

## Autoreferat

**1. Imię i nazwisko:** Magdalena Popowska

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

a) Dyplom magistra biologii, specjalizacja mikrobiologia, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, 1991, tytuł pracy magisterskiej: „Białka wiążące się z DNA formy pierwotnej i wtórnej *Xenorhabdus luminescens*”

b) Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologia, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, 2003, tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza genetyczna i funkcjonalna regionu genomu *Listeria monocytogenes* EGD, determinującego aktywność autolizyny”

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

- Asystent w Zakładzie Fizjologii Bakterii, Wydział Biologii, Instytut Mikrobiologii od 1991-2004r.

- Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, Wydział Biologii, Instytut Mikrobiologii od 2004 - obecnie, od Maja 2009r. w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej IM.

- Kierownik Zakładu Mikrobiologii Ogólnej (P.O.) w latach 2007 – 2009 r.

**Urlopy macierzyńskie i wychowawcze:**

- 03.08.1996- 01.01.1998

- 27.01.2001 – 25.07.2002

**4. Wskazanie 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) tytuł osiągnięcia naukowego:** Charakterystyka wybranych białek *Listeria monocytogenes* związanych ze strukturą osłon komórkowych, pełniących kluczowe znaczenie w fizjologii komórki bakteryjnej – nowe cele dla potencjalnych, nowych terapii antylisteriowych

**B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

IF podany zgodnie z rokiem opublikowania, punkty MNISW zgodnie z Załącznikiem do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17 września 2012 r.

1. **Popowska M., Osińska M., Rzczkowska M. 2012.** N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (NagA) of *Listeria monocytogenes* EGD, an essential enzyme for the metabolism and recycling of amino sugars. *Arch. Microbiol.*; 194(4):255-68. Epub 2011 Sep 24. DOI:10.1007/s00203-011-0752-3. punkty MNISW – 20; IF – 1.431; cytowania 1

*Wkład habilitantki 90% - autor korespondencyjny, koncepcja pracy, projekt i wykonanie pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.*  
(Osińska M., Rzczkowska M. wykonywały i pisały pracę magisterską pod moim kierunkiem)

2. Markiewicz Z., **Popowska M. 2011.** An Update on Some Structural Aspects of the Mighty Miniwall *Pol. J. Microbiol.* 60 (3):181-186; punkty MNISW – 15; IF – 0.760; cytowania 0

*Wkład habilitantki 40 % - koncepcja i przygotowanie manuskryptu.*

3. **Popowska M.**, Kusio M., Szymańska P., Z. Markiewicz. **2009.** Inactivation of the wall-associated de-N-acetylase (PgdA) of *Listeria monocytogenes* results in greater susceptibility of the cells to induced autolysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9:932-945.; punkty MNISW – 20; IF – 2.062; cytowania 6

*Wkład habilitantki 80% - autor korespondencyjny, koncepcja pracy, projekt i wykonanie pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.*  
(Kusio M., Szymańska P. wykonywały i pisały pracę magisterską pod moim kierunkiem)

4. **Popowska M.** and Z. Markiewicz. **2006.** Characterization of protein Lmo0327 of *Listeria monocytogenes* with murein hydrolase activity. *Arch. Microbiol.* 186: 69-86; punkty MNISW – 20; IF – 1.820; cytowania 13

*Wkład habilitantki 90% - autor korespondencyjny, koncepcja pracy, projekt i wykonanie pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.*

5. **Popowska M.** and Z. Markiewicz. **2004.** Murein-Hydrolyzing Activity of Flagellin FlaA of *Listeria monocytogenes*. *Pol. J. Microbiol.* 53(4): 237-241; punkty MNISW – 15; IF – 0.286; cytowania 8

*Wkład habilitantki 90% - autor korespondencyjny, koncepcja pracy, projekt i wykonanie pracy eksperymentalnej, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu.*

6. **Popowska M.** and Z. Markiewicz. **2004a.** Classes and Functions of *Listeria monocytogenes* Surface Proteins. *Pol. J. Microbiol.* 53(2): 75-88; punkty MNISW – 15; IF – 0.286; cytowania 6

*Wkład habilitantki 90% - autor korespondencyjny, koncepcja, analiza danych i przygotowanie manuskryptu.*

7. **Popowska M. 2004.** Analysis of the Peptidoglycan Hydrolases of *Listeria monocytogenes*: Multiple Enzymes with Multiple Functions. *Pol. J. Microbiol.* 53 Suppl.: 29-34; punkty MNISW – 15; IF – 0.286; cytowania 20

*Wkład habilitantki 100% - autor korespondencyjny, koncepcja, analiza danych i przygotowanie manuskryptu.*

- \* Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 7.

### **C) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:**

#### **Wstęp**

*L. monocytogenes* jest gramdodatnią bakterią powszechnie bytującą w środowisku naturalnym. Występuje w glebie, wodzie, roślinach, ściekach, odchodach, w przewodach pokarmowych wielu gatunków zwierząt domowych i dzikich oraz w żywności (Schlecht, 2000; Hammon i wsp., 2006). Konsekwencją rozpowszechnienia tego mikroorganizmu w środowisku, jego wysokiej odporności na czynniki fizyko-chemiczne, a także wyjątkowej w świecie bakterii zdolności do przeżycia i namnażania się w szerokim zakresie temperatur, jest jego częsta obecność w surowcach zwierzęcych i roślinnych oraz produktach spożywczych (Gandhi i Chikindas, 2007). *L. monocytogenes* jest fakultatywnym tlenowcem, ma zdolność do namnażania się w warunkach niesprzyjających: przy pH 4,5 - 9,0 i w temperaturze 0 - 45 °C, jest także odporna na wysokie stężenie NaCl i mrożenie. Najlepsze warunki dla wzrostu *L. monocytogenes* to pH 6 - 9 i temperatura 22 – 37 °C. Bakteria ta jest bardzo ruchliwa w zakresie temperatury od 22 - 30 °C, natomiast w temperaturze 37 °C nie produkuje wici. Na podłożu z krwią ten patogen tworzy strefy hemolizy. Bakteria ta ma również zdolność do formowania biofilmu, komórki przytwierdzają się do stałych powierzchni i intensywnie dzielą, w wyniku czego powstaje skomplikowana i niezmiernie trudna do usunięcia struktura, zbudowana z mikrokoloni oddzielonych siecią otwartych kanałów (Borucki i wsp., 2003). *L. monocytogenes* cechuje wrażliwość na środki dezynfekcyjne, jak również podwyższoną temperaturę. Bakterię niszczy obróbka termiczna w temperaturze 60 °C przez 5-8 minut.

Bakteria ta jest wewnątrzkomórkowym patogenem ludzi i zwierząt powodującym sporadyczne jak i epidemiczne zakażenia. Szacuje się, że 99% przypadków listeriozy u ludzi jest spowodowanych spożyciem żywności zanieczyszczonej tym drobnoustrojem (ang. food-borne diseases). Zdolność do namnażania w niskich temperaturach, przy niskim pH, sprzyja rozwojowi *Listeria monocytogenes* w nieodpowiednio przetworzonej czy przechowywanej żywności. Zgodnie z zaleceniami Komisji Unii Europejskiej w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych należy badać obecność tego patogenu w produktach spożywczych, w szczególności gotowych do spożycia przechowywanych w warunkach chłodniczych (paszety, wędzone ryby, sery miękkie, mleko, owoce morza, surówki) (Hammon i wsp., 2006). Parametr ten stanowi jedno z kryteriów bezpieczeństwa żywności, a dopuszczalny poziom tych bakterii nie może przekroczyć 100 jtk/g, w czasie całego okresu przydatności do spożycia. Częsta obecność *L. monocytogenes* w żywności w połączeniu

z wysoką śmiertelnością w wyniku infekcji wywołanej przez ten patogen: u dorosłych od 20 do 60%, szczególnie w przypadku infekcji centralnego układu nerwowego, u noworodków 54-90% (Hof, 2004), zdecydowanie wyróżnia listeriozę spośród innych zatruc pokarmowych i stanowi poważny publiczny problem zdrowotny (Lorber, 1997).

Patogenność *L. monocytogenes* jest uwarunkowana głównie przez następujące czynniki wirulencji: listeriolizynę O (LLO), białko ActA, dwie fosfolipazy C - fosfolipazę C specyficzną dla fosfatydyloinozytolu (PI-PLC, PlcA) i fosfolipazę C specyficzną dla fosfatydylocholiny (PlcB, lecytynaza) oraz metaloproteazę. Geny kodujące te czynniki są zlokalizowane na chromosomie bakteryjnym obok siebie w obszarze genów wirulencji, których ekspresja jest regulowana przez aktywator transkrypcji PrfA (Vazquez-Boland i wsp., 2001). Ponadto inne determinanty, jak: internaliny (InlA i InlB), białko CwhA (ang. cell wall hydrolase A), katalaza, dysmutaza nadtlenu i białko LmaA również odgrywają rolę w patogenezie (Popowska i Markiewicz, 2004).

Do grupy największego ryzyka zakażenia pałeczką *L. monocytogenes* należą: kobiety ciężarne, noworodki, osoby w podeszłym wieku i chorzy z upośledzoną odpornością komórkową (Schlecht, 2000). Najczęstszymi postaciami listeriozy są: zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, bakteremia oraz zakażenia okołoporodowe. Może również wywoływać zapalenie wsierdza, zapalenie i ropień wątroby, zapalenie otrzewnej, żołądka i jelit, a także infekcje skórne i mięśniowo-szkieletowe. Nie jest znana dawka bakterii wywołująca chorobę u ludzi, dawka zakażająca u ssaków (małpy) wynosi  $\geq 10^9$  bakterii (Chodorowska i Kuklińska, 2002). Znane są przypadki spożycia takiej dawki u ludzi i nie zachorowania, jak również zachorowania po spożyciu jedynie  $10^2$  bakterii przez osoby z grupy ryzyka. Okres od zakażenia do pojawienia się pierwszych objawów choroby u ludzi waha się od 11 do 70 dni (Lorber, 1997).

W przypadku zakażenia wywołanego przez *L. monocytogenes* terapią z wyboru jest antybiotyk  $\beta$ -laktamowy, jak penicylina benzylova lub ampicylina, pojedynczo lub w skojarzeniu z aminoglikozydami, najczęściej gentamicyną (Walsh i wsp., 2001). Lekiem alternatywnym, szczególnie u chorych uczulonych na penicylinę, jest trimetoprim połączony z antybiotykami z grupy sulfonamidów, takimi jak np. sulfometoksazol (np. preparat kotrimoksazol) (Jones i MacGowan, 1995).

Coraz częściej izolowane są szczepy kliniczne jak i środowiskowe *L. monocytogenes* (Chen i wsp., 2010), odporne na antybiotyki, konieczne jest zatem poszukiwanie alternatywnych celów dla leków przeciwlisteriowych, jak również w ramach działań prewencyjnych, bezpiecznych środków mogących znaleźć zastosowanie w zwalczaniu komórek tej bakterii w produktach spożywczych, zwłaszcza tych gotowych do spożycia. Moim zdaniem potencjalnym celem mogą stać się: (I) enzymy, które są odpowiedzialne za syntezę i/lub modyfikację głównego składnika ściany komórkowej –

mureiny jak i głównych polimerów peptydoglikanu *L. monocytogenes* - kwasów tejchojowych, jak również (II) białka powierzchniowe zakotwiczone w strukturach osłon tej bakterii o kluczowym znaczeniu w fizjologii tej bakterii. W każdym przypadku są to białka, których ekspresja nie jest zależna od warunków środowiska, w odróżnieniu od białek biorących udział w procesie patogenezy (Toledo-Arana i wsp., 2009).

**I.** Zarówno u bakterii gramdodatnich jak i gramujemnych, na zewnątrz błony cytoplazmatycznej znajduje się sztywna struktura zwana mureiną (syn. mureina), dodatkowo wzmocniona polianionowymi polimerami kwasami tejchojowymi lub techuronowymi (bakterie gramdodatnie) oraz różnymi białkami. Mureina pełni przede wszystkim funkcje mechaniczne, chroniąc komórkę przed skutkami zmian ciśnienia osmotycznego, wieloma czynnikami chemicznymi (rozpuszczalniki czy detergenty), nadaje także i utrzymuje charakterystyczny dla danego gatunku bakterii kształt i uczestniczy w procesach związanych z podziałem komórkowym. Szkielet cukrowy mureiny składa się z jednostek dwucukrowych zbudowanych z reszt *N*-acetyloglukozoaminy (GlcNAc) oraz kwasu *N*-acetylmuraminowego (MurNAc), połączonych wiązaniem  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 glikozydowym. Do reszty D-mleczanowej kwasu *N*-acetylmuraminowego dołączony jest krótki peptyd, w skład którego wchodzi zarówno typowe dla białek bakterii i organizmów wyższych izomery L, jak i rzadko występujące izomery D aminokwasów. Tetrapeptydy i tripeptydy sąsiadujących ze sobą łańcuchów połączone są poprzecznymi wiązaniami peptydowymi (Vollmer i wsp., 2008; Popowska i wsp., 2011).

W czasie tzw. procesów dojrzewania mureiny, towarzyszących wzrostowi komórki bakteryjnej, makrocząsteczka ta u niektórych gatunków bakterii, przede wszystkim chorobotwórczych, ulega pewnym modyfikacjom. Do tego rodzaju zmian w części glikanowej należy brak acetylacji grupy aminowej przy węglu C-2 w resztach glukozoaminy, enzymami odpowiedzialnymi za deacetylację są deacetylazy *N*-acetyloglukozoaminy (GlcNAc) (Boneca i wsp., 2007; Popowska i wsp., 2009). Ta modyfikacja chroni mureinę przed degradacją przez niektóre muramidazy, np. lizozymem powszechnie występującym w komórkach i płynach ustrojowych ssaków, który hydrolizuje wiązanie glikozydowe w łańcuchu cukrowym mureiny.

**II.** Analiza sekwencji genomu *L. monocytogenes* EGD pozwoliła poznać typ i liczbę białek powierzchniowych, które występują tu w znacznie większej liczbie niż u innych bakterii (Popowska i Markiewicz, 2004a). Ustalono, iż genom *L. monocytogenes* EGD koduje 2 853 białka, z czego aż 133 to białka powierzchniowe. Białka te biorą udział w wielu istotnych dla życia komórki bakteryjnych procesach tj. ochrona przed niekorzystnymi warunkami środowiska, udział we wzroście i podziałach komórki. Odgrywają również rolę w przesyłaniu sygnałów międzykomórkowych, oddziaływaniu z systemem immunologicznym gospodarza, a także w procesie inwazji, adhezji i kolonizacji różnych

powierzchni i interakcji z innymi komórkami, m.in. w procesie powstawania i formowania biofilmu. Ze względu na te różnorodne funkcje, charakteryzowanie białek powierzchniowych pozwala na lepsze zrozumienie czynników, które wpływają na kolonizację różnych nisz środowiskowych jak i komórek eukariotycznych przez ten patogen. Ekspresja tych białek zależna jest od różnych warunków środowiska tj. temperatury, odstępność składników odżywczych, etapów wzrostu bakterii czy obecności specyficznych czynników związanych z komórkami gospodarza (Bierne i Cossart, 2007).

W skład ściany komórkowej bakterii *L. monocytogenes* wchodzi szereg białek powierzchniowych, zawierających motywy lub domeny umożliwiające silne lub słabe interakcje, z co najmniej jedną częścią składową bakteryjnych osłon. Wyróżniono trzy główne mechanizmy oddziaływania białek z osłonami komórek bakterii gramdodatnich:

- Białka kowalencyjnie połączone z peptydoglikanem za pomocą C-terminalnej domeny- tzw. białka z motywem LPXTG
- Białka połączone z mureiną w sposób niekowalencyjny - białka motywem GW oraz domenami LysM i WxL
- Białka oddziałujące z błoną cytoplazmatyczną- lipoproteiny i białka hydrofobowe (Popowska i Markiewicz, 2004, 2004a; Bierne i Cossart, 2007).

Do białek powierzchniowych należą również hydrolazy mureiny, które rozszczepiają wiązania w mureinie. Ze względu na specyficzność działania można wyróżnić dwie grupy tych enzymów: glikozydazy hydrolizującą wiązanie  $\beta$ -1,4-glikozydowe w łańcuchu cukrowym i peptydazy hydrolizującą wiązanie w części peptydowej (Popowska, 2004, Bierne i Cossart, 2007).

Na podstawie dotychczasowych badań można przypisać różne funkcje określonym autolizynom. Jednak w wielu przypadkach, kiedy w komórce występuje wiele enzymów hydrolizujących peptydoglikan, interpretacja ich roli jest bardzo trudna (Markiewicz, 1993). Wiadomo, że enzymy te biorą udział w tak ważnych dla komórki procesach jak wzrost sakulusa i podział komórki (Popowska, 1998; Popowska, 2004). Postuluje się udział autolizyn w procesach dotyczących:

- aktywności hydrolitycznej dostarczającej nowe miejsca akceptorowe w mureinie dla włączenia prekursorów tej makrocząsteczki,
- wstawiania nowych podjednostek do warstwy mureiny w miejsca "dziur" przerwanych wiązań w sieci polimeru,
- hydrolizy wiązań w wybranych obszarach powierzchni ściany komórkowej co powoduje modyfikację pierwotnego jej kształtu ,
- podziału komórki,

- udziału w ostatnim etapie oddzielania się komórek po podziale,
- obrotu metabolicznego i recyklingu mureiny, tj. ponownego wykorzystywania produktów degradacji mureiny do syntezy tej makrocząsteczki
- transformacji komponentów komórkowych,
- tworzenia spor i kiełkowania,
- autolizy
- indukcji  $\beta$ -laktamaz
- formowania funkcjonalnej struktury rzęski.
- tworzenia biofilmów

### **Cel naukowy**

Wzrastająca oporność bakterii patogennych na terapię antybiotykową stwarza realne zagrożenie wzrostu liczby przypadków zachorowań wywoływanych przez bakterie patogene wykazujące oporność na tradycyjną antybiotykoterapię, co dotyczy także gatunku patogennego dla człowieka tj. – *L. monocytogenes* – mikroorganizmu wywołującego infekcje charakteryzujące się wysoką śmiertelnością. Zaobserwowana wzrastająca nieskuteczność antybiotykoterapii staje się palącym problemem nie tylko w Polsce, ale na całym świecie. W związku z powyższym jak najbardziej celowe wydaje się opracowania nowych strategii skutecznych w walce z bakteriami patogennymi.

Jedną z nich może być znalezienie nowych celów dla leków przeciwlisteriowych, nie będących antybiotykami. Punktem wyjścia do opracowania nowych strategii zarówno eliminacji komórek *L. monocytogenes* z produktów żywnościowych jak i leczenia zakażeń wywoływanych przez ten patogen może stać się charakterystyka białek biorących udział w istotnych fizjologicznych procesach dla komórki tej bakterii.

**Celem naukowym** badań prowadzonych w ramach prezentowanej rozprawy habilitacyjnej było zbadanie fizjologicznej funkcji wybranych białek *Listeria monocytogenes*: (i) enzymów biorących udział we wzroście komórki bakteryjnej oraz w syntezie i/lub modyfikacji mureiny - głównego składnika ściany komórkowej tej bakterii jak również odpowiedzialnych za syntezę głównego polimeru ściany komórkowej - kwasów teichojowych oraz; (ii) białek powierzchniowych *L. monocytogenes*, o aktywności hydrolazy mureiny oraz o kluczowym znaczeniu w fizjologii komórki bakteryjnej.

## Najważniejsze wyniki badań

### **I. Deacetylaza mureiny *Listeria monocytogenes*: deacetylaza *N*-acetyloglukozoaminy PgdA oraz NagA (prace 1-3: Popowska i wsp., 2009; Popowska i Markiewicz, 2011; Popowska i wsp., 2012)**

Przeprowadzone przeze mnie analizy *in silico* stwierdziły występowanie w genomie *L. monocytogenes* trzech sekwencji kodujących potencjalne deacetylazy GlcNAc. Dwa białka kodowane przez geny *lmo0956* i *lmo2108* nie mają tzw. sekwencji sygnałnej, czyli przypuszczalnie pozostają w cytoplazmie, gdzie mogą uczestniczyć w recyklingu mureiny, trzecie, kodowane przez gen *lmo0415*, posiada taką sekwencję – jest więc prawdopodobnie translokowane na zewnątrz błony cytoplazmatycznej, gdzie katalizuje usuwanie reszt acetylowych z GlcNAc w łańcuchach cukrowych mureiny. Modyfikacja ta polega na deacetylacji podstawowego składnika mureiny – *N*-acetyloglukozaminy (GlyNAc), czego skutkiem jest brak wrażliwości na lizozym (muramidazę powszechnie obecną w płynach ustrojowych i komórkach eukariotycznych) stanowiący pierwszą linię obrony organizmu przed infekcją. Im wyższy jest procent deacetylacji mureiny tym bardziej bakteria jest oporna na działanie lizozymu. Moje wcześniejsze badania wykazały, że procent deacetylacji mureiny *L. monocytogenes* sięga aż 70%, powodując analogicznie jak u *Streptococcus pneumoniae* oporność na działanie lizozymu. W przypadku *Streptococcus pneumoniae* (bakterii chorobotwórczej, której aktywność zdecydowanie odbiega od wewnątrzkomórkowego trybu działania *L. monocytogenes*), scharakteryzowano enzym PgdA, który usuwa grupę acetylową z reszt *N*-acetyloglukozoaminy. Mutacja w genie *pgdA* kodującym deacetylazę GlcNAc, powoduje wzrost podatności *S. pneumoniae* na lizozym, a w rezultacie obniżenie poziomu jej wirulencji *in vivo* (Vollmer i Tomasz, 2002).

Ponieważ proces deacetylacji aminocukrów czyni mureinę złym substratem dla naturalnych lizozymów, wydaje się, że enzym katalizujący tę reakcję może być celem przy prewencyjnych działaniach zwalczania *L. monocytogenes* w żywności jak również w chemioterapii zakażeń listeriowych, zapobiegając utrzymywaniu się bakterii w makrofagach i jej dalszemu rozprzestrzenianiu się.

Przeprowadzone badania dotyczące deacetylazy GlcNAc Lmo415 (PgdA) *L. monocytogenes* (Popowska i wsp., 2009) obejmowały:

1. konstrukcję mutantu *L. monocytogenes* w genie *lmo0415*
2. szczegółową charakterystykę fizjologiczną otrzymanego mutantu w odniesieniu do szczepu dzikiego, obejmującą m.in. (a) morfologię i tempo wzrostu komórek; (b) ocenę wpływu inaktywacji genu na podatność mureiny wobec lizozymu i innych muramidaz oraz autolizę indukowaną



substancjami powierzchniowo-czynnymi; (c) wrażliwość na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe; (d) strukturę muropeptydową ściany komórkowej;

3. oczyszczenie białka oraz określenie i wykazanie ich aktywności substratowej *in vitro*, etap ten obejmował: (a) stworzenie odpowiedniego konstruktów genetycznych z wykorzystaniem wektora pBAD/Myc-HisB, (b) nadekspresję białka Lmo0415/6His indukowano poprzez inkubację szczepu *E. coli* TOP 10 niosącego plazmid pBAD/Myc-HisB /lmo0415 z odpowiednim stężeniem arabinozy jako induktorem, (c) oczyszczenie białko PgdA/6His na złożu Ni-NTA oraz jego identyfikację białka poprzez metodę hybrydyzacji typu Western Blott z wykorzystaniem przeciwciał do fragmentu 6 histydyn, (d) oznaczanie aktywności enzymatycznej białka PgdA/6His wobec substratów: *N*-acetyloglukozaminy, kwasu *N*-acetylmuraminowego oraz peptydoglikanu z wykorzystaniem metody HPLC-MS/MS.

Analizy *in silico* wykazały, że Gen *lmo0415* w genomie *L. monocytogenes* EGD znajduje się w pozycji 77461 do 78930. Kodon startu translacji wg NCBI (GTG) znajduje się w pozycji 22 – 24 od początku genu, natomiast potencjalną sekwencję Shine–Dalgarno tzw. RBS (ang. Ribosomal Binding Sequences) zidentyfikowano w pozycji 8 – 13. Sekwencja ta ma postać: 5' – GTG AGG – 3'. Odnaleziono również potencjalne regiony promotorowe powyżej genu, w pozycji –10 (5' – ATG TAT AAT – 3') oraz w pozycji –35 (5' – TAG AAA – 3'). Zostały one odnalezione przy pomocy programu komputerowego BPROM (ang. Prediction of Bacterial Promoters). Region terminatora znajduje się w pozycji 1429 – 1480 od początku genu i ma postać: 5' – GTA GCT AAG ATG AGT TAA TCA TTT TAG CTA CTT TTT TCA TAC – 3'. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała, iż gen *lmo0415* koduje białko o masie 52,495 kDa i punkcie izoelektrycznym pI wynoszącym 10,07. Białko to zbudowane jest z 466 aminokwasów. Analiza komputerowa wykazała również, że białko to jest białkiem występującym w ścianie komórkowej, z uwagi na występowanie 22 aminokwasowej sekwencji sygnałnej zidentyfikowanej programem DAS i TMHMM. Region ten (sekwencja sygnałna) występuje w N-terminalnej części białka, między 5 a 26 aminokwasem: N – WIRLSLVAILIIVVFIGVIGF – C. Dalsza analiza (przeprowadzona za pomocą programu NCBI Conserved Domain Search) wykazała również obecność w białku Lmo0415 charakterystycznej i konserwowanej domeny pfam01522.13 (domeny deacetylazy polisacharydowej) typowej dla enzymów o aktywności deacetylaz *N*-acetyloglukozaminy. Stworzony model konserwowanej domeny PgdA (263-461 z 466 reszt) na podstawie szablonu 2c1gA (1,75 Å) przy użyciu serwera <http://swissmodel.expasy.org>, pokazał jego znaczące podobieństwo do innych białek tego typu, należących do CE4 rodziny (Popowska i wsp. 2009).

Stworzony mutant *L. monocytogenes* MP w genie *lmo0415* z wykorzystaniem wektora pAULA (Chakroborty i Schäferkordt, 1995) nie wykazywał zmian w morfologii jak i w tempie wzrostu

komórki. Efektem pierwotnym braku funkcjonalnego białka są różnice w składzie muropeptydowym mureiny pomiędzy szczepem dzikim a mutantem. Brak funkcjonalnego białka PgdA powodowało znacząco większą podatność komórek mutantu na autolizę indukowaną substancjami powierzchniowo-czynnymi Triton X-100 i EDTA jak i na działanie muramidaz peptydoglikanu (kationowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, ang. CAMP) lizozymu i mutanolizyny. Niezwykle istotne jest też wykazanie większej wrażliwości szczepu mutantu na niektóre antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, które są lekiem stosowanym z wyboru w terapii zakażeń wywołanych przez *L. monocytogenes*. Odnotowane wartości minimalnego stężenia hamującego MIC (ang. minimal inhibitory concentration) dla penicyliny, ampicyliny oraz oxacyliny były dwukrotnie niższe w przypadku szczepu mutantu w porównaniu ze szczepem dzikim *L. monocytogenes* (Popowska i wsp. 2009).

W wyniku przeprowadzonych badań z wykorzystaniem oczyszczonego białka PgdA/6His wykazałam aktywność enzymatyczną deacetylazy *N*-acetyloglukozaminy tego białka wobec naturalnego substratu jakim jest peptydoglikan izolowany zarówno z komórek *L. monocytogenes* jak i z *Escherichia coli* oraz w stosunku do jednego ze składników łańcucha cukrowego peptydoglikanu - *N*-acetyloglukozaminy. Badany enzym nie wykazywał aktywności wobec kwasu *N*-acetylmuraminowego, co jest zgodne z właściwościami głównej domeny w sekwencji aminokwasowej PgdA (Popowska i wsp., 2009). Powyższe wyniki badań zdecydowanie wskazują białko PgdA jako potencjalny cel dla nowych terapii antylisteriowych.

Przeprowadzone badania dotyczące deacetylazy *N*-acetylo-*D*-glucosamino-6-fosforanu - *Lmo0956* (*NagA*) *L. monocytogenes* (Popowska i wsp., 2012) obejmowały:

1. analizę *in silico* genomu *L. monocytogenes* i opracowanie szlaku recyklingu i metabolizmu aminocukrów w komórkach tej bakterii;
2. konstrukcję mutantu *L. monocytogenes* w genie *lmo0956*;
3. szczegółową charakterystykę fizjologiczną otrzymanego mutantu w odniesieniu do szczepu dzikiego, obejmującą m.in. (a) morfologię i tempo wzrostu komórek; (b) ocenę wpływu inaktywacji genu na podatność mureiny wobec mutanolizyny; (c) wrażliwość na wybrane antybiotyki; (d) strukturę muropeptydową ściany komórkowej;

Ściana komórkowa *Listeria monocytogenes* zawiera dwa różne polianionowe polimery: kwasy tejchojowy (TAs), które są związane kowalencyjnie z peptydoglikanem, i kwasy lipotejchojowe (LTAs), które są osadzone w błonie cytoplazmatycznej przez diacylglicerolipid. Polimery te odgrywają ważną funkcję w homeostazie kationów metali, kotwiczeniu białek powierzchniowych, autolizie, tworzeniu biofilmów oraz transporcie jonów, substancji odżywczych i białek, odporność na antybiotyki, takie jak kationowe peptyd, są również głównymi determinantami immunogenności powierzchniowej, stanowiąc podstawę rozróżniania serotypów *L. monocytogenes* (Weidenmaier

i Peschel 2008). Warto zauważyć, że estryfikacja D-Ala TAs i LTAs jest ważne dla zjadliwości *L. monocytogenes*.

Pierwszym krokiem w szlaku biosyntezy prekursorów aminocukrów wymaganych następnie do biosyntezy peptydoglikanu ściany komórkowej i kwasów tejchojowych (TA) w komórkach *L. monocytogenes* jest deacetylacja N-acetyloglukozaminy-6 fosforanu (GlcNAc-6-P) do glukozaminy-6 fosforanu (GlcN-6-P) i octanu (Park i Uehara 2008). Enzymem odpowiedzialnym za tę reakcję jest białko NagA (Barnhart et al. 2006). Deacetylacja N-acetyloglukozaminy jest ważna w syntezie lipopolisacharydów i w procesie recyklingu mureiny bakteryjnej ściany komórkowej. GlcN-6-P uczestniczy w szlaku otrzymywania UDP-GlcNAc, która następnie jest włączana do szlaku biosyntezy peptydoglikanu. Alternatywnie GlcN-6-P może być przekształcona do fruktozo-6-P (NagB), który w wyniku kolejnych reakcji jest przekształcany w UDP-Glc, który ostatecznie jest włączany do biosyntezy kwasów tejchojowych. NagA (EC 3.5.1.25) z konserwowaną domeną cd00854 strukturalnie reprezentuje super-rodzinę metalo-zależnych hydrolaz mających w centrum katalitycznym Fe (Jaeger i Mayer 2007). Szlak recyklingu i metabolizmu aminocukrów *L. monocytogenes* z udziałem enzymu typu NagA jest bardzo podobny do tego, proponowany przez Vincent i in. (2004) w komórkach *B. subtilis* (Vincent i in. 2004). W wyniku przeprowadzonej przeze mnie analizy genomu *L. monocytogenes* (BLAST- podobieństwo w architekturze domen konserwowanych) znaleziono geny kodujące analogiczne białka katalizujące kolejne etapy tego szlaku. Na tej podstawie zaproponowano szlak recyklingu i metabolizmu aminocukrów (GlcNAc i anhMurNAc) w komórkach *L. monocytogenes* i udział deacetylazy N-acetyloglukozamina-6-P w tych procesach (Popowska i wsp., 2012).

Przeprowadzona przeze mnie analiza genomu *L. monocytogenes* ujawniła m.in. obecność dwóch genów kodujących białka z domeną NagA, *lmo0956* i *lmo2108*, o prawdopodobnej lokalizacji cytoplazmatycznej. Do dalszych badań wytypowano białko Lmo0956 z uwagi na większy procent podobieństwa do innych znanych enzymów tego typu. Gen *lmo0956* wraz z genami *lmo0957* i *lmo0958* wchodzi w skład operonu 150 (Toledo-Arana i wsp., 2009). Geny *lmo0956* i *lmo0957* są regulowane przez regulator transkrypcji, kodowany przez gen *lmo0958*, podobny do regulatorów z rodziny GntR. Gen *lmo0956* koduje białko o mase 41,414 kDa i punkcie izoelektrycznym pI = 5.43. Analizy *in silico* ujawniły obecność charakterystycznej i silnie konserwowanej domeny NagA (Cd00854) zgodnej w 100% z E-value - 5.26e - 125, która jest charakterystyczna dla deacetylazy N-acetylo-D-glucosamino-6-fosforanu. Gen *lmo0957* koduje białko o aktywności izomerazy glucosamino-6-fosforanu - NagB (EC 5.3.1.10).

Otrzymany mutant w genie *lmo0956* z wykorzystaniem wektora pAULA, charakteryzuje się poważnymi zaburzeniami w morfologii i wzroście komórki *L. monocytogenes*, z uwagi na bardzo

cienką i niestabilną strukturę ściany komórkowej jest zdolny do wzrostu tylko w obecności odpowiedniego stężenia osmotycznego. Ponadto mutant cechuje się zmniejszoną zawartością mureiny w ścianie komórkowej, zwiększoną wrażliwość na hydrolazę ściany komórkowej – mutanolizynę oraz na antybiotyki peptydowe – kolastynę i cefalosporynę trzeciej generacji - ceftriakson. Przeprowadzone badania wskazują, że enzym NagA u *Listera monocytogenes* jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania komórki: jest wymagany do biosyntezy peptydoglikanu ściany komórkowej i kwasów teichojowych, a jednocześnie niezbędny dla wzrostu i podziałów komórki bakteryjnej, jak i pośrednio wpływa na wrażliwość komórki na hydrolazy ściany komórkowej i antybiotyki peptydowe (Popowska i wsp., 2012). Ponieważ komórki mutantu nie są w stanie żyć w normalnych warunkach panujących w środowisku lub w komórkach gospodarza, wydaje się że NagA jest idealnym celem dla nowych terapii antylisteriowych.

## **II. Białka powierzchniowe *L. monocytogenes*, o aktywności hydrolazy mureiny (prace 4-7: Popowska, 2004; Popowska i Markiewicz, 2004a, 2004; Popowska i Markiewicz, 2006)**

Pracę eksperymentalną dotyczącą charakterystyki białek o aktywności hydrolaz mureiny poprzedziła dokładna analiza białek powierzchniowych *L. monocytogenes*, w skład których wchodzi również hydrolazy mureiny (Popowska, 2004; Popowska i Markiewicz, 2004a).

Przeprowadzone badania dotyczące aktywności hydrolazy mureiny flageliny FlaA *L. monocytogenes* (Popowska i Markiewicz, 2004) obejmowały:

1. ekstrakcję białek powierzchniowych *L. monocytogenes* z wykorzystaniem 4M LiCl
2. hydrolizę wyznakowanej z wykorzystaniem [3H]-A2pm ściany komórkowej *L. monocytogenes* i/lub *E. coli*;
3. Analizę zymograficzną (elektroforeza w żelu denaturującym), elektroforezę dwukierunkową i sekwencjonowanie;
4. Oczyszczanie białka FlaA metodą FPLC i wykazanie aktywności hydrolazy mureiny.

W środowisku, poza komórkami eukariotycznymi, *L. monocytogenes* może poruszać się za pomocą rzęsek. Wić rzęski zbudowana jest z jednego białka, flageliny FlaA (Dons, 1992). wcześniejsze badania wykazały, że ekspresja genów *L. monocytogenes* kodujących białka budujące rzęskę jest zależna od temperatury. Szczepy *L. monocytogenes* wykazują zdolność do ruchu w temperaturze poniżej 30 °C, i na ogół tracą tę zdolność w 37 °C, czyli w temperaturze komórek gospodarza. Przeprowadzone badania wskazują jednak, że ekspresja flageliny utrzymuje się 37 °C, w niektórych szczepach laboratoryjnych i w około 20% izolatów klinicznych (Popowska i Markiewicz, 2004; Way, 2004). Wiadomo również, że FlaA wraz z produktami genów *cheY* i *cheA*, inicjuje kontakt

z komórkami nabłonkowymi, przyczyniając się do skutecznej i inwazji (Dons i wsp., 2004; Eriksson i wsp., 2004). Dyskutowany jest również udział flageliny *L. monocytogenes* w tworzenia biofilmu oraz w kolonizacji powierzchni abiotycznych i biotycznych (Renier i wsp., 2011).

Kilka globalnych czynników regulacji bierze udział w kontroli ekspresji genów ruchliwości w *L. monocytogenes*, w tym PrfA aktywator transkrypcji regulujący ekspresji czynników wirulencji związanych z patogenezą. Zidentyfikowano również represor genu *flaA*, MogR, którego ekspresja jest wymagana do pełnej zjadliwości *L. monocytogenes* (Grundling i wsp., 2004).

Białko FlaA *L. monocytogenes* (30.4 kDa) zostało zidentyfikowane w wyniku sekwencjonowania białka po transformacji z żelu, po rozdziale dwukierunkowym, na membranę PVDF. Analiza bioinformatyczna (BLAST-podobieństwo w architekturze domen konserwowanych) wykazała, że sekwencja aminokwasowa białka lokującego się na żelu na wysokości wzorca mas ok. 30 kDa jest w 100% identyczna z sekwencją aminokwasowa flageliny FlaA *L. monocytogenes* Acc. No NP464217. Następnie białko zostało oczyszczone metodą FPLC na złożu - Mono-S Sepharose. W wyniku przeprowadzonych badań z wykorzystaniem analizy zymograficznej (żele renaturujące) wobec mureiny izolowanej z komórek *L. monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* jak również w reakcji ze znakowaną trytem mureiną wyizolowaną z komórek *Escherichia coli* wykazano, że białko FlaA wykazuje aktywność hydrolazy mureiny (Popowska i Markiewicz, 2004).

Wcześniejsze badania wskazują na zaangażowanie enzymów hydrolizujących mureinę (autolizyn) w powstawanie funkcjonalnej struktury rzęski w szczepach *Bacillus subtilis* (Rashid i wsp., 1993; Lazarevic i wsp., 1994). Viollier i Shapiro w 2003 udowodnili udział litycznej transglikozylazy w tworzeniu rzęski u *Caulobacter crescentus*. Bardzo ciekawe spostrzeżenie zostało poczynione dla flageliny FlgJ budującej rzęskę u *Salmonella* spp., wykazano aktywność hydrolizy peptydoglikanu dla tego białka oraz dodatkowo, oprócz strukturalnej, funkcję w hydrolizie mureiny w miejscu tworzenia się rzęski (Nambu i wsp., 1999; Hirano i wsp., 2001). Flagelina FlaA *L. monocytogenes* jest więc drugim opisanym jak dotąd białkiem tego typu wykazującym aktywność hydrolazy i to pierwszym wśród bakterii gramdodatnich (Popowska i Markiewicz, 2004).

Przeprowadzone badania dotyczące charakterystyki białka powierzchniowego Lmo0327 *L. monocytogenes* (Popowska i Markiewicz, 2006) obejmowały:

1. analizę *in silico* genomu *L. monocytogenes*;
2. Konstrukcja banku genów *L. monocytogenes* EGD oraz analiza funkcjonalna otrzymanych klonów *E.coli* oraz plazmidów zawierających geny kodujące białka o aktywności hydrolaz mureiny
3. sekwencjonowanie wybranych genów oraz analizy bioinformatyczne

4. konstrukcję mutantów *L. monocytogenes* w genach *lmo0326* (mutant MP2), *lmo0327* (mutant MP1) oraz analizę transkrypcyjną z wykorzystaniem metody RT-PCR

5. szczegółową charakterystykę fizjologiczną otrzymanych mutantów w odniesieniu do szczepu dzikiego, obejmującą m.in. (a) morfologię i tempo wzrostu komórek; (b) wzór białkowy po rozdziale frakcji białek powierzchniowych w żelu poliakrylamidowym i renaturującym; (c) ocenę wpływu inaktywacji ww. genów na autolizę komórek indukowaną substancjami powierzchniowo-czynnymi oraz autolizę mureiny; (d) wrażliwość na wybrane antybiotyki  $\beta$ -laktamowe i peptydowe; (e) strukturę muropetydową ściany komórkowej;

6. Badanie aktywności białka Lmo0327;

Do tej pory, u *Listeria monocytogenes*, scharakteryzowano sześć białek o właściwościach hydrolazy mureiny: CwhA, P45, Ami, MurA, Auto, FlaA. Wiadomo jednak, że bakterie gramdodatnie posiadają co najmniej kilka jeśli nie kilkanaście białek o takich właściwościach, pełniących istotne dla komórki fizjologiczne funkcje (Popowska, 2004).

Analiza *in silico* genomu *L. monocytogenes* wykazała obecność 11 białek z domenami charakterystycznymi dla hydrolaz mureiny, co pokazuje, że nie wszystkie białka o aktywności hydrolaz mureiny zostały zidentyfikowane. Dotychczasowe moje badania wskazują, że *L. monocytogenes* bardzo trudno ulega autolizie przy zastosowaniu powszechnie znanych czynników takich jak EDTA, SDS, Triton X-100 w przeciwieństwie do innych bakterii gramdodatnich (Popowska 1999). Również w obecności antybiotyków  $\beta$ -laktamowych *L. monocytogenes* zachowuje się bardzo nietypowo, śmierci komórek nie towarzyszy widoczna autoliza. Powyższe dane wskazują na prawdopodobnie odmienny i na pewno bardzo złożony mechanizm regulacji aktywności autolizyn u tej bakterii.

W prezentowanej pracy (Popowska i Markiewicz, 2006) sklonowano gen kodujący białko powierzchniowe Lmo0327 wraz z potencjalnym regulatorem transkrypcji Lmo0326. Gen *lmo0327* liczy 4101 pz, przed kodonem startu translacji (ATG) znajduje się potencjalna sekwencja Shine-Dalgarno (AGGAAG). Powyżej *lmo0327* nie zlokalizowano sekwencji potencjalnego promotora. Gen ten koduje białko składające się z 1348 aa, o masie 146,7 kDa (pI 6,2).

Wykorzystując programy SOSUI, TMHMM i DAS, wykazano obecność w Lmo0327 dwóch regionów transmembranowych. Pierwszy region (sekwencja sygnałna) występuje w N-terminalnej części białka, między 5 a 24 aminokwasem (20 aa): N-IFIALIALVVIINTVSFTSV-C. Przewidywana masa dojrzałego białka wynosi ok. 144 kDa. Drugi region występuje w C-terminalnej części białka, w (22 aa): N-LLNLLRLIGLVLILGVFLAVGS-C. Obecność takiej sekwencji sugeruje możliwość lokalizacji Lmo0327 w ścianie komórkowej.

Białko Lmo0327 w swojej sekwencji aminokwasowej zawiera N-terminalną domenę LRR (ang. leucine reach repeat) klasyfikując to białko do grupy internalin oraz C-terminalny motyw LPXTG, kotwiczący białko w ścianie komórkowej (Bierne i Cossart, 2007). Przeprowadzono analizę komputerową sekwencji aminokwasowej domeny LRR Lmo0327 oraz pozostałej części tego białka, co pozwoliło określić ich prawdopodobne struktury trzeciorzędowe. Domena N-terminalna – LRR (151 aa) tworzy prawoskrętną beta-helisę z obrotem po każdym powtórzeniu sekwencji aminokwasów. Model ten strukturalnie odpowiada analogicznej domenie zidentyfikowanej w białkach należących do bardzo licznej rodziny internalin i jest identyczny z modelem krystalograficznym innych znanych internalin *L. monocytogenes* InIA, InIB i InIH. Na podstawie analizy sekwencji *L. monocytogenes*, zidentyfikowano w tej bakterii aż 20 białek tego typu (Cabanes, 2002). Domena LRR bierze udział w interakcjach białko-białko i w wielu innych procesach takich jak adhezja, interakcje ligand-receptor i reakcjach sygnałnych (Kajava, 1998).

Gen lmo0326 liczy 927 nukleotydów, przed kodonem startu znajduje się potencjalna sekwencja Shine-Dalgarno AGGAGG oraz hipotetyczne sekwencje promotorowe (-10): TAAAAT oraz TATATA. Gen lmo0326 koduje białko składające się ze 290 aminokwasów, o masie 34,1 kDa (pI 6,09). W białku tym zidentyfikowano domenę HTH (ang. Helix-turn-helix), charakterystyczną dla rodziny regulatorów transkrypcji XRE. Porównanie sekwencji aminokwasowej Lmo0326 (BLAST) wykazało znaczące podobieństwo do pozytywnych regulatorów transkrypcji typu Rgg, regulujących aktywność czynników wirulencji jak i białek biorących udział w procesie kiełkowania i sporulacji, regulatory tego typu biorą również udział w procesie wydzielania białek na zewnątrz komórki (Foster 1992).

Charakterystyka mutantów *L. monocytogenes* w genach *lmo0326* (mutant MP2), *lmo0327* (mutant MP1) otrzymanych z wykorzystaniem wektora pAULA wykazała, że białko Lmo0327 jest kowalencyjnie związane z mureiną ściany komórkowej *L. monocytogenes* a Lmo0326, regulator transkrypcji, pozytywnie reguluje ekspresję genu *lmo0327*. Obserwacje w mikroskopie z kontrastem fazowym oraz elektronowym skaningowym, wykazały zmianę kształtu komórek szczepów zmutowanych w porównaniu ze szczepem dzikim. Mutanty rosną w postaci długich łańcuchów nierozdzielonych komórek po podziale. Szczep dziki rośnie w postaci pojedynczych komórek, kształtem przypominających pałeczki, co świadczy o zaburzeniach w procesie wzrostu i/lub podziałów komórkowych a zwłaszcza etapu oddzielania się komórek potomnych po podziale. Wykazano również znacznie wolniejsze tempo wzrostu w temp. skrajnych 25°C i 42°C oraz dużo wolniejsze tempo autolizy mutantów MP1 i MP2. Zaobserwowano wolniejsze tempo obrotu metabolicznego mureiny badanych mutantów w porównaniu ze szczepem dzikim. Wykazano także różnice ilościowe jak i jakościowe we wzorze zymograficznym różnych frakcji białkowych izolowanych z mutantów

w porównaniu z analogicznymi frakcjami szczepu dzikiego. Zbadano, że mutacje w każdym z genów *lmo0326* i *lmo0327* powodują brak aktywności enzymatycznej białka Lmo0327. Stwierdzono, metodą spektrofotometryczną, aktywność hydrolityczną wobec oczyszczonej mureiny pozbawionej białek powierzchniowych oczyszczonej frakcji białkowej zawierającej białko Lmo0327. Przeprowadzony eksperyment pozwalający na określenie roli Lmo0327 w procesie adhezji i wejścia komórek *L. monocytogenes* do komórek eukariotycznych linii Int407 nie wykazał różnicy między komórkami typu dzikiego i mutantów.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że białko Lmo327 jest kowalencyjnie związane z mureiną, posiada aktywności hydrolazy mureiny, jest pozytywnie regulowane przez regulator transkrypcji typu Rgg, oraz odgrywa rolę w dwóch kluczowych procesach fizjologicznych: oddzielaniu się komórek potomnych po podziale oraz w obrocie metabolicznym mureiny (ang. turnover). Zaproponowano przynależność tego białka do nowej klasy białek powierzchniowych o właściwościach adhezyny i hydrolazy mureiny (Popowska i Markiewicz, 2006).

### **Podsumowanie wyników i ich znaczenie aplikacyjne**

#### **Znaczenie prowadzonych badań**

Wzrastająca oporność bakterii patogennych na terapię antybiotykową stwarza realne zagrożenie wzrostu liczby przypadków zachorowań wywoływanych przez bakterie patogene wykazujące oporność na tradycyjną antybiotykoterapię, co dotyczy także gatunku patogennego dla człowieka tj. – *L. monocytogenes* – mikroorganizmu wywołującego infekcje charakteryzujące się wysoką śmiertelnością. Zaobserwowana wzrastająca nieskuteczność antybiotykoterapii staje się palącym problemem nie tylko w Polsce, ale na całym świecie. W związku z powyższym jak najbardziej celowe wydaje się opracowania nowych strategii skutecznych w walce z bakteriami patogennymi.

Jedną z nich może być znalezienie nowych celów dla leków przeciwlisteriowych, nie będących antybiotykami. Punktem wyjścia do opracowania nowych strategii leczenia zakażeń wywoływanych przez *L. monocytogenes* może stać się charakterystyka białek o istotnym znaczeniu w fizjologii tej bakterii. W przypadku badanych białek, zaprezentowanych powyżej wykazano ich kluczową rolę w takich procesach fizjologicznych jak: (i) wzrost i podziałów komórki bakteryjnej, (ii) wrażliwość komórek *L. monocytogenes* na autolizę indukowaną substancjami powierzchniowo-czynnymi Triton X-100 i EDTA; (iii) nie wrażliwość na działanie lizozymu poprzez deacetylację głównego składnika mureiny ściany komórkowej - *N*-acetylglukozaminy); (iv) wrażliwość komórki na hydrolazy ściany komórkowej i antybiotyki peptydowe oraz niektóre antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, które są lekiem stosowanym z wyboru w terapii zakażeń wywołanych przez *L. monocytogenes*; (v) biosynteza



peptydoglikanu ściany komórkowej i kwasów teichojowych; (vi) formowanie funkcjonalnej struktury rzęski; (vii) oddzielanie się komórek potomnych po podziale; (viii) obrót metaboliczny mureiny (ang. turnover).

Poznanie fizjologicznej funkcji tych białek zarówno *in vitro* jak i *in vivo* jest niezmiernie ciekawym zagadnieniem ze względu na specyfikę samego mikroorganizmu, który jest wewnątrzkomórkowym, gramodatnim patogenem człowieka, jak również w związku z drogą zakażenia związaną ze spożyciem zanieczyszczonej tym mikroorganizmem żywności. Wykazanie udziału badanych białek w tak istotnych dla komórki procesach fizjologicznych wskazuje te białka jako nowe cele dla nowych leków przeciwlisteriowych, które mogą znaleźć zastosowanie głównie w działaniach prewencyjnych, czyli eliminacji tego patogenu z produktów spożywczych jak również leczeniu listeriozy. Zaprezentowane badania kryją w sobie zatem nie tylko aspekt poznawczy, ale również aplikacyjny.

## Literatura

1. Barnhart, M.M., Lynem, J., Chapman, M.R., 2006. GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 188, 5212-5219.
2. Bierne, H., P. Cossart. 2007. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2:377-397.
3. Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J.P., Giovannini, M., Coyle, A., Bertin, J., Namane, A., Rousselle, J.C., Cayet, N., Prévost, M.C., Balloy, V., Chignard, M., Philpott, D.J., Cossart, P., Girardin, S.E., 2007. A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 104, 997-1002.
4. Borucki M.K., Peppin J.D., White D. F. Loge, and D.R. Call. 2003. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environment. Microbiol. 7336–7342.
5. Cabanes D., P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul, P. Cossart. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. Trends in Microbiol., 5:238-245.
6. Chen B.-Y., R. Pyla, T.-J. Kim, J.L. Silva, Y.-S. Jung. 2010. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish filets and processing environment. Lett. Appl. Microbiol. 50, 626–632.
7. Chodorowska, M., D. Kuklińska. 2002. Czynniki wirulencji *Listeria monocytogenes* oraz patogeneza, obraz kliniczny i antybiotykoterapia listeriozy. Post. Mikrobiol. 41(1):37-49.
8. Dons L., E. Eriksson, Y. Jin, M.E. Rottenberg, K. Kristensson, C.N. Larsen, J. Bresciani and J.E. Olsen. 2004. Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. Infect. Immun. 72: 3237-3244.
9. Eriksson E.L., A.G. Rothfuchs, P. Heldin, H. Wigzell and M.E. Rottenberg. 2003. CD44-regulated intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 71: 4101-11
10. Foster S.J. 1992. Autolysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bacteriol. 174:464 – 470.
11. Gandhi M., M.L. Chikindas. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol, 113:1-15.

12. Grundling A., L.S. Burrack, H.G. Bouwer and D.E. Higgins. 2004. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 12318-12323.
13. Hamon, M., H. Biernie, P. Cossart. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Microbiol.*, 4:423-434.
14. Hirano T., T. Minamino and R.M. Macnab. 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol.* 312(2):359-369.
15. Hof H (2004) An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opin Pharmacother* 5:1727-1735
16. Jaeger, T., Mayer, C., 2007. N-acetylmuramic acid 6-phosphate lyases (MurNAc etherases): role in cell wall metabolism, distribution, structure, and mechanism. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65, 928-939.
17. Jones E.M., MacGowan A.P. 1995. Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14, 165-175
18. Kajava A.V. 1998. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 277:144-158
19. Lazarevic V., P.B. Margot, B. Soldo and D. Karamata. 1992. Sequencing and analysis of the *Bacillus subtilis* *lytRABC* divergon: a regulatory unit encompassing the structural genes of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier. *J Gen Microbiol.* 138:1949-1961.
20. Lorber B. 1997. Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.*, 24, 1-11
21. Markiewicz Z., **Popowska M.** 2011. An Update on Some Structural Aspects of the Mighty Miniwall *Pol. J. Microbiol.* 60(3):181-186.
22. Markiewicz Z.: „Struktura i funkcje osłon bakteryjnych.” Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1993.
23. Mauro C., P. Domenico, V.A. D'Orio Vincenzo, V. Alberto, I. Adriana. 2007. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and food-processing environment. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*, XXVII, 157-164.
24. Nambu T., T. Minamino, R.M. Macnab and K. Kutsukake. 1999. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 181: 1555-1561.
25. Park, J.T., Uehara, T., 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 211-227.
26. **Popowska M.** 2004. Analysis of the Peptidoglycan Hydrolases of *Listeria monocytogenes*: Multiple Enzymes with Multiple Functions. *Pol. J. Microbiol.* 53: 29-34.
27. **Popowska M.** and Z. Markiewicz. 2004. Murein-Hydrolyzing Activity of Flagellin FlaA of *Listeria monocytogenes*. *Pol. J. Microbiol.* 53: 237-241.
28. **Popowska M.** and Z. Markiewicz. 2004a. Classes and Functions of *Listeria monocytogenes* Surface Proteins. *Pol. J. Microbiol.* 52: 75-88.
29. **Popowska M.** and Z. Markiewicz. 2006. Characterization of protein Lmo0327 of *Listeria monocytogenes* with murein hydrolase activity. *Arch. Microbiol.* 186: 69-86.
30. **Popowska M.**, Kusio M., Szymańska P., Z. Markiewicz. 2009. Inactivation of the wall-associated de-N-acetylase (PgdA) of *Listeria monocytogenes* results in greater susceptibility of the cells to induced autolysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9:932-945.
31. **Popowska M.**, M. Kłoszewska, S. Górecka, Z. Markiewicz. 1999. Autolysis of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Pol.* 48: 141-52; obecnie *Pol. J. Microbiol*
32. **Popowska M.**, Osińska M., Rzczkowska M. 2012. N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (NagA) of *Listeria monocytogenes* EGD, an essential enzyme for the metabolism and recycling of amino sugars. *Arch. Microbiol.*; 194(4):255-68.

33. **Popowska M.A.**: 1998. Bakteryjne enzymy hydrolizujące wiązania w mureinie. *Post. Mikrobiol.* XXXVII, 2.
34. Rashid M.H., A. Kuroda and J. Sekiguchi. 1993. *Bacillus subtilis* mutant deficient in the major autolytic amidase and glucosaminidase is impaired in motility. *FEMS Microbiol Lett.* 112(2):135-140.
35. Renier S, M. Hébraud, M. Desvaux. 2011. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Appl Environ Microbiol*, 13:835–850.
36. Renier, S. Hébraud, M. Desvaux, M., 2011. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 13, 835-850.
37. Schäferkordt S. and T. Chakraborty. 1995. Vector plasmid for insertional mutagenesis and directional cloning in *Listeria* spp. *Biotechniques*, 19:720-725
38. Schlech W.F. 2000. Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.*, 31, 770-5
39. Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergassola, M., Nahori, M.A., Soubigou, G., Régnault, B., Coppée, J.Y., Lecuit, M., Johansson, J., Cossart, P., 2009. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 459:950-956.
40. Vincent, F., Yates, D., Garman, E., Davies, G.J., Brannigan, J.A., 2004. The three-dimensional structure of the N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, NagA, from *Bacillus subtilis*: a member of the urease superfamily. *J. Biol. Chem.* 279, 2809-2816.
41. Viollier P.H. and L. Shapiro. 2003. A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. *Mol Microbiol.* 49(2):331-345.
42. Vollmer, W., Blant, D., de Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.*, Published article online, 08-Jan-2008.
43. Vollmer, W., Tomasz, A., 2002. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 70, 7176-7178.
44. Walsh D., G. Duffy, J.J. Sheridan, I.S. Blair and D.A. McDowell. 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods *J. Appl. Microbiol.*, 90:517-522
45. Way S.S., L.J. Thompson, J.E. Lopes, A.M. Hajjar, T.R. Kollmann, N.E. Freitag and C.B. Wilson. 2004. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell Microbiol.* 6: 235-242.
46. Weidenmaier, C., Peschel, A., 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Rev. Microbiol.* 6, 276-287.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Na mój dorobek naukowy składa się 17 publikacji naukowych w czasopismach (IF - 18,725, punkty MNISW - 330, Liczba cytowań - 81, Indeks Hirscha - 6) oraz 11 publikacji w recenzowanych materiałach konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym, a także zgłoszenie patentowe, nr P 399388. Obecnie jestem opiekunem naukowym 1 grantu NCN, kierownikiem 1 grantu NCN (międzynarodowy-niewspółfinansowany), wykonawcą 2 grantów NCN. W poprzednich latach kierowałam i/lub byłam wykonawcą 4 projektów badawczych MNISW.

Szczegółowy wykaz innych (nie wchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w pkt I Autoreferatu, Załącznik 2) opublikowanych prac naukowych oraz wskaźniki dokonań naukowych znajduje się w Załączniku nr 4

Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej znajduje się w Załączniku nr 6

Uczestniczę w badaniach dotyczących wyjaśnienia mechanizmów działania bakteriobójczego na bakterie naturalnych związków roślinnych: kwasu ursolowego i oleanolowego, czego efektem jest praca z 2010 roku (Kurek i wsp., 2010), której jestem współautorem. Badam również antybiotykooporność na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe wśród szczepów *Listeria monocytogenes* wraz z wyjaśnieniem zmian zachodzących na terenie komórki tego patogenu w obecności antybiotyków z tej grupy (Korsak i wsp., 2005; Popowska i wsp., 2006; Krawczyk-Balska i wsp., 2012).

Przedmiotem moich zainteresowań są również dwa zagadnienia związane zarówno z fizjologią bakterii jak i z szeroko rozumianym środowiskiem. Jednocześnie pragnę dodać, że realizowane przeze mnie projekty badawcze mają charakter badań podstawowych o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym.

### **1. Charakterystyka autochtonicznych szczepów bakterii zdolnych do biodegradacji aromatycznych związków nitrowych**

Celem prowadzonych badań było znalezienie wydajnego sposobu usuwania toksycznych aromatycznych związków nitrowych z gleby z wykorzystaniem wyselekcjonowanych rodzimych szczepów bakterii, za pomocą stworzonej, optymalnej w składzie, szczepionki mikrobiologicznej.

Obecnie w swojej kolekcji posiadam kilkadziesiąt różnych szczepów bakterii zdolnych do biodegradacji aromatycznych związków nitrowych jak również produktów ropopochodnych. Bakterie te są dodatkowo odporne na metale ciężkie oraz antybiotyki co czyni je idealnym narzędziem do wykorzystania w bioremediacji terenów zanieczyszczonych tymi związkami.

W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań dokonano zgłoszenia patentowego nr. P 399388\* pt.: „Kompozycja szczepów zawierająca: *Stenotrophomonas* sp. szczep 2L, *Stenotrophomonas* sp. szczep 5L, *Stenotrophomonas* sp. szczep 6L, *Stenotrophomonas* sp. szczep 3N, *Achromobacter* sp. szczep 4P, *Arthrobacter* sp. szczep 1N, *Brevundimonas* sp. szczep 2N, *Brevundimonas* sp. szczep 5N, *Brevundimonas* sp. szczep 6N, *Pseudomonas* sp. szczep 3G, *Pseudomonas* sp. szczep 4G, zdeponowana pod numerem – numer depozytu KKP 2041p., szczepionka bioremediacyjna zawierająca kompozycję szczepów, zastosowanie szczepionki bioremediacyjnej do usuwania z gleby zanieczyszczeń i sposób oczyszczania gleby, w Urzędzie Patentowym RP. Czerwiec 2012r. (Załącznik nr 8).

Szczepy bakterii wchodzące w skład szczepionki bioremediacyjnej stanowiącej przedmiot niniejszego zgłoszenia potrafią degradować/metabolizować aromatyczne związki nitrowe oraz ogólnie związki aromatyczne m.in. fenole, aminofenole, nitrofenole jak również wielopierścieniowe związki aromatyczne, które mogą stanowić dla tych mikroorganizmów jedyne źródło węgla i energii. Co więcej, szczepy zdolne są do wzrostu w obecności wysokich stężeń metali ciężkich (w przypadku gleb zanieczyszczonych nitrowymi związkami organicznymi lub ropopochodnymi, metale ciężkie również występują): As (III), Cu (II), Cr (VI), Zn (II) i Ni (II). Należy podkreślić, że w przypadku arsenu oraz chromu zastosowano formę metalu uznawaną za najbardziej toksyczną dla organizmów żywych As (III) i Cr (VI) i mimo to odnotowano wysokie wartości MIC dla badanych szczepów w porównaniu z danymi literaturowymi dla szczepu wzorcowego (Spain, 2003). Jednocześnie badane szczepy są zdolne do wzrostu w obecności wysokich stężeń antybiotyków (w przypadku bioremediacji terenów przy firmach farmaceutycznych lub terenów dodatkowo zanieczyszczonych antybiotykami lub ich metabolitami jest to bardzo istotne) z grup: makrolidy (erytromycyna), aminoglikozydy (streptomycyna), fluorochinolony (ciprofloksacyna), tetracykliny (tetracyklina), beta-laktamy (penicylina), glikopeptydy (wankomycyna).

Wynalazek może znaleźć zastosowanie na terenach skażonych, w szczególności związkami ropopochodnymi, odpadami z przemysłu tłuszczowego, olejami roślinnymi i mineralnymi oraz na terenach byłych poligonów wojskowych.

Przedmiotowe rozwiązanie stanowi naturalną metodę usuwania ze środowiska niebezpiecznych zanieczyszczeń nie wprowadzając do środowiska żadnych syntetycznych produktów. Bioremediacja *in situ* oparta jest na naturalnych zachodzących w środowisku procesach, co wiąże się ze znacznie mniejszymi kosztami niż tradycyjne metody fizyko-chemiczne. Opracowany i zdeponowany skład kompozycji/szczepionki daje możliwość szybkiego namnożenia odpowiedniej ilości preparatu i przeprowadzenie bioremediacji środowiska w krótkim czasie.

Większość związków nitro aromatycznych cechuje stabilność i trwałość w układach biologicznych oraz ich znaczna odporność na degradację (Kulkarni i Chaudhari, 2007). Dodatkowy niepokój budzi fakt, że skażenie związkami nitrowymi gruntu, stanowi również bezpośrednie zagrożenie dla wód podziemnych, a w konsekwencji może powodować przenikanie tych zanieczyszczeń do wód płynących. Problem skażenia gruntu i wód podziemnych związkami organicznymi pochodzącymi z różnych gałęzi przemysłu dotyczy nie tylko Polski i pozostałych krajów Unii Europejskiej, ale praktycznie wszystkich uprzemysłowionych krajów świata. Zarówno w Polsce, jak i na świecie problem zanieczyszczenia środowiska tymi związkami dotyczy głównie terenów położonych w pobliżu zakładów chemicznych, gdzie były one wykorzystywane jako substraty w syntezie organicznej, a także terenów baz wojskowych, gdzie były przechowywane i magazynowane.

Znanych jest kilka konwencjonalnych, fizykochemicznych metod neutralizacji związków nitrowych, m.in. utlenianie oraz fotoutlenianie, hydroliza, parowanie, spalanie, adsorpcja itd. (Kanekar i wsp., 2003). Takie metody mają jednak liczne wady i ograniczenia – spalanie nie jest ekonomicznie opłacalne i nie ekologiczne. Dodatkowo towarzyszy mu uwalnianie do środowiska znacznych ilości toksycznych oparów. Podczas takich zabiegów jak filtracja, ekstrakcja czy adsorpcja na żywicy, niepożądane związki są jedynie odseparowywane, nie prowadzi to jednak do ich zniszczenia. Procesy utleniania zaś generują powstawanie toksycznych pochodnych i wiążą się z dużymi kosztami (Kulkarni i Chaudhari, 2007).

Opracowano kilka strategii remediacji gruntów – metody fizyczne, chemiczne i biologiczne. Jednak za najtańsze i najbardziej skuteczne i bezpieczne, uważane są technologie bioremediacji wykorzystujące potencjał metaboliczny mikroorganizmów. Bioremediacja jest procesem naprawczym, w którym wykorzystuje się mikroorganizmy, takie jak bakterie, drożdże oraz grzyby strzępkowe w celu rozłożenia niebezpiecznych substancji w mniej toksyczne lub nietoksyczne związki. Dla potrzeb procesów bioremediacji, drobnoustroje izoluje się spośród mikroflory naturalnej występującej w zanieczyszczonym środowisku (reinokulacja) lub uzyskuje się metodami inżynierii genetycznej. W praktyce w procesie biodegradacji zaangażowane są wyspecjalizowane zestawy (konsorcja mikroorganizmów) wykazujące szczególne uzdolnienia do degradacji określonych grup węglowodorów. Konsorcja takie oprócz wysokiej aktywności detoksykacyjnej muszą szybko adaptować się w skażonym środowisku, współpracować z rodzimą mikroflorą oraz nie gromadzić toksycznych produktów pośrednich rozkładu.

W glebie z terenów wojskowych (m.in. poligony wojskowe) i obszarów uprzemysłowionych bardzo często notowane są wysokie koncentracje nie tylko różnorodnych ksenobiotyków organicznych ale również metali ciężkich m.in. arsenu, kadmu, chromu, miedzi, ołowiu, rtęci, niklu, cynku i innych (Bahig i Altalhi, 2009). Metale ciężkie uznawane są za silne inhibitory procesów biodegradacji ksenobiotyków organicznych (Silva i wsp., 2007). Uznaje się, że obecność metali ciężkich w ściekach przemysłowych stanowi jedno z głównych ograniczeń stosowania biologicznych metod remediacji (Kulkarni i Chaudhari, 2007). Wieloletnia obecność tych zanieczyszczeń w środowisku sprawiła jednak, że bakterie wykształciły mechanizmy detoksykacji tych związków. Ponadto, sugeruje się, że tolerancja mikroorganizmów na metale ciężkie może mieć wpływ na utrzymanie i rozprzestrzenianie wśród bakterii genów oporności na antybiotyki na skutek zwiększenia presji selekcyjnej środowiska (Spain, 2003). Istnieją również dowody na związek między opornością bakterii na wiele istotnych klinicznie klas leków przeciwbakteryjnych, metale ciężkie i czwartorzędowe związki amoniowe używane jako środki dezynfekujące. Niejednokrotnie, związane jest to z lokalizacją genów, które warunkują taką oporność, blisko siebie na tym samym plazmidzie bakteryjnym, co sugeruje możliwość

wspólnego przenoszenia całych zespołów genów drogą transferu horyzontalnego (Schluter i wsp., 2007).

### **Literatura**

1. Bahig E.D., Altalhi A.D. 2009. Degradative plasmid and heavy metal resistance plasmid naturally coexist in phenol and cyanide assimilating bacteria. *Am. J. Biochem. Biotech.* 5(2): 84-93.
2. Kanekar P., Doudpure P., Sarnaik S. 2003. Biodegradation of nitroexplosives. *Indian J. Exper. Biol.* 41: 991-1001
3. Kulkarni M., Chaudhari A. 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *J. Environ. Manag.* 85: 496-512.
4. Schluter A., Szczepanowski R., Puhler A., Top E.M. 2007. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:449-477.
5. Silva A.D.A., Pereira P.M., Filho S.G., Hofer E. 2007. Utilization of phenol in the presence of heavy metals by metal-tolerant non-fermentative gram-negative bacteria isolated from wastewater. *Microbiol.* 49: 68-73.
6. Spain A. 2003. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev. Undergrad. Res.* 2: 1-6.

### **2. Oporność na antybiotyki stosowane powszechnie w medycynie, weterynarii i rolnictwie (uprawy rolne oraz stawy hodowlane)**

Realizacja tego zadania badawczego związana jest z moim uczestnictwem w Management Committee Akcji TD0803 pt. „Detecting evolutionary hot spots of antibiotic resistances in Europe” w ramach Programu COST (European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (<http://www.cost.esf.org>) oraz z uzyskanym grantem MNISW (2010 – 2013, 741/N-COST/2010/0) międzynarodowym, niewspółfinansowanym, którego jestem kierownikiem i głównym wykonawcą, pod tytułem: „Geny oporności na antybiotyki występujące w bakteriach izolowanych ze środowisk naturalnych oraz ścieków i stawów hodowlanych – identyfikacja, rozpowszechnienie oraz zdefiniowanie nośników genetycznych warunkujących ich horyzontalny transfer”

Zastosowanie antybiotyków w terapii medycznej oraz w rolnictwie pozwoliło, przez dziesiątki lat, nie tylko na skuteczną walkę z bakteriami patogennymi, lecz także na zwiększanie biomasy roślin i zwierząt hodowlanych. Produkcja antybiotyków na skalę przemysłową i ich niekontrolowane stosowanie, spowodowało akumulację tych związków (i produktów ich przemian) w różnych środowiskach (Gootz, 2010; Knapp, 2010). W dużej mierze wynika to z dynamicznego rozwoju medycyny, weterynarii i metod hodowli roślin i zwierząt. Jako trzy główne przyczyny powstawania i rozprzestrzeniania się oporności bakterii na leki przeciwko nim skierowane, wymienia się: (i) nadmierne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków, które dokonują selekcji klonów opornych, pojawiających się w sposób naturalny w ich populacjach, (ii) przenoszenie genów oporności między różnymi gospodarzami bakteryjnymi, drogą horyzontalnego transferu genów oraz (iii)

rozprzestrzenianie się drobnoustrojów opornych za sprawą m.in. mobilności ludzi i zwierząt. Swoistym „hot spots”, będącym rezerwuarem genów opornościowych, w którym występują masowo szczepy bakterii pochodzące z różnych środowisk, są m.in. oczyszczalnie ścieków i środowiska wodne. W wodzie bakterie z różnych źródeł (medycyna, weterynaria, hodowla zwierząt, rolnictwo, ścieki) są w stanie współistnieć i w obecności antybiotyków lub innych zanieczyszczeń takich jak metale ciężkie wymieniać się genami warunkującymi oporność. Antybiotykooporność może ewoluować w wyniku stałej wymiany i rearanzacji genów znajdujących się na ruchomych elementach genetycznych takich jak plazmidy i transpozony w warunkach presji. Antybiotyki (często w niskich stężeniach), środki odkażające oraz metale ciężkie są rozpowszechnione w wodzie, gdzie mogą działać jako czynniki selektywnie wspierający rozwój nowych AR (Aminov i Mackie, 2007; Aminov, 2009; Allen i wsp., 2010).

Obecnie stosowanych klinicznie jest około 160 antybiotyków, z czego około trzy czwarte to substancje hamujące biosyntezę mureiny bakteryjnej ściany komórkowej. Wśród tej grupy zdecydowanie dominują antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. W 1996 roku w Unii Europejskiej, zużyto około 10 200 ton antybiotyków, z czego ok. 50% w weterynarii i jako stymulatory wzrostu (Kümmerer, 2009). Należy podkreślić, że np. podczas oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego, degradacji ulega jedynie 60% antybiotyków, a niektóre z nich w ogóle nie są w tym procesie rozkładane. Z danych literaturowych wiadomo (Martinez, 2009; Mayers, 2009), że oporności bakterii na antybiotyki rośnie i stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, zwłaszcza w szpitalach. Obecnie znanych jest ponad 20 tys. genów, należących do 400 różnych klas, potencjalnie kodujących oporność na antybiotyki. Istotne zatem wydaje się zbadanie w jakim stopniu środowisko służy jako reaktor rozwoju nowych oporności na antybiotyki.

Celem niniejszego projektu, realizowanego w ramach Akcji COST TD0803 pt. „Detecting evolutionary hot spots of antibiotic resistances in Europe”, jest określenie poziomu oporności na wybrane antybiotyki (makrolidy, beta-laktamy, aminoglikozydy, tetracykliny i sulfonamidy), ważne z klinicznego punktu widzenia, wśród populacji bakterii wyizolowanych z: (i) wytypowanych zakładów oczyszczalni ścieków komunalnych i przemysłowych (przemysł mleczarski i mięsny), (ii) gleby uprawnej, nawożonej nawozem naturalnym oraz (iii) rybnych stawów hodowlanych (woda i osady denne).

Realizacja poszczególnych zadań badawczych pozwoli na izolację ze środowiska oraz uzyskanie czystych kultur szczepów bakterii opornych, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii potencjalnie patogennych lub oportunistycznych wskazanych w założeniach Akcji TD0803 (*Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio* spp., *Salmonella* spp.). Uzyskane wyniki pozwolą oszacować skalę



problemu antybiotykooporności oraz wskazać zakres i kierunki horyzontalnego transferu genów w analizowanych środowiskach.

Podsumowując, wyniki uzyskane w trakcie realizacji tego projektu powinny odegrać kluczową rolę w opracowaniu raportu na temat rozpowszechnienia genów opornościowych w różnych środowiskach naszego kraju; powinny też stanowić cenną wskazówkę pomocną przy optymalizacji metod zwalczania pojawiających się zakażeń bakteryjnych, jak również przy opracowaniu i stosowaniu nowych chemioterapeutyków.

W ramach tego projektu zostały opublikowane już 2 oryginalne publikacje naukowe o łącznym IF - 7,077, szczegóły w Załączniku 5. Obecnie przygotowywane są dwie publikacje dotyczące antybiotykooporności w stawach hodowlanych. Aktualnie trwają badania określania poziomu oporności na wybrane antybiotyki, z 6 różnych grup, w próbach pobranych z oczyszczalni ścieków. Rozpoczęliśmy również analogiczne badania w naturalnych zbiornikach wody: rzeki i jeziora.

W pracy z 2010 roku (Popowska i wsp., 2010) oceniano wpływ tetracykliny i streptomycyny na mikroorganizmy w glebie z trzech różnych siedlisk: las, gleba rolna i kompostowa. Antybiotyki te są powszechnie zarówno w terapii medycznej i weterynarii, a także w produkcji biomasy roślinnej i do niedawna w produkcji biomasy zwierząt. Mikrokosmosy użyto jako system modelowy, w których m.in. była analizowana liczba mikroorganizmów w zależności od stężenia antybiotyków. Zostało ustalone również Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) tetracykliny i streptomycyna. Wartości MIC i MBC tetracykliny wobec badanych szczepów wynosiły odpowiednio od 20 do 180 µg/ml i 30 do 300 µg/ml, dla streptomycyny 360 do 500 µg/ml i 500 µg/ml. Zostały zidentyfikowane odporne szczepy bakterii, jak również określono ich fizjologiczny profil. Stwierdzono, że obecność streptomycyny i tetracykliny w glebie redukuje ilość bakterii w badanych od 50 do 80%. Zidentyfikowane bakterie okazały się bardziej odporne na streptomycynę niż tetracyklinę. Gatunki bakterii wykazujące najwyższą odporność na tetracyklinę obejmowały: *Rhizobium radiobacter*, *Burkholderia cepacia*, *Brevundimonas vesicularis* i *Pasteurella multocida*. Większość gleb o wysokim stężeniu streptomycyny (5 mg/kg), zawierała głównie *Rhizobium radiobacter*, *Burkholderia cepacia* i *Sphingomonas multivorum*. Szczepy odporne na tetracyklinę w większości przypadków były wyizolowane z gleb uprawnych, gdzie stosowano nawozy naturalne zawierające tetracyklinę. Wśród szczepów bakterii odpornych zostały zidentyfikowane patogeny oportunistyczne.

Badania zaprezentowane w pracy z 2012 (Popowska i wsp., 2012) roku pokazują różnice w poziomie oporności bakterii glebowych na erytromycynę, tetracyklinę i streptomycynę w zależności od badanej gleby. Przeanalizowano cztery naturalne gleby z różnych systemów rolniczych, oraz glebę leśną. Przy wykorzystaniu ilościowego RealTime PCR (qPCR) wykryto następujące geny oporności *tet(B)*, *aad(A)*, *str(A)* (tylko w jednej glebie uprawnej) oraz *tet(M)* i *tet(W)* wykryto we wszystkich

badanych glebach. W przypadku szczepów hodowlanych bakterii opornych najczęściej były wykrywane geny oporności na tetracyklinę: tet(B), tet(D), tet(O), tet(T) i tet(W), oporności na streptomycynę: *str(A)*, *str(B)* i *aac*, oporności na erytromycynę: *erm(C)*, *erm(V)*, *erm(X)*, *msr(A)*, *ole(B)*, i *vga*. W badanych szczepach wykryto również geny specyficzne dla transpozonów, niosących geny oporności, Tn916, Tn1549, TnB1230, Tn4451 i Tn5397. Zakresy MIC izolowanych bakterii dla tetracykliny, streptomycyny i erytromycyną wynosiły odpowiedni: 8 do > 256 µg/ml, 6 do 1024 µg/ml i 0,094 do > 256 µg/ml. Na podstawie podobieństwa zamplifikowanych PCR sekwencji genu 16S rRNA, zidentyfikowane typowe rodzaje bakterii dla tego środowiska. Bakterie z najwyższymi MIC wykryto w glebach nawożonych obornikiem lub w glebach rolniczych z udokumentowaną historią stosowania antybiotyków, gdzie znaleziono również wiele szczepów bakterii wieloopornych (ang. multidrug resistance, MDR).

### Literatura

1. Allen H.K, Donato J., Wang H.H., Cloud-Hansen K.A., Davies J. and Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8, 251-259, doi:10.1038/nrmicro2312
2. Aminov RI, Mackie RI. 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:147–216.
3. Aminov RI. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.* 11:2970–2988.
4. Gootz TD. 2010. The global problem of antibiotic resistance. *Crit. Rev. Immunol.* 30:79–93.
5. Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PA, Graham DW. 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.* 44:580–587.
6. Kümmerer K. 2008. *Pharmaceuticals in the environment: source, fate, effects and risks.* Springer, New York, NY.
7. Martinez JL. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Poll.* 157:2893–2902.
8. Mayers DL. 2009. *Antimicrobial drug resistance, vol 1. Mechanisms of drug resistance (infectious disease).* Springer, Dordrecht, The Netherlands.
9. **Popowska M.**, Miernik A., Rzczycka M., Łopaciuk A. 2010. The impact of environmental contamination with antibiotics on levels of resistance in soil bacteria. *Journal of Environmental Quality.* 39(5):1679-87.
10. **Popowska M.**, Rzczycka M., Miernik A., Krawczyk-Balska A., Walsh F., Duffy B. 2012. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(3):1434-43.

