesie transportu maltozy, cechowały się drastycznie obniżonym poziomem sekrecji białek Yop, ale nie transkrypcji genów regulonu *yop*. Wyniki te wskazują na istnienie korelacji pomiędzy funkcjonowaniem systemu maltozowego, a produkcją czynników zjadliwości *Y. enterocolitica*. Maltoza pochodząca z hydrolizy skrobi jest powszechnie występującym związkiem odżywczym w jelicie człowieka, stanowi więc łatwo dostępne źródło węgla dla *Y. enterocolitica*. Wydaje się więc, iż maltoza może stanowić ważny sygnał uczestniczący w koordynacji ekspresję czynników wirulencji enterobakterii. Sygnał ten na wczesnym etapie inwazji mógłby informować bakterie patogenne o znalezieniu się w przewodzie pokarmowym organizmu gospodarza, gdzie powinna rozpocząć się w pierwszej kolejności synteza czynników kolonizacyjnych, niezbędnych w procesie adhezji do komórek eukariotycznych.

Badania dotyczące wpływu OmpR na ekspresję czynników wirulencji *Y. enterocolitica* były finansowane z grantu KBN (3-P05A-114-22), którego byłam kierownikiem.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Publikacje:

Raczkowska A., Brzostek K. 2004. Identification of OmpR protein and its role in the invasion properties of *Yersinia enterocolitica*. *Pol. J. Microbiol.* 53: 11-16.

Raczkowska A., Brzóstkowska M., Brzostek K. **2008.** Regulation of *Yersinia enterocolitica* *mal* genes by MalT and Mlc proteins. *Pol. J. Microbiol.* 57: 19-26.

Brzóstkowska M., **Raczkowska A.,** Brzostek K. **2012.** OmpR, a response regulator of the two-component signal transduction pathway, influences *inv* gene expression in *Yersinia enterocolitica* O9. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* doi: 10.3389/fcimb.2012.00153.

Skorek K., **Raczkowska A.,** Dudek B., Miętka K., Guz-Regner K., Pawlak A., Klaus E., Bugla-Płoskońska G., Brzostek K. **2013.** Regulatory protein OmpR influences the serum resistance of *Yersinia enterocolitica* O:9 by modifying the structure of the outer membrane. *PLoS One* 8(11): e79525. doi: 10.1371/journal.pone.0079525.

Nieckarz M., **Raczkowska A.,** Dębski J., Kistowski M., Dadlez M., Heesemann J., Rossier O., Brzostek K. **2016.** Impact of OmpR on the membrane proteome of *Yersinia enterocolitica* in different environments: repression of major adhesin YadA and heme receptor HemR. *Env. Microbiol.* 18: 997-1021. doi:10.1111/1462-2920.13165.

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam moje zainteresowania w zakresie udziału białka OmpR oraz regulonu maltozowego w patofizjologii *Y. enterocolitica*. Analizy bioinformatyczne sekwencji aminokwasowej OmpR wykazały istnienie wysokiego stopnia homologii tego białka syntetyzowanego przez gatunki bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*. Przeprowadzone testy inwazji linii komórkowej HeLa dowiodły, iż mutant *ompR* cechuje się obniżoną zdolnością do inwazji komórek eukariotycznych w porównaniu do szczepu dzikiego (Raczkowska i Brzostek, 2004). Obserwacje te wraz z późniejszymi wynikami opisanymi w moim osiągnięciu habilitacyjnym świadczą o istotnej roli regulatora OmpR w modulowaniu zjadliwości *Y. enterocolitica*. Kolejne badania dotyczące regulonu maltozowego rozpoczęto od określenia roli MalT oraz Mlc w regulacji procesu transportu maltozy w komórkach *Y. enterocolitica* (Raczkowska i wsp., 2008). Z danych literaturowych wiadomo, iż MalT pełni funkcję pozytywnego regulatora ekspresji genów regulonu maltozowego, natomiast Mlc to globalny represor ekspresji wielu genów metabolizmu cukrów, który kontroluje również ekspresję *malT* u *E. coli*. Zasadnicze zagadnienie, będące konsekwencją badań prowadzonych w ramach moich studiów doktoranckich, dotyczyło poszukiwania korelacji pomiędzy aktywnością MalT, a produkcją cytotoksycznych białek Yop. Otrzymane wyniki wykazały, iż MalT *Y. enterocolitica* pełni nadrzędną rolę w kontroli ekspresji genów *mal*, natomiast Mlc uczestniczy w negatywnej regulacji ekspresji *malT*, podobnie jak w przypadku *E. coli*. Ponadto wykluczono aby regulator MalT brał udział w kontroli procesu syntezy/sekrecji białek wirulencji Yop.

Jednym z tematów badań wchodzących w skład mojej rozprawy habilitacyjnej było wyjaśnienie roli regulatora OmpR w modulowaniu ekspresji *inv* *Y. enterocolitica* Ye9. Z danych literaturowych wynika, iż wzór ekspresji genu inwazyjności, w odpowiedzi na różne czynniki środowiskowe, różni się w zależności od serotypu, a nawet szczepu. W pracy Brzóstkowska i wsp. (2012) wykazano, iż ekspresja *inv* jest hamowana nie tylko w 37°C i wysokiej osmolarności, ale również w niskim pH, a ponadto udowodniono, że kombinacja temperatury 37°C i niskiego pH (pH 5,5) indukuje wysoki poziom transkrypcji *inv*. Udowodniono również, że ekspresja *ompR* podlega regulacji z udziałem temperatury i niskiego pH, co może przekładać się na wzór ekspresji *inv*. Dodatkowo wykazano, analizując poziom aktywności promotora *rovA* w fuzji transkrypcyjnej z genem reporterowym *lacZ*, iż OmpR nie uczestniczy w regulacji syntezy RovA, nadrzędnego aktywatora ekspresji genu inwazyjności w 37°C. Przeprowadzone testy EMSA, w tym testy kompetycji, sugerowały, iż OmpR może hamować oddziaływanie białka RovA z promotorem *inv*, co niewątpliwie ma

związek z bliskim położenie potencjalnego miejsca wiązania OmpR i jednej z sekwencji wiązania dla RovA.

Kolejne badania, w których brałam aktywny udział, dotyczyły określenia roli OmpR w modulowaniu wrażliwości *Y. enterocolitica* na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej (NHS, ang. Normal Human Serum) (Skorek i wsp., 2013). Punktem wyjścia była obserwacja, iż mutant *ompR* rosnący w 37°C cechuje się bardzo wysoką opornością na działanie NHS oraz obniżonym poziomem syntezy lipopolisacharydu (LPS) w porównaniu do szczepu dzikiego. Z danych literaturowych wiadomo, iż białka błony zewnętrznej, w szczególności adhezyna YadA, ale również Ail, odgrywają istotną rolę w ochronie *Y. enterocolitica* przed działaniem układu dopełniacza obecnego w NHS.

W toku badań wykazano istnienie odwrotnej regulacji z udziałem OmpR transkrypcji genów *ail* oraz *ompX*, kodujących dwa homologiczne białka błony zewnętrznej. Nie wykazano natomiast różnic w syntezie YadA w zależności od aktywności OmpR. Ponadto białka Ail oraz OmpC, odwrotnie niż OmpX, warunkowały oporność szczepu dzikiego na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej, ale nie były odpowiedzialne za wysoką oporność mutantu *ompR* na NHS. Okazało się również, iż obniżony poziom ekspresji *flhDC* w mutancie *ompR* (co udowodniłam i opisałam w moim osiągnięciu habilitacyjnym), odpowiadał częściowo za wysoką oporność mutantu *ompR* na NHS. W związku z tym można było stwierdzić, iż obserwowany fenotyp mutantu *ompR* jest wynikiem złożonego procesu, bowiem OmpR-zależne zmiany w składzie i strukturze błony zewnętrznej determinowane obniżoną syntezą FlhDC (a tym samym rzęskowego aparatu sekrecyjnego) oraz LPS mogą przyczyniać się do zwiększenia aktywności/ekspozycji białka YadA na powierzchni komórki bakteryjnej, co warunkuje wysoką oporność na bakteriobójcze działanie surowicy.

Otrzymane dane sugerowały, że regulator OmpR może mieć kluczowe znaczenie w modulowaniu procesu wirulencji i zdolności adaptacyjnych *Y. enterocolitica* w wyniku modulowania proteomu błony zewnętrznej. Dalsze badania, w których brałam czynny udział, pozwoliły na identyfikację puli 120 białek błonowych, których synteza jest OmpR-zależna (Nieckarz i wsp., 2016). Dzięki analizom proteomicznym, metodą „shotgun” z zastosowaniem tandemowej spektrometrii mas, przeprowadzono porównanie frakcji białek błonowych szczepu dzikiego i mutantu *ompR* rosnących w dwóch temperaturach, 26°C oraz 37°C, w warunkach standardowych, jak również w warunkach stresowych, tj. w niskim pH oraz wysokiej osmolarności. Zidentyfikowane białka podzielono według kategorii biologicznych procesów, w których uczestniczą. Okazało się, iż jedna trzecia OmpR-zależnych białek związana była z transportem błonowym. Dużą grupę stanowiły białka zaangażowane w proces patogenezy, a wśród nich adhezyna YadA oraz białka Yop, których synteza była w większości regulowana negatywnie przez OmpR. Wśród zidentyfikowanych białek znalazły się także te związane z homeostazą żelaza oraz opornością bakterii na stres. Ponieważ OmpR może w sposób bezpośredni regulować ekspresję genów, lub też pośrednio poprzez wpływ na transkrypcję innego regulatora białkowego czy też sRNA, przeprowadzono analizę *in silico* genomu *Y. enterocolitica* w celu identyfikacji potencjalnych miejsc wiązania OmpR, korzystając z sekwencji consensus *E. coli*. Prawdopodobne sekwencje wiązania OmpR wyznaczono między innymi w genie *yadA* oraz *hemR*. YadA, jak wspominałam wcześniej, jest białkiem błony zewnętrznej odpowiadającym za adhezję do komórek eukariotycznych oraz chroniącym bakterie przed cytolityczną aktywnością układu dopełniacza. HemR natomiast to białko receptorowe błony zewnętrznej, uczestniczące w procesie pobierania hemu, który jest źródłem żelaza, czynnika limitującego wzrost *Y. enterocolitica* w organizmie gospodarza.

Różnicowe analizy proteomiczne wykazały wzrost poziomu syntezy YadA oraz HemR w mutancie *ompR*, w porównaniu do szczepu dzikiego. Analizy immunodetekcji YadA oraz HemR potwierdziły te obserwacje. Również w przypadku skonstruowanych fuzji, tj. translacyjnej *yadA::gfp* oraz transkrypcyjnej *hemR::lacZYA* wykazano wzrost poziomu aktywności Gfp oraz β -galaktozydazy w mutancie *ompR* w stosunku do szczepu dzikiego, co świadczy o udziale białka OmpR w negatywnej regulacji ekspresji badanych genów. Zarówno w przypadku analiz immunodetekcji HemR jak i badaniu aktywności promotora *hemR* zaobserwowano w warunkach derepresji regulonu żelazowego, czyli w obecności chelatora żelaza w podłożu, zniesienie OmpR-zależnej regulacji, co może świadczyć o udziale OmpR w pośredniej kontroli ekspresji *hemR* poprzez wpływ na poziom syntezy represora Fur. W celu zbadania możliwości bezpośredniego oddziaływania OmpR z wyznaczonymi sekwencjami w genie *yadA* i *hemR* przeprowadzono w warunkach *in vitro* testy EMSA, które potwierdziły zdolność OmpR do specyficznego oddziaływania z sekwencją promotorową *yadA* oraz brak wiązania OmpR z obszarem promotorowym *hemR*. Otrzymane wyniki wskazują na bezpośrednią OmpR-zależną regulacją ekspresji *yadA* oraz pośrednią kontrolę ekspresji *hemR*.

Badania dotyczące udziału OmpR w regulacji ekspresją genu inwazyjności oraz innych właściwości wirulentnych *Y. enterocolitica*, jak również w adaptacji do warunków stresowych były finansowane z grantu KBN (501/66/GR-2505) oraz grantu NCN (OPUS, UMO-2011/01/B/NZ6/01845), w których byłam głównym wykonawcą.

Publikacje:

Łotowska W.A., Rutkowska I.A., Seta E., Szaniawska A.W., Sęk S., **Raczkowska A.**, Brzostek K., Kulesza P.J. **2016**. Bacterial-biofilm enhanced design for improved electrocatalytic reduction of oxygen in neutral medium. *Electrochim. Acta* 213: 314-323.

Seta E., Łotowska W., Rutkowska I.A., Wadas A., **Raczkowska A.**, Nieckarz M., Brzostek K., Kulesza P.J. **2016**. Polyaniline-supported bacterial biofilms as active matrices for platinum nanoparticles: enhancement of electroreduction of carbon dioxide. *Australian J. Chem.* 69(4): 411-418.

Osobny temat badawczy prowadziłam we współpracy z zespołem prof. dr hab. Pawła Kuleszy z Wydziału Chemii i Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Uniwersytetu Warszawskiego. Tematyka badań dotyczyła elektrochemicznych właściwości biofilmów bakteryjnych i możliwości ich wykorzystania m.in. w produkcji bioelektryczności w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych (Łotowska i wsp., 2016; Seta i wsp., 2016). Analizowano strukturę biofilmu utworzonego przez *Y. enterocolitica* na elektrodach z węgla szklonego w elektronowym mikroskopie skaningowym (SEM), oceniano przeżywalność komórek bakteryjnych w testowanych biofilmach oraz przeprowadzano badania woltamperometryczne. Biofilm modyfikowano przez dodanie nanorurek węglowych, porfiryny kobaltowej, polianiliny czy nanocząstek platyny. Wyniki badań wykazały, że biofilm *Y. enterocolitica* wykazuje właściwości elektrokatalityczne względem redukcji tlenu, nadtlenu wodoru i dwutlenku węgla oraz może być aktywnym składnikiem warstw hybrydowych.

6. Dane bibliometryczne.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania – **32,971**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitanta - **500**

Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitanta (wg bazy Web of Science) - **130**

Indeks Hirscha habilitanta (wg bazy Web of Science) - **6**

